

**HUGO JAVIER LOAIZA RÍOS**

**ESTUDO DO CORPO GORDUROSO DE *Aedes aegypti* EM DIFERENTES  
ESTÁGIOS DE DESENVOLVIMENTO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Entomologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: Gustavo Ferreira Martins

**VIÇOSA – MINAS GERAIS  
2024**

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

T

L795e  
2024

Loaiza Ríos, Hugo Javier, 1986-  
Estudo do corpo gorduroso de *Aedes aegypti* em diferentes  
estágios de desenvolvimento / Hugo Javier Loaiza Ríos. –  
Viçosa, MG, 2024.  
1 dissertação digital (40 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Gustavo Ferreira Martins.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,  
Departamento de Biologia geral, 2024.

Referências bibliográficas: f. 38-40.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2024.143>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. *Aedes aegypti* - Histologia. 2. *Aedes aegypti* -  
Morfologia. 3. Mosquito. 4. Larvas. I. Martins, Gustavo Ferreira,  
1980-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de  
Biologia geral. Programa de Pós-Graduação em Entomologia.  
III. Título.

CDD 22. ed. 595.772

**HUGO JAVIER LOAIZA RÍOS**

**ESTUDO DO CORPO GORDUROSO DE *Aedes aegypti* EM DIFERENTES  
ESTÁGIOS DE DESENVOLVIMENTO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Entomologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 29 de fevereiro de 2024.

Assentimento:

---

Hugo Javier Loaiza Rios  
Autor

---

Gustavo Ferreira Martins  
Orientador

## AGRADECIMENTOS

Primeiro, gostaria de agradecer ao laboratório de Biologia Celular e Molecular de Insetos do Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal de Viçosa pela hospitalidade e pelo conhecimento adquirido durante este processo. Este percurso foi uma verdadeira montanha-russa, repleto de desafios e conquistas, que, de alguma forma, foram fundamentais para impulsionar-me em direção aos meus objetivos.

Quero estender meu sincero agradecimento ao meu orientador, Gustavo, por compartilhar sua expertise, paciência e acolhimento em seu laboratório.

Agradeço também aos meus colegas de laboratório, em especial à Lisbetd, cuja presença constante e disposição para esclarecer dúvidas foram inestimáveis, além dos momentos de descontração compartilhados durante nossas tarefas. Obrigado, Lis, você é uma ótima pessoa.

Agradeço ao Dr. Renan, que, embora tenha sido pouco tempo, foi um colega disposto a resolver minhas dúvidas. Também sou grato aos meus colegas Maurício e Dayvson do Laboratório de Ultraestrutura Celular, assim como a tantas outras pessoas que, mesmo não mencionadas, desempenharam um papel fundamental nesse percurso.

À equipe do Núcleo de Microscopia e Análise, expresse minha gratidão pela calorosa recepção e pelo suporte essencial que possibilitou a realização das minhas análises. E aos colegas de diferentes nacionalidades que tive a honra de conhecer, aprendi o valor da amizade e compartilhei experiências acadêmicas enriquecedoras. Muito obrigado a todos.

Ao CNPq pela oportunidade de bolsa durante o mestrado.

E por fim, mas não menos importante, gostaria de agradecer à minha família pelo constante apoio, motivação e carinho, mesmo à distância. Especialmente à minha irmã Sharon, cujo apoio inabalável tem sido uma fonte constante de força e inspiração.

## RESUMO

RÍOS, Hugo Javier Loaiza, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2024. **Estudo do corpo gorduroso de *Aedes aegypti* em diferentes estágios de desenvolvimento.** Orientador: Gustavo Ferreira Martins.

O *Aedes aegypti* é um vetor eficiente de arboviroses, representando um sério problema de saúde pública em escala global. Adaptado ao ambiente urbano devido à expansão populacional, esse mosquito tem sido bem-sucedido devido à sua alta taxa de proliferação. Diante desses fatores, é crucial estudar a biologia desse inseto. O corpo gorduroso desempenha papéis essenciais na síntese e armazenamento de lipídeos, carboidratos e proteínas, sinalização hormonal, desintoxicação, imunidade e longevidade. Assim, o objetivo deste trabalho foi investigar as alterações que ocorrem no corpo gorduroso dos diferentes estágios de desenvolvimento (larva 4º instar, pupa branca, pupa 24 horas e pupa 48 horas) durante a metamorfose, pois durante esse processo, alguns tecidos e órgãos são reorganizados. Este estudo foi realizado utilizando técnicas de histologia, incluindo microscopia óptica e de varredura, bem como técnicas para a detecção de apoptose. Além disso, foram realizadas análises morfométricas para mensurar as áreas correspondentes aos enócitos grandes, núcleo de trofócitos e enócitos grandes, e gotículas lipídicas em cada estágio de desenvolvimento. Predominantemente, as células presentes nesse órgão são os trofócitos, em maior quantidade, e os enócitos, em menor proporção. Essas células estão localizadas em lóbulos envoltos por uma fina lâmina basal que se estende do tegumento aos órgãos internos. Logo após o início da fase de pupa (pupa branca) foram detectadas algumas células do órgão em apoptose. Na análise morfométrica, foram encontradas diferenças significativas na área nuclear dos trofócitos e enócitos entre as pupas de 48h e os demais estágios, assim como no tamanho das gotículas lipídicas, sendo menores nas larvas do quarto instar em comparação com os demais estágios. Por outro lado, não foram observadas diferenças significativas na área celular dos enócitos grandes entre os estágios analisados. Este estudo oferece evidências para compreender a fisiologia e morfologia do corpo gorduroso durante a metamorfose de *A. aegypti*. Esses resultados indicam que durante o processo de metamorfose, as células do corpo gorduroso sofrem alterações no nível morfológico. Este achado sugere uma remodelação do órgão durante a metamorfose, o que poderia ter implicações importantes na regulação do metabolismo e no desenvolvimento pós-embriônico do organismo.

**Palavras-chave:** Reorganização celular. Histologia. Larva. Pupa. Mosquito.

## ABSTRACT

RÍOS, Hugo Javier Loaiza, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February 2024. **Study of the fat body of *Aedes aegypti* at different stages of development.** Advisor: Gustavo Ferreira Martins.

The *Aedes aegypti* is an efficient vector of arboviruses, representing a serious public health problem on a global scale. Adapted to the urban environment due to population expansion, this mosquito has been successful due to its high rate of proliferation. Given these factors, it is crucial to study the biology of this insect. The fat body plays essential roles in the synthesis and storage of lipids, carbohydrates, and proteins, hormonal signaling, detoxification, immunity, and longevity. Thus, the aim of this work was to investigate the alterations that occur in the fat body during different stages of development (4th instar larva, white pupa, 24-hour pupa, and 48-hour pupa) during metamorphosis, as some tissues and organs are reorganized during this process. This study was conducted using histological techniques, including optical and scanning microscopy, as well as techniques for the detection of apoptosis. Additionally, morphometric analyses were performed to measure the areas corresponding to large oenocytes, trophocyte nuclei, and large oenocytes nuclei, as well as lipid droplets at each stage of development. Predominantly, the cells present in this organ are trophocytes, in greater quantity, and oenocytes, in smaller proportion. These cells are located in lobes surrounded by a thin basal lamina that extends from the tegument to the internal organs. Immediately after the onset of the pupal stage (white pupa), some cells of the organ undergoing apoptosis were detected. In the morphometric analysis, significant differences were found in the nuclear area of trophocytes and oenocytes between the 48-hour pupae and the other stages, as well as in the size of lipid droplets, which were smaller in fourth instar larvae compared to the other stages. On the other hand, no significant differences were observed in the cellular area of large oenocytes between the stages analyzed. This study provides evidence to understand the physiology and morphology of the fat body during *A. aegypti* metamorphosis. These results indicate that during the metamorphosis process, fat body cells undergo changes at the morphological level. This finding suggests an organ remodeling during metamorphosis, which could have important implications in regulating metabolism and post-embryonic organism development.

**Keywords:** Cellular reorganization. Histology. Larvae. Pupa. Mosquito.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	9
1.1. <i>Aedes aegypti</i> .....	9
1.2. Corpo gorduroso dos insetos.....	12
1.3. Modificações do corpo gorduroso durante a metamorfose.....	14
2. OBJETIVO.....	15
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	15
3.1. <i>Aedes aegypti</i> .....	15
3.2. Histologia.....	16
3.2.1. Microscopia óptica.....	16
3.3. Microscopia de varredura .....	17
3.4. Apoptose .....	17
3.4.1. Apoptose por detecção da atividade de caspase .....	17
3.4.2. Apoptose detectada por imunofluorescência .....	18
3.5. Análise morfométrica e estatística.....	18
4. RESULTADOS .....	19
4.1. Histologia.....	19
4.2. Microscopia eletrônica de varredura.....	23
4.3. Apoptose .....	28
4.4. Morfometria .....	31
5.0. DISCUSSÃO.....	34
6.0. CONCLUSÕES.....	37
7.0. REFÊRENCIAS .....	38

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. *Aedes aegypti*

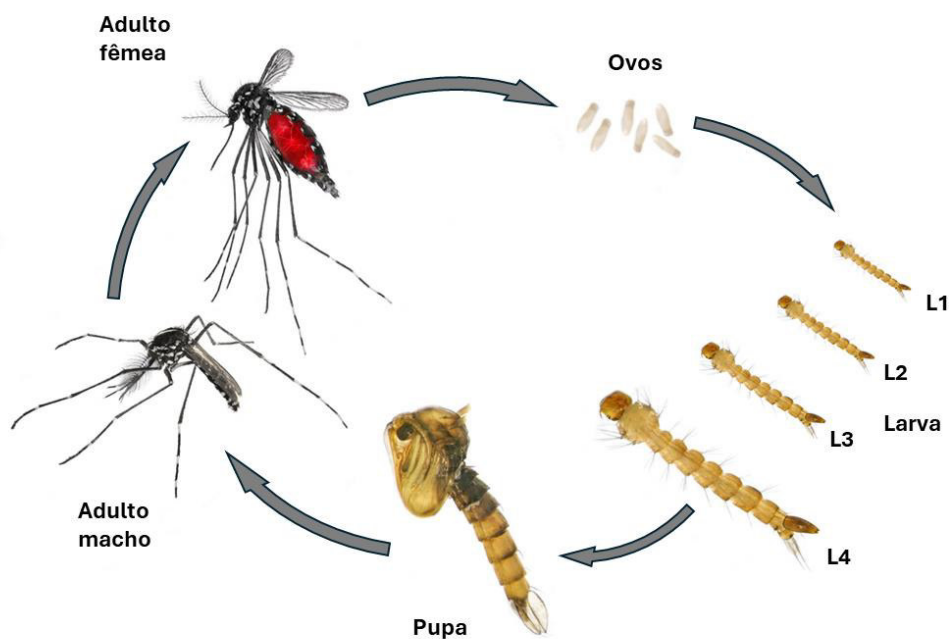
O *A. aegypti* é comumente conhecido no mundo como o “mosquito da febre amarela”, ou “mosquito da dengue” no Brasil, pertence à ordem Diptera, subordem Nematocera, família Culicidae, subfamília culicinae, tribo Aedini, gênero *Aedes*, e subgênero *Stegomyia* (CHRISTOPHERS; SR, 1960; CONSOLI, A. G. B.; LOURENÇO DE OLIVEIRA, 1994). *Aedes aegypti aegypti* é considerada uma espécie nativa da África. Lá também é possível encontrar outra subespécie conhecida como *Aedes aegypti formosus*, um mosquito selvagem cujas larvas podem ser encontradas em habitats naturais como buracos de árvores e lagos associados a ambientes florestais. As fêmeas adultas se alimentam de sangue de mamíferos não humanos. No continente americano, tem presença *A. aegypti aegypti* o qual foi transportado para América em navios durante as primeiras expedições realizadas pelos europeus (CONSOLI, A. G. B.; LOURENÇO DE OLIVEIRA, 1994; POWELL; GLORIA-SORIA; KOTSAKIOZI, 2018).

Considerada uma espécie cosmopolita devido à sua dispersão global, o *Aedes aegypti* é comumente encontrado em regiões tropicais e subtropicais. Sua presença é especialmente marcante em áreas urbanas, especialmente onde existem reservatórios artificiais de água - locais ou objetos criados por atividades humanas - que podem armazenar água e proporcionar ambientes propícios para a oviposição e a proliferação de larvas (CONSOLI, A. G. B.; LOURENÇO DE OLIVEIRA, 1994; MICHAEL J. NELSON, 1986). Na América Latina e no Caribe, as temperaturas extremas produto da mudança climática está proporcionando novos habitats favoráveis para o mosquito *A. aegypti*, permitindo a ampliação de sua distribuição geográfica, representando um desafio em termos de controle e prevenção (LAPORTA *et al.*, 2023).

A sua alta importância na saúde se deve ao fato de que o *A. aegypti* é um vetor de arbovírus causadores de doenças como febre amarela, Zika, chikungunya e dengue, esta última doença representa um dos maiores riscos para quase a metade da população mundial com um número estimado entre 100 e 400 milhões de casos da infecção anualmente. Embora muitas infecções por Dengue sejam assintomáticas ou leves, em algumas situações podem se tornar graves e até fatais (WHO, 2023). A transmissão desses arbovírus ocorre através da fêmea do mosquito, que necessita se alimentar de sangue, preferencialmente humano, para obter as

proteínas necessárias para o desenvolvimento dos ovos (CONSOLI, A. G. B.; LOURENÇO DE OLIVEIRA, 1994; POWELL; TABACHNICK, 2013). O *A. aegypti* é caracterizado como vetor eficiente e altamente antropofílico, tem a capacidade de picar mais de um hospedeiro antes de completar a ovogênese, demonstrando maior atividade no amanhecer e antes do anoitecer. (POWELL; TABACHNICK, 2013; WHO, 2023). Este mosquito desenvolve seu ciclo de vida em estreita proximidade com os seres humanos (CONSOLI, A. G. B.; LOURENÇO DE OLIVEIRA, 1994).

O ciclo de vida do *A. aegypti* compreende quatro fases de desenvolvimento: começa com os ovos, seguido pelas larvas em quatro instares distintos (L1, L2, L3, L4), passa pelas pupas e culmina com os adultos (Fig. 1). Esse ciclo ocorre em dois ambientes distintos: as larvas e pupas se desenvolvem em ambientes aquáticos temporários, enquanto os adultos são encontrados em ambientes terrestres, principalmente no peridomicílio ou dentro dos domicílios humanos, onde encontram proteção e alimento (CONSOLI, A. G. B.; LOURENÇO DE OLIVEIRA, 1994; DURDEN; MULLEN, 2019).



**Figura. 1.** Ciclo de vida do mosquito *Aedes aegypti*. Fonte: Adaptado de <https://encr.pw/H5vxu>. Acesso em 22/03/2024.

Os ovos têm aproximadamente entre 0,5 e 1 mm de comprimento, forma alongada, e coloração branca durante a postura e posteriormente se tornam pretos. Eles são depositados na lateral de recipientes preferencialmente escuros, acima do nível da água - que deve estar limpa e parada e ainda com pouca matéria orgânica (CARVALHO; MOREIRA, 2017; MICHAEL J. NELSON, 1986). O desenvolvimento embrionário se completa em dois a três dias, dependendo da temperatura (DURDEN; MULLEN, 2019). Os ovos podem suportar longos períodos de dessecação de até um ano, sendo uma forma bem sucedida de sobrevivência dessa espécie (CHRISTOPHERS; SR, 1960; CONSOLI, A. G. B.; LOURENÇO DE OLIVEIRA, 1994; MIRANDA *et al.*, 2021).

As larvas do *A. aegypti* são cilíndricas e de coloração branca, possuindo um aparelho bucal composto por cerdas que filtram parte da matéria orgânica que consomem. Seu tórax é ovoide, enquanto o abdome é composto por vários segmentos. Na parte posterior e anal, apresentam quatro expansões lobadas e uma estrutura respiratória adaptada para trocas gasosas na superfície da água, conhecida como sifão (CHRISTOPHERS; SR, 1960; DURDEN; MULLEN, 2019; MICHAEL J. NELSON, 1986). Durante o estágio larval, são formadas as reservas de nutrientes no corpo gorduroso, que serão utilizadas nos diferentes processos fisiológicos do inseto, incluindo a metamorfose. As reservas acumuladas no corpo gorduroso larval fornecem energia suficiente ao mosquito recém-emergido para voar e sobreviver aos primeiros dias de vida adulta (CONSOLI, A. G. B.; LOURENÇO DE OLIVEIRA, 1994; DURDEN; MULLEN, 2019).

A pupa apresenta forma de vírgula com a cabeça e tórax fundidos, formando o cefalotórax e o abdome curvo. No mesotórax localizado no dorso, há um par de tubos respiratórios chamados trombas, através dos quais ocorrem as trocas gasosas na superfície da água. Durante esta fase a pupa não se alimenta e pode ter uma duração entre dois a três dias até a emergência do adulto (DURDEN; MULLEN, 2019; MICHAEL J. NELSON, 1986; SERVICE, 2012).

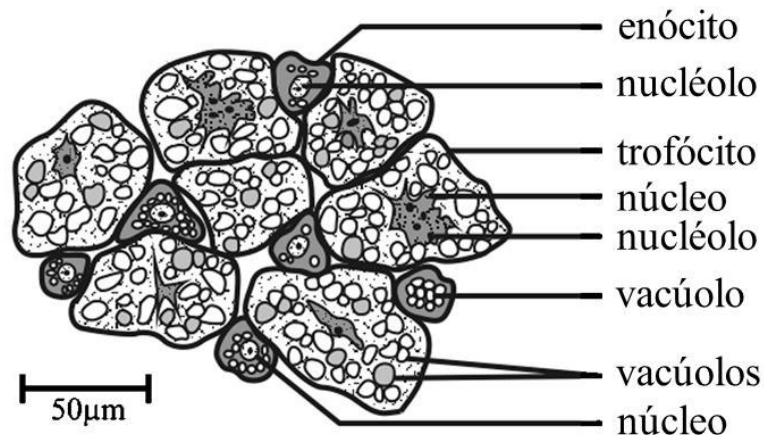
Os adultos de *A. aegypti* exibem coloração marrom ou preta, com faixas brancas nos segmentos tarsais. No mesonoto, observa-se uma mancha em forma de lira. A expectativa de vida é aproximadamente de 30 dias (GOINDIN *et al.*, 2015; MICHAEL J. NELSON, 1986). A morfologia externa possibilita a diferenciação entre os sexos: os machos apresentam antenas longas e plumosas, enquanto as fêmeas exibem antenas pilosas. Após emergirem, tanto os machos quanto as fêmeas do *A. aegypti* alimentam-se do néctar de flores e de diversas secreções açucaradas vegetais. No entanto, após a cópula, as fêmeas requerem uma fonte adicional de alimento: o sangue. Este fornece as proteínas necessárias para a síntese da vitelogenina pelo

corpo gorduroso (DURDEN; MULLEN, 2019; LI; YU; FENG, 2019). A vitelogenina, precursora do vitelo do ovo, desempenha um papel fundamental como substrato para a síntese de lipídios e glicogênio, permitindo a continuidade dos processos fisiológicos, como a ovogênese, e a sobrevivência do inseto (DURDEN; MULLEN, 2019). Essa necessidade de alimentação sanguínea pelas fêmeas é crucial para o sucesso reprodutivo e a proliferação do mosquito. Como resultado, ocorre a disseminação de doenças infecciosas, representando um desafio significativo para os sistemas de saúde.

## 1.2. Corpo gorduroso dos insetos

O corpo gorduroso, de origem mesodérmica, pode ser comparado ao tecido adiposo e ao fígado dos vertebrados, uma vez que desempenha diversas funções metabólicas no inseto e coordena processos como crescimento, metamorfose e reprodução (CHAPMAN, 2013). Além disso, está envolvido nas funções de desintoxicação e imunidade (CHAPMAN, 2013; MESCHI; DELANOUE, 2021; SNODGRASS, 1993).

O corpo gorduroso mantém contato direto com a hemolinfa, permitindo uma intensa troca de substâncias. Ele é composto por células agrupadas, formando lóbulos de diferentes tamanhos (Fig. 2). Embora seja principalmente encontrado no abdômen, também está presente em menor extensão no tórax e na cabeça. No abdômen, o órgão pode ser subdividido em duas regiões, de acordo com a localização: o corpo gorduroso parietal, que está aderido ao tegumento, e o corpo gorduroso perivisceral, que está associado aos tratos digestivo e reprodutor (CHAPMAN, 2013; SNODGRASS, 1993; TOPRAK *et al.*, 2020).



**Figura. 2.** Desenho esquemático das células do corpo gorduroso de formigas da tribo Attini. Gines de *Cyphomyrmex rimosus*. Fonte: Adaptado de Roma, *et al.*, 2010.

Em mosquitos adultos, apenas o corpo gorduroso parietal está presente, enquanto o corpo gorduroso visceral só é encontrado durante a fase larval e desaparece durante a metamorfose. Estudos demonstraram que o tipo de dieta influencia a morfologia do corpo gorduroso em fêmeas de *A. aegypti*. Fêmeas alimentadas com açúcar apresentam um aumento do corpo gorduroso devido ao acúmulo de lipídios. Por outro lado, aquelas alimentadas com sangue mostram um encolhimento desse tecido devido à expansão do intestino médio, além de um aumento nos ovários que comprimem o corpo gorduroso contra a parede corporal (Martins *et al.*, 2011b). A redução do corpo gorduroso após a ingestão de sangue também pode estar associada ao processo de vitelogênese. Após a alimentação sanguínea, o tecido adiposo passa por um processo de autofagia, que resulta em sua degradação. Além disso, há uma estreita relação entre a autofagia e a vitelogênese, uma vez que a inibição de certos genes responsáveis pela autofagia no corpo gorduroso afeta o desenvolvimento dos ovócitos. A inibição resulta em malformações e na redução no número de gametas, impactando reprodução da fêmea do *A. aegypti* (BRYANT; RAIKHEL, 2011).

O corpo gorduroso dos Díptera é composto por dois principais tipos de células (trofócitos e enócitos) que exibem variações em tamanho, forma, função e composição ao longo das várias fases de desenvolvimento do inseto (MARTINS *et al.*, 2011d; PASCINI *et al.*, 2011; TURGAY-İZZETOĞLU; GÜLMEZ, 2019). Como por exemplo, o corpo gorduroso adultos de *Anopheles darlingi*, *Culex quinquefasciatus*, *Aedes albopictus*, *Aedes fluviatilis* e *Anopheles aquasalis* é caracterizado por uma organização similar. Ele é amorfo, está localizado sob o tegumento e exibe uma distribuição heterogênea na região do abdome. É composto principalmente por trofócitos, com enócitos em menor quantidade, os quais são encontrados na periferia do órgão (MARTINS *et al.*, 2011d). Descobertas semelhantes foram feitas no corpo gorduroso de *Culex pipiens*, onde as células, trofócitos e enócitos, são encontradas sob o tegumento, embora os adultos apresentem corpo gorduroso perivisceral no final do abdome próximo aos órgãos reprodutivos (TURGAY-İZZETOĞLU; GÜLMEZ, 2019).

### 1.2.1. Trofócitos

Na maioria dos insetos, o corpo gorduroso é composto principalmente por trofócitos ou adipócitos, de origem mesodérmica. Os trofócitos desempenham um papel central no armazenamento de nutrientes, variando em quantidade conforme o estágio de desenvolvimento do inseto. São células polimórficas que possuem um núcleo irregular, e contém várias inclusões de lipídios, grânulos proteicos e glicogênio no citoplasma. Esse tipo de célula é caracterizado pela presença abundante de organelas, como o retículo endoplasmático rugoso (RER), o

aparelho de golgi, mitocôndrias, lisossomos e peroxissomos. (CHAPMAN, 2013; PAES DE OLIVEIRA; DA CRUZ LANDIM, 2003; TOPRAK *et al.*, 2020).

### 1.2.2. Enócitos

Os enócitos são células ectodérmicas que, além de serem encontradas no corpo gorduroso, estão distribuídas em vários locais do corpo, muitas vezes entre as células epidérmicas abaixo da cutícula e também agrupadas em espiráculos próximo à origem das traqueias (NATION SR., 2016). Essas células estão envolvidas na síntese e metabolismo de lipídios (MARTINS *et al.*, 2011a; NATION SR., 2016; SKOWRONEK; ŁUKASZ; STRACHECKA, 2021). Os enócitos possuem um retículo endoplasmático liso (REL) abundante, mitocôndrias, um núcleo central e vacúolos contendo gotículas e grânulos de lipídios, glicogênio e proteínas (PAES DE OLIVEIRA; DA CRUZ LANDIM, 2003; SKOWRONEK; ŁUKASZ; STRACHECKA, 2021). Além disso, os enócitos pupais estão relacionados a diversos processos fisiológicos, incluindo a desintoxicação, o metabolismo lipídico e a imunidade em *A. Aegypti* (MARTINS *et al.*, 2011a). Em *Anopheles gambiae*, essas células estão associadas à síntese de lipídios e hidrocarbonetos, essenciais para a formação da cutícula e, portanto, do exoesqueleto (GRIGORAKI *et al.*, 2020).

### 1.3. Modificações do corpo gorduroso durante a metamorfose

A metamorfose dos insetos holometábolos é regulada pelo hormônio 20-hidroxiecdisona (20E) que estimula apoptose em uma variedade de tecidos larvais (CHAPMAN, 2013). No corpo gorduroso, ocorrem alterações significativas em forma, tamanho e função durante esse processo de remodelação. Durante a metamorfose, as células do corpo gorduroso larval podem se dissociar e, posteriormente, passar por morte celular programada (PCD), resultando na formação do corpo gorduroso adulto (CHAPMAN, 2013; LARSEN, 1976; LI; YU; FENG, 2019; NELLIOT; BOND; HOSHIZAKI, 2006). No caso específico de *Calpodex ethlius* (Lepidoptera), por exemplo, durante a metamorfose, as células do corpo gorduroso larval se dissociam, permanecendo individualizadas. Posteriormente, essas células se agrupam ao redor das traqueolas, iniciando a formação de vacúolos intracelulares. Estes vacúolos autofagocitam parte das organelas celulares sem afetar sua integridade. Por fim, a partir da biogênese de novas organelas, ocorre a formação do corpo gorduroso adulto (CHAPMAN, 2013; SKOWRONEK; ŁUKASZ; STRACHECKA, 2021). Em alguns estudos realizados em *Helicoverpa armigera* e *Bombyx mori*, constatou-se que a protease catépsina L

desempenha um papel na dissociação do corpo gorduroso larval induzida pela 20-hidroxiciclodisona (LI; YU; FENG, 2019; ZHANG *et al.*, 2013).

Alguns dos trabalhos citados acima descreveram as alterações que o corpo gorduroso sofre durante a metamorfose, sendo remodelado na maioria dos casos, mas não em sua totalidade, pois células larvais dão origem a esse órgão nos adultos. No entanto, ainda há lacunas no conhecimento sobre as alterações e organização das células do corpo gorduroso de *A. aegypti* ao longo do seu desenvolvimento. Assim, este estudo teve como propósito examinar as mudanças morfológicas do corpo gorduroso durante a metamorfose de *A. aegypti*, empregando técnicas de histologia e técnicas para a detecção de apoptose. Dada a relevância desse mosquito na saúde pública, nossos resultados podem ser fundamentais para compreender o desenvolvimento e as mudanças ao nível celular, fornecendo informações importantes sobre sua biologia e ciclo de vida.

## **2. OBJETIVO**

Investigar as alterações morfológicas do corpo gorduroso durante a metamorfose de *A. aegypti*.

## **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

### ***3.1. Aedes aegypti***

Larvas de 4º instar (L4) e pupa de diferentes idades (pupa branca, pupa 24h e pupa 48h. (Fig. 3)) de *A. aegypti* (linhagem PPCampos, Campos dos Goytacazes, RJ) foram obtidas da colônia mantida no insetário do Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal de Viçosa (MG). As larvas foram mantidas em bandejas plásticas contendo água deionizada e foram alimentadas com ração para tartarugas (Reptolife®, Alcon Pet 596 Ltda, Camboriú, SC, Brasil). As condições ambientais foram mantidas controladas, com temperatura em torno de  $28 \pm 2$  °C, umidade relativa de 50-60%, e com fotoperíodo de 12h.



**Figura. 3.** Estágios do desenvolvimento de *Aedes aegypti*. (A) Larva 4<sup>o</sup> instar. (B) Pupa branca. (C) Pupa 24 horas. (D) Pupa 48 horas.

## 3.2. Histologia

### 3.2.1. Microscopia óptica

Os mosquitos foram dissecados sob um microscópio estereoscópico (Zeiss Stemi 2000C), em solução salina tamponada com fosfato PBS (0.1 M, NaCl, 20 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, e 20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; pH 7.6). Para este estudo, foram utilizadas 20 larvas do 4<sup>o</sup> instar (L4), que representam o estágio final antes da metamorfose, bem como 20 pupas fêmeas na cor branca (PB), obtidas imediatamente após a ecdise do L4, e 20 pupas fêmeas de 24 e 48 horas após a ecdise (cor preta) (P24 e P48, respectivamente). Considerando que a maior parte do corpo gorduroso está localizada na região abdominal, procedeu-se à separação do abdome da cabeça e tórax (larva) e cefalotórax (pupa). Posteriormente, realizou-se um corte transversal no último segmento abdominal para extrair e descartar as vísceras. As carcaças contendo o corpo gorduroso parietal abdominal foram fixadas em Zamboni (paraformaldeído a 2% contendo 15% de ácido pícrico em tampão fosfato de sódio a 0,1 M, Stefanini M., De Martino C. & Zamboni L. 1967) para preservação adequada das estruturas.

As amostras foram submetidas a uma série de etapas de preparação, começando com a lavagem em água destilada, seguida pela desidratação em solução crescente de etanol (30%, 50%, 70%, 90% e 100%). Em seguida, as amostras foram incluídas em historesina (Leica Microsystems, Heidelberg Mannheim, Alemanha). Após a inclusão, foram realizados cortes de 5 µm de espessura em um micrótomo (Leica Reichert-Jung 2050 Super Cut). Os cortes foram corados com Hematoxilina e Eosina (HE) e posteriormente analisados e fotografados em um microscópio de luz Olympus BX53 conectado a uma câmera digital DP 73 (Olympus Optical Co., Tóquio, Japão).

### **3.3. Microscopia de varredura**

As carcaças contendo o corpo gorduroso de L4, PB, P24 e P48 foram fixadas em glutaraldeído a 2,5%. Em seguida, as amostras foram lavadas duas vezes em PBS por 10 minutos cada, desidratadas em uma série de concentrações crescentes de etanol (30-100%) e, posteriormente, secas em um aparelho de ponto crítico Balzers CPD 030. Após a secagem, as amostras foram abertas com alfinetes entomológicos para expor o corpo gorduroso e montadas em suportes adequados. Em seguida, foram metalizadas com ouro e fotografadas utilizando o microscópio eletrônico de varredura LEO 1430VP do Núcleo de Microscopia e Microanálise (NMM). Foram utilizados oito indivíduos para cada idade, incluindo fêmeas adultas (30 minutos depois da ecdise).

### **3.4. Apoptose**

Para a identificação de células em apoptose, foram utilizadas duas técnicas distintas: a detecção da atividade da enzima caspase e a marcação com anticorpos.

#### **3.4.1. Apoptose por detecção da atividade de caspase**

Com o objetivo de identificar células em processo de apoptose, larvas L4, e pupas PB, P24 e P48) foram dissecadas em solução salina tamponada com fosfato (0,1 M PBS), pH 7,2. As carcaças, contendo o corpo gorduroso de cada estágio, foram então incubadas no reagente CellEvent™ Caspase-3/7 (1:350, Invitrogen) por 30 minutos, em um ambiente escuro para evitar a fotodegradação. Em seguida, as amostras foram fixadas em paraformaldeído a 4% por 30 minutos e submetidas a três lavagens em PBS, cada uma com duração de cinco minutos. Por fim, as amostras foram montadas em lâminas de vidro utilizando solução antidesvaneamento

Mowiol (Sigma-Aldrich Brasil Ltda, São Paulo, SP). As amostras montadas foram fotografadas no microscópio confocal Zeiss LSM510 META do Núcleo de Microscopia e Microanálise (NMM) da UFV. Como controle negativo, os corpos gordurosos dos diferentes estágios foram preparados da mesma forma, mas sem a inclusão do reagente CellEvent™ Caspase-3/7. Este procedimento permitiu a comparação entre os resultados obtidos com o grupo experimental e o controle, garantindo a confiabilidade dos dados.

### **3.4.2. Apoptose detectada por imunofluorescência**

Carcaças com o corpo gorduroso de L4, PB, P24 e P48 foram fixadas em Zamboni durante duas horas. Amostras foram lavadas em PBS e incubadas com PBST (Tween™ 20 1% em PBS) durante 30 minutos por três vezes. Em seguida, as amostras foram incubadas *overnight* com o anticorpo primário diluído em PBS: anticaspase-3 (clivada) *rabbit* (1: 100, Cell Signalling Technology, Beverly, MA, EUA).

No dia seguinte, as amostras foram lavadas e em seguida submetidas à incubação com o anticorpo secundário IgG FITC (1:200, Sigma), em condições cuidadosamente controladas de câmara úmida, sob total ausência de luz. No terceiro dia de processamento, as amostras passaram por uma nova etapa de lavagem antes de serem incubadas com DAPI (Biotium, Inc., Hayward, CA, EUA) por 30 minutos, para a marcação do núcleo celular. Após esta etapa, as amostras foram lavadas por três vezes e então montadas em lâminas utilizando solução Mowiol (Sigma-Aldrich Brasil Ltda, São Paulo, SP), para serem cuidadosamente fotografadas sob o microscópio de epifluorescência Olympus BX60. Para garantir a validade dos resultados, foram incluídos controles positivos, consistindo em três intestinos médios de pupa branca (PB) - uma fase conhecida pela ocorrência de apoptose, conforme descrito no item 3.3 - enquanto o controle negativo foi conduzido de acordo com as especificações do item 3.3.1, sem usar DAPI.

### **3.5. Análise morfométrica e estatística**

Para determinar a densidade dos trofócitos e dos enócitos grandes por estágio (L4, PB, P24 e P48), foram utilizadas fotomicrografias de três indivíduos por estágio, com uma área de 3000  $\mu\text{m}^2$ , e a análise foi realizada utilizando o software ImageJ 1.54g. Da mesma forma, as medições da área celular e nuclear dos enócitos grandes ( $n = 36$ ), área do núcleo dos trofócitos ( $n = 39$ ) e das gotículas lipídicas ( $n = 60$ ) por estágio (L4, PB, P24 e P48) foram tomadas utilizando o software ImageJ 1.54g.

Todas as análises estatísticas foram realizadas no software R (R Core Team, 2022) com interface de desenvolvimento integrada (IDE) do RStudio (Posit team, 2023). Área celular dos enócitos grandes, área nuclear dos enócitos grandes, área da gotícula lipídica e área nuclear dos trofócitos foram submetidas a modelos lineares generalizados com a família de distribuição gama para os erros. Os estádios imaturos dos mosquitos foram considerados como efeitos fixos nos modelos. Os ajustes dos modelos foram realizados através da função `glm()` do pacote “lme4” (Bates et al., 2015). A adequabilidade dos modelos foi verificada através da inspeção visual dos resíduos utilizando o pacote “ggResidpanel” (Goode & Rey, 2019). Pontos influentes foram identificados e os modelos foram reajustados após a retirada deles. Em seguida, a análise de variância tipo II foi realizada usando o pacote “car” (Fox & Weisberg, 2019) a 5% de significância e, quando necessário, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância utilizando o pacote “multcomp” (Hothorn et al., 2008).

## 4. RESULTADOS

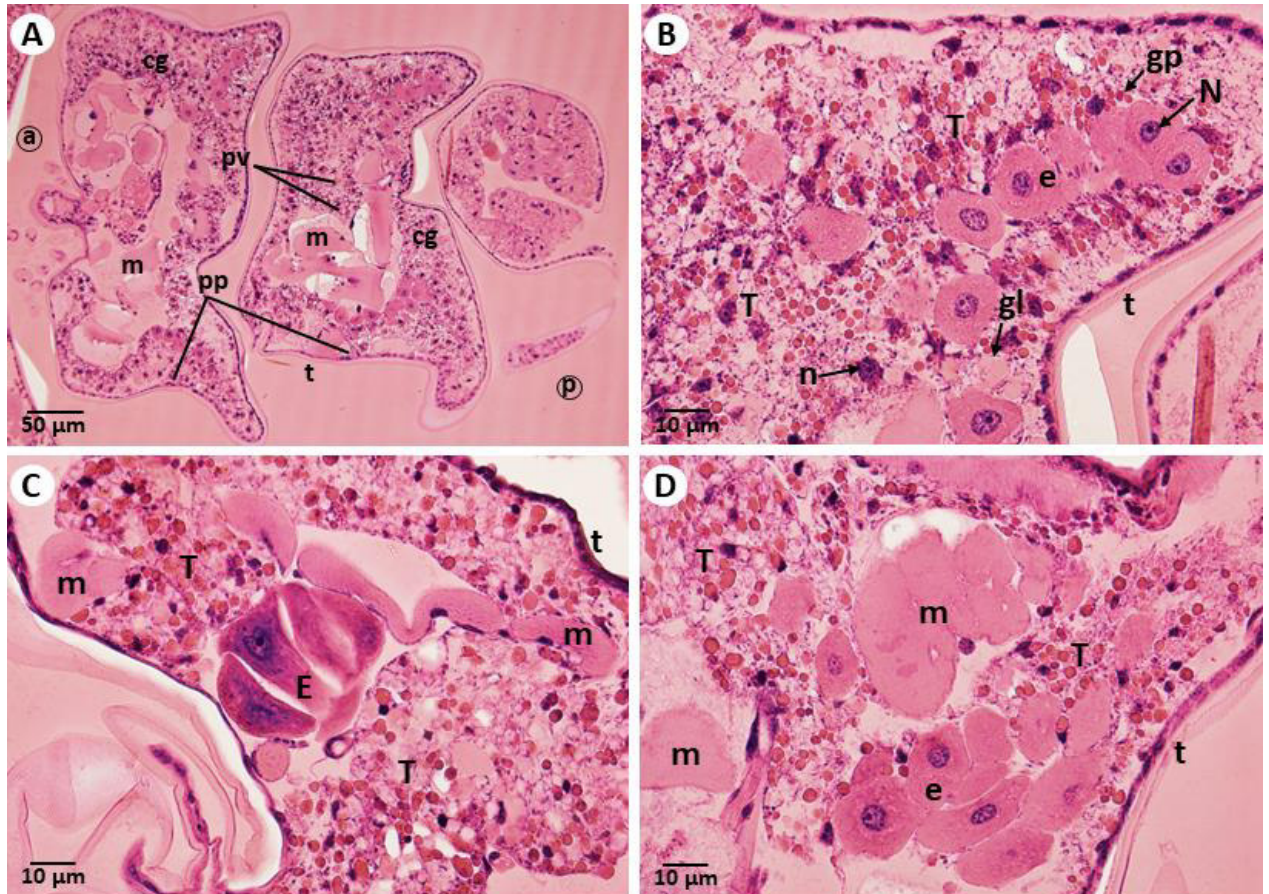
### 4.1. Histologia

As análises histológicas foram realizadas considerando a região do abdômen, em quatro estágios diferentes do *A. aegypti*, sendo estes L4, PB, P24 e P48. Os principais tipos celulares observados no corpo gorduroso, tanto na larva quanto na pupa, foram os trofócitos e enócitos. O corpo gorduroso está localizado em cada segmento abdominal e apresenta duas regiões distintas: a região parietal, próxima ao tegumento e perivisceral, em contato com as vísceras (Fig. 1A). As principais células do órgão são os trofócitos que exibem um núcleo pleomórfico com nucléolo bem desenvolvido, e no citoplasma, podem ser observadas gotículas lipídicas (Fig. 1B). Associados aos trofócitos, os enócitos formam grupos de poucas células e podem ser divididos em dois grupos, de acordo com o tamanho, sendo eles enócitos grandes ou pequenos, os quais são encontrados nos estágios L4, PB, P24 e P48. Os enócitos grandes apresentam uma forma irregular e núcleo muito desenvolvido. Os enócitos pequenos são ovoides, com núcleo central bem desenvolvido e com nucléolo proeminente, localizados próximos da epiderme da porção parietal do órgão (Fig. 1C-D). A estrutura do corpo gorduroso apresentou semelhanças em todas as fases do ciclo de vida dos mosquitos e será descrita nos próximos subtópicos.

O número dos trofócitos em L4 foi maior (19 células x 3000  $\mu\text{m}^2$ ), em comparação com PB (15 células x 3000  $\mu\text{m}^2$ ), P24 (7 células x 3000  $\mu\text{m}^2$ ) e P48 (16 x 3000  $\mu\text{m}^2$  células), as quais exibiram uma menor densidade de trofócitos por área. Por outro lado, o número de enócitos em

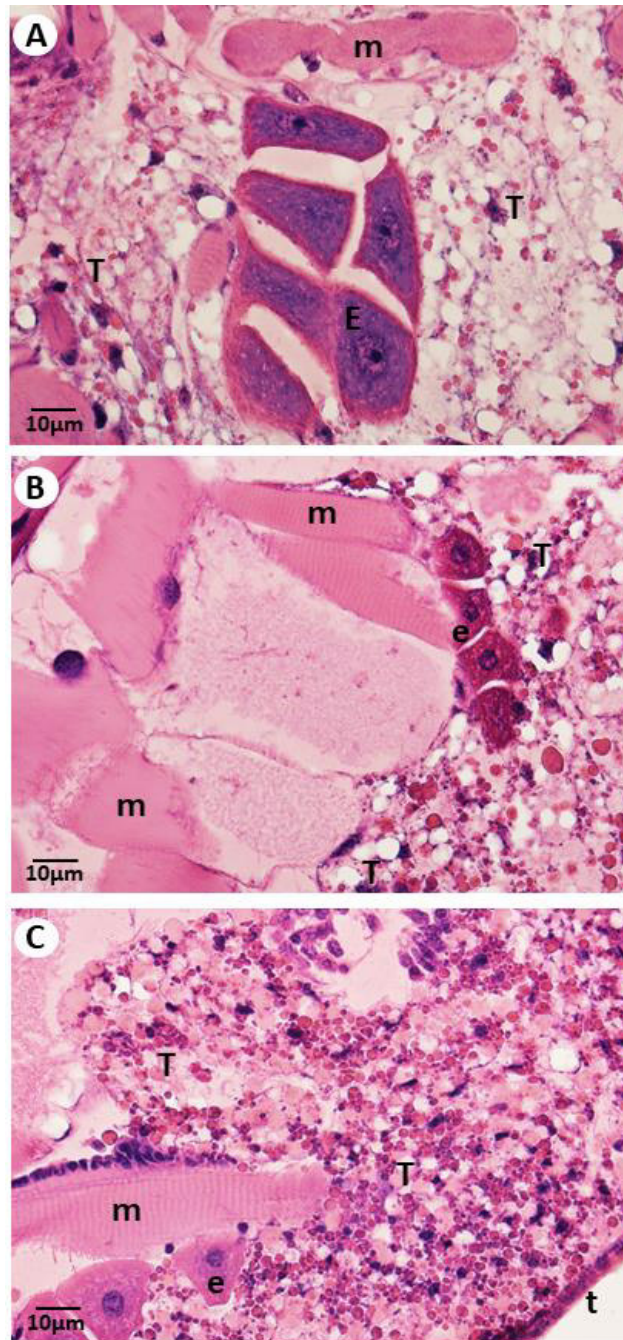
cada estágio de desenvolvimento foi similar, na L4 (3 células x 3000  $\mu\text{m}^2$ ), PB (4 células x 3000  $\mu\text{m}^2$ ), P24 (4 células x 3000  $\mu\text{m}^2$ ) e P48 (4 células x 3000  $\mu\text{m}^2$ ).

Em L4, os enócitos grandes possuem  $366 \pm 92,10 \mu\text{m}^2$  (Fig. 1C) e os pequenos possuem  $151,9 \pm 36,79 \mu\text{m}^2$  (Fig. 1D).

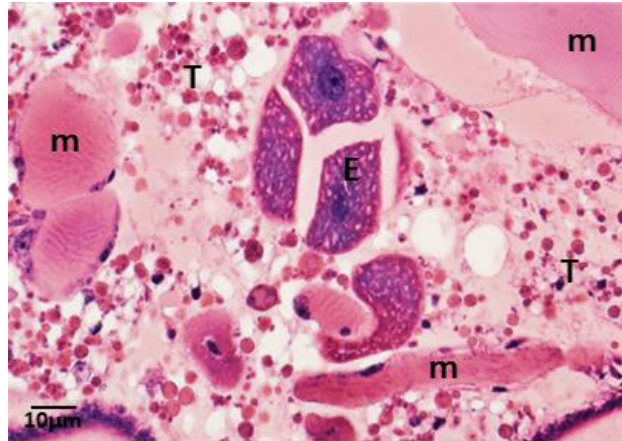


**Figura. 4.** Secções histológicas do corpo gorduroso do abdômen de L4 de *Aedes aegypti* HE. **A** – Porção parietal (pp) do corpo gorduroso (cg) próximo ao tegumento (t) e a porção perivisceral (pv). Região anterior (a) e posterior (p). **B** – Núcleos dos trofócitos (n) e enócitos (N) além de algumas gotículas lipídicas (gl) e grânulos de proteínas (gp). **C** – Enócitos grandes (E) agrupados entre trofócitos (T) e próximos a músculos intersegmentais (m). **D** – Grupo de enócitos pequenos (e) ao interior do corpo gorduroso.

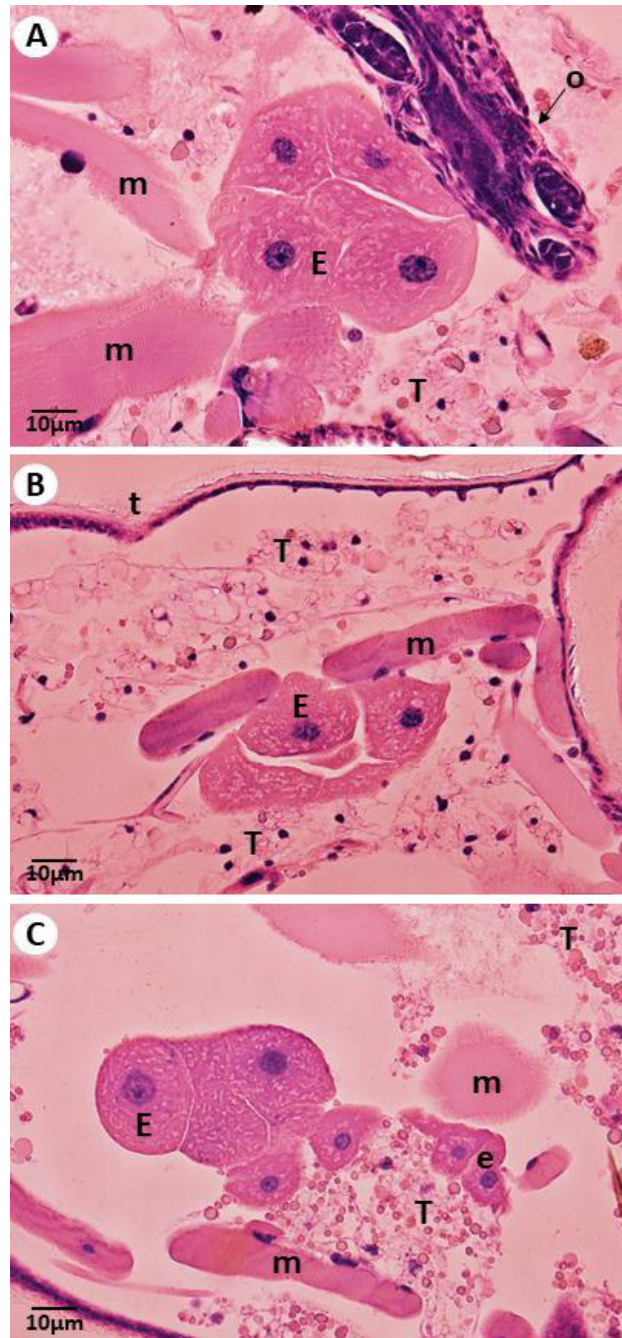
Na PB, os enócitos grandes possuem  $423,3 \pm 116,64 \mu\text{m}^2$  e os pequenos possuem  $160,4 \pm 44,59 \mu\text{m}^2$  (Fig. 2).



**Figura. 5.** Secções histológicas do corpo gorduroso da região do abdômen da PB de *Aedes aegypti* HE. **A** – Enócitos grandes (E) agrupados com até 6 células rodeados por trofócitos (T). **B e C** – Enócitos pequenos (e) próximos a músculos intersegmentais (m) e ao tegumento (t).



**Figura. 6.** Secção histológica do corpo gorduroso da região do abdômen da P24 de *Aedes aegypti* HE, mostrando alguns aspectos gerais e outros detalhados. Enócitos grandes (E) cercados por trofócitos (T) próximos ao tegumento (t) e alguns músculos intersegmentais (m).

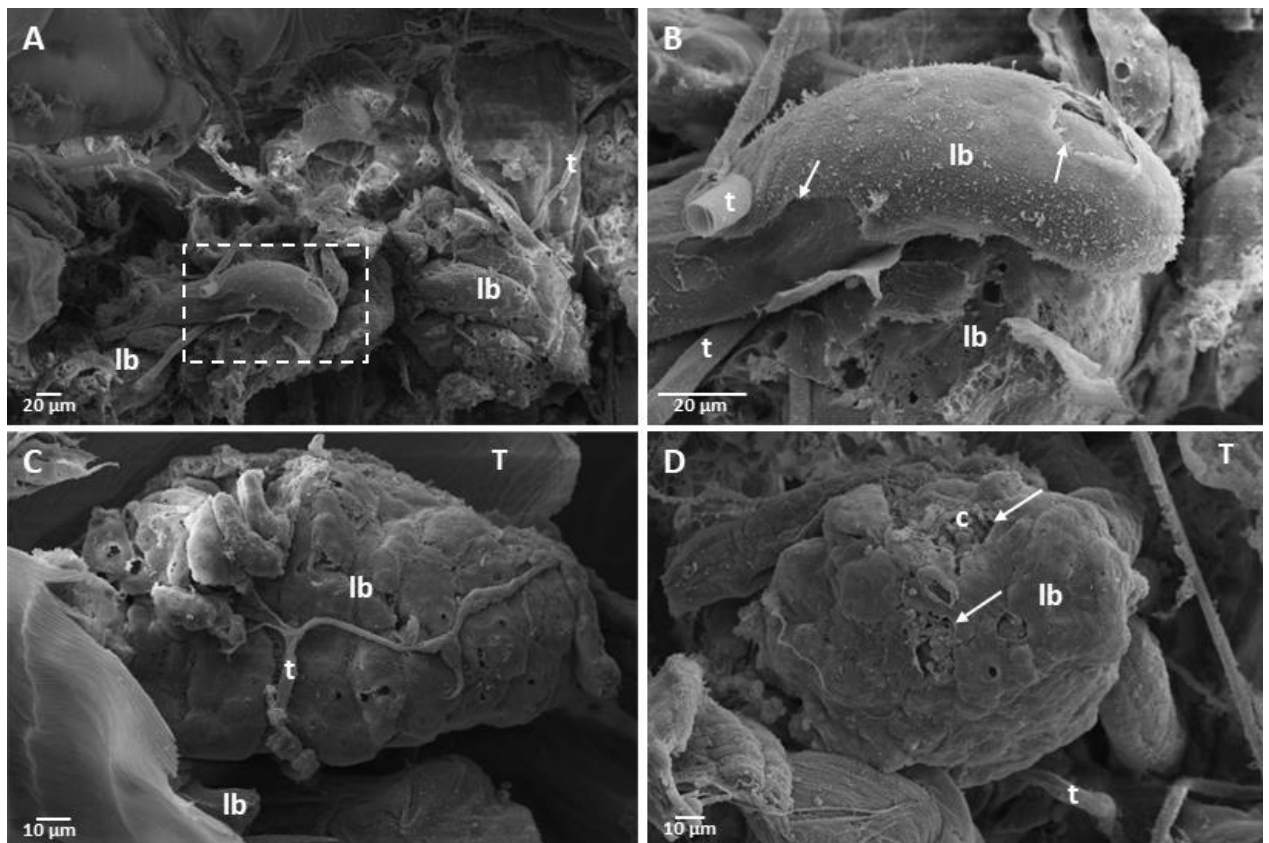


**Figura. 7.** Secções histológicas do corpo gorduroso da região do abdômen da P48 de *Aedes aegypti* HE. **A** – Alguns enócitos grandes (E) são encontrados próximos aos ovários (o) e músculos (m). **B** – Na P48 os trofócitos (T) apresentam núcleo (n) reduzido. **C** – Tanto enócitos grandes (E) quanto pequenos (e) estão entre os trofócitos (T).

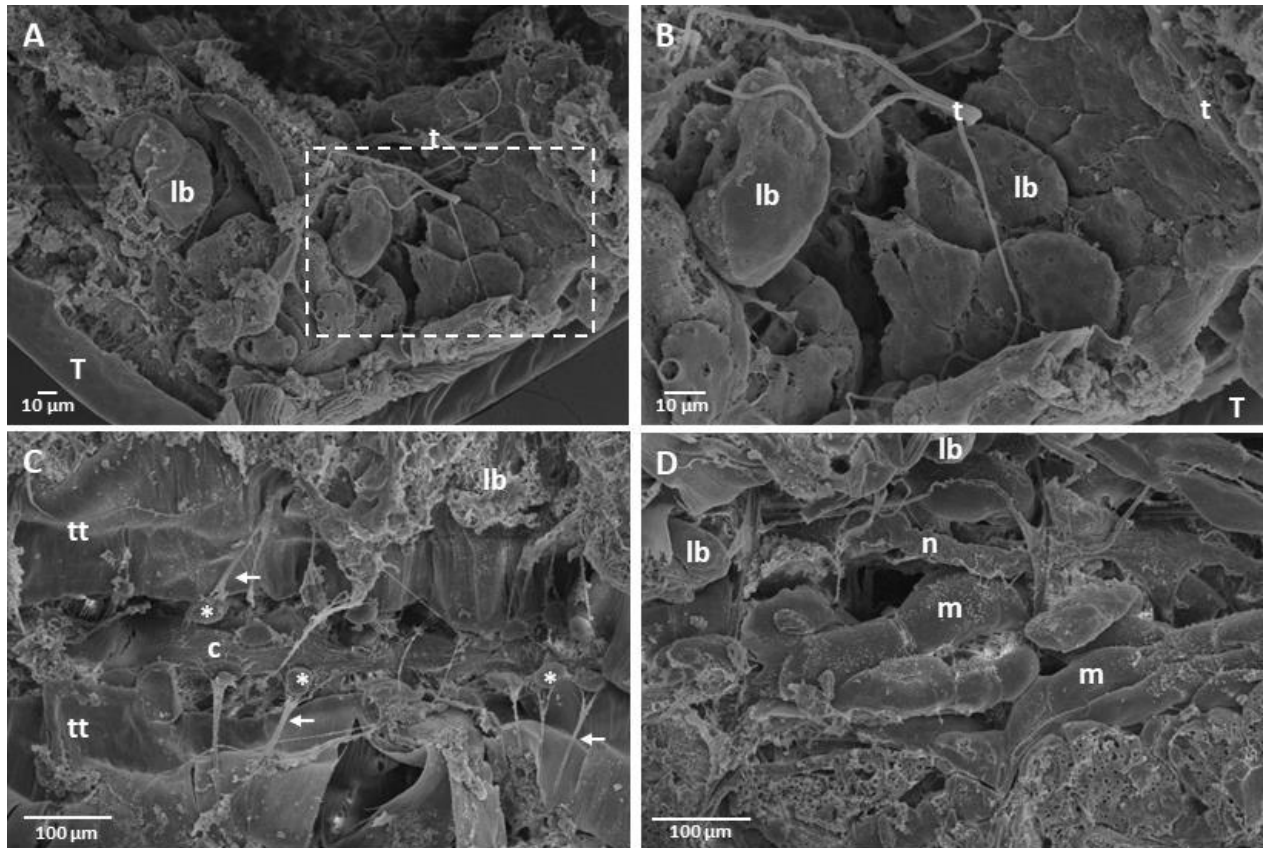
#### 4.2. Microscopia eletrônica de varredura

As fotografias do corpo gorduroso de *A. aegypti* revelaram que este órgão possui porções que formam protuberâncias ou lóbulos de diferentes tamanhos, os quais são estendidos

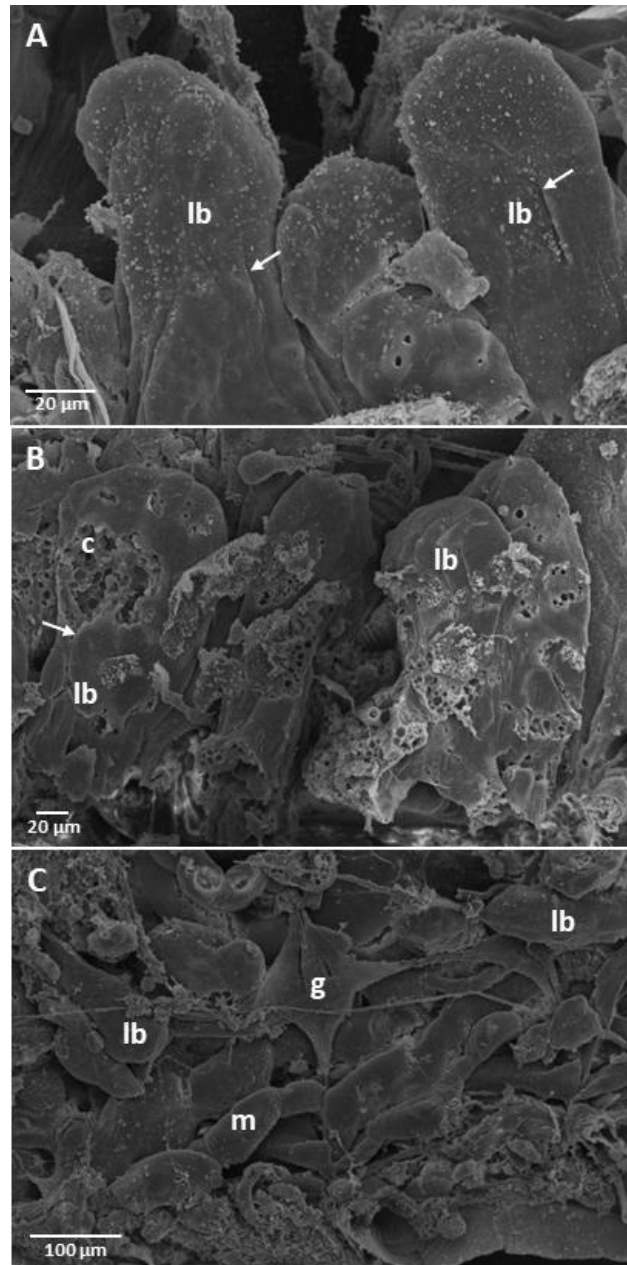
do tegumento ao interior da cavidade corpórea. Esses lóbulos foram encontrados na região dorsal, ventral e lateral da cavidade abdominal. Eles estão cobertos por uma lâmina basal com uma superfície rugosa, e as células do órgão estão contidas em seu interior. Além disso, foi identificada uma estreita relação entre os lóbulos e as traqueias, sendo que alguns lóbulos estão sobre elas e outros são atravessados por essas traqueias. Essas observações foram feitas em cada estágio de desenvolvimento analisado.



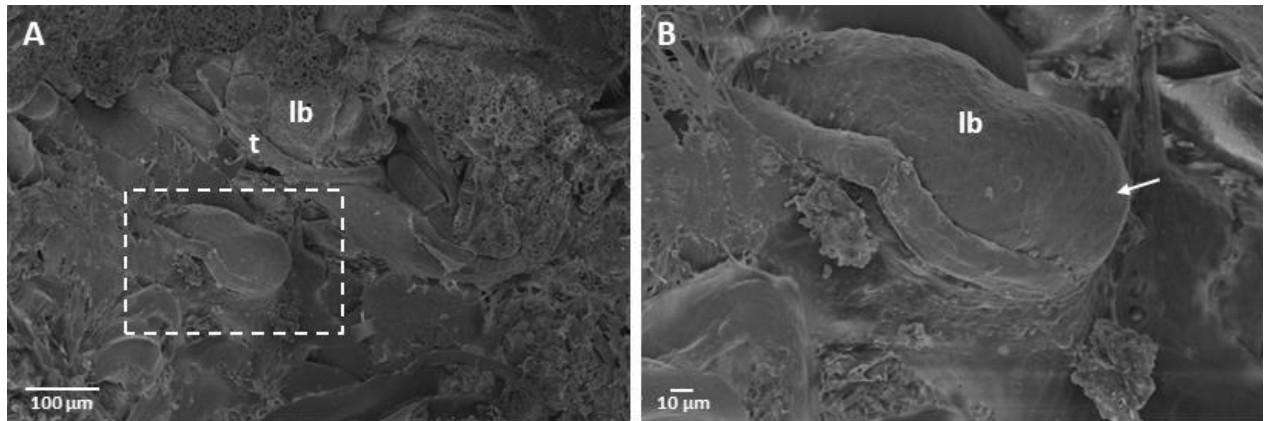
**Figura. 8.** Microscopia eletrônica de varredura do corpo gorduroso abdominal da L4 de *Aedes aegypti*. **A** – Lóbulos (lb) do corpo gorduroso aderidos ao tegumento. **B** – Detalhe mostrando o lóbulo (lb) lateral delimitado por uma membrana basal (seta) e atravessado por uma traqueia (t). **C** – Lóbulo dorsal (lb) mais desenvolvido e coberto por algumas traqueias (t) próximo ao tegumento (T). **D** – Lóbulo ventral (lb) com a lâmina basal rompida (seta) com células expostas (c), ademais da associação com as traqueias (t) e localizado próximo ao tegumento (t).



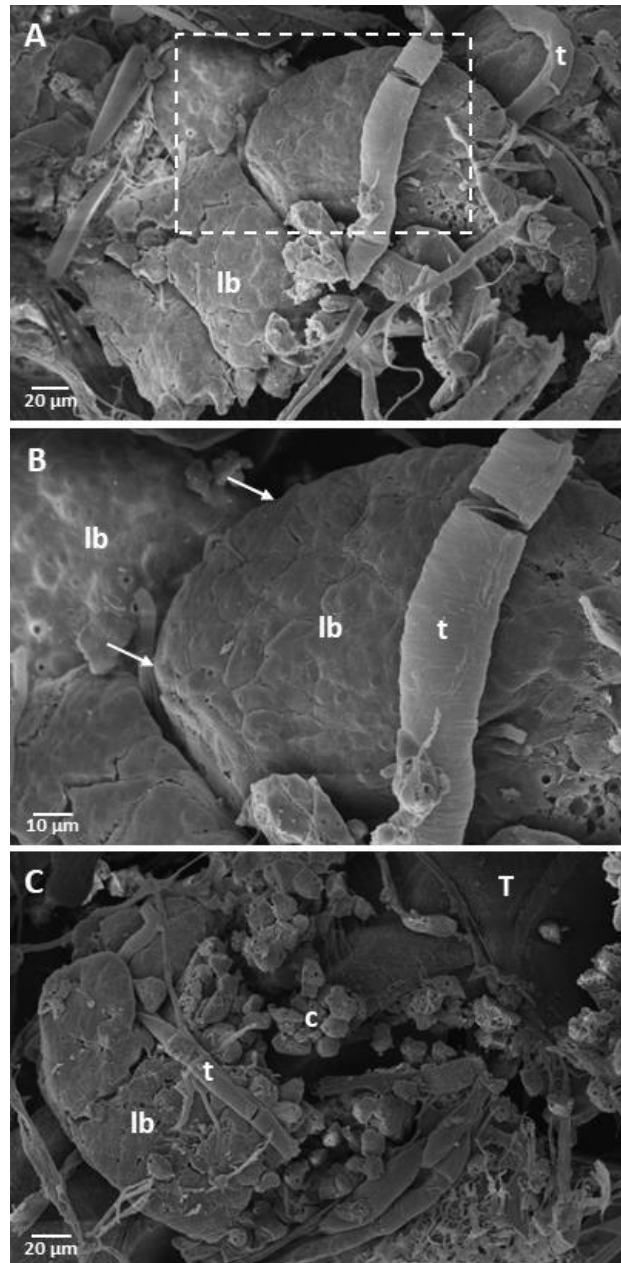
**Figura. 9.** Microscopia eletrônica de varredura do corpo gorduroso abdominal de PB de *Aedes aegypti*. **A** – Superfície interna do tegumento (T) onde é possível observar lóbulos (lb) do corpo gorduroso. **B** – Detalhe de lóbulos laterais (lb) adjuntos a algumas traqueias (t). **C** – Na região dorsal com o tubo dorsal ou coração (c), entre dois troncos traqueais (tt). Células pericardiais (\*); músculos alares (setas) associados aos lóbulos (lb). **D** – Região ventral mostrando alguns músculos (m), o sistema nervoso (n) próximos a alguns lóbulos (lb).



**Figura. 10.** Microscopia eletrônica de varredura do corpo gorduroso abdominal de P24 de *Aedes aegypti*. **A** – Lóbulos laterais (lb) com lâmina basal enrugada (seta). **B** – Lóbulos laterais (lb) apresentam a lâmina basal (seta) rompida, permitindo que as células do corpo gorduroso (c) sejam expostas. **C** – Lóbulos (lb) de corpo gorduroso próximos ao gânglio associados ao sistema nervoso (n) e extensões de músculos (m).



**Figura. 11.** Microscopia eletrônica de varredura do corpo gorduroso abdominal de P48 de *Aedes aegypti*. **A** – Visão geral da superfície interna do abdome com um lóbulo em destaque. **B**. Detalhe do lóbulo (lb) cuja superfície da lâmina basal apresenta protuberâncias das células do corpo gorduroso (seta).

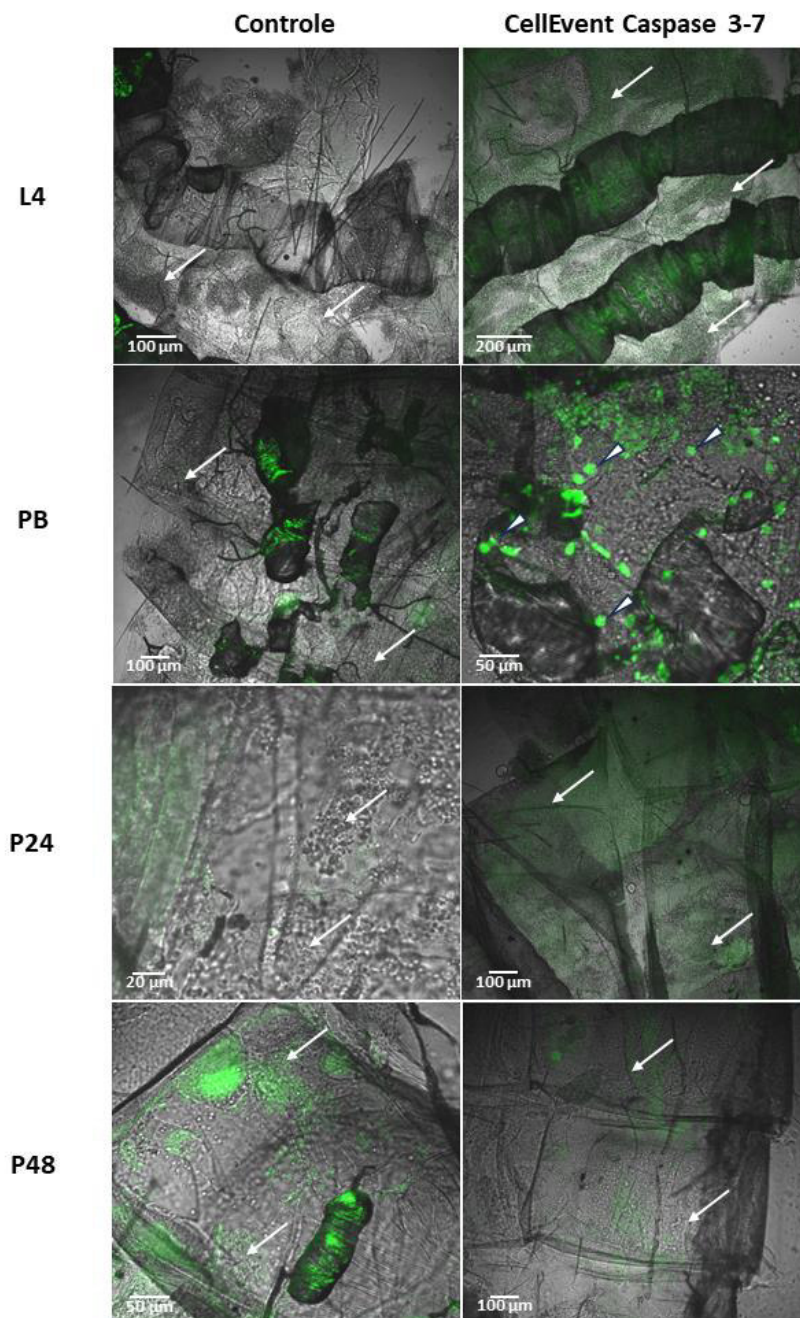


**Figura. 12.** Microscopia eletrônica de varredura do corpo gorduroso abdominal de fêmea adulta recém-emergida de *Aedes aegypti*. **A** – Lóbulos (lb) do corpo gorduroso. **B** – Lóbulo globular (lb) cuja membrana basal (seta) apresenta proeminências que correspondem às células do corpo gorduroso, coberto por traqueias (t). **C** – Lóbulos laterais (lb) com lâmina basal rompida expondo algumas células do corpo gorduroso (c) próximos ao tegumento (T).

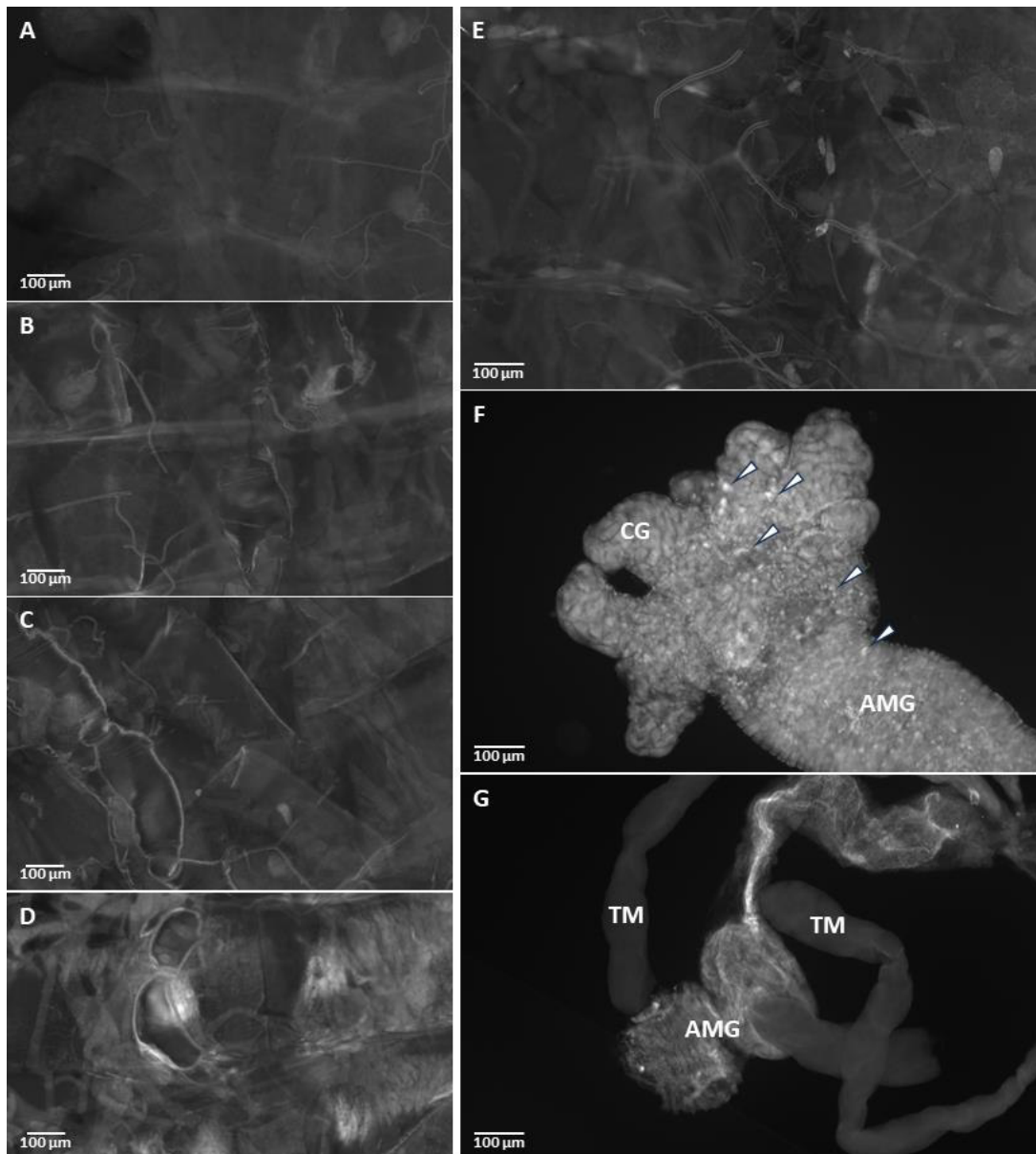
### 4.3. Apoptose

Células em apoptose foram detectadas exclusivamente na PB (Fig. 10, painel direito). Além disso, se identificou a presença de autofluorescência, incluindo em traqueias, no tratamento controle em PB, P24 e P48 (Fig. 10, painel esquerdo). Não foram detectadas

células positivas para caspase-3 no corpo gorduroso em todos os estágios analisados (Fig. 11A-E).



**Figura. 13.** Microscopia confocal do corpo gorduroso abdominal de diferentes estágios de desenvolvimento de *A. aegypti* incluindo L4 (Larva 4<sup>o</sup> instar), PB (pupa branca), P24 (pupa 24 horas) e P48 (pupa 48 horas). Controle negativo (não tratados - painel da esquerda). Tratados com CellEvent – Caspase 3/7 (painel da direita). Corpo gorduroso (seta); células do corpo gorduroso positivas (ponta da seta). Nota: Algumas estruturas possuem autofluorescência verde, como pode ser visto em algumas amostras (painel da esquerda).



**Figura. 14.** Microscopia de fluorescência do corpo gorduroso abdominal de *Aedes aegypti* testados para anticorpo primário anticaspase-3. **A** – Corpo gorduroso de larvas de 4<sup>o</sup> instar. **B** – Corpo gorduroso de pupa branca. **C** – Corpo gorduroso de pupa 24 horas. **D** – Corpo gorduroso de pupa 48 horas. **E** – Corpo gorduroso de fêmea adulta. **F** – Intestino médio (AMG) de pupa branca contendo células positivas (cabeças de setas). Ceco gástrico (CG); (AMG); células em apoptose (pontas de setas). **G** – Controle negativo – Intestino médio de pupa branca (AMG) e túbulos de Malpighi (TM).

#### 4.4. Morfometria

Não há diferença significativa na área dos enócitos grandes entre os diferentes estágios ( $\chi^2 = 0,80$ ;  $df = 3$ ;  $p = 0.85$ ; Fig. 15A). Por outro lado, a área nuclear dos enócitos grandes varia

dependendo dos estágios de desenvolvimento ( $\chi^2 = 8,79$ ;  $df = 3$ ;  $p = 0.03$ ; Fig. 15B), sendo menor em L4 em comparação a PB.

**Tabela 1** – Área celular ( $\mu\text{m}^2$ ) dos enócitos grandes de diferentes estágios de *Aedes aegypti*.

Fêmeas (n = 3) (média $\pm$ desvio padrão)			
Larva 4° instar	Pupa branca	Pupa 24 h	Pupa 48 h
243,1 $\pm$ 124,99 (n =36)	268,5 $\pm$ 183,38 (n =36)	268,5 $\pm$ 130,65 (n =36)	275,9 $\pm$ 265,29 (n =36)

A área das gotículas dos lipídeos é diferente entre os estágios, sendo menor em L4 do que em outros estágios. ( $\chi^2 = 112,10$ ;  $df = 3$ ;  $p = < 0,001$ ; Fig. 15C).

**Tabela 2** – Área da gotícula lipídica ( $\mu\text{m}^2$ ) de *Aedes aegypti* em diferentes estágios.

Fêmeas (n = 3) (média $\pm$ desvio padrão)			
Larva 4° instar	Pupa branca	Pupa 24 h	Pupa 48 h
8,929 $\pm$ 3,841 <sup>b</sup> (n =60)	16,74 $\pm$ 8,453 <sup>a</sup> (n =60)	15,81 $\pm$ 5,560 <sup>a</sup> (n =60)	18,94 $\pm$ 6,518 <sup>a</sup> (n =60)

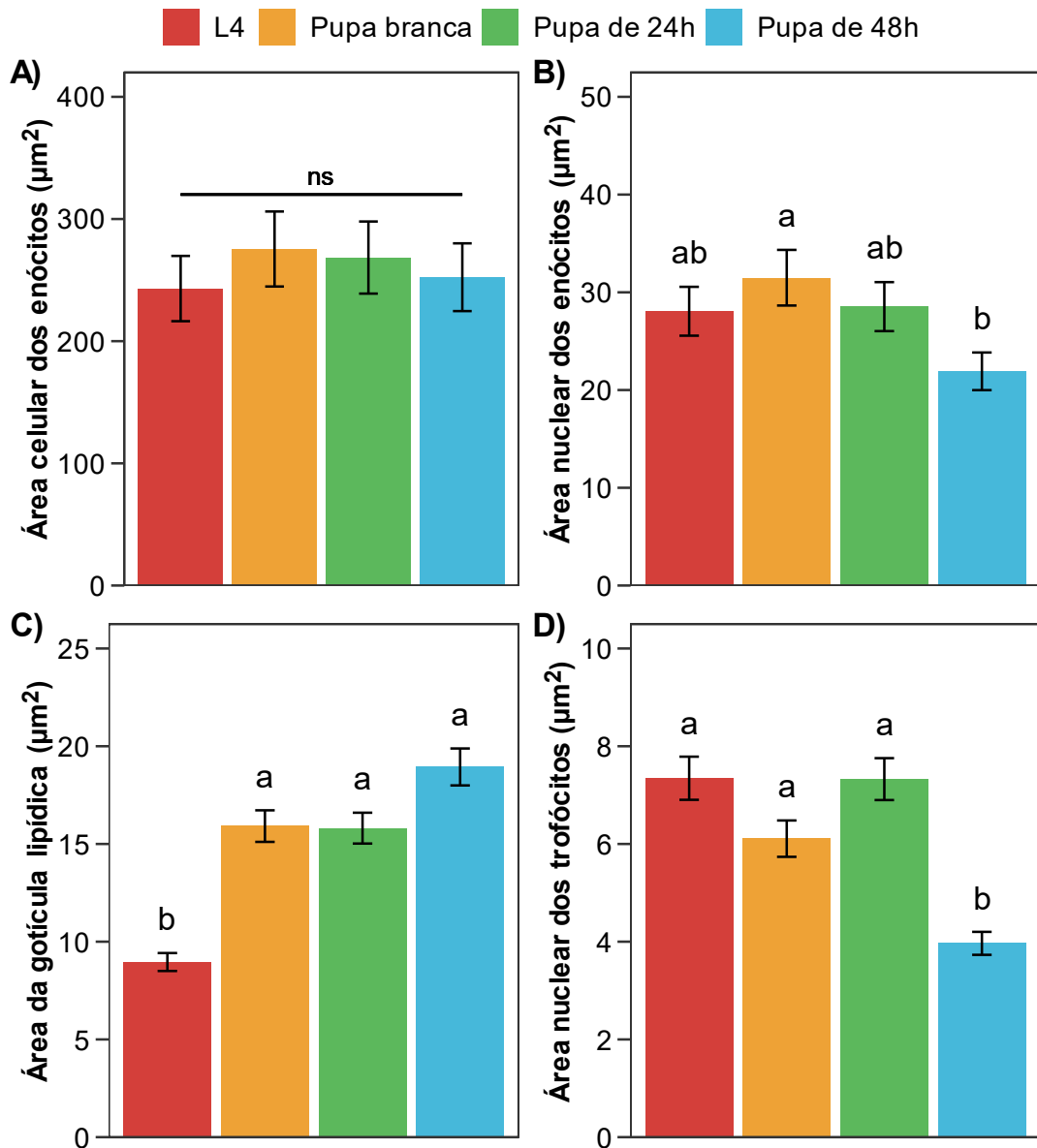
A área do núcleo dos trofócitos também varia de acordo com o estágio de desenvolvimento ( $\chi^2 = 66,28$ ;  $df = 3$ ;  $p < 0,001$ ; Fig. 15D). Ela foi menor em P48 do que nos demais estágios.

**Tabela 3:** Área nuclear ( $\mu\text{m}^2$ ) dos enócitos grandes e trofócitos de *Aedes aegypti* nos diferentes estágios.

Fêmeas (n = 3) (média $\pm$ desvio padrão)				
	Larva 4° instar	Pupa branca	Pupa 24 h	Pupa 48 h
Enócitos	29,79 $\pm$ 16,30 <sup>ab</sup> (n =36)	29,99 $\pm$ 17,78 <sup>a</sup> (n =36)	28,54 $\pm$ 12,86 <sup>ab</sup> (n =36)	23,83 $\pm$ 16,95 <sup>b</sup> (n =36)

Trofócitos	$7,556 \pm 3,543^a$ (n=39)	$5,778 \pm 2,854^a$ (n=39)	$7,327 \pm 2,556^a$ (n=39)	$4,142 \pm 1,590^b$ (n=39)
------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------

Letras diferentes (a-b) indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey ( $p < 0.05$ ).



**Figura. 15.** Área celular dos enócitos grandes (A), área nuclear dos enócitos grandes (B), área da gotícula lipídica (C) e área nuclear dos trofócitos (D) em diferentes estádios de *Aedes aegypti*. Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ( $p < 0.05$ ).

## 5.0. DISCUSSÃO

O corpo gorduroso dos diferentes estágios de *A. aegypti*, (L4, PB, P24 e P48) consiste em lóbulos formados por células, basicamente trofócitos, que se projeta para o interior da cavidade corpórea. Os enócitos ocorrem associados aos trofócitos, formando grupos de poucas células. Essas características estão em concordância com as observadas em outros insetos da ordem Díptera (CHRISTOPHERS; SR, 1960; MARTINS *et al.*, 2011a; SNODGRASS, 1993).

A distinção entre os trofócitos e os enócitos, baseada na presença de inclusões específicas no citoplasma, como gotículas lipídicas, grânulos proteicos nos trofócitos, e na morfologia característica dos enócitos, células grandes ovoides que apresentam um núcleo central proeminente, também confirma achados em outros mosquitos (MARTINS *et al.*, 2011d; PAES DE OLIVEIRA; DA CRUZ LANDIM, 2003; TURGAY-İZZETOĞLU; GÜLMEZ, 2019).

Os enócitos encontrados em *A. aegypti* apresentam uma distinção adicional com base em seu tamanho, sendo classificados como enócitos grandes e enócitos pequenos. Os enócitos grandes geralmente podem estar agrupados próximos ao tegumento, rodeados por trofócitos e alguns músculos intersegmentais. Por outro lado, os enócitos pequenos podem ser encontrados frequentemente em numerosos grupos, e alguns individualmente, no interior do corpo gorduroso e na periferia do órgão. Essa variabilidade na população de enócitos e sua distribuição já foi observada em diferentes espécies de dípteros como *Culex pipiens*, *Anopheles maculipennis*, *Lutzomyia longipalpis*, *Phlebotomus papatasi* e *Aedes aegypti* (ASSIS *et al.*, 2014; CHRISTOPHERS; SR, 1960; MARTINS; RAMALHO-ORTIGÃO, 2012; TURGAY-İZZETOĞLU; GÜLMEZ, 2019). A diferenciação no tamanho dos enócitos se deve ao seu papel específico ao longo do ciclo de vida do inseto. Os enócitos grandes estão presentes nos estágios larvais, neste caso L4 e pupa, sendo encontrados até P48, cuja função consiste na síntese de componentes lipídicos para a formação da cutícula pupal durante a metamorfose. Por outro lado, os enócitos pequenos surgem na L4 e persistem até o adulto, possivelmente desempenhando funções relacionadas ao metabolismo lipídico ao longo do tempo e adaptação a diferentes condições ambientais. Essa diferenciação no tamanho dos enócitos reflete a complexidade e a adaptabilidade do ciclo de vida do inseto, com diferentes células desempenhando papéis específicos em diferentes estágios do desenvolvimento (MAKKI; CINNAMON; GOULD, 2014; MARTINS *et al.*, 2011b; MARTINS; RAMALHO-ORTIGÃO, 2012).

Foi observado uma maior densidade de trofócitos em L4 (avaliados em uma área de 3000  $\mu\text{m}^2$ ), em comparação com PB, P24 e P48. Este grande número de trofócitos durante o estágio larval também foi documentado em outros dípteros, o *Culex pipiens* e *Drosophila melanogaster*, os quais exibiram um número maior de trofócitos durante o último estágio larval (BUTTERWORTH; EMERSON; RASCH, 1988; TURGAY-İZZETOĞLU; GÜLMEZ, 2019). A maior densidade numérica de trofócitos na L4 pode estar associada ao fato de que neste estágio ainda não se iniciou o processo de reorganização do corpo gorduroso. Assim, em estágios posteriores, essa densidade numérica de trofócitos diminuiu gradualmente até atingir P48. Este fato pode estar relacionado com o uso de energia utilizada durante a metamorfose, a qual está armazenada nos trofócitos. Essa sequência de eventos resulta na formação do corpo gorduroso no adulto (CHAPMAN, 2013; LI; YU; FENG, 2019; PAES DE OLIVEIRA; DA CRUZ LANDIM, 2003). Em contraste, os enócitos grandes dos estágios de *A. aegypti* não exibiram variação no número de células. Isso pode estar correlacionado com a função que desempenham durante a metamorfose, na formação da epicutícula pupal (MAKKI; CINNAMON; GOULD, 2014; TRAGER, 1937). Após na pupa tardia os enócitos larvais são eliminados, o que leva à sua ausência nos adultos recém-emergidos (TRAGER, 1937).

A organização e caracterização dos lóbulos do corpo gorduroso nos diferentes estágios de desenvolvimento de *A. aegypti*, é semelhante à de fêmeas adultas (CHRISTOPHERS; SR, 1960; MARTINS; PIMENTA, 2008). Lóbulos foram encontrados na região dorsal, próximos ao tubo dorsal, assim como também na região ventral perto ao sistema nervoso e algumas extensões musculares, exibindo uma estreita relação com a hemolinfa e as vísceras. Esse tipo de disposição permite o intercâmbio de metabólitos que será utilizado em diferentes processos fisiológicos do inseto, metamorfose, fonte de energia para a procura de alimentos nos adultos recém emergidos, formação do vitelogenina para o sucesso reprodutivo (CHAPMAN, 2013; LI; YU; FENG, 2019; PAES DE OLIVEIRA; DA CRUZ LANDIM, 2003).

Algumas células que apresentavam apoptose foram detectadas no corpo gorduroso de PB de *A. aegypti*. Esses achados corroboram que há atividade, ainda que restrita, de caspase durante a metamorfose. Estudos preliminares durante a metamorfose realizados em outros dípteros descrevem a detecção de apoptose na fase de pupa branca, corroborando nossos resultados. Em *Drosophila melanogaster* foi descrito que durante a fase de pupa branca há intensa atividade de caspase em algumas células do corpo gorduroso. Similarmente em *Rhynchosciara americana*, a pupa inicial apresentou atividade de caspase no órgão (BRANDÃO *et al.*, 2014; LIU *et al.*, 2013). O corpo gorduroso dos estágios imaturos de *A.*

*aegypti* apresenta pouca atividade apoptótica durante a metamorfose, indicando que este será preservado no adulto.

De L4 até P48, ocorrem algumas mudanças no corpo gorduroso sendo observada a redução da área do núcleo dos trofócitos de P48. Essa redução também foi observada durante a fase pupal do mosquito *Toxorhynchites theobaldi* a qual apresentou uma redução do núcleo, em comparação com L4 e adultos recém emergidos (PASCINI *et al.*, 2011). Isso possivelmente está correlacionado com a diminuição da atividade celular dos trofócitos após a metamorfose, o que resulta na diminuição da área nuclear (BUTTERWORTH; EMERSON; RASCH, 1988).

A área das gotículas lipídicas de *A. aegypti* é menor em L4, com relação aos outros estágios. Essa constatação é diferente do descrito para *T. theobaldi*, o qual exibiu gotículas lipídicas que apresentavam maior área na L4 em comparação com pupa e fêmeas recém-emergidas (PASCINI *et al.*, 2011). Esta diferença se deve a que *T. theobaldi* é uma espécie fitófaga na fase adulta e não se alimenta de sangue, sendo sua larva predadora, acumulando muitas reservas no corpo gorduroso, garantindo assim o desenvolvimento dos ovários na etapa adulta. Por outro lado, as fêmeas adultas de *A. aegypti* são anautógenas, sendo obrigatória a alimentação sanguínea necessária para o desenvolvimento do ciclo gonotrófico (CONSOLI, A. G. B.; LOURENÇO DE OLIVEIRA, 1994; PASCINI *et al.*, 2011).

A área dos enócitos grandes não apresentou variação durante os estágios de *A. aegypti* (L4, PB, P24 e P48), conservando seu tamanho celular ao longo do desenvolvimento. Este fato pode estar associado à função desse tipo de célula, pois de acordo com a literatura, os enócitos grandes crescem durante a fase larval e são responsáveis pela formação da cutícula na pupa. Por tanto, a atividade celular na pupa (P48) ainda está presente, o que estaria correlacionado com a homogeneidade no tamanho dos enócitos grandes. Ao finalizar sua função, os enócitos grandes começam a se degradar e desaparecem antes da eclosão do adulto (MAKKI; CINNAMON; GOULD, 2014; TRAGER, 1937). Porém, em nosso estudo não foi possível observar este tipo de morte celular através da histologia e detecção de caspase-3 ativada. Portanto pode-se inferir que a morte celular nos enócitos não é induzida pela caspase, provavelmente está associada a outras vias de morte celular, como autofagia ou degradação proteossomal. Por outro lado, a área nuclear dos enócitos grandes apresentou diferenças, sendo maior na PB em relação à L4. Esse aumento nuclear possivelmente é uma sinal da ocorrência de endoploidia ou endomitose, durante o início do estágio da PB período em que a cutícula é formada (LOCKE, 1969; MAKKI; CINNAMON; GOULD, 2014).

## 6.0. CONCLUSÕES

- Em termos gerais, observaram-se alterações morfológicas no corpo gorduroso do *A. aegypti* durante a metamorfose de larva para pupa, evidenciando mudanças nas células que compõem esse órgão.
- Os trofócitos exibiram uma redução da área nuclear no estágio P48, possivelmente nesta fase cessa a sínteses de proteínas, devido ao gasto energético realizado nos estágios PB-P48 durante a metamorfose. Paralelamente a área das gotículas lipídicas foi menor na L4. Esse fenômeno está associado ao tipo de alimentação das fêmeas de *A. aegypti* durante sua etapa adulta, as quais precisam se alimentar de sangue para a produção de vitelogênese regulado pelo corpo gorduroso, o que permitirá o desenvolvimento do ciclo gonadotrófico.
- Os enócitos apresentaram uma diminuição na área nuclear no estágio pupa 48h. Essas mudanças podem estar associadas ao metabolismo durante a transformação de larva para adultos. No entanto, a área dos enócitos larvais não variou de tamanho, esse fato possivelmente está relacionado com os estágios de L4-P48 nos que foram estudados, já que sua função é restringida para formar a cutícula da pupa.
- No corpo gorduroso do *A. aegypti*, foram identificadas poucas células em apoptose na pupa branca (PB), o que é uma evidência de que o órgão é preservado até a fase adulta.
- O estudo apresentado oferece uma melhor compreensão da morfologia, composição celular e alterações do corpo gorduroso do *A. aegypti* durante o desenvolvimento, contribuindo para a compreensão do processo de metamorfose e adaptação do corpo gorduroso do estágio larval para o estágio de pupa. Essa compreensão é crucial devido à importância desse inseto como vetor de arbovírus e seus impactos na saúde pública.

## 7.0. REFÊRENCIAS

ASSIS, W. A. de; MALTA, J.; PIMENTA, P. F. P.; RAMALHO-ORTIGÃO, J. M.; MARTINS, G. F. The characterization of the fat bodies and oenocytes in the adult females of the sand fly vectors *Lutzomyia longipalpis* and *Phlebotomus papatasi*. **Arthropod Structure & Development**, v. 43, n. 5, p. 501–509, set. 2014. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1467803914000425>>.

BRANDÃO, A. dos S.; DO AMARAL, Jô. B.; REZENDE-TEIXEIRA, P.; HARTFELDER, K.; SIVIERO, F.; MACHADO-SANTELLI, G. M. Cell death and tissue reorganization in *Rhynchosciara americana* (Sciaridae: Diptera) metamorphosis and their relation to molting hormone titers. **Arthropod Structure and Development**, v. 43, n. 5, p. 511–522, 2014.

BRYANT, B.; RAIKHEL, A. S. Programmed autophagy in the fat body of *Aedes aegypti* is required to maintain egg maturation cycles. **PLoS ONE**, v. 6, n. 11, 2011.

BUTTERWORTH, F. M.; EMERSON, L.; RASCH, E. M. Maturation and degeneration of the fat body in the *Drosophila* larva and pupa as revealed by morphometric analysis. **Tissue and Cell**, v. 20, n. 2, p. 255–268, 1988.

CARVALHO, F. D.; MOREIRA, L. A. Why is *Aedes aegypti* Linnaeus so Successful as a Species? **Neotropical Entomology**, v. 46, n. 3, p. 243–255, 2017.

CHAPMAN, R. F. **The Insects**. New York: Cambridge University Press, 2013. 107-131 p.  
CHRISTOPHERS; SR. *Aedes aegypti* (L.), the yellow fever mosquito. **Its life history, bionomics, and structure**. [s.l.: s.n.].

CONSOLI, A. G. B., R.; LOURENÇO DE OLIVEIRA, R. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. Rio de Janeiro: 1994, 1994. 1-228 p.

Dengue and severe dengue. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>>. Acesso em: 22 mar. 2024.

DURDEN, L. A.; MULLEN, G. R. Introduction. *In*: MULLEN., G. R.; DURDEN, L. A. **Medical and Veterinary Entomology**. [s.l.] Elsevier, 2019. p. 1–73.

GOINDIN, D.; DELANNAY, C.; RAMDINI, C.; GUSTAVE, J.; FOUQUE, F. Parity and longevity of *Aedes aegypti* according to temperatures in controlled conditions and consequences on dengue transmission risks. **PLoS ONE**, v. 10, n. 8, p. 1–21, 2015.

GRIGORAKI, L.; GRAU-BOVÉ, X.; YATES, H. C.; LYCETT, G. J.; RANSON, H. Isolation and transcriptomic analysis of *Anopheles gambiae* oenocytes enables the delineation of hydrocarbon biosynthesis. **eLife**, v. 9, p. 1–24, 2020.

LAPORTA, G. Z.; POTTER, A. M.; OLIVEIRA, J. F. A.; BOURKE, B. P.; PECOR, D. B.; LINTON, Y. M. Global Distribution of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in a Climate Change Scenario of Regional Rivalry. **Insects**, v. 14, n. 1, 2023.

LARSEN, W. J. Cell Remodeling in the Fat Body of an Insect. v. 8, n. I, 1976.

LI, S.; YU, X.; FENG, Q. Fat Body Biology in the Last Decade. **Annual Review of Entomology**, v. 64, n. January 2021, p. 18.1-18.19, 2019.

LIU, H.; JIA, Q.; TETTAMANTI, G.; LI, S. Balancing crosstalk between 20-hydroxyecdysone-induced autophagy and caspase activity in the fat body during *Drosophila* larval-prepupal transition. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 43, n. 11, p. 1068–1078, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ibmb.2013.09.001>>.

LOCKE, M. The ultrastructure of the oenocytes in the molting cycle of an insect. **Tissue and Cell**, v. 1, n. 1, p. 103–154, jan. 1969. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0040816669800091>>.

MAKKI, R.; CINNAMON, E.; GOULD, A. P. The development and functions of oenocytes. **Annual Review of Entomology**, v. 59, p. 405–425, 2014.

MARTINS, G. F.; GUEDES, B. A. M.; SILVA, L. M.; SERRÃO, J. E.; FORTES-DIAS, C. L.; RAMALHO-ORTIGÃO, J. M.; PIMENTA, P. F. P. Isolation, primary culture and morphological characterization of oenocytes from *Aedes aegypti* pupae. **Tissue and Cell**, v. 43, n. 2, p. 83–90, 2011a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tice.2010.12.003>>.

MARTINS, G. F.; PIMENTA, P. F. P. Structural changes in fat body of *Aedes aegypti* caused by aging and blood feeding. **Journal of Medical Entomology**, v. 45, n. 6, p. 1102–1107, 2008.

MARTINS, G. F.; RAMALHO-ORTIGÃO, J. M. Oenocytes in insects. **Invertebrate Survival Journal**, v. 9, n. 2, p. 139–152, 2012.

MARTINS, G. F.; RAMALHO-ORTIGÃO, J. M.; LOBO, N. F.; SEVERSON, D. W.; MCDOWELL, M. A.; PIMENTA, P. F. P. Insights into the transcriptome of oenocytes from *Aedes aegypti* pupae. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 3, p. 308–315, maio 2011b. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0074-02762011000300009&lng=en&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762011000300009&lng=en&tlng=en)>.

MARTINS, G. F.; SERRÃO, J. E.; RAMALHO-ORTIGÃO, J. M.; PIMENTA, P. F. P. Histochemical and ultrastructural studies of the mosquito *Aedes aegypti* fat body : effects of aging and diet type. **Microscopy research and technique**, v. 74, n. 11, p. 1032–1039, 2011c.

MARTINS, G. F.; SERRÃO, J. E.; RAMALHO-ORTIGÃO, J. M.; PIMENTA, P. F. P. A comparative study of fat body morphology in five mosquito species. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 6, p. 742–747, 2011d.

MESCHI, E.; DELANOUE, R. Adipokine and fat body in flies: Connecting organs. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 533, n. March, p. 111339, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.mce.2021.111339>>.

MICHAEL J. NELSON. *Aedes aegypti*: **BIOLOGY AND ECOLOGY**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <[https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/28514/PNSP8664\\_eng.pdf?sequence=1](https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/28514/PNSP8664_eng.pdf?sequence=1)>. Acesso em: 29 ago. 2022.

MIRANDA, A. P.; CARVALHO, H. J. C. de; RODRIGUES RIBEIRO, R.; LEÓN, M.; MARIA, D. A.; MIGLINO, M. A. *Aedes aegypti*: egg morphology and embryonic

development. **Parasites and Vectors**, v. 14, n. 1, p. 1–12, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s13071-021-05024-6>>.

NATION SR., J. L. **Physiology and biochemistry**. Boca Raton, Florida.: 2016, 2016. 28-51 p.

NELLIOT, A.; BOND, N.; HOSHIZAKI, D. K. Fat-body remodeling in *Drosophila melanogaster*. **genesis**, v. 44, n. 8, p. 396–400, ago. 2006. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/dvg.20229>>.

PAES DE OLIVEIRA, T. V.; DA CRUZ LANDIM, C. Morphology and Function of Insect Fat Body Cells: a Review. **Biociencias**, v. 11, p. 195–205, 2003.

PASCINI, T. V.; ALBENY, D. S.; RAMALHO-ORTIGÃO, M.; VILELA, E. F.; SERRÃO, J. E.; MARTINS, G. F. Changes in the fat body during the post-embryonic development of the predator *Toxorhynchites theobaldi* (Dyar & Knab) (Diptera: Culicidae). **Neotropical entomology**, v. 40, n. 4, p. 456–61, ago. 2011. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1519566X2011000400008&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1519566X2011000400008&lng=en&nrm=iso&tlng=en)>.

POWELL, J. R. .; TABACHNICK, W. J. History of domestication and spread of *Aedes aegypti*-A review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, n. August, p. 11–17, 2013.

POWELL, J. R.; GLORIA-SORIA, A.; KOTSAKIOZI, P. Recent history of *Aedes aegypti*: Vector genomics and epidemiology records. **BioScience**, v. 68, n. 11, p. 854–860, 2018.

SERVICE, M. **Medical Entomology for Students**. New York: Cambridge university press, 2012. 57;61 p.

SKOWRONEK, P.; ŁUKASZ, W.; STRACHECKA, A. Fat Body—Multifunctional Insect Tissue. **Insects**, v. 12, n. 6, p. 547, 2021. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2075-4450/12/6/547>>.

SNODGRASS, R. E. **Principles of Insect Morphology (Comstock Book)**. [s.l: s.n.]327-329 p.

TOPRAK, U.; HEGEDUS, D.; DOĞAN, C.; GÜNEY, G. A journey into the world of insect lipid metabolism. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 104, n. 2, p. 1–67, 2020.

TRAGER, W. Cell size in relation to the growth and metamorphosis of the mosquito, *Aedes aegypti*. **Journal of Experimental Zoology**, v. 76, n. 3, p. 467–489, 1937.

TURGAY-İZZETOĞLU, G.; GÜLMEZ, M. Characterization of fat body cells at different developmental stages of *Culex pipiens*. **Acta Histochemica**, v. 121, n. 4, p. 460–471, 2019.

ZHANG, Y.; LU, Y. X.; LIU, J.; YANG, C.; FENG, Q. L.; XU, W. H. A Regulatory Pathway, Ecdysone-Transcription Factor Relish-Cathepsin L, Is Involved in Insect Fat Body Dissociation. **PLoS Genetics**, v. 9, n. 2, 2013.