

**TALES VICARI PASCINI**

**DESENVOLVIMENTO DAS ESPERMATECAS DURANTE O  
ESTÁGIO PUPAL DE *Aedes aegypti***

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

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL**

**2014**

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

T

P225d  
2014 Pascini, Tales Vicari, 1989-  
Desenvolvimento das espermatecas durante o estágio pupal  
de *Aedes Aegypti* / Tales Vicari Pascini. – Viçosa, MG, 2014.  
vi, 40f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Gustavo Ferreira Martins.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Referências bibliográficas: f.35-40.

1. *Aedes aegypti*. 2. Inseto - Reprodução. 3. Espermateca.  
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de  
Entomologia. Programa de Pós-graduação em Entomologia.  
II. Título.

CDD 22. ed. 614.4323

**TALES VICARI PASCINI**

**DESENVOLVIMENTO DAS ESPERMATECAS DURANTE O  
ESTÁGIO PUPAL DE *Aedes aegypti***

Tese 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: 25 de julho de 2014

---

José Marcelo Ramalho-Ortigão

---

José Lino Neto

---

Gustavo Ferreira Martins  
(Orientador)

## **Agradecimentos**

Inicialmente, gostaria de agradecer à Universidade Federal de Viçosa, que me acolheu durante meus estudos ao longo da graduação e o mestrado. Da mesma forma agradeço ao Departamento de Entomologia pelo curso de Mestrado. Ao CNPQ e à CAPES, agências de fomento que me proporcionaram a bolsa e subsídios para a realização do meu projeto, respectivamente.

Ao meu orientador Prof. Gustavo Ferreira Martins, um exemplo de pessoa, profissional e amigo; sempre à disposição para auxiliar, corrigir e ensinar. Agradeço também à sua família (Adriana e Elisa), mesmo que elas não saibam, por cederem parte da companhia do Gustavo para que ele me auxiliasse ao longo dos meus experimentos.

Ao Prof. José Marcelo Ramalho Ortigão, por fazer parte da minha banca de mestrado e, por sempre se mostrar à disposição auxiliando tanto a mim quanto ao Gustavo no desenvolvimento dos nossos projetos.

Ao Prof. José Lino Neto, por integrar minha banca de mestrado e por se mostrar sempre solícito a esclarecer minhas dúvidas e ajudar no que for preciso.

Aos meus amigos do Laboratório de Biologia Molecular de Insetos (Renata, Raquel, Kenner, Isaac, Nadja, Samira e Juliana), por me auxiliarem até mesmo com apoio moral durante minha jornada acadêmica.

Aos outros amigos e colegas de jornada acadêmica do Laboratório de Ultraestrutura Celular, do Beagle e dos outros laboratórios do departamento.

À minha mãe, minha base, esteio, porto seguro, por quem minha vida não seria nada sem sua companhia e auxílio em todas as horas.

Às minhas tias e avó, que cada uma também ocupa o papel de mãe na minha vida.

E, por fim, a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho e minha formação profissional.

## Sumário

Resumo .....	iv
Abstract.....	vi
1. Introdução e revisão bibliográfica .....	1
1.1. Os mosquitos.....	1
1.2. A espermateca dos insetos .....	3
1.3. Reservatório espermatecal .....	5
1.4. Cutícula espermatecal .....	7
1.5. Glândula espermatecal.....	8
1.6. Ducto espermatecal.....	10
1.7. Controle endócrino e desenvolvimento espermatecal .....	12
2. Justificativa.....	14
3. Objetivo .....	14
4. Materiais e Métodos .....	15
4.1. Mosquitos.....	15
4.2. Dissecção .....	15
4.3. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	16
4.4. Morfometria .....	16
5. Resultados.....	16
6. Discussão.....	30
7. Conclusão .....	34
8. Referências Bibliográficas.....	35

## Resumo

PASCINI, Tales Vicari, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2014.  
**Desenvolvimento das espermatecas durante o estágio pupal de *Aedes aegypti*.**  
Orientador: Gustavo Ferreira Martins

As fêmeas dos culicídeos copulam uma única vez e são capazes de armazenar espermatozoides em um ou mais órgão(s) do sistema reprodutor denominado(s) espermateca(s). Em *Aedes aegypti* os espermatozoides são mantidos no interior de suas três espermatecas graças às secreções das glândulas espermatecais desse órgão. Apesar das espermatecas de *A. aegypti* serem bem caracterizadas, seu processo de desenvolvimento ainda é desconhecido. No presente trabalho estudamos o desenvolvimento das espermatecas ao longo da pupação, a partir do período de pupa branca até a fase adulta. Durante o desenvolvimento espermatecal não se observou alterações morfológicas como as descritas para *Drosophila melanogaster*, há somente um aumento de volume das células e crescimento de suas estruturas constituintes, possibilitando o rápido desenvolvimento desse órgão. No início da pupação (o estágio de pupa branca), a espermateca se apresenta como uma estrutura diminuta, que rapidamente cresce após 24 horas. Em 48 horas de pupação, se observa a glândula espermatecal, a deposição cuticular no reservatório e a presença de uma secreção com aspecto floculento, no lúmen do ducto espermatecal. Com 72 horas de pupação, observa-se novamente um aumento no volume do reservatório espermatecal, esse apresentando cutícula com todas as suas camadas formadas e o interior dos ductos das células glandulares repletos desse mesmo material floculento encontrado no período anterior. A presença desse material nos períodos iniciais de desenvolvimento parece promover a abertura do espaço onde vai ser formado o lúmen do ducto e do reservatório, que posteriormente vai sofrer o processo de deposição cuticular. Foram observadas algumas células em processo de morte celular. Há ainda, a presença de microvilosidades nas células epiteliais e nas células glandulares em todos os períodos analisados, que parece estar relacionada seja para a produção dos componentes para a formação da cutícula pelo epitélio ou no processo de secreção de substâncias lançadas no interior do lúmen do reservatório pela glândula espermatecal. Observou-se ainda, uma diferença temporal na estruturação entre o reservatório e o ducto espermatecal, que também foi observada em *Tenebrio molitor* e em *D. melanogaster*, o que pode ser pelo fato de o ducto espermatecal ser formado antes do reservatório. Já nas fêmeas recém-

emergidas, a espermateca apresenta seu reservatório, glândula e ducto espermatecal completamente formados, com uma espessa camada cuticular e uma grande quantidade de material floculento e elétron-denso, que se acredita ser originado para fornecer as condições essenciais para a condução, alocação e manutenção da viabilidade dos espermatozoides em seu interior.

## Abstract

PASCINI, Tales Vicari, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2014. **Spermathecal development during the pupation of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti***. Adviser: Gustavo Ferreira Martins

In general, culicid females copulate once and store sperm in one or more structures in their reproductive system named spermathecae. In *Aedes aegypti*, the sperm are stored during the female reproductive period into three spermathecae and are supposedly maintained by the spermathecal glandular secretions. Despite the *A. aegypti* spermathecae is well characterized, its development is still unknown. The present work studied the *A. aegypti* spermathecal development during the pupation. During the development of *A. aegypti* spermatheca, no morphological changes, such as those described in *Drosophila melanogaster*. In white pupa (just after pupation), the spermathecal primordia appears as a tiny structure that grows rapidly after 24 hours of pupation. After 48 hours of pupation, we can see the spermathecal gland, reservoir cuticular deposition and the presence of a flocculent secretion into the spermathecal duct lumen. Within 72 hours of pupation, we observe again an increase in the volume of spermathecal reservoir, this showing its cuticle layers and the same flocculent material found in the previously. This flocculent material/secretion in the early stages of development seems to assist in the spermathecal lumen development, which happens at the same time of the cuticular deposition. We have observed cell death, a process that seems to provide space for the neighbor cells to grow. Microvilli were observed in all analysed periods in epithelial and glandular cells, which seems to be related to the cuticle components production by the epithelial cells or the substances secreted into the reservoir lumen through spermathecal gland. The temporal difference in the development of the reservoir and the duct (which was also observed in other insects) may happens because the spermathecal duct is formed earlier than the reservoir. In newly-emerged females, the spermathecae are already completely formed with reservoir, gland cells and duct with a thick cuticular layer and a large amount of flocculent secretion into the lumen. This secretion is believed to be originated from glandular cells to provide the essential conditions for guiding, allocating and maintaining the sperm.

## 1. Introdução e revisão bibliográfica

### 1.1. Os mosquitos

As fêmeas dos mosquitos, além de provocarem grande desconforto aos hospedeiros pela picada, apresentam várias espécies que desempenham importante papel como vetores de parasitos de helmintoses, protozoonoses e arboviroses que acometem o homem em vastas áreas do mundo, sendo imensuráveis os danos causados à sociedade pela veiculação desses patógenos (Lozovei 2001).

Com mais de 2,5 bilhões de pessoas vivendo em áreas de risco, o *Aedes aegypti* é considerado o principal vetor do vírus dengue no mundo, além de ser transmissor do vírus da febre amarela e outras flavoviroses, causando mortes nas regiões urbanas desde os anos 50 (Christophers 1960, Nelson 1986). O *A. aegypti* é um mosquito de origem africana, de atividade diurna, pertencente à família Culicidae da ordem Diptera, que compreende dez tribos contendo 34 gêneros com mais de 3500 espécies pelo mundo (Christophers 1960, Nelson 1986, Consoli & Oliveira 1994). Essa espécie tem distribuição mundial e encontra-se, geralmente, nas regiões tropicais e subtropicais, com altitudes inferiores a mil metros (Organização Pan-americana de Saúde 1995). No Brasil, o *A. aegypti* está presente nos 26 estados e no Distrito Federal (Secretaria de Vigilância de Saúde 2013).

Os ovos de *A. aegypti* são muito resistentes, sobrevivendo por vários meses até que haja disponibilidade de água, tornando-o de difícil controle. A fêmea deposita seus ovos em diversos locais, que ao serem reidratados eclodem e liberam suas larvas, dando origem às pupas, das quais emerge o adulto. Como na maioria dos demais mosquitos, somente as fêmeas se alimentam de sangue para a maturação de seus ovos; enquanto que elas também, assim como os machos, se alimentam de secreções vegetais e néctar (Neves et al. 2005, Secretaria de Combate à Dengue 2013).

O vírus Dengue (DENV) pertence ao gênero *Flavivirus* (família *Flaviviridae*), que é transmitido por mosquitos do gênero *Aedes* em primatas. A transmissão desse vírus em humanos se intensificou, atingindo cerca de 100 milhões de pessoas em todo o mundo, sendo encontrado em mais de 100 países. Apesar disso, a maioria dos casos de dengue são assintomáticos ou quando muito, promovem sintomas semelhantes aos de uma gripe que logo cessa; apenas 0,5% dos casos é considerado grave, conhecido como “dengue hemorrágica”, causando mortalidade e morbidade aos pacientes, além de prejuízos econômicos irreparáveis (Suaya et al. 2009, Vasilakis et al. 2012).

As fêmeas de *A. aegypti* se infectam com os vírus da dengue (quatro sorotipos: DENV1-DENV4) quando realizam o repasto sanguíneo a partir de um indivíduo contendo o vírus em sua corrente sanguínea. Recentemente, foi descoberto um quinto tipo de vírus dengue (DENV5), distinto dos outros quatro tipos, que anteriormente circulava somente entre primatas da Malásia e que parece ter mutado, passando a ser transmitido para humanos e causar os mesmos sintomas já descritos para a dengue (CIDRAP 2013, Normile 2013). O vírus atravessa o intestino médio do mosquito, cai na hemolinfa e se aloja na glândula salivar onde se multiplica e, quando o mosquito pica outro indivíduo, os vírus são liberados juntamente com as substâncias anticoagulantes e anestésicas presentes em sua saliva (Neves et al. 2005, CDC 2013).

Os quatro tipos de vírus (DENV1-DENV4) são mantidos em ciclos distintos de transmissão: o ciclo silvestre e o ciclo humano. No ciclo silvestre, os primatas são contaminados por diferentes espécies do gênero *Aedes*, localizados principalmente no oeste da África e na península da Malásia. Já o ciclo humano, quando ocorre em áreas domiciliares envolve o mosquito *A. aegypti* e em áreas peridomiciliares o *Aedes albopictus* (Vasilakis et al. 2012).

É difícil identificar onde e quando ocorreu a transmissão do vírus da dengue de forma interespecífica pela primeira vez, levando ao surgimento da infecção em humanos. A dengue foi primeiramente documentada nas Américas no fim do século XVIII, com sua chegada ao continente como resultado do tráfico de escravos originários do oeste da África, encontrando um ambiente propício para sua dispersão. Na Ásia, os primatas arborícolas são considerados sua principal fonte de dispersão, e seu principal mosquito vetor o *Aedes albopictus*, que é considerado como mais susceptível à infecção por DENV que outras espécies do mesmo gênero (Vasilakis et al. 2012). Atualmente, o aumento da urbanização e as alterações climáticas são considerados fatores que promovem uma maior dispersão do DENV, expandindo a distribuição de seus reservatórios e vetores silvestres em regiões urbanas e peridomiciliares, aumentando significativamente os casos relatados de dengue no mundo (Vasilakis et al. 2012).

De acordo com os dados do Programa Regional da Dengue da OPAS/OMS, na região das Américas, já no início de 2013, foram registrados 279 mil casos da doença, com 1752 casos graves e 84 óbitos. Os países que registraram os maiores números de casos graves foram: México, Venezuela e Brasil, o que equivale a 71% dos casos notificados (Organização Pan-Americana de Saúde 2014).

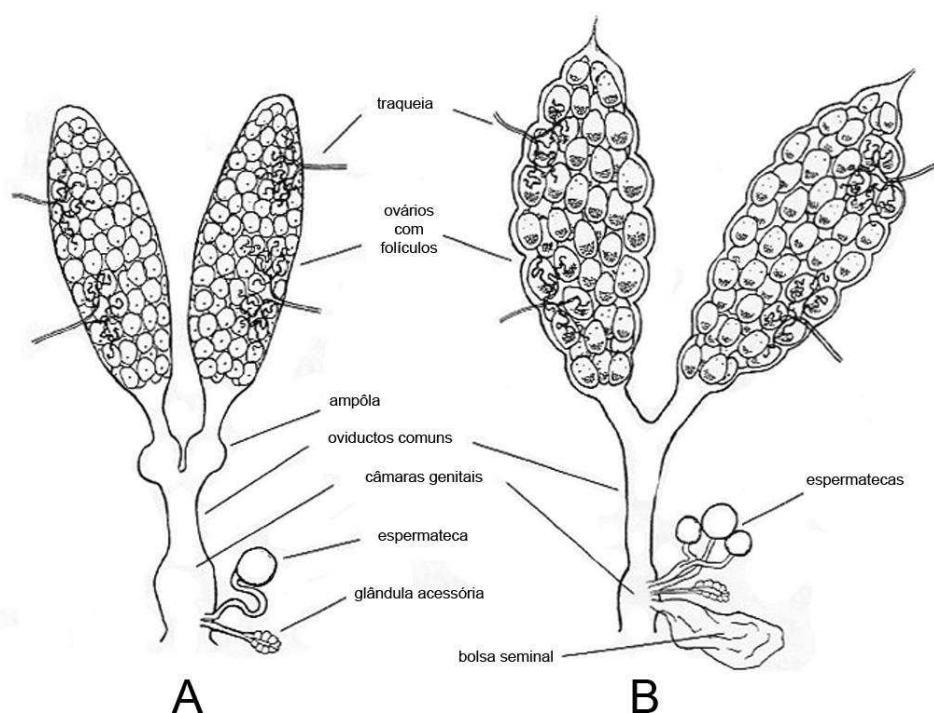
Segundo o Ministério da Saúde, até 21 de setembro de 2013, foram registrados 1,4 milhão de casos de dengue no Brasil. Esse número é quase três vezes maior que o do mesmo período de 2012, quando foram notificados 537 mil casos. De acordo com o mesmo levantamento, 530 pessoas morreram por causa da dengue, em comparação com 2012, onde foram contabilizadas 283 mortes, representando um aumento de 87,2% na incidência de casos graves dessa doença (Organização Pan-Americana de Saúde 2013). Já no primeiro bimestre de 2014, houve uma redução dos casos de dengue confirmados em cerca de 80%, foram notificados 87 mil casos contra 427 mil no mesmo período do ano passado. A Região Sudeste obteve a maior redução, passando de 323,5 mil casos em 2013 para 36,9 mil; seguida da Região Centro-Oeste, que passou de 122,8 mil para 28,2 mil casos e da Região Nordeste que registrou uma queda de 29,6 mil para 7,9 mil casos. Essa redução se deve à implementação das técnicas de combate ao seu principal mosquito vetor, o *A. aegypti* (Laboissière 2014, Portal da Saúde 2014). Apesar de esses dados impressionarem, ainda não há vacinas efetivas que previnam a infecção pelo vírus da dengue, apresentando-se como medida profilática mais efetiva o combate ao seu inseto vetor (Neves et al. 2005, CDC 2013, OMS 2013).

## 1.2. A espermateca dos insetos

A alta capacidade reprodutiva observada nos insetos se deve principalmente ao processo de armazenamento dos gametas no trato reprodutivo feminino, em especial na espermateca, permitindo que a fêmea copule cedo na fase adulta, mas que possa atrasar por dias, semanas ou até meses o processo de fertilização e concomitantemente sua oviposição (Fig. 1) (Tombes & Roppel 1972). A espermateca é o órgão responsável por manter os espermatozoides viáveis durante a fase reprodutiva das fêmeas, fornecendo gametas para a fertilização de seus ovos. Geralmente a espermateca é uma estrutura saculiforme revestida internamente por uma espessa cutícula e pode ser dividida em diferentes partes: o ducto espermatecal, o reservatório ou receptáculo, o componente glandular e a bomba espermatecal ou esfíncter (Fig. 2) (Tombes & Roppel 1972, Pabalan et al. 1996, Barreto et al. 2008, Chapman 2013).

Em mosquitos o número de espermatecas pode variar de acordo com a espécie. Por exemplo, no gênero *Anopheles* está presente somente uma, enquanto que em *Culex nigripalpus* e *A. aegypti* elas são três, sendo que nesse último, a maior mede cerca de 100 µm de diâmetro, e as demais 70 µm (Fig. 1) (Giglioli 1963, Clements & Potter

1967, Klowden & Chambers 2004, Barreto et al. 2008, Pascini et al. 2012).



**Figura 1:** Sistemas reprodutivos femininos das fêmeas de (A) anofelino, baseado no *A. gambiae*, e (B) culicíneo, baseado em *A. aegypti* (adaptado de Foster & Walker 2009).

O desenvolvimento da espermateca pode variar em função da idade dos insetos (Souza et al. 2008). Esse órgão pode apresentar pequenas variações dentro da mesma espécie, ou até estruturas totalmente novas em seus diferentes gêneros (Winterton et al. 1999) ainda, podendo desempenhar outras funções como osmorregulação e controle de pH em diferentes organismos (Gobin et al. 2006).

A remoção das espermatecas é capaz de influenciar a oviposição das fêmeas dos mosquitos de maneiras diferentes, dependendo da espécie. Por exemplo, as fêmeas de *A. aegypti* são capazes de ovipositar mesmo depois de terem todas as espermatecas removidas, enquanto que as fêmeas de *Anopheles gambiae* não ovipositaram. Essa diferença sugere que há um mecanismo que é desencadeado provavelmente pelo conteúdo proteico do ejaculado do macho ou pela percepção do enchimento da espermateca atuando como um gatilho para a oviposição em *A. gambiae* (Klowden 2006, 2008).

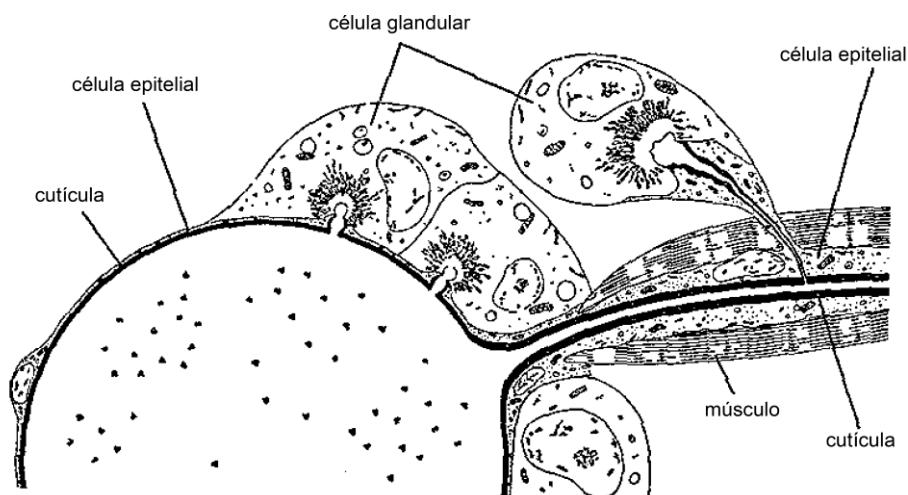
Foi observado em *Locusta migratoria* (Orthoptera: Acrididae) uma grande quantidade de inervações observadas ao redor da espermateca, incluindo múltiplos prolongamentos dos gânglios abdominais, sugerindo um refinado controle neuronal de

sua espermateca. Além de um grande número, essas inervações se apresentam de forma diferente entre as regiões da espermateca, a porção que contém o reservatório e sua região é estimulada por um gânglio abdominal, enquanto que a região distal do ducto por outro. Quando a espermateca é retirada do abdômen desses insetos, ela se contrai espontaneamente, gerando ondas que partem do reservatório e se propagam ao longo do ducto espermatecal (Lange & Silva 2007).

Curiosamente, a espermateca também pode servir como porta de entrada de patógenos depositados juntamente com o ejaculado do macho. Esse ejaculado pode servir como veículo para a transmissão vertical de vírus, como o que causa deformação de asas do zangão em *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae), através da liberação direta, pela fertilização do ovócito com espermatozoides contaminados ou indiretamente por meio de uma infecção venérea do aparelho reprodutivo da rainha (transmissão horizontal), seguida de uma transmissão vertical (Miranda & Fries 2008).

### **1.3. Reservatório espermatecal**

O reservatório espermatecal nos insetos é a principal estrutura de alocação de espermatozoides, sendo constituída por uma camada de células epiteliais, uma camada cuticular que reveste seu interior e por células glandulares que podem estar concentradas ou dispostas ao longo de toda a sua superfície (Fig. 2) (Christophers 1960, Pascini et al. 2012, Chapman 2013). O diâmetro do reservatório espermatecal reflete diretamente na capacidade de alocação de gametas (potencial em armazenar espermatozoides), que apresenta grande variação dentro dos culicídeos, como observado entre o *A. aegypti* que possui três reservatórios com tamanhos distintos (um maior e dois menores) (Fig. 1), enquanto que em *A. gambiae* e *A. aquasalis* há apenas um (Curtin & Jones 1961, Clements & Potter 1967, Pabalan et al. 1996, Klowden 2006, Pascini et al. 2012, 2013).



**Figura 2:** Estrutura da espermateca de *A. aegypti* (adaptado de Clements & Potter 1967).

As células epiteliais que revestem esse reservatório são responsáveis pela secreção da camada cuticular, podendo também secretar substâncias semelhantes às das células glandulares espermatecais em algumas espécies (Fig. 2) (Clements & Potter 1967, Jones & Fishman 1970, Pascini et al. 2012, Chapman 2013). Acredita-se que a camada cuticular do reservatório espermatecal em mosquitos seja impermeável a nutrientes que, por sua vez, não poderiam advir da hemolinfa. Portanto, os nutrientes disponibilizados para os gametas provavelmente são originados do ejaculado do macho ou das secreções da glândula espermatecal que são lançadas na luz do órgão por meio de pequenos canalículos presentes na cutícula, por onde passam extensões das células glandulares (Fig. 2) (Tombs & Roppel 1972, Pascini et al. 2012, 2013). Em *A. aquasalis*, na região que compreende o canalículo onde a glândula espermatecal libera sua secreção para o lúmen do reservatório, ocorre uma redução das camadas cuticulares, na qual a epicutícula se projeta para o interior do reservatório sob a forma de protrusão, estabelecendo verdadeiras pontuações claras ao longo de todo o reservatório, onde se encontram as células glandulares (Pascini et al. 2013).

Na luz do reservatório espermatecal, os espermatozoides permanecem até o momento da fertilização dos ovos. Em mosquitos eles se apresentam organizados paralelamente entre si no interior do reservatório, processo de organização esse que ainda não está claro se é condicionado pelo conteúdo presente no reservatório espermatecal, pelas secreções do ejaculado do macho ou ambos (Tombs & Roppel 1972, Pascini et al. 2012, 2013).

#### 1.4. Cutícula espermatecal

A camada cuticular da espermateca de *A. aegypti* apresenta em torno de 0,7  $\mu\text{m}$  de espessura e, quando observada transversalmente, possui um aspecto lamelar, com cerca de sete a dez camadas mais elétron-densas alternadas com camadas de menor elétron-densidade. Acredita-se que essas camadas de cutícula presentes na espermateca apresentem similaridade em seu processo de formação com a cutícula do exoesqueleto dos insetos. Sua estruturação se inicia no processo de metamorfose na pupa até seu completo estabelecimento em fêmeas logo após a emergência (Clements & Potter 1967, Klowden 2008, Mayhell & Merritt 2013).

O intertegumento, que vai originar o exoesqueleto nos insetos, é organizado em duas principais camadas: uma camada de cutícula espessa e esclerotizada e abaixo uma fina camada de células epiteliais. Esse revestimento cuticular por sua vez varia tanto em composição quanto na organização de seus componentes, originando três áreas bem definidas: o envelope de cuticulina, a epicutícula e a procutícula (Nation 2008).

O envelope de cuticulina é formado pelo acúmulo da lipoproteína de mesmo nome na superfície externa da membrana plasmática das células epiteliais, fornecendo maior rigidez e resistência a essa estrutura. Logo abaixo, encontra-se a epicutícula que apresenta proteínas esclerotizadas impregnadas com lipoproteínas, lipídeos e ceras, podendo ainda apresentar minerais e outros componentes químicos dependendo do inseto. É nessa camada que ocorre o processo de esclerotização, onde são formadas ligações cruzadas entre suas moléculas constituintes, fornecendo força, rigidez e baixa permeabilidade à água, mesmo não contendo quitina (Hopkins 1992, Klowden 2008, Nation 2008).

A procutícula, é constituída de quitina e proteínas, apresentando um gradiente de esclerotização de acordo com a disposição e composição de suas camadas (quando há um maior grau de esclerotização observa-se a exocutícula e as regiões mais maleáveis e flexíveis recebem o nome de endocutícula). Em alguns insetos ainda pode-se observar uma camada com grau intermediário de esclerotização conhecida como mesocutícula (Hopkins 1992, Nation 2008, Chapman 2013).

No processo de metamorfose, que é o remodelamento dos tecidos corporais, onde o inseto vai passar para a fase adulta ocorre a muda, sendo desencadeada por estímulos hormonais ou ambientais que resultam na eliminação da camada cuticular velha e a produção de uma nova posteriormente. Nesse processo a procutícula é digerida

e reabsorvida, tendo seus componentes reutilizados para a síntese da nova camada cuticular, somente a epicutícula é eliminada completamente (Hopkins 1992, Nation 2008, Chapman 2013).

A produção de uma nova cutícula se inicia com a liberação para o espaço extracelular da cuticulina estabelecendo uma fina camada, que é deslocada pela produção da epicutícula e posteriormente da procutícula. Uma vez sintetizadas, essas camadas sofrem o processo de esclerotização, onde são formadas ligações cruzadas entre suas proteínas e seus lipídeos constituintes pela ação das proteínas quinonas, o que leva ao seu enrijecimento e posterior escurecimento (Hopkins 1992, Klowden 2008, Nation 2008).

No caso do ducto espermatecal de *A. aegypti* e no de *A. aquasalis*, que são estruturas que sofrem tensão pela contração de seus músculos associados, acredita-se que na composição de sua cutícula encontra-se uma maior quantidade da proteína resilina, que permite maior resistência ao estiramento. Já a cutícula do reservatório espermatecal, onde há a necessidade do isolamento e manutenção dos espermatozoides em seu interior, acredita-se predominar a cuticulina, que é uma proteína que proporciona maior resistência e rigidez a essa estrutura (Clements & Potter 1967, Jones & Fishman 1970, Nation 2008, Pascini et al. 2012, 2013).

### **1.5. Glândula espermatecal**

Outro constituinte da espermateca é o componente glandular que pode estar representado por uma ou mais glândulas, ou por células espalhadas sobre o epitélio do reservatório espermatecal (Fig. 2) (Chapman 2013). Através de inferências morfológicas e citoquímicas, essas células podem ser consideradas responsáveis pela produção de nutrientes que são despejados no lúmen do reservatório através de seus próprios ductos celulares para nutrir os espermatozoides (Dallai 1975, Cruz-Landim & Serrão 2002, Martins & Serrão 2002, Gobin et al. 2006, Pascini et al. 2012).

O controle da liberação da secreção pela glândula ainda é pouco conhecido. Por exemplo, em *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) as secreções produzidas pelas glândulas espermatecais são armazenadas no lúmen das células glandulares; e, momentos antes da cópula a secreção glandular é liberada para o interior do reservatório espermatecal desobstruindo todo o órgão, permitindo a entrada e alocação dos espermatozoides (Ilango 2005).

A glândula spermatecal na maioria dos insetos é classificada como glândula epidérmica de tipo III por se consistir de uma unidade secretória associada a células de suporte (células epidérmicas) e por possuir um canal, ou ducto, que termina num complexo extracelular pelo qual a secreção passa da célula secretória para seu exterior. Esse ducto e aparato terminal são construídos por uma ou mais células suporte, mas em alguns insetos adultos, a glândula funcional é composta de poucas células, sugerindo um processo de apoptose que remove as células após completarem sua função no desenvolvimento dessa estrutura (Noirot & Quennedey 1991). As células secretoras são o principal tipo de glândulas dermais de classe III. Elas se tornam maiores com o desenvolvimento do órgão a que estão associadas através do aumento da quantidade de DNA e microvilosidades, que circundam o reservatório ou o órgão final para a liberação de sua secreção (Noirot & Quennedey 1991).

No interior das spermatecas de fêmeas virgens e fertilizadas de *A. aegypti* é evidenciado um material “floculento” e elétron-denso. Em algumas regiões esse material é encontrado ao longo do lúmen dos ductos das células glandulares, evidenciando sua secreção para o interior do reservatório (Clements & Potter 1967, Pascini et al. 2012). Esse aspecto é característico de secreção proteica, que também foi observado no interior da spermateca de *Anastrepha suspensa* (Diptera: Tephritidae), provavelmente estabelecendo o meio adequado para o armazenamento dos espermatozoides após a cópula (Fritz & Turner 2002).

Ainda em *A. suspensa*, são observados desmossomos ancorando as células glandulares entre si, assim como entre as células epiteliais circundantes do reservatório spermatecal; estruturas semelhantes são observadas em *A. aegypti* (Fritz & Turner 2002, Pascini et al. 2012). Também, circundando a spermateca de *A. suspensa*, são encontrados enocitoides, cuja presença está associada à defesa contra patógenos oriundos do ejaculado do macho (Fritz & Turner 2002).

As células glandulares da spermateca de *A. aegypti* são encontradas agrupadas na região do reservatório próxima do ducto spermatecal (Fig. 2), bem como dispostas ao longo de todo epitélio do reservatório de *A. aquasalis*. Essas células glandulares também estão presentes no ducto spermatecal, e são responsáveis pela secreção de substâncias nutritivas em seu interior, além de desempenhar importante papel na quimiotaxia para o processo de migração dos espermatozoides e sua posterior alocação no interior do reservatório spermatecal (Clements & Potter 1967, Pascini et al. 2012, 2013).

Em formigas, a glândula espermatecal é individualizada do reservatório e suas células apresentam pouca quantidade de retículo endoplasmático, um complexo de Golgi pouco desenvolvido e o núcleo e grânulos de glicogênio polarizados na região basal. Isso sugere que as células glandulares juntamente com o epitélio do reservatório espermatecal, estão envolvidos com o transporte de eletrólitos da hemolinfa para o lúmen da espermateca (Wheeler & Krutzsch 1994, Gobin et al. 2006).

O papel das secreções glandulares das espermatecas vai além da manutenção dos gametas em seu interior, como em *Anthonomous grandis* (Coleoptera: Curculionidae) e *P. papatasi*, onde as glândulas espermatecais produzem glicoproteínas e mucopolissacarídeos que supostamente auxiliam no transporte e migração dos espermatozoides da vagina para a espermateca (Grodner & Steffens 1978, Ilango 2005). Na presença desses componentes, a motilidade dos espermatozoides em *A. grandis* aumenta, de forma que, quando as glândulas espermatecais são removidas, os espermatozoides reduzem sua atividade locomotora (Villavaso 1975, Grodner & Steffens 1978).

Em *A. gambiae* foi observado que essas células glandulares do ducto são mais ativas antes da cópula, provavelmente por suas secreções estabelecerem um meio adequado para o armazenamento de espermatozoides. Acredita-se que a velocidade relativamente alta com que os espermatozoides passam pela vagina seja explicada pela existência de um vácuo que se estabelece durante a inseminação por contrações peristálticas dos músculos que circundam o ducto espermatecal. Além disso, é possível que a migração dos gametas da vagina para a espermateca após a inseminação se dê através de estimulação quimiotática resultante das secreções glandulares (Giglioli 1963, Klowden 2006).

## **1.6. Ducto espermatecal**

Desembocando no reservatório espermatecal de *A. aegypti* encontra-se o ducto espermatecal (Fig. 2), que é composto de um canal revestido de células epiteliais cúbicas, dependendo da espécie, e cutícula em seu interior. Ao redor desse ducto estão dispostas fibras musculares estriadas que auxiliam na condução do ejaculado até o reservatório, recebendo o nome de bomba ou esfíncter (Christophers 1960, Spielman 1964, Clements & Potter 1967, Pascini et al. 2012). A disposição dessas fibras ao longo do ducto pode variar entre diferentes indivíduos, podendo estar arranjadas de forma

longitudinal/circular como em *A. aegypti* e *P. papatasi* (Clements & Potter 1967, Jones & Fishman 1970, Ilango 2005, Pascini et al. 2012).

As células glandulares do ducto espermatecal de mosquitos descarregam a sua secreção dentro do lúmen do ducto. O aspecto das células epiteliais do ducto de *A. aegypti* é bastante característico, apresentando sua base relativamente mais larga, com um único núcleo ovoide. As mitocôndrias são distribuídas principalmente na metade apical (voltada para o lúmen) das células. Os microtúbulos são organizados em paralelo ao longo do eixo longitudinal dessas células e pouco retículo endoplasmático é observado. A característica mais importante dessas células é sua membrana plasmática altamente convoluta, com uma grande quantidade de reentrâncias de membrana, arranjadas concentricamente próximas da cutícula do ducto (Jones & Fishman 1970).

A camada cuticular no interior do ducto se apresenta intercalada por uma camada fina e escura em contato com o lúmen, denominada de epicutícula, e outra mais espessa e menos corada, a procutícula, que se organiza próxima ao epitélio das células do ducto. Essas camadas permitem a manutenção da estrutura, a estabilidade e a resistência à contração e distensão dessa estrutura (Jones & Fishman 1970, Pascini et al. 2012).

Em abelhas da espécie *Bombus morio* (Hymenoptera: Apidae) o ducto espermatecal é formado por um epitélio com características variáveis, de acordo com o estado reprodutivo da rainha. São encontradas partículas de glicogênio em diferentes localizações nas células, além de uma combinação de microvilosidades na região apical, muitas mitocôndrias e ausência de vesículas de secreção caracterizando essas células como um típico epitélio de transporte. Também em *B. morio* foi demonstrado que o ducto espermatecal não apenas encaminha os gametas no trajeto vagina-receptáculo e vice-versa, mas também é capaz de fornecer nutrientes para eles. A luz do ducto é rica em polissacarídeos e acredita-se que esses nutrientes sejam originados de suas células epiteliais, já que nessa espécie não há células glandulares associadas ao ducto (Schoeters & Billen 2000). Já nos ductos espermatecais de *Sitophilus granarius* (Coleoptera: Curculionidae) observa-se um acúmulo de desmossomos entre as células epiteliais repletas de um material osmiofílico sugerindo que suas células epiteliais constituintes apresentem função osmorregulatória durante o movimento do material do lúmen do ducto para a cavidade corporal (Tombes & Roppel 1972).

## 1.7. Controle endócrino e desenvolvimento espermatecal

Os discos imaginais das larvas dos insetos holometábolos são formados por um grupo de células indiferenciadas que irão desenvolver e formar os tecidos adultos sob condições hormonais apropriadas. Essas células são derivados ectodérmicos agrupados em vários locais, que começam a se dividir e aumentar de tamanho no último estágio larval e, quando ocorre a pupação, os discos imaginais fornecem células para originar os tecidos do adulto. Os discos imaginais foram melhor estudados em *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae); e em Diptera seu desenvolvimento inclui a formação das asas, pernas, halteres, olhos compostos, antenas, estruturas genitais, reprodutivas e algumas partes do aparelho bucal (Nation 2008, Chapman 2013). O aparelho reprodutivo dos insetos com todas as suas estruturas associadas, como as espermatecas, são originados por meio de invaginações dos discos imaginais presentes no oitavo segmento abdominal, permitindo que, logo após a emergência dos adultos, eles já se encontrem aptos para o início de sua fase reprodutiva (Christophers 1960, Klowden 2008, Chapman 2013).

O processo de desenvolvimento desses discos imaginais é desencadeado por picos entre os hormônios ecdisteroides (dentre eles, o mais bem descrito é a ecdisona) e o hormônio juvenil (JH), que são responsáveis por atuar coordenando o processo de muda e metamorfose (Willis 1974, Handler 1982, Riddiford et al. 2010). No caso das estruturas reprodutivas, especialmente as espermatecas, o JH é responsável por desencadear sua formação e desenvolvimento, que posteriormente, logo após a emergência do adulto, vai sofrer o processo de deposição cuticular pela ação dos ecdisteroides (Handler 1982). Foi observado em *D. melanogaster* e *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae) que ao se retirar a *corpora allata* (que é o principal órgão de produção do JH nas larvas), todo o processo de desenvolvimento é afetado, levando a uma redução significativa dos níveis desse hormônio, que acelera o processo de desenvolvimento, levando à origem de adultos ainda com características do estágio larval (Handler 1982, Gu & Chow 2003).

Em mosquitos hematófagos como o *A. aegypti*, onde o desenvolvimento do ovo é desencadeado pela alimentação sanguínea, foi observado que ao se injetar ecdisona nas fêmeas, ocorre a ativação da dopa descarboxilase (enzima que é responsável por hidroxilar a ecdisona), desencadeando o processo de desenvolvimento dos ovos mesmo sem o repasto sanguíneo, reafirmando a importância desse hormônio no sucesso

reprodutivo desses organismos (Fallon et al. 1974, Hargedorn et al. 1975). Apesar disso, pouco se sabe sobre a ação do ecdisona e do JH no desenvolvimento das espermatecas dos mosquitos.

Em outros insetos adultos, como no gafanhoto *Gomphocerus rufus* (Orthoptera: Acrididae) onde há a produção do espermatóforo pelo macho, o JH está relacionado com o estímulo para a produção e liberação de enzimas proteolíticas responsáveis por eliminar o arcabouço do espermatóforo no interior da fêmea, liberando os espermatozoides que serão alocados na espermateca (Hartmann 1978). Já em *Blattella germanica* (Blattodea: Blattellidae) esse mesmo hormônio está envolvido com os movimentos do ducto espermatecal que atuam no processo de encaminhamento dos espermatozoides em direção ao reservatório espermatecal (Liang & Schal 1993). Já os ecdisteroides parecem afetar diretamente a atividade de secreção das glândulas espermatecais, aumentando ou reduzindo a secreção de carboidratos relacionados com o processo de condução dos espermatozoides para o interior da espermateca na fase adulta, como o observado em *A. mellifera* (Wegener et al. 2013).

Como a espermateca é utilizada somente na fase adulta (ou quando ocorre a reprodução sexuada), ela está ausente nas fases imaturas (larval), se desenvolvendo durante a metamorfose. Há poucos trabalhos dedicados à formação das espermatecas nos insetos. Recentemente um elegante trabalho revelou esse processo de forma detalhada durante a metamorfose de *D. melanogaster*. O processo de desenvolvimento da espermateca em *D. melanogaster* se inicia no processo de metamorfose no início do estágio pupal. A espermateca se torna evidente após 24 horas de pupação, assumindo a forma de clava, que é mantida até 36 horas, onde o lúmen começa a aumentar de tamanho e acumular secreções. A mudança mais drástica na morfologia espermatecal se dá entre 42 e 48 horas após a pupação, onde a espermateca adquire uma forma esférica que persiste até a fase adulta com algumas modificações (Mayhew & Merritt 2013).

Logo após a muda, inicia-se a multiplicação dos discos imaginais que resulta na origem de um tubo que termina sob a forma de clava (espermateca), cerca de 18 horas após a pupação. Nenhuma mudança estrutural ocorre até o estágio de pupa 24 horas, somente a proliferação das células que compõe essa estrutura. Já no tempo de 36 horas após a pupação, são observadas três unidades de células glandulares da espermateca bem evidentes e ocorre o início do rearranjo dessas células sob a forma de rosetas, para o estabelecimento de um reservatório extracelular de secreção comum. Esse processo de estabelecimento de um domínio glandular se dá até 72 horas após a pupação, em que

ocorre a morte de algumas células desse complexo e o aumento do lúmen do reservatório comum, adquirindo a morfologia e organização já encontrada no adulto (Mayhew & Merritt 2013).

O mais interessante encontrado na análise do desenvolvimento da espermateca de *D. melanogaster* é que o estabelecimento da estrutura espermatecal se dá inicialmente por multiplicação e posterior refinamento do número dessas células, por meio de processos ainda não muito bem elucidados de morte celular (Mayhew & Merritt 2013). Adicionalmente, a formação do ducto espermatecal, bem como o desenvolvimento das glândulas espermatecais necessitam de ser esclarecidas pelo meio da microscopia eletrônica (Mayhew & Merritt 2013).

## **2. Justificativa**

A alta taxa reprodutiva dos culicídeos é um fator determinante em sua capacidade vetorial. A maior parte do sucesso reprodutivo da fêmea é resultado de uma cópula única, que é suficiente para adquirir espermatozoides para fertilizar seus ovos por toda a vida. A incapacidade de substituir os gametas velhos ou defeituosos significa que as fêmeas possuem um mecanismo altamente eficiente para a manutenção da viabilidade dos espermatozoides em seu interior (Rogers et al. 2008). Essa capacidade é atribuída às funções da espermateca por criar um ambiente adequado através da proteção física e do fornecimento de nutrientes a esses gametas (Jones & Wheeler 1965, Klowden & Chambers 2004, Pascini et al. 2012, Chapman 2013).

Mosquitos hematófagos realizam uma ou sucessivas ingestões de sangue, as quais são pré-requisitos para o desenvolvimento dos ovos. Em consequência da digestão do sangue, radicais livres são formados, o que pode ser danoso para os espermatozoides. Nesse sentido, as espermatecas cumprem papel crucial para proteção dos gametas (Catteruccia et al. 2005, Akbari et al. 2013). Porém, seu processo de desenvolvimento ainda não tinha sido estudado.

## **3. Objetivo**

O presente trabalho investigou o desenvolvimento da espermateca de *A. aegypti* do início do processo de pupação até a fase adulta.

## **4. Materiais e Métodos**

### **4.1. Mosquitos**

Os mosquitos *A. aegypti*, da linhagem PP-Campos, Campos dos Goytacazes (RJ, Brasil), foram obtidos de colônias mantidas no insetário do Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal de Viçosa. As larvas foram alimentadas com ração de tartaruga ReptoLife®, as pupas fêmeas foram separadas e emergiram em gaiolas apropriadas. Os adultos foram criados com um fotoperíodo de 12:12 (luz/escurecimento) e com umidade relativa de 70-80%.

### **4.2. Dissecção**

Foram separados indivíduos no início do processo de metamorfose (pupa branca), pupas com 24 horas, 48 horas e 72 horas de idade contadas a partir da ecdise, além de fêmeas adultas imediatamente após sua emergência (recém-emergidas). As fêmeas foram dissecadas em solução salina, e as espermatecas retiradas do último seguimento abdominal. As espermatecas foram fixadas em solução de glutaraldeído 2,5% em sacarose 4% e tampão cacodilato 0,1 M pH 7,2, e mantidas em fixador a 4° C até a desidratação.

Para a montagem total, as amostras fixadas foram lavadas em PBS 0,1 M pH 7,2, montadas em lâminas com meio Mowiol (Login et al. 1993) e armazenadas em geladeira. As lâminas foram observadas e fotografadas usando o microscópio de luz com câmera acoplada Olympus BX53 do Laboratório de Sistemática Molecular do Departamento de Biologia Animal da UFV.

Para realizar os cortes histológicos as amostras foram desidratadas em solução crescente de etanol e infiltradas em historesina Leica pura sem endurecedor. Após a infiltração, as amostras foram embebidas em historesina com endurecedor em molde de polipropileno, ao abrigo do ar e à temperatura ambiente por no mínimo 40 minutos, de acordo com protocolo do fabricante.

Os blocos de resina polimerizada contendo as amostras foram seccionados a 3 µm com o auxílio de um micrótomo alocado no Departamento de Biologia Geral da UFV com navalhas de vidro. As secções foram coradas com hematoxilina e eosina (HE). As lâminas foram montadas com Eukit® (Fluka), observadas e fotografadas no mesmo microscópio de luz citado anteriormente.

### 4.3. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

As espermatecas fixadas foram pós-fixadas por uma hora em tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato pH 7,2. Após a pós-fixação, as espermatecas foram lavadas com água destilada e contrastadas por 2 horas em solução aquosa de acetato de uranila 3%, lavadas com água destilada e desidratadas em solução crescente de etanol (70-100%). As amostras foram pré-infiltradas em solução de resina LRWhite® (EMS) e etanol 100% (1:1) por 2 horas. Posteriormente, os exemplares foram embebidos em resina pura LRWhite® (EMS) *overnight* à temperatura ambiente ( $\pm 25^{\circ}\text{C}$ ), seguido de sua polimerização em cápsulas de gelatina [Electron Microscopy Sciences (EMS), Hatfield, PA, USA] por 24h a  $60^{\circ}\text{C}$  (Snelling et al. 2011). Após a polimerização, foram obtidas secções semifinas ( $\sim 700$  nm) e ultrafinas (70-90 nm) no ultramicrotomo com o auxílio de navalha de diamante. As secções semifinas foram coradas com azul de toluidina 1% sobre placa aquecida. As secções ultrafinas foram coletadas em grades de cobre (300 *mesh*), observadas e fotografadas no MET Zeiss EM 109 do Núcleo de Microscopia e Microanálises da UFV.

### 4.4. Morfometria

Nas secções histológicas de 10 indivíduos nos diferentes grupos de fêmeas de *A. aegypti* (item 4.1) foi medido o diâmetro do lúmen do reservatório e do ducto espermatecal, bem como a espessura da camada cuticular presente no interior dessas estruturas com o auxílio do Programa Image Pro Plus®.

## 5. Resultados

As fêmeas de *A. aegypti* possuem três espermatecas, uma maior mediana e outras duas menores laterais, se apresentando como uma estrutura revestida internamente por uma espessa cutícula, sendo subdividida em diferentes partes: o reservatório, o componente glandular e o ducto espermatecal contendo fibras musculares ao seu redor. O desenvolvimento dessas três espermatecas e suas partes correspondentes durante o período de pupação ocorre simultaneamente. A seguir a estrutura das espermatecas será descrita em ordem cronológica da pupação até o início da fase adulta.

#### – 24 horas após a pupação

Até esse período não se observou nenhuma estrutura que sugerisse um primórdio espermatecal, somente um aglomerado celular, indistinguível entre si. A partir de 24 horas de pupação, as espermatecas se apresentam como brotamentos em desenvolvimento na base do oviducto comum (Fig. 3A). O reservatório da espermateca maior possui um diâmetro de  $66,11 \pm 6,3 \mu\text{m}$  (Fig. 3B), e o das espermatecas menores possui diâmetro de  $48,7 \pm 4,4 \mu\text{m}$ , esses de aspecto translúcido. Não se observa nesse período cutícula ou secreção no lúmen dessa estrutura (Fig. 3C).

A parede do reservatório se encontra com espessura variada, cheio de reentrâncias, com células com cromatina descondensada e seu citoplasma cheio de reentrâncias (Fig. 3C). Nesse momento, não se observa diferença entre as células epiteliais do reservatório e as células que compõe a glândula espermatecal (Figs. 3B e 3C).

O ducto espermatecal já se encontra bem estruturado, possuindo um lúmen com diâmetro de  $3,88 \pm 0,2 \mu\text{m}$ , vazio e repleto de reentrâncias em seu interior (Fig. 3D). Não se observa cutícula no interior do ducto espermatecal. As fibras musculares se encontram arranjadas ao redor dessa estrutura longitudinalmente, organização também observadas nos próximos períodos analisados. Entre as células glandulares do ducto espermatecal, há células parecendo estar em processo de morte (Fig. 3E).

#### – 48 horas após a pupação

Nas pupas com 48 horas de desenvolvimento, as espermatecas já se apresentam com sua estrutura bem definida localizadas na porção central do oitavo segmento abdominal, com  $81,4 \pm 3,6 \mu\text{m}$  e  $63,4 \pm 2,03 \mu\text{m}$  de diâmetro para o reservatório da espermateca maior e menores, respectivamente (Figs. 4A e 4B). Essas se apresentam “murchas”, translúcidas, quando comparadas às encontradas nos períodos subsequentes.

O reservatório espermatecal apresenta em seu interior uma cutícula já bem evidente com espessura de  $0,76 \pm 0,1 \mu\text{m}$ , compreendendo 10 camadas dispostas em cinco camadas mais elétrons-densas alternadas com outras cinco camadas menos elétrons-densas (Fig. 4C). O reservatório é composto por células epiteliais achatadas, com núcleo apical, apresentando cromatina descondensada, nucléolo evidente e citoplasma com estruturas membranosas e convolutas, rico em mitocôndrias (Figs. 4D e 4F); além da presença de corpos multivesiculares (Fig. 4E). Na região apical dessas células são encontradas pequenas vesículas contendo material elétron-denso semelhante ao encontrado na cutícula, evidenciando ainda o processo de deposição cuticular. As

junções intercelulares são bem evidentes e imersas num material elétron-denso presente nessa região (Fig. 4H).

As células glandulares, já se encontram localizadas na região de junção ducto/reservatório estabelecendo o domínio da glândula spermatecal a partir de 48 horas após o início da pupação (Figs. 4C e 4D). Essas células apresentam núcleo basal com cromatina descondensada e citoplasma repleto de mitocôndrias, principalmente de perfil circular e um retículo endoplasmático rugoso bem desenvolvido, além de microvilosidades na região apical (Fig. 4D). As junções, tanto entre as células glandulares quanto entre essas e as células epiteliais adjacentes, são bem evidentes por apresentarem maior elétron-densidade. As microvilosidades apresentam-se envoltas por uma substância elétron-densa, principalmente circundando a região onde se acredita originar o ducto da célula glandular, em que há um maior depósito dessa mesma substância (Fig. 4H). Há ainda, na região próxima às células glandulares a presença de células apresentando núcleo desestruturado/picnótico, cromatina fragmentada e membrana plasmática convoluta, sugerindo estarem em processo de morte celular (não mostrado).

O ducto spermatecal apresenta o lúmen com diâmetro de  $4,16 \pm 0,03 \mu\text{m}$ , mais distendido, preenchido em seu interior por uma maior quantidade de substância elétron-densa já encontrada 24 horas após a pupação. A cutícula ainda se apresenta em processo de deposição, com  $1,03 \pm 0,2 \mu\text{m}$  de espessura. O epitélio é composto por células epiteliais colunares bem espaçadas, com núcleo de cromatina descondensada, nucléolo evidente, mitocôndrias alongadas dispostas por toda a célula e uma maior concentração de microvilosidades na região apical, próxima à camada cuticular (Figs. 4G e 4H). As células glandulares do ducto spermatecal, como já descrito no período anterior, apresentam seu núcleo evidente, com cromatina descondensada e um retículo endoplasmático bem evidente, a única diferença é a ausência dos corpos multivesiculares (Fig. 4I). As fibras musculares estão dispostas externamente ao longo de todo o comprimento dessa estrutura, como já descrito no período anterior (Fig. 4G).

**Figura 3:** Montagem total [A], secção histológica [B] e micrografias eletrônicas de transmissão [C a E] evidenciando as espermatecas das fêmeas de *A. aegypti* com 24 horas de pupação.

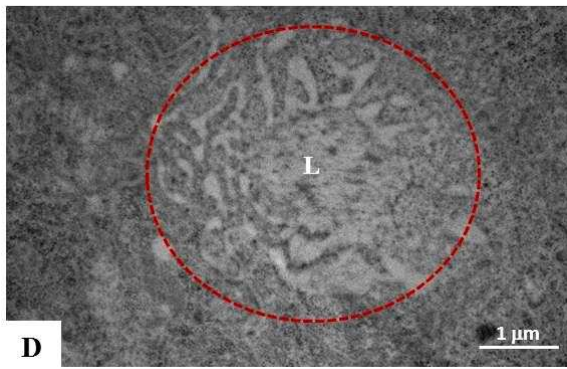
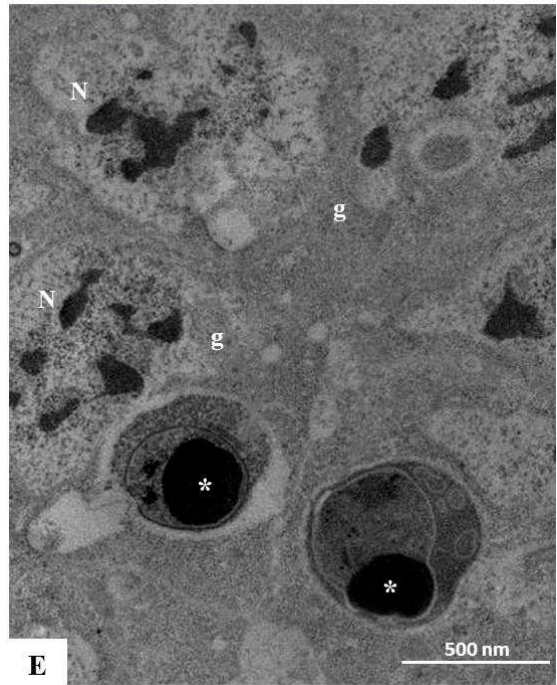
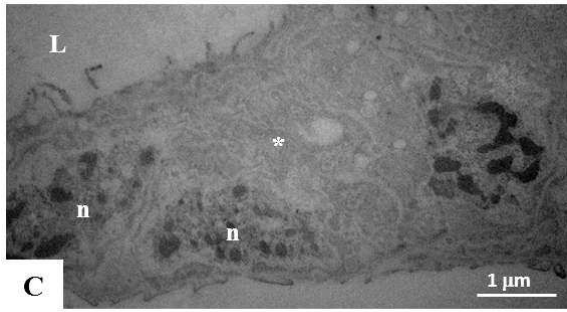
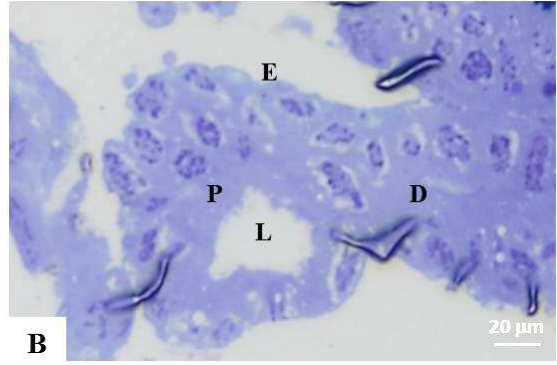
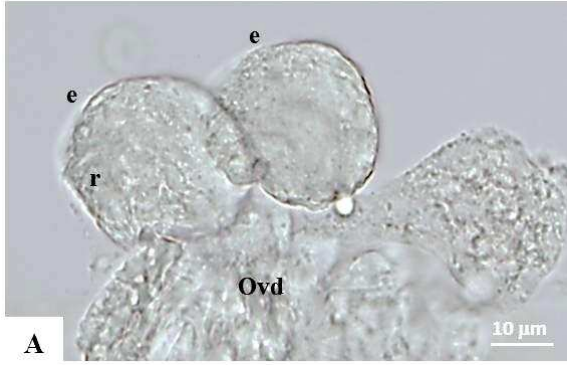
**A:** Visão geral do reservatório (r) das duas espermatecas menores (e) próximas do oviducto comum (Ovd).

**B:** Seção semi-fina corada com azul de toluidina evidenciando a parede (P) do reservatório da espermateca maior (E) circundando seu lúmen (L) com o ducto espermatecal (D) desembocando nessa estrutura.

**C:** Detalhe de uma região da parede do reservatório espermatecal apresentando suas células com seu núcleo (n) bem evidente e o citoplasma apresentando várias reentrâncias (asterisco).

**D:** Detalhe de uma região do lúmen do ducto espermatecal (L) “murcho”, apresentando a membrana plasmática das células epiteliais bastante convolutas (círculo vermelho).

**E:** Detalhe da região das células glandulares do ducto espermatecal (g), apresentando seu núcleo (N) contendo cromatina descondensada. Observam-se ainda células que provavelmente estão em processo de morte celular (\*).



**Figura 4:** Montagens totais [A e B], secção histológica [C] e micrografias eletrônicas de transmissão [D a I] evidenciando as espermatecas de *A. aegypti* após 48 horas de pupação.

**A:** Visão geral de duas espermatecas: uma maior (E) e uma menor (e), evidenciando o reservatório espermatecal (r), a região da glândula espermatecal (G), ducto espermatecal (D) e as células glandulares do ducto espermatecal (g).

**B:** Detalhe da região do reservatório espermatecal (r) onde desemboca o ducto espermatecal (D), apresentando suas células glandulares (g) e a região da glândula espermatecal (G).

**C:** Secção histológica evidenciando a região onde o ducto espermatecal (D) desemboca no reservatório, e as células da glândula espermatecal (G) dispostas nessa região, apresentando seu ducto (cabeça de seta).

**D:** Detalhe de uma região do reservatório espermatecal com as células epiteliais (ep) circundando o lúmen (L), já apresentando uma fina camada cuticular (c). Acima se observa as células glandulares (G) com seu núcleo (N) contendo cromatina descondensada e o retículo endoplasmático bem desenvolvido.

**E:** Detalhe de um corpo multivesicular (área sublinhada em vermelho) presente na região do epitélio do reservatório espermatecal (ep), ao redor do lúmen (L) do reservatório espermatecal. Na região entre a cutícula e as células epiteliais observa-se os processos celulares (asterisco) que parecem estar relacionando com o processo de deposição cuticular.

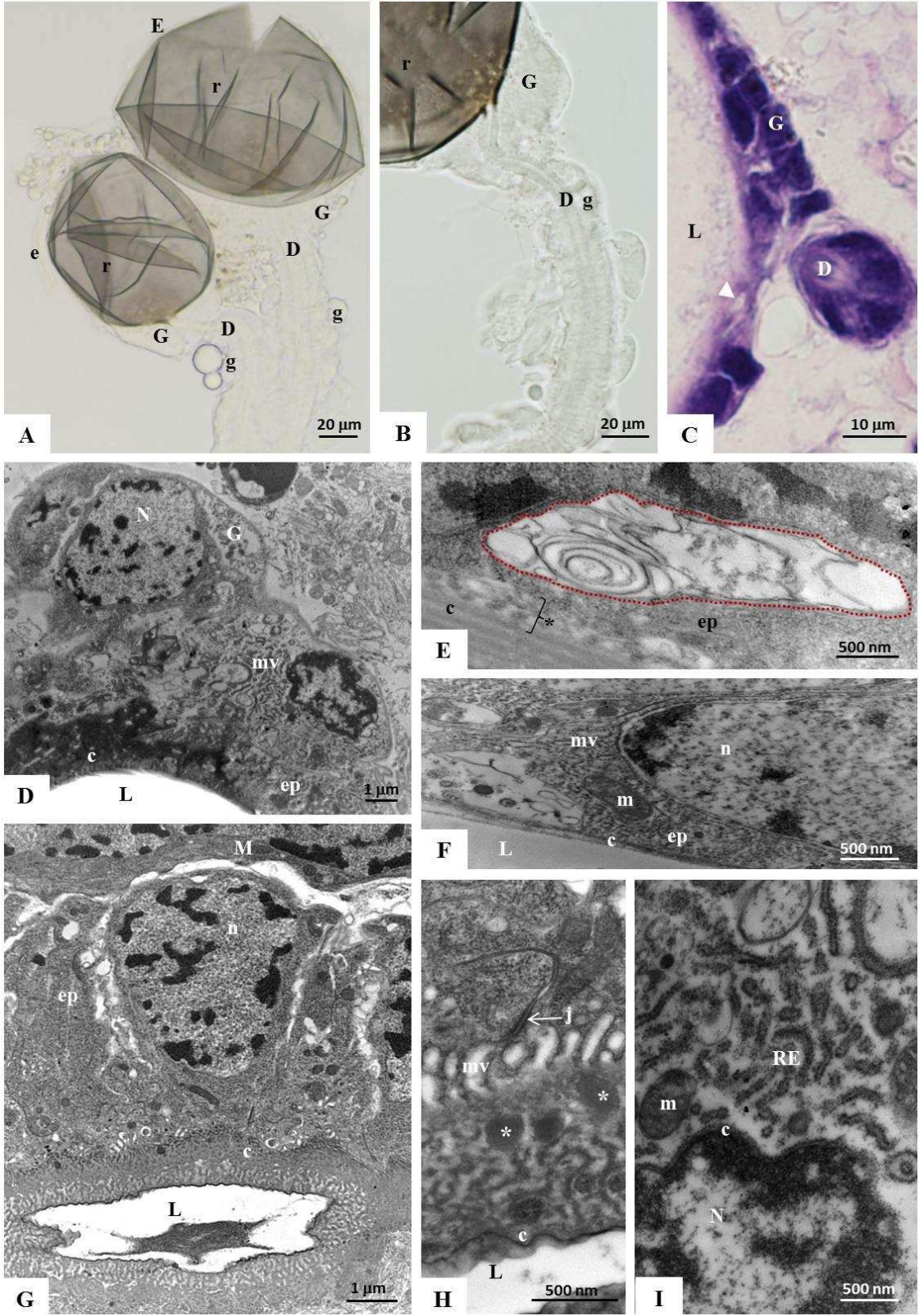
**F:** Detalhe de uma região de uma célula epitelial achatada (ep), apresentando núcleo alongado (n), com cromatina descondensada em seu interior, mitocôndrias em seu citoplasma e o lúmen do reservatório (L) revestido por uma espessa camada cuticular (c).

**G:** Detalhe do ducto espermatecal (D), apresentando suas células epiteliais altas (ep) com o núcleo (n) contendo cromatina descondensada, circundando o lúmen do ducto espermatecal (L) revestido por uma camada cuticular (c). Ao redor do ducto observam-se fibras musculares dispostas longitudinalmente (M).

**H:** Detalhe do epitélio do ducto espermatecal, evidenciando seu citoplasma apresentando microvilosidades (mv), e processos celulares contendo um material elétron-denso (asterisco) e as junções celulares bem evidentes (j).

**I:** Detalhe de uma célula glandular do ducto espermatecal apresentando seu núcleo (N) com cromatina descondensada e seu citoplasma repleto de mitocôndrias (m),

apresentando um retículo endoplasmático (RE) bem desenvolvido.



#### – 72 horas após a pupação

As pupas de 72 horas apresentam suas espermatecas com reservatório marrom, mais rígido e com  $83,84 \pm 2,02 \mu\text{m}$  e  $65,58 \pm 1,16 \mu\text{m}$  de diâmetro da espermateca maior e das espermatecas menores, respectivamente (Figs. 5A e 5B). O reservatório é bem semelhante ao já descrito no período anterior, apresentando células epiteliais achatadas, com núcleo evidente na região apical da célula, cromatina descondensada e seu citoplasma repleto de mitocôndrias com aspecto alongado e uma grande quantidade de microvilosidades, principalmente na região basal, próximo aos ductos celulares (Figs. 5C e 5D). Observam-se as junções intercelulares elétron-densas bem evidentes e um menor espaço intercelular que nos períodos anteriores.

O lúmen do reservatório contém uma secreção de aspecto floculento e possui uma camada cuticular com  $0,77 \pm 0,3 \mu\text{m}$  de espessura, contendo 14 camadas, alternadas entre sete camadas mais elétron-densas com outras sete de menor elétron-densidade (Fig. 5F). As células glandulares nesse período apresentam-se bem evidentes, e com seus núcleos contendo cromatina descondensada e nucléolo evidente. Seu citoplasma é bem volumoso, e a membrana celular apresenta microvilosidades envoltas por uma substância elétron-densa (Fig. 5C). Ainda, na região do citoplasma dessas células próxima à cutícula, se observa uma grande quantidade de material elétron-denso, onde possivelmente formará o ducto da célula glandular (Figs. 5C e 5E), observado no próximo período analisado.

O ducto espermatecal se encontra sinuoso, bem desenvolvido, apresentando um lúmen com  $4,88 \pm 0,7 \mu\text{m}$  de diâmetro, envolto por uma cutícula com  $1,06 \pm 0,03 \mu\text{m}$  de espessura e preenchido por uma maior quantidade da secreção floculenta (Figs. 5G e 5H), já observada nos períodos anteriores. O epitélio, as células glandulares e as fibras musculares dispostas ao redor do ducto espermatecal apresentam as mesmas características observadas no período anterior.

#### – Adulto recém-emergido

As espermatecas dos adultos recém-emergidos apresentam-se como órgãos com aspecto esférico, marrom e rígido, em que o reservatório espermatecal maior possui diâmetro de  $87,45 \pm 1,02 \mu\text{m}$  e os menores, diâmetro de  $64,20 \pm 3,06 \mu\text{m}$  (Fig. 6A). O lúmen do reservatório é preenchido pela secreção de aspecto floculento e circundado por uma cutícula de  $0,77 \pm 0,2 \mu\text{m}$  de espessura, apresentando 14 camadas, sendo sete mais elétron-densas intercaladas com outras sete camadas de menor elétron-densidade (Figs. 6B e 6E), semelhante ao período anterior. São observadas regiões de interrupção

da cutícula mais evidentes localizadas onde os ductos das células glandulares desembocam no lúmen do reservatório (Fig. 6C).

O epitélio do reservatório é composto por células achatadas apresentando núcleo com cromatina descondensada, mitocôndrias alongadas e uma grande quantidade de microvilosidades localizadas em sua porção apical, além de apresentarem suas junções intercelulares bem evidentes (Fig. 6E). Essas características também foram observadas antes do final da fase pupal, como descrita para pupas de 72h.

As células constituintes da glândula espermatecal possuem o núcleo com cromatina descondensada e citoplasma repleto de mitocôndrias de perfil circular e um retículo endoplasmático bem desenvolvido (Figs. 6D e 6F).

O epitélio do ducto espermatecal apresenta organização semelhante à encontrada no período anterior da pupação, porém, com um lúmen maior, com de  $5,02 \pm 1,02 \mu\text{m}$  de diâmetro e uma cutícula mais espessa com  $1,61 \pm 0,3 \mu\text{m}$  (Figs. 6H e 6I). As células glandulares do ducto apresentam uma maior concentração de microvilosidades na região apical da célula, principalmente ao redor de seu ducto (Fig. 6J). Há ainda, na região das células glandulares ao redor do ducto, células com cromatina condensada com aspecto de morte celular, aparentando estarem em processo de morte celular (Fig. 6G).

**Figura 5:** Montagem total [A], secção histológica [B] e micrografias eletrônicas de transmissão [C a H] evidenciando as espermatecas de *A. aegypti* após 72 horas de pupação.

**A:** Visão geral do reservatório espermatecal apresentando regiões mais claras (seta), onde se localizam as interrupções da cutícula onde se encontram os ductos das células glandulares e a região onde o ducto espermatecal desemboca no reservatório (D).

**B:** Corte histológico tangencial corado com HE evidenciando o lúmen (L) do reservatório espermatecal, apresentando uma espessa cutícula (c). Na região da glândula espermatecal (G), observam-se as regiões mais claras na cutícula (seta) correspondentes ao local onde desemboca o ducto da célula glandular.

**C:** Detalhe de uma região do reservatório espermatecal apresentando seu lúmen (L) circundado por uma camada cuticular (c), evidenciando células glandulares (G) com seu núcleo (N) contendo cromatina descondensada e a presença de material osmiofílico próximo à cutícula do reservatório (\*), onde se acredita serem formados os ductos das células glandulares.

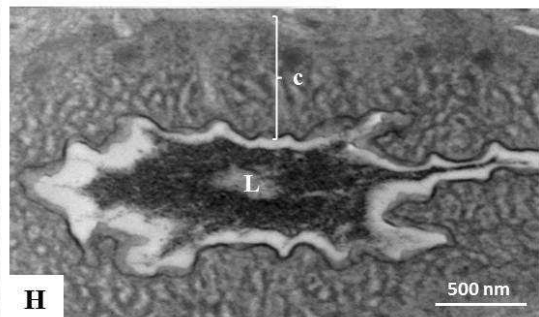
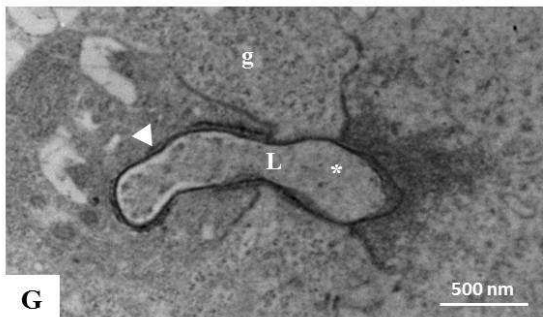
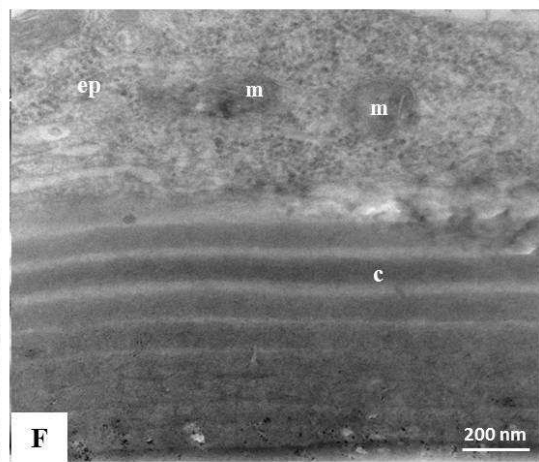
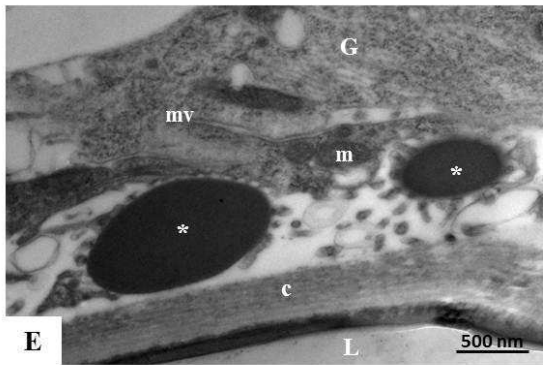
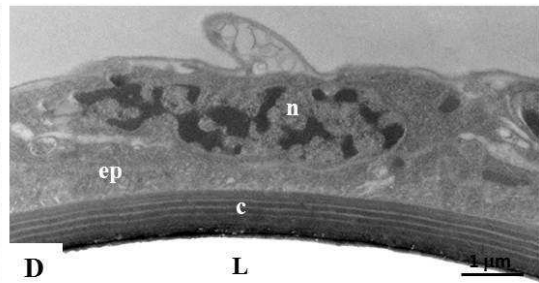
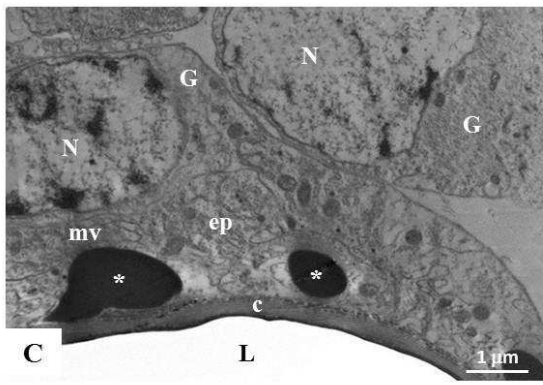
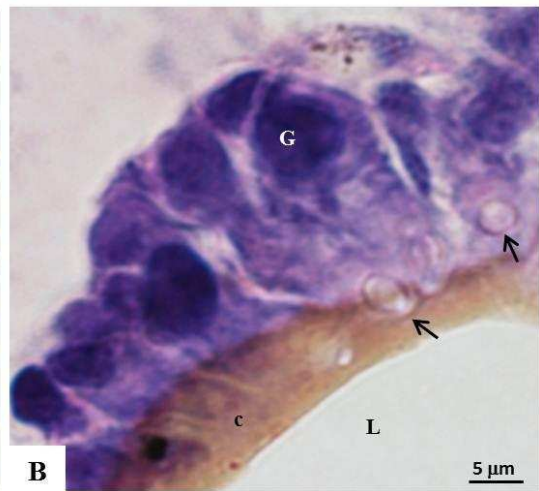
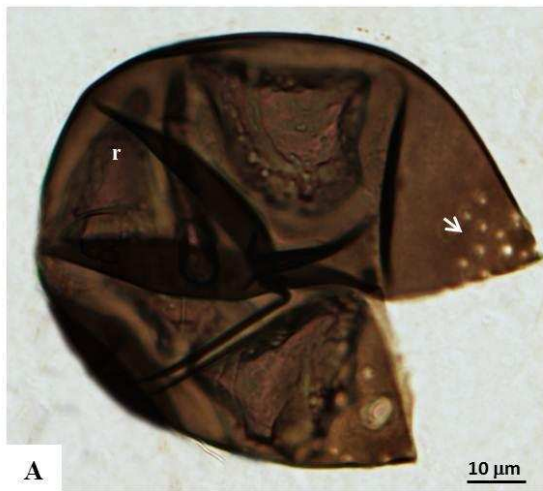
**D:** Detalhe de uma região do epitélio do reservatório espermatecal evidenciando uma célula epitelial mais achatada (ep), apresentando núcleo alongado (n), com cromatina descondensada em seu interior, circundando o lúmen do reservatório (L), que é revestido por uma espessa camada cuticular (c).

**E:** Detalhe da região do citoplasma de uma célula glandular (G) do reservatório espermatecal com mitocôndrias e apresentando deposição de um material elétron-denso (\*) na região próxima à cutícula (c) do reservatório espermatecal e muitas microvilosidades (mv).

**F:** Detalhe da cutícula do reservatório espermatecal, evidenciando suas camadas (c).

**G:** Detalhe da região do ducto da célula glandular do ducto espermatecal (g), apresentando seu lúmen (L) revestido por uma camada cuticular delgada (cabeça de seta) e contendo um material elétron-denso em seu interior (\*).

**H:** Detalhe de uma região do lúmen (L) do ducto espermatecal, apresentando uma camada cuticular (c) bastante espessa e a presença de uma secreção de aspecto floculento em seu interior (\*).



**Figura 6:** Montagem total [A], secções histológicas [B e C] e micrografias eletrônicas de transmissão [D a J] evidenciando as espermatecas de fêmeas de *A. aegypti* recém-emergidas.

**A:** Visão geral das três espermatecas: uma maior e duas menores. Observa-se ainda, ducto (D) desembocando no reservatório espermatecal (r).

**B:** Secção histológica corada com HE evidenciando o reservatório (r) das três espermatecas, evidenciando seu lúmen (L), que é revestido internamente uma espessa cutícula (c) e a região do ducto espermatecal (D).

**C:** Detalhe da porção do reservatório próxima à glândula espermatecal (G), onde se observa as interrupções na cutícula (c) por onde desembocam os ductos das células glandulares (seta).

**D:** Detalhe de uma região da glândula espermatecal (G), com células glandulares apresentando seu núcleo (N) contendo cromatina descondensada. Ainda observa-se uma célula epitelial adjacente ligada à célula glandular circundando o lúmen do reservatório espermatecal (L) que está revestido por uma espessa cutícula (c), apresentando secreção floculenta em seu interior (asterisco).

**E:** Detalhe do reservatório espermatecal evidenciando uma célula epitelial achatada (cp), com núcleo (n) alongado e contendo cromatina descondensada, circundando o lúmen dessa estrutura (L), sendo revestido por uma espessa cutícula (c).

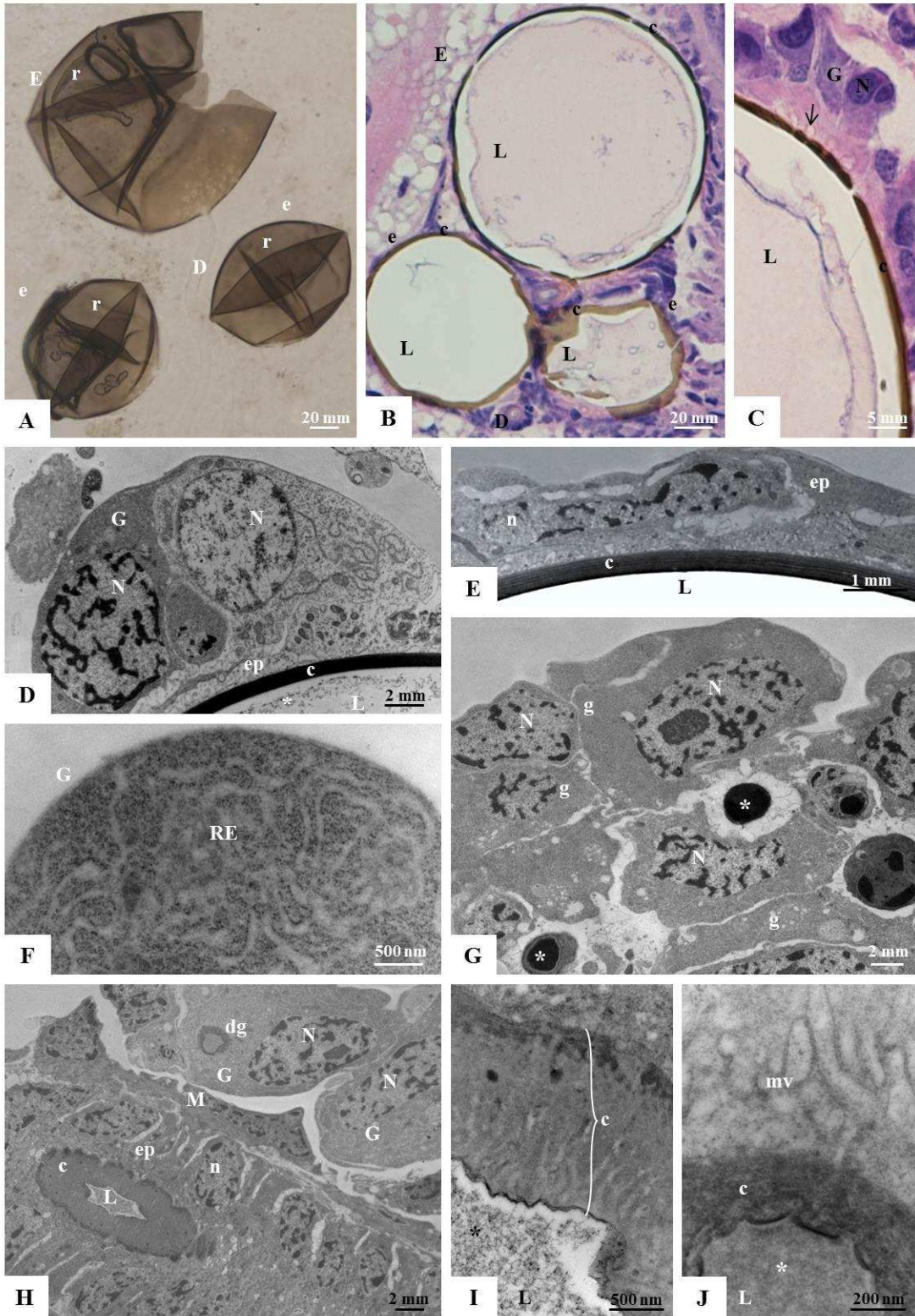
**F:** Detalhe do citoplasma de uma célula glandular constituinte da glândula espermatecal (G) preenchido por um retículo endoplasmático bem desenvolvido em seu interior (RE).

**G:** Detalhe de uma região do ducto espermatecal contendo células glandulares (g), apresentando seu núcleo (N) com cromatina descondensada. Observa-se ainda nessa região, células aparentam estar em processo de morte celular (\*).

**H:** Detalhe de uma região do ducto espermatecal com suas principais estruturas: uma camada de células epiteliais (ep) apresentando seu núcleo bem evidente (n), circundando o lúmen do (L) revestido por uma espessa cutícula (c), preenchido em seu interior por uma secreção elétron-densa. Ao redor das células epiteliais observam-se células musculares (M) e células glandulares (G) evidenciando seus ductos (dg).

**I:** Detalhe de uma região do lúmen (L) do ducto espermatecal, evidenciando sua espessa cutícula (c) e a presença de uma secreção de aspecto floculento em seu interior (\*).

**J:** Detalhe da região do ducto espermatecal evidenciando o ducto da célula glandular, apresentando seu lúmen (L) revestido por uma camada cuticular (c), contendo um material elétron-denso em seu interior, circundado por microvilosidades (mv).



## 6. Discussão

Para elucidar o processo de desenvolvimento do aparelho reprodutor feminino de um inseto é necessário acompanhar a migração dos primórdios teciduais que vão originar todas as estruturas no adulto (Christophers 1960), relato comprovado pela análise do desenvolvimento espermatecal durante a pupação de *D. melanogaster* (Mayhew & Merritt 2013), onde se observou a estruturação e migração dos primórdios formadores da espermateca. Já para *A. aegypti*, os formadores dos primórdios espermatecais, os discos imaginais, se tornam evidentes no último instar larval e no início do da pupação; característica que não foi evidente, sendo que nesse mesmo período analisado (Christophers 1960).

Em *A. aegypti* o primórdio espermatecal se origina por meio de uma invaginação de um disco imaginal localizado na lateral da parede corporal e que ocorre de forma parecida ao descrito para *D. melanogaster* (Mayhew & Merritt 2013), até o período de 24 horas após a pupação, em que primeiramente ocorre a formação de um prolongamento a partir da região onde se encontram o disco imaginal em direção à região central do abdômen. Esse prolongamento se estrutura como um tubo com extremidade cega, a partir daí, a extremidade distal dessa estrutura se dilata dando origem ao reservatório espermatecal. O prolongamento que desemboca no reservatório espermatecal origina o ducto espermatecal, iniciando o processo de deposição cuticular no interior de seu lúmen por suas células epiteliais e a organização das células glandulares ao seu redor. Esse mesmo processo de formação do ducto espermatecal também é observado em *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) (Happ & Happ 1977), onde à medida em que esta estrutura vai crescendo, a camada cuticular vai sendo depositada ao redor de seu lúmen e já se observa os prolongamentos das células glandulares para a formação de seus ductos.

Durante o desenvolvimento espermatecal em *A. aegypti* não se observou as alterações morfológicas descritas para *D. melanogaster*, quando a espermateca com 24 horas de pupação apresenta formato de trevo, que em seguida assume um formato esférico após 48 horas de pupação e, passando por uma mudança brusca às 60 horas, quando a espermateca adquire formato cogumelar e, que se expande adquirindo formato alongado, semelhante ao observado nas fêmeas adultas (Mayhew & Merritt 2013). Em *A. aegypti*, há expansão do reservatório esférico, seguido de seu escurecimento em função do processo de cuticulogênese e esclerotização, além de um crescimento em

comprimento do ducto e da glândula espermatecal, possibilitando o rápido desenvolvimento desse órgão durante o período pupal.

Ao longo do processo de pupação, as células epiteliais e glandulares da espermateca de *A. aegypti* apresentam núcleo com cromatina descondensada, nucléolo evidente, citoplasma contendo retículo endoplasmático bem desenvolvido, mitocôndrias e muitas microvilosidades, sugerindo alta atividade metabólica (Clements & Potter 1967, Pascini et al. 2012); características que também são observadas durante esse processo em *A. suspensa* (Fritz & Turner 2001) e *D. melanogaster* (Mayhew & Merritt 2013). Essas características aliadas à presença de microvilosidades estão relacionadas com a atividade secretória das células constituintes da espermateca, seja para a produção dos componentes para a formação da cutícula pelas células epiteliais ou no processo de secreção de substâncias nutritivas para os espermatozoides lançadas no interior do lúmen do reservatório pelas glândulas espermatecais como em *B. morio* (Schoeters & Billen 2000). Em *A. suspensa*, se acredita que as microvilosidades também tenham função osmorregulatória, absorvendo o excesso de água, concentrando as secreções glandulares antes de serem liberadas para o lúmen do reservatório espermatecal (Fritz & Turner 2001).

O processo de formação dos ductos das células glandulares parece divergir bastante entre os insetos. Foi observado em *A. aegypti* que esses ductos são formados individualmente no citoplasma das células glandulares, formando interrupções na cutícula do reservatório por onde são lançadas suas secreções (Pascini et al. 2012), diferentemente, do que ocorre em *Anopheles aquasalis* (Diptera: Culicidae), onde esses ductos se formam por protrusões que vão de encontro ao reservatório, gerando um afinamento na cutícula dessa estrutura (Pascini et al. 2013). E ainda, esse processo em *T. molitor* é bem curioso, no qual logo após o processo de multiplicação e diferenciação das células glandulares, essas formam processos ciliares que se mantêm entre as células epiteliais e, quando o reservatório se encontra estruturado, esses processos se desfazem, originando os ductos das células glandulares (Happ & Happ 1977).

Pelo fato de o *A. aegypti* apresentar um curto período de pupação, a cuticulogênese em sua espermateca se inicia logo após o início da pupação, diferindo de *T. molitor*, em que ocorre entre o oitavo e o nono dias de pupação (Happ & Happ 1977). Esse processo de deposição de cutícula é semelhante ao que ocorre durante a formação do exoesqueleto dos insetos, com destaque para o complexo de microvilosidades formado pela invaginação da membrana plasmática nas células epiteliais, o que se

acredita ter a função de aumentar a superfície secretória e direcionar as vesículas contendo os componentes cuticulares (Nation 2008, Chapman 2013). As diferenças de elétrons-densidades observadas entre as camadas da cutícula podem ser explicadas pela diferença de seus constituintes, bem como esses apresentarem diferentes concentrações (Hopkins 1992, Chapman 2013). Essa espessa cutícula encontrada no interior da espermateca de *A. aegypti* parece garantir uma proteção, seja contra choques mecânicos, alterações no meio externo ou até mesmo patógenos oriundos da hemolinfa, isolando os espermatozoides em seu interior; estabelecendo assim, juntamente com as secreções glandulares, um meio propício para alocação desses gametas até o momento da fertilização dos ovos (Clements & Potter 1967, Jones & Wheeler 1975).

Nas fêmeas de *A. aegypti* com 24 horas de pupação, observou-se estruturas semelhantes a corpos multivesiculares, no citoplasma das células epiteliais componentes do reservatório espermatecal, contendo um material elétron-denso semelhante ao encontrado na cutícula, sugerindo sua função no encaminhamento dos componentes para o processo de deposição cuticular (Hanson & Cashibar 2012). Os corpos multivesiculares são estruturas ainda pouco estudadas que são formadas quando a membrana de um endossomo se invagina formando brotamentos que vão em direção ao lúmen. A principal função dessas estruturas é encaminhar substâncias no meio intracelular que serão degradadas, sugerindo seu papel como mediadoras da autofagia. Além disso, os corpos multivesiculares podem estar associados a diferentes vias de acúmulo e posterior liberação de substâncias para o exterior da célula (Piper & Katzmann 2007, Hanson & Cashibar 2012).

A secreção de aspecto floculento encontrada às 48 horas de pupação no lúmen do ducto espermatecal e com 72 horas no lúmen do reservatório, parece se acumular aos poucos e ser semelhante à secreção encontrada no interior das espermatecas de fêmeas adultas, aptas para a cópula. A presença dessa secreção tanto no ducto espermatecal quanto no reservatório nos períodos iniciais de desenvolvimento parece promover a abertura do espaço onde vai ser formado o lúmen dessas estruturas, que posteriormente vai sofrer o processo de deposição cuticular (Clements & Potter 1967, Jones & Fischman 1970). Essa secreção pode variar em função do organismo em que é produzida, podendo ser mais bem caracterizada por meio de técnicas como o transcriptoma, onde se obtêm os genes expressos nesse órgão, permitindo a partir daí, inferir quais processos estão envolvidos na estruturação da espermateca e por quais destes os espermatozoides estão sujeitos durante sua alocação no interior dessa estrutura

(Collins et al. 2004, Heimpel & Boer 2008, Prokupek 2008).

Quarenta e oito horas após a pupação, células encontradas juntamente com as células da glândula espermatecal apresentam seu núcleo com cromatina altamente condensada e fragmentada, sugerindo que essas células estejam no processo de morte (Clarke 1990, Ziegler & Groscurth 2004). Já se sabe que no desenvolvimento dos organismos ocorrem inúmeros processos de morte e proliferação celular, onde uma estrutura temporária cede espaço para o desenvolvimento de uma estrutura semelhante, de caráter definitivo. Sob o microscópio eletrônico, podemos observar as células em processo de apoptose com seu núcleo apresentando cromatina condensada, dito picnótico, iniciando seu processo de fragmentação. A evidência de que essas células observadas em *A. aegypti* nesse período, sejam células glandulares e estejam em processo de morte celular é ressaltada por Noirot & Quenedey (1991), que descrevem que no processo de desenvolvimento das unidades glandulares de classe III, ocorre uma rápida multiplicação celular, permitindo a estruturação do órgão, seguida de um grande acúmulo de secreção glandular em seu reservatório. Uma vez estruturado, em algumas células, inicia-se o processo de morte celular, fornecendo espaço para que as células adjacentes cresçam em volume. Esse mesmo processo foi observado durante o desenvolvimento da espermateca de *D. melanogaster*, sugerindo que ele esse processo seja conservado entre os dípteros (Mayhew & Merritt 2013).

De acordo com Noirot & Quenedey (1991), o processo de formação dos ductos na maioria das células glandulares de classe III pode envolver a produção de um ou mais processos ciliares temporários na estruturação de um órgão glandular, como o observado no desenvolvimento da espermateca de *T. molitor* (Happ & Happ 1977). Em *D. melanogaster*, foram observados processos celulares ricos em actina emitidos pelas células da glândula espermatecal indo em direção à camada cuticular, formando o ducto dessas células (Mayhew & Merritt 2013). Em *A. aegypti*, acreditamos que os ductos das células glandulares sejam formados nas regiões onde há um grande acúmulo de material elétron-denso evidente no citoplasma dessas células, com 72 horas de pupação. Nas fêmeas recém-emergidas, esse material passa a dar lugar então, ao o ducto das células glandulares, já apresentando seu lúmen preenchido por secreção de glandular. Ainda em *A. aegypti*, Jones & Fischman (1970), observaram a presença desse mesmo material elétron-denso nas células glandulares ainda em desenvolvimento das espermatecas de fêmeas recém-emergidas; bem diferente da secreção glandular no lúmen do reservatório.

O atraso na formação do reservatório quando comparado, nos mesmos períodos, com a formação do ducto espermatecal de *A. aegypti* também foi observada em *T. molitor* (Happ & Happ 1977) e em *D. melanogaster* (Mayhew & Merritt 2013), o que se acredita ser pelo fato de o ducto espermatecal ser formado primeiro, e, posteriormente na sua extremidade longitudinal ser formado o reservatório. Já nas fêmeas recém-emergidas de *A. aegypti*, as espermatecas se apresentam como estrutura semelhante à encontrada em fêmeas adultas; a pequena diferença entre o volume do reservatório encontrado pode ser devido ao fato de que logo após a emergência, a cutícula ainda se encontra em processo final de esclerotização (Clements & Potter 1967, Jones & Fishman 1970, Hopkins 1992, Pascini et al. 2012).

## 7. Conclusão

Nossos resultados indicam que as espermatecas de *A. aegypti*, logo no início do processo de pupação, são estruturas diminutas apresentando já o reservatório e ducto espermatecal. Com 24 horas de pupação, ocorre um aumento significativo no tamanho da espermateca, sofrendo o processo de deposição cuticular ao longo do reservatório. Passados 48 horas, se observa a glândula espermatecal bem evidente, o final do processo de deposição cuticular no reservatório e a presença de uma secreção floculenta no interior do lúmen do ducto espermatecal, o que poderia preencher o espaço e promover o crescimento desse lúmen. O aumento do volume do reservatório espermatecal prossegue nas 72 horas da pupação, e a sua cutícula apresenta todas as suas camadas formadas e o interior dos ductos das células glandulares preenchido pela secreção encontrada no ducto espermatecal no período anterior.

No que diz respeito à estrutura das espermatecas, as fêmeas de *A. aegypti* logo após sua emergência já se encontram aptas morfológica e funcionalmente para a cópula, onde as espermatecas apresentam seu reservatório, glândula e ducto espermatecal bem estruturados, características essenciais para desempenhar seu papel no armazenamento e manutenção da viabilidade dos espermatozoides em seu interior. Sendo assim, as descobertas aqui descritas são de fundamental importância para o entendimento da biologia reprodutiva desses mosquitos, podendo contribuir para a elucidação dos mecanismos pelos quais as fêmeas passam até se tornarem aptas para armazenar e manter os gametas em seu interior, fornecendo alvos para o desenvolvimento de técnicas que visam reduzir o sucesso reprodutivo desses organismos.

## 8. Referências Bibliográficas

- Cruz-Landim C & Serrão JE. 2002. Ultrastructure of the spermathecal gland of *Melipona bicolor* Lep. (Hymenoptera, Apinae, Meliponini). Brazilian Journal of Morphological Science 19:9-16.
- Akbari OS, Antoshechkin I, Amrhein H, Williams B, Diloreto R, Sandler J & Hay BA. 2013. The developmental transcriptome of the mosquito *Aedes aegypti*, an invasive species and major arbovirus vector. Genes/Genomics/Genetics (G3) 3:1493-1509.
- Barreto M, Burbano ME & Barreto P. 2008. Gynandromorphs in mosquitoes (Diptera: Culicidae) from Valle del Cauca, Colombia. Neotropical Entomology 37:296-300.
- Catteruccia F, Benton JP & Crisanti A. 2005. An *Anopheles* transgenic sexing strain for vector control. Nature Biotechnology 23(11):1414-1417.
- CDC: Centers of Disease Control and Prevention. 2013. Disponível em: [www.cdc.gov](http://www.cdc.gov). Acessado em 22 de Dezembro de 2013.
- Chapman RF. 2013. The insects: structure and function. Editora Cambridge University Press. 5ª edição. 683 págs.
- Christophers R. 1960. *Aedes aegypti* (L.), the yellow fever mosquito. Its life history, bionomics and structure. Cambridge University Press. New York. 314 págs.
- CIDRAP: Center for Infectious Disease Research and Policy. 2013. Researchers identify fifth dengue subtype. Disponível em: [www.cidrap.umn.edu](http://www.cidrap.umn.edu). Acessado em 10 de Junho de 2014.
- Clarke PGH. 1990. Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. Anatomy and Embryology (Berlin) 181:195-213.
- Clements AN & Potter SA. 1967. The fine structure of the spermathecae and their ducts in the mosquito *Aedes aegypti*. International Journal of Insect Morphology and Embryology 8(1):51-58.
- Collins AM, Williams V & Evans JD. 2004. Sperm storage and antioxidative enzyme expression in the honey bee, *Apis mellifera*. Insect Molecular Biology 13(2):141-146.
- Consoli RAGB & Oliveira LR. 1994. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Editora Fundação Instituto Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, Brasil. 1ª edição. 228 págs.
- Curtin TJ & Jones JC. 1961. The mechanism of ovulation and oviposition in *Aedes aegypti*. Annals of the Entomological Society of America 54(2):298-313.
- Dallai R, Valentina Z & Fanciulli PP. 2008. Fine structure of the spermatheca and of the

- accessory glands in *Oschesella villosa* (Collembola, Hexapoda). *Journal of Morphology* 269(9):1122-1133.
- Dumser JB. 1970. Evidence for a spermathecal hormone in *Rhodnius prolixus* (STAL). Department of Zoology. 78 págs.
- Fallon AM, Hagedorn HH, Wyatt GR & Laufer H. 1974. Activation of vitellogenin synthesis in the mosquito *Aedes aegypti* by ecdysone. *Journal of Insect Physiology* 20:1815-1823.
- Foster WA & Walker ED. 2009. In: *Medical and Veterinary Entomology*, capítulo: 14. Editora Elsevier. 637 págs.
- Fritz AH & Turner FR. 2002. A light and electron microscopical study of the spermathecae and ventral receptacle of *Anastrepha suspensa* (Diptera: Tephritidae) and implications in female influence of sperm storage. *Arthropod Structure and Development* 30(4):293-313.
- Giglioli MEC. 1963. The female reproductive system of *Anopheles gambiae melas*, I. The structure and function of the genital ducts and associated organs. *Rivista di Malariologia* 42:149-176.
- Gobin B, Fumionori I, Peeters C, Billen J. 2006. Queen worker differences in spermatheca reservoir of phylogenetically basal ants. *Journal of Cell and Tissue Research* 326(1):169-178.
- Grodner ML & Steffens W. 1978. Evidence of a chemotactic substance in the spermathecal gland of the female boll weevil. *Transactions of the American Microscopical Society* 97:116-120.
- Gu S & Chow Y. 2003. Stimulation of juvenile hormone biosynthesis by different ecdysteroids in *Bombyx mori*. *Zoological Studies* 42(3):450-453.
- Hagedorn HH, O'Connor JD, Fuchs MS, Sage B, Schlaeger DA & Bohm MK. 1975. The ovary as a source of  $\alpha$ -ecdysone in and adult mosquito. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 72(8):3255-3259.
- Handler AM. 1982. Ecdysteroid titers during pupal and adult development in *Drosophila melanogaster*. *Developmental Biology* 93:73-82.
- Hanson PI & Cashikar A. 2012. Multivesicular body morphogenesis. *Annual Review of Cell and Development* 28:337:362.
- Happ GM & Happ CM. 1977. Cytodifferentiation in the accessory glands of *Tenebrio molitor*. III. Fine structure of the spermathecal accessory gland in pupa. *Tissue & Cell* 9(4):711-732.

- Hartmann R. 1978. The juvenile hormone-carrier in the haemolymph of the acridine grasshopper *Gomphocerus rufus* L.: Blocking of the juvenile hormone's action by means of repeated injections of an antibody to the carrier. *Roux's Archives of Development Biology* 184:301-324.
- Heimpel GE & Boer JG. 2008. Sex determination in the Hymenoptera. *Annual Review of Entomology* 53:209-230.
- Hopkins TL. 1992. Insect cuticle sclerotization. *Annual Review of Entomology* 37:273-302.
- Ilango K. 2005. Structure and function of the spermathecal complex in the phlebotomine sandfly *Phlebotomus papatasi* Scopoli (Diptera: Psychodidae): II. Post-copulatory histophysiological changes during the gonotrophic cycle. *Journal of Biosciences* 30:711-731.
- Jones JC & Fishman DA. 1970. An electron microscopic study of the spermathecal complex of virgin *Aedes aegypti* mosquitoes. *Journal of Morphology* 132(3):293-311.
- Jones JC & Wheeler RE. 1965. Studies on spermathecal filling in *Aedes aegypti* (Linnaeus). I. Description. *The Biological Bulletin* 129(3): 532-545.
- Karbowski M & Youle RJ. 2003. Dynamics of mitochondrial morphology in healthy cells and during apoptosis. *Cell Death and Differentiation* 10:870-880.
- Klowden MJ & Chambers GM. 2004. Production of polymorphic sperm by anopheline and their fate within the female genital tract. *Journal of Insect Physiology* 50(12):1163-1170.
- Klowden MJ. 2006. Switchover to the mated state by spermathecal activation in female *Anopheles gambiae* mosquitoes. *Journal of Insect Physiology* 52:679-684.
- Klowden MJ. 2008. *Physiological systems in insects*. Editora Elsevier. 2ª edição. 696 págs.
- Laboissière P. 2014. Casos de dengue no país caem 80% no primeiro bimestre. Disponível em: [www.fiocruz.br/rededengue](http://www.fiocruz.br/rededengue). Acessado em 13 de Junho de 2014.
- Lange AB & Silva R. 2007. Neural and hormonal control of muscular activity of the spermatheca in the locust, *Locusta migratoria*. *Peptides* 28:174-184.
- Liang D & Schal C. 1994. Neural and hormonal regulation of calling behavior in *Blattella germanica* females. *Journal of Insect Physiology* 40(3):251-258.
- Longin A, Souchier C, French M & Bryon PA. 1993. Comparison of anti-fading agents used in fluorescent microscopy: image analysis and laser confocal microscopy study. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 41:1833-1840.

- Lovozei AL. 2001. Culicídeos (Mosquitos). In: Marcondes CB, editor. Entomologia médica e veterinária. Editora Atheneu. São Paulo. 2ª edição. 526 págs.
- Martins GF & Serrão JE. 2002. A comparative study of the spermatheca in bees (Hymenoptera: Apoidea). *Sociobiology* 40:711-720.
- Mayhew ML & Merritt DJ. 2013. The morphogenesis of spermathecae and spermathecal glands in *Drosophila melanogaster*. *Arthropod Structure & Development* 42:385-393.
- Miranda JR & Fries I. 2008. Venereal and vertical transmission of deformed wing virus in honeybees (*Apis mellifera* L.). *Journal of Invertebrates Pathology* 98:184-189.
- Nation JL. 2008. *Insect Physiology and Biochemistry*. CRC Press. 2ª edição. 544 págs.
- Nelson MJ. 1986. *Aedes aegypti*: Biologia y ecologia. Organização Panamericana de la salud. Washington DC. 1ª edição.
- Neves DP, Melo AL & Linardi PM. 2005. *Parasitologia Humana*. Editora Atheneu. 11ª edição. 494 págs.
- Noirot C & Quenedey A. 1991. Glands, gland cells, glandular units: some comments on terminology and classification. *Annales de la Société Entomologique de France* 27(2):123-128.
- Normile D. 2013. First new dengue virus type in 50 years. Disponível em: [www.news.sciencemag.org](http://www.news.sciencemag.org). Acessado em 10 de Junho de 2014.
- OMS (Organização Mundial da Saúde). 2013. Disponível em: [www.who.int](http://www.who.int). Acessado em 20 de Janeiro de 2014.
- Organização Pan-Americana de Saúde 2014. Disponível em: [www.paho.org](http://www.paho.org). Acessado em 10 de Junho de 2014.
- Organização Pan-americana de Saúde. 1995. Dengue e dengue hemorrágica nas Américas: guias para sua prevenção e controle. Washington, DC.
- Organização Pan-Americana de Saúde. 2013. Disponível em: [www.paho.org/bra](http://www.paho.org/bra). Acessado em 10 de Janeiro de 2014.
- Pabalan N, Davey KG & Packer L. 1996. Comparative morphology of spermathecae in solitary and primitive eusocial bees (Hymenoptera; Apoidea). *Canadian Journal of Zoology* 74:802-808.
- Pascini TV, Ramalho-Ortigão M & Martins GF. 2013. The fine structure of the spermatheca in *Anopheles aquasalis* (Diptera: Culicidae). *Annals of the Entomological Society of America* 106(6):857-867.

- Pascini TV, Ramalho-Ortigão M, & Martins GF. 2012. Morphological and morphometrical assessment of spermathecae of *Aedes aegypti* females. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 107(6):705-712.
- Piper RC & Kartzmann D. 2007. Biogenesis and function of multivesicular bodies. *Annual Review of Cell and Development* 23:519:547.
- Portal da Saúde. 2014. Disponível em: [www.portalsaude.saude.gov.br](http://www.portalsaude.saude.gov.br). Acessado em 13 de Junho de 2014.
- Prokupek A, Hoffmann F, Eyun S, Moriyama E, Zhhou M & Marshman L. 2008. An evolutionary expressed sequence tag analysis of *Drosophila* spermatheca genes. *Evolution* 62:2936-2947.
- Riddiford LM, Truman JW, Mirth CK & Shen Y. 2010. A role for juvenile hormone in the prepupal development of *Drosophila melanogaster*. *Development* 137:1117-1126.
- Riddiford LM. 1980. Insect Endocrinology: action of hormones at the cellular level. *Annual Review of Physiology* 42:511-528.
- Rogers DW, Whitten MMA, Thaylayil J, Soichot J, Levashina EA & Catteruccia F. 2008. Molecular and cellular components of the mating machinery in *Anopheles gambiae* females. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States (PNAS)* 105(49):19389-19394.
- Schoeters E & Billen J. 2000. The importance of the spermathecal duct in bumblebees. *Journal of Insect Physiology* 46:1303-1312.
- Secretaria de Combate à Dengue. 2013. Disponível em: [www.riocontradengue.rj.gov.br](http://www.riocontradengue.rj.gov.br). Acessado em 20 de Dezembro de 2013.
- Secretaria de Vigilância de Saúde. 2013. Guia de Vigilância Epidemiológica. Centro de Vigilância Epidemiológica. Ministério da Saúde. 7ª edição.
- Snelling EP, Seymour RS, Runciman S, Matthews PGD & White CR. 2011. Symmorphosis and the insect respiratory system: allometric variation. *Journal of Experimental Biology* 214:3225-3237.
- Souza EA, Campos LAO, Neves CA & Zanúncio JC. 2008. Effect of delayed mating on spermathecal activation in *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Hymenoptera, Apidae) queens. *Apidologie* 39(3):293-301.
- Spielman A. 1964. The mechanics of copulation in *Aedes aegypti*. *Biological Bulletin* 127(2):324-344.
- Suaya JA, Shepard DS, Siqueira JB, Martelli CT, Lum LCS, Tan LH, Kongsin S, Jiamton S, Garrido F, Montoya R, Armien B, Huy R, Cartillo L, Caram M, Sah BK,

- Sughayyar R, Tyo KR & Halstead SB. 2009. Cost of dengue cases in eight countries in the Americas and Asia: A prospective study. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene* 80(5):846-855.
- Tombes AS & Roppel RM. 1972. Ultrastructure of the spermatheca of the granary weevil, *Sitophilus granarius* (L.) (Coleoptera: Curculionidae). *International Journal of Insect Morphology and Embryology* 1:14-52.
- Vasilakis N, Cardoso J, Hanley KA, Holmes EC & Weaver SC. 2012. Fever from the forest: prospects for the continued emergence of sylvatic dengue virus and its impact on public health. *Nature Reviews Microbiology* 9(7):532-542.
- Villavaso EJ. 1975. The role of the spermathecal gland of the boll weevil *Anthonomus grandis*. *Journal of Insect Physiology* 21:1457-1462.
- Wegener J, Huang ZY, Lorenz MW, Lorenz JI & Bienefeld K. 2013. New insights into the roles of juvenile hormone and ecdysteroids in honey bee reproduction. *Journal of Insect Physiology* 59:655-661.
- Wheeler D & Krutzsch P. 1994. Ultrastructure of the spermatheca and its associated gland in the ant *Crematogaster opuntiae* (Hymenoptera: Formicidae). *Zoomorphology* 114:203-212.
- Willis JH. 1974. Morphogenetic action of insect hormones. *Annual Review of Entomology* 19:97-115.
- Winterton SL, Merritt DJ, O'Toole A, Yeates DK & Irwin ME. 1999. Morphology and histology of the spermathecal sac, a novel structure in the female reproductive system of *Therevidae* (Diptera: Asiloidea). *International Journal of the Insect Morphology and Embryology* 28:273-279.
- Ziegler U & Groscurth P. 2004. Morphological features of cell death. *American Physiological Society* 19:124-128.