

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

Alterações no intestino médio de larvas de mosquitos *Toxorhynchites violaceus* e *Lutzia bigoti* após ingestão de *Aedes aegypti*

João Paulo Pimentel de Oliveira Cruz
Magister Scientiae

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2025**

JOÃO PAULO PIMENTEL DE OLIVEIRA CRUZ

Alterações no intestino médio de larvas de mosquitos *Toxorhynchites violaceus* e *Lutzia bigoti* após ingestão de *Aedes aegypti*

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

Orientador: Gustavo Ferreira Martins

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2025**

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

T

C957a
2025 Cruz, João Paulo Pimentel de Oliveira, 1995-
Alterações no intestino médio de larvas de mosquitos
Toxorhynchites violaceus e *Lutzia bigoti* após ingestão de *Aedes
aegypti* / João Paulo Pimentel de Oliveira Cruz. – Viçosa, MG,
2025.

1 dissertação eletrônica (51 f.): il. (algumas color.).

Inclui anexos.

Orientador: Gustavo Ferreira Martins.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Biologia Geral, 2025.

Referências bibliográficas: f. 44-51.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2025.589>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Culicidae. 2. Insetos predadores. 3. *Toxorhynchites
violaceus*. 4. *Lutzia bigoti*. 5. *Aedes aegypti*. 6. Intestinos -
Microbiologia. I. Martins, Gustavo Ferreira, 1980-.
II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia
Geral. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e
Estrutural. III. Título.

CDD 22. ed. 595.772153

JOÃO PAULO PIMENTEL DE OLIVEIRA CRUZ

Alterações no intestino médio de larvas de mosquitos *Toxorhynchites violaceus* e *Lutzia bigoti* após ingestão de *Aedes aegypti*

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

APROVADA: 31 de julho de 2025.

Assentimento:

João Paulo Pimentel de Oliveira Cruz
Autor

Gustavo Ferreira Martins
Orientador

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi realizado com o apoio das seguintes agências de pesquisa brasileiras: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

À Universidade Federal de Viçosa (UFV), minha gratidão por ter sido o espaço que contribuiu de forma significativa para meu crescimento pessoal e profissional ao longo de oito anos.

Ao professor e orientador Gustavo Ferreira Martins, pelo tempo concedido, pela paciência em me ensinar e corrigir diversas vezes, e por ser um excelente professor, cuja didática impecável e profissionalismo sério me servem de inspiração desde a primeira aula de Biologia Molecular.

Aos meus pais, Julio e Jaqueline, e ao meu irmão, Julio, por serem pilares fundamentais em minha vida. Agradeço pelo apoio incondicional e por me proporcionarem todas as oportunidades possíveis, e até mesmo as impossíveis, para que eu pudesse realizar meus sonhos.

À minha companheira, Lais, por estar ao meu lado em todos os momentos, sempre me apoiando, incentivando e acreditando em mim.

Ao pessoal do laboratório pelos anos de convivência, com agradecimento especial à Renata e ao Vinicius pela ajuda nas coletas em campo, no fornecimento de reagentes e no esclarecimento de dúvidas ao longo do desenvolvimento da pesquisa.

Aos amigos que fiz durante esses longos oito anos na UFV, que contribuíram de alguma forma para tornar minha vida mais leve e alegre. Agradeço em especial ao amigo João Victor, parceiro desde a graduação, que nunca mediu esforços para me ajudar.

Ao Núcleo de Microscopia e Microanálise e ao Departamento de Física da UFV, pelo acesso aos equipamentos e microscópios, instrumentos essenciais para a conclusão deste trabalho.

Obrigado!

RESUMO

CRUZ, João Paulo Pimentel de Oliveira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2025. **Alterações no intestino médio de larvas de mosquitos *Toxorhynchites violaceus* e *Lutzia bigoti* após ingestão de *Aedes aegypti*.** Orientador: Gustavo Ferreira Martins.

Mosquitos (Diptera: Culicidae) são vetores de patógenos para humanos e vertebrados de importância veterinária. Larvas predadoras dos gêneros *Toxorhynchites* e *Lutzia* alimentam-se de formas imaturas de invertebrados, incluindo mosquitos, oferecendo uma oportunidade única para estudar adaptações digestivas. Neste estudo, analisamos e comparamos a morfologia do intestino médio (IM) de *Toxorhynchites violaceus* e *Lutzia bigoti* após a ingestão de larvas de *Aedes aegypti*, bem como o tempo de retenção do bolo alimentar. Larvas do quarto ínstar de *T. violaceus* e *L. bigoti* foram mantidas em jejum por 24 horas e, posteriormente, alimentadas individualmente com larvas de *A. aegypti*, sendo fornecido uma presa por predador. Os indivíduos foram dissecados em diferentes tempos pós-ingestão (uma, três, cinco, 16 e 24 horas), com um grupo controle em zero horas. O IM foi examinado por microscopia eletrônica de varredura e óptica, utilizando colorações, marcações e impregnações específicas para evidenciar proteínas, lipídios e núcleos. O IM de ambas as espécies apresenta a organização tubular típica dos culicídeos, composto por cecos gástricos (CG), porção anterior e posterior. Os CG de *T. violaceus* são alongados e cilíndricos, com lúmen escuro e grânulos pigmentados, enquanto os de *L. bigoti* são digitiformes, com projeções celulares e fibras musculares. A cárdia de *T. violaceus* é mais desenvolvida, sugerindo maior capacidade de regulação do bolo alimentar e produção de matriz peritrófica. O epitélio do IM anterior em *T. violaceus* varia de cúbico a colunar, com acúmulo de gotículas lipídicas, principalmente entre uma e 16 horas pós-ingestão. Em *L. bigoti*, o epitélio é pavimentoso ou cúbico, com gotículas lipídicas discretas apenas após uma hora. A retenção alimentar foi mais prolongada em *T. violaceus*, com núcleos celulares da presa detectados até uma hora, enquanto em *L. bigoti* não foram observados núcleos em nenhum tempo. No IM posterior, *L. bigoti* apresenta uma dilatação mais acentuada, mas em ambas as espécies o epitélio é colunar com borda em escova espessa. A digestão do bolo alimentar induz alterações estruturais no IM, revelando estratégias digestivas e adaptações fisiológicas distintas entre *T. violaceus* e *L. bigoti*.

Palavras-chave: *Aedes aegypti*; *Toxorhynchites*; *Lutzia*; ceco gástrico; intestino médio

ABSTRACT

CRUZ, João Paulo Pimentel de Oliveira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2025. **Changes in the midgut of mosquito larvae *Toxorhynchites violaceus* and *Lutzia bigoti* after ingestion of *Aedes aegypti*.** Adviser: Gustavo Ferreira Martins.

Mosquitoes (Diptera: Culicidae) are vectors of pathogens to humans and vertebrates of veterinary importance. Predatory larvae of the genera *Toxorhynchites* and *Lutzia* feed on immature forms of invertebrates, including mosquitoes, providing a unique opportunity to study digestive adaptations. In this study, we analyzed and compared the morphology of the midgut (MG) of *Toxorhynchites violaceus* and *Lutzia bigoti* after ingestion of *Aedes aegypti* larvae, as well as the food retention time. Fourth-instar larvae of *T. violaceus* and *L. bigoti* were fasted for 24 hours and subsequently fed individually with *A. aegypti* larvae, providing one prey per predator. Individuals were dissected at different post-ingestion times (one, three, five, 16, and 24 hours), with a control group at zero hours. The MG was examined using scanning and light microscopy, employing specific stains, markers, and impregnations to reveal proteins, lipids, and nuclei. The MG of both species exhibits the typical tubular organization of culicids, composed of gastric caeca (GC), anterior, and posterior regions. The GC of *T. violaceus* are elongated and cylindrical, with a dark lumen and pigmented granules, whereas those of *L. bigoti* are digitiform, with cellular projections and muscle fibers. The cardia of *T. violaceus* is more developed, suggesting greater capacity to regulate the food bolus and produce a peritrophic matrix. The anterior MG epithelium of *T. violaceus* ranges from cuboidal to columnar, with accumulation of lipid droplets, mainly between one and 16 hours post-ingestion. In *L. bigoti*, the epithelium is squamous to cuboidal, with discrete lipid droplets observed only after 1 hour. Food retention was prolonged in *T. violaceus*, with prey cell nuclei detected up to 1 hour, while in *L. bigoti* nuclei were not observed at any time. In the posterior MG, *L. bigoti* exhibits a more pronounced dilation, but in both species the epithelium is columnar with a thick brush border. Digestion of the food bolus induces structural changes in the MG, revealing distinct digestive strategies and physiological adaptations between *T. violaceus* and *L. bigoti*.

Keywords: *Aedes aegypti*; *Toxorhynchites*; *Lutzia*; gastric caeca; midgut

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	7
1.1 Diptera	7
1.2 Culicidae.....	8
1.3 Mosquitos predadores.....	10
1.4 <i>Toxorhynchites</i>	11
1.5 <i>Lutzia</i>	13
1.6 Sistema digestivo de larvas de mosquitos	15
1.6.1 Intestino anterior.....	15
1.6.4 Intestino médio	16
1.6.3 Intestino posterior	18
1.6.5 Matriz peritrófica.....	18
2. OBJETIVOS.....	19
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
3.1 Larvas predadoras.....	19
3.2 <i>A. aegypti</i>	20
3.3 Experimento	20
3.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	20
3.5 Microscopia óptica	20
3.6 Marcação por DAPI.....	21
3.7 Detecção de lipídeos (impregnação por ósmio)	21
3.8 Detecção de proteínas (azul de bromofenol).....	21
4. RESULTADOS	21
4.1 Histologia	25
4.2 Lúmen do intestino médio	35
5. Discussão.....	38
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	43
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

1. INTRODUÇÃO

1.1 Diptera

A ordem Diptera, uma das mais diversas dentro de Insecta, compreende aproximadamente 152.000 espécies descritas, distribuídas nos mais variados ecossistemas (Pape et al., 2011). Os dípteros são caracterizados por apresentarem apenas um par de asas funcionais, os élitros anteriores, enquanto o segundo par é modificado em halteres, estruturas que atuam como órgãos sensoriais responsáveis pela estabilização do voo (Chapman, 2013). Todas as espécies dessa ordem desenvolvem-se por meio de metamorfose completa (holometabolía), com estágios de ovo, larva, pupa e adulto morfologicamente distintos, o que favorece as possibilidades adaptativas do grupo (Yeates & Wiegmann, 2005; Truman, 2019).

A expressiva diversidade morfológica, comportamental e ecológica dos dípteros reflete-se na ampla variedade de nichos ocupados. Espécies da ordem estão presentes em ambientes tropicais e temperados, zonas áridas e até em regiões de clima extremo, como áreas costeiras da Antártida, sendo representadas, por exemplo, por *Belgica antarctica* e *Trichocera maculipennis* (Potocka & Krzemińska, 2018; Kozeretska et al., 2022). As funções ecológicas exercidas pelos dípteros são igualmente variadas, incluindo polinização, decomposição, predação, parasitismo e veiculação de patógenos. Esse último aspecto confere à ordem particular relevância nas áreas médica, veterinária e agrícola, devido à capacidade de inúmeras espécies atuarem como vetores de agentes etiológicos de doenças infecciosas (Merritt & Courtney, 2009; Grimaldi & Engel, 2005).

A ordem Diptera é dividida em duas subordens principais: Nematocera e Brachycera, as quais se distinguem por características morfológicas dos adultos e das formas imaturas, além de diferenças em aspectos fisiológicos e ecológicos (Bertone & Wiegman, 2009). Nematocera reúne os grupos considerados mais basais da ordem, como os mosquitos (*Culicidae*), maruins (*Ceratopogonidae*), moscas-de-fungo (*Mycetophilidae*, *Sciaridae*) e tipulídeos (*Tipulidae*). Os adultos dessa subordem apresentam corpo delgado, asas estreitas e alongadas, além de antenas compostas por múltiplos segmentos, geralmente filiformes e plumosas em machos. Suas larvas possuem cápsula cefálica esclerosada, bem diferenciada do tórax, com peças bucais externas do tipo mastigador. Essa morfologia está associada a hábitos alimentares diversos, que incluem filtração de partículas orgânicas, raspagem de biofilmes e predação de microinvertebrados aquáticos (Courtney et al., 2017).

Em contraste, Brachycera engloba grupos mais derivados, como as moscas domésticas (*Muscidae*), moscas-das-frutas (*Tephritidae*), varejeiras (*Calliphoridae*) e as moscas tsé-tsé (*Glossinidae*). Os adultos dessa subordem possuem corpo geralmente mais robusto, antenas

curtas com três segmentos principais e presença de uma arista terminal ou subterminal. Suas larvas são ápodes, com cápsula cefálica reduzida ou internalizada, adaptadas à alimentação em substratos semissólidos ou líquidos, como tecidos animais, matéria vegetal ou detritos orgânicos em decomposição. Essa simplificação estrutural larval está relacionada à exploração eficiente de ambientes ricos em recursos e à redução da especialização morfológica para alimentação (Grimaldi & Engel, 2005; Courtney et al., 2017).

Entre os representantes de Nematocera, os mosquitos (Culicidae) destacam-se pela ampla diversidade, distribuição global e relevância ecológica. Além da reconhecida importância de muitas espécies como vetores de patógenos, os culicídeos exibem uma variedade de estratégias alimentares e comportamentais, refletidas em adaptações morfofisiológicas ao longo do desenvolvimento, consolidando sua posição como uma família de grande importância (Buzzi, 1985; Merrit & Courtney, 2009).

1.2 Culicidae

Os mosquitos são dípteros pertencentes à família Culicidae e representam um táxon monofilético, apresentam cerca de 3546 espécies distribuídas em duas subfamílias: Anophelinae e Culicinae, sendo a última maior, abrangendo cerca de 3061 espécies (Harbach & Kitching, 1998; Narayanan Kutty et al., 2018). Apresentam uma grande diversidade morfológica, o que lhes permite ocupar diferentes habitats e alcançar sucesso evolutivo. São facilmente encontrados em ambientes de florestas tropicais e possuem uma ampla distribuição global, exceto em regiões de gelo permanente, como no continente Antártico (Becker et al., 2010; Wilkerson et al., 2021)

Os mosquitos são insetos holometábolos, durante o seu ciclo biológico eles passam por fases distintas de desenvolvimento como ovo, larva, pupa e adultos. Os ovos apresentam uma forma elíptica ou ovoide e, dependendo do gênero, ocorrem diferentes tipos de deposição. Nos *Anopheles*, os ovos são depositados isoladamente e flutuam sobre a água devido a estrutura acessórias, em *Culex* são depositados em conjuntos sobre a água, formando as características jangadas e em *Aedes* são depositados de forma isolada, próximo à água (Consoli & Oliveira, 1994; De Almeida, 2011; Wilkerson et al., 2021).

A fase larval passa por quatro instares (L1, L2, L3, L4) apresentando uma grande semelhança, exceto pelo tamanho que aumenta com o decorrer do desenvolvimento (Consoli & Oliveira, 1994; Foster & Walker, 2019). O corpo da larva pode ser dividido em cabeça, tórax e abdômen. A cabeça é separada do tórax e apresenta cerdas orais que auxiliam na alimentação, o tórax é arredondado e globuloso, enquanto o abdômen é mais estreito e alongado, criando um contraste visual com o tórax (De Almeida, 2011). Nos instares iniciais, as larvas atuam

principalmente como filtradoras, alimentando-se de microrganismos e partículas em suspensão na água. Nos estágios posteriores, mantêm esse comportamento, embora passem a consumir também matéria orgânica sedimentada, atuando de forma combinada como filtradoras e detritívoras (Clements, 1999). Embora esse padrão alimentar seja comum à maioria dos culicídeos, há exceções importantes. Em alguns gêneros, como *Toxorhynchites* e *Lutzia*, as larvas adotam hábitos predadores, alimentando-se ativamente de outras larvas de invertebrados, incluindo mosquitos. Nesses casos, estruturas como mandíbulas e maxilas são especialmente desenvolvidas e adaptadas à captura e manipulação de presas (Steffan & Evenhuis, 1981; Foster & Walker, 2019).

O habitat larval e pupal é o meio aquático, enquanto na fase adulta é terrestre (De Almeida, 2011). As larvas se alimentam até se desenvolverem em pupas, e entram em um estado inativo para realizar a transição para a forma adulta (Wiegmann et al., 2009). As pupas possuem divisão corporal em cefalotórax e abdome, apresentando uma forma bem característica que remete à uma vírgula (Mullen & Durden, 2009).

Os adultos possuem cabeça pequena e esférica, corpo delgado e recoberto por escamas, peças bucais longas e flexíveis, tórax com três pares de pernas alongadas e asas membranosas e estreitas (Harbach & Kitching, 1998; De Almeida, 2011). Machos e fêmeas apresentam características distintas. As fêmeas, de modo geral, possuem antenas longas e pilosas, aparelho bucal perfurador para auxiliar na alimentação sanguínea e são mais robustas que os machos, que, em contraste, não apresentam aparelho bucal perfurador e suas antenas são plumosas (Forattini, 2002; Albergaria et al. 2024).

A transmissão de patógenos ocorre através da picada das fêmeas dos mosquitos que, em geral, são hematófagas e se alimentam de sangue de vertebrados, tendo como exceção os gêneros *Toxorhynchites*, *Malaya*, *Topomyia* que não apresentam esse comportamento, sendo gêneros exclusivamente fitófagos. Mosquitos machos se alimentam de soluções açucaradas como seiva e néctar vegetal, não sendo, portanto, vetores. O repasto sanguíneo é importante para aquisição de nutrientes essenciais para manutenção da vida e maturação dos ovos. A aquisição de sangue obrigatória pode tornar as fêmeas vetoras eficientes, dependendo da espécie, uma vez que a constante repetição pela busca por alimentação sanguínea aumenta as chances de sucesso da transmissão de patógenos (Harbach & Howard 2007; Becker et al., 2010; Clements, 2023). Para garantir a eficiência no processo de alimentação sanguínea, adaptações anatômicas, comportamentais e fisiológicas ocorreram ao longa da evolução. Estruturas do aparelho bucal, como mandíbulas e estiletos, foram morfológicamente modificados para perfurar a pele do hospedeiro e canalizar o fluxo sanguíneo (Krenn & Aspöck, 2012).

Simultaneamente a saliva desses insetos apresentam anticoagulantes, vasodilatadores e inibidores da agregação plaquetária, neutralizando a hemostasia sanguínea do hospedeiro. Além disso, moléculas imunomoduladoras suprimem as respostas imunes e inflamatórias iniciais, potencializando mais o sucesso da alimentação (Ribeiro & Francischetti, 2003; Fontaine et al., 2011; Vogt et al., 2018). Adaptações também ocorrem no IM para neutralizar o estresse oxidativo, além da otimização da digestão do sangue por meio de enzimas proteolíticas específicas para a degradação da hemoglobina. Essas adaptações evoluíram ao longo do tempo aprimorando a eficiência alimentar dos mosquitos hematófagos (Oliveira et al., 2011; Wu & Zhang, 2011; Cai & Christophides, 2024).

O sangue ingerido é estocado e digerido no IM posterior. Caso a alimentação ocorra com o sangue de um vertebrado infectado, o agente infeccioso precisa superar barreiras do sistema de defesa do mosquito para completar seu ciclo e tornar o inseto um vetor competente (Franz et al., 2015; Clementes, 2023). A natureza desse processo varia com o tipo de patógeno: protozoários, como *Plasmodium*, realizam estágios de reprodução sexuada e assexuada no intestino médio do mosquito *Anopheles* antes de migrar para as glândulas salivares. Em contraste, arbovírus, como o da dengue replicam-se nas células epiteliais do intestino de *Aedes aegypti*, invadem a hemolinfa e podem alcançar outros órgãos, incluindo a glândula salivar, essencial para o processo de infecção de novos hospedeiros (Rückert & Ebel, 2019; Venugopal et al., 2020)

1.3 Mosquitos predadores

Os inseticidas, principalmente de classes como organofosforados e piretroides, são amplamente utilizados para o combate as larvas de mosquitos; contudo, o desenvolvimento de resistência a esses compostos tem reduzido a eficácia do controle químico (Vontas et al., 2012). A constante aplicação dos inseticidas é um desafio adicional, uma vez que impacta negativamente organismos não-alvos, como as abelhas, que desempenham papel fundamental na polinização e manutenção de diversos biomas (Garibaldi et al. 2013; Siviter & Muth, 2020). Dessa forma, há uma demanda para novos mecanismos mais seguros e eficazes que combinem segurança ambiental e eficiência no controle de larvas e mosquitos vetores.

Com o aumento de estudos relacionados ao controle biológico de mosquitos de forma sustentável e não agressiva ao meio ambiente, descobriu-se que os principais inimigos naturais de larvas de mosquitos abrangem um largo espectro taxonômico, incluindo fungos, aranhas, hidras, planárias, peixes, copépodes e diversos insetos. O uso combinado de invertebrados predadores demonstra um potencial significativo, podendo reduzir a sobrevivência das larvas de mosquito em mais de 90% (Quiroz-Martínez & Rodríguez-Castro, 2007; Dambach, 2022).

Algumas espécies de mosquitos apresentam estágios larvais predatórios, podendo ser obrigatórios ou facultativos, e atuam na predação de larvas de outros mosquitos. Embora pouco estudadas, essas larvas desempenham um papel relevante no controle populacional de espécies vetoras de patógenos (Shalan & Canyon, 2009). O gênero *Toxorhynchites* destaca-se por possuir larvas predadoras altamente eficientes, capazes de consumir entre 150 e 360 larvas de outros mosquitos ao longo do seu desenvolvimento larval (Steffan & Evenhuis, 1981).

Da mesma forma, larvas do gênero *Lutzia* também apresentam hábito predatório e ocupam habitats microaquáticos, atuando na regulação de populações de mosquitos vetores (Moirangthem et al., 2018). Em condições laboratoriais, uma única larva de *L. bigoti* pode consumir até cinco larvas de *A. aegypti* em um período de 12 horas (Rocha & Martins, 2024).

1.4 *Toxorhynchites*

O gênero *Toxorhynchites* pertence à tribo Toxorhynchitini, sendo o único gênero que a compõe. Ele compreende aproximadamente 90 espécies divididas em quatro subgêneros, *Toxorhynchites* (51 sp.), *Lynchiella* (16 sp.), *Afrorhynchus* (19 sp.) e *Ankylorhynchus* (4 sp.). A distribuição do subgênero *Toxorhynchites* está limitada ao Velho Mundo, *Ankylorhynchus* e *Lynchiella* presentes no Novo Mundo e *Afrorhynchus* são encontrados no continente Africano, representando uma ampla distribuição geográfica (Harbach, 2007; Wrbu, 2021).

Os *Toxorhynchites* possuem fêmeas não hematófagas, então não apresentam importância epidemiológica (Collins & Blackwell, 2000). Outra característica marcante desse gênero é o seu grande tamanho, sendo popularmente chamado de “mosquito elefante” quando adulto, pelo tamanho avantajado e pelo formato curvado do aparelho bucal (Focks, 2007, Wrbu, 2021). Ocupam majoritariamente áreas tropicais, tendo o Sudeste Asiático com 24 espécies registradas, podendo ser encontrados em regiões costeiras de palmeiras e algumas espécies adaptaram-se a clima temperado como *Toxorhynchites rutilus* (Collins & Blackwell, 2000; Sukupayo et al., 2024).

A deposição dos ovos de *Toxorhynchites* ocorre em locais com presença de sombra e água, podendo ser recipientes naturais ou artificiais. Todas as espécies geram ovos de cor branca ou amarelada com um formato oval e precisam ficar em contato com a água para não ressecarem. Os ovos são distribuídos em locais separados e em pequenos lotes, o que minimiza o canibalismo e a competição por alimento que geram mortes das larvas recém emergidas. O período de incubação é influenciado pela temperatura e umidade do ambiente, podendo variar entre 40 a 60 horas (Steffan & Evenhuis, 1981).

Todos os estágios larvais de *Toxorhynchites* exibem comportamento predatório, alimentando-se de larvas de outras espécies, incluindo larvas de mosquitos, o que as torna

agentes eficientes no controle biológico (Collins & Blackwell 2000; Lounibos et al., 2008). O habitat aquático dessas larvas pode variar desde águas limpas e transparentes até águas turvas e poluídas (Focks, 2007).

O comportamento predatório de *Toxorhynchites* é caracterizado por uma estratégia oportunista, em que as larvas não buscam ativamente suas presas, mas aguardam que estas adentrem seu alcance para então realizar o ataque. A ingestão das presas fornece nutrientes essenciais, como proteínas e lipídios, que são necessários para a ovogênese nos adultos. Suas mandíbulas robustas, com extensões semelhantes a garras, são adaptadas para a captura eficiente das presas (Steffan & Evenhuis, 1981; Donald et al., 2020). Adicionalmente, as larvas apresentam comportamento canibal, consumindo larvas e pupas da própria espécie, especialmente em ambientes com recursos alimentares limitados (Steffan & Evenhuis, 1981). Outra característica notável é o fenômeno denominado "matança compulsiva", no qual as larvas matam suas presas sem consumi-las. Esse comportamento ocorre principalmente próximo à fase de transição para a pupação. O comportamento predatório de *Toxorhynchites* pode ser classificado em três categorias principais: (a) consumo total da presa, (b) consumo parcial da presa, deixando partes dela intactas, e (c) matança da presa sem ingestão subsequente (Steffan & Evenhuis, 1981).

O estágio pupal dura em torno de quatro a seis dias em condições de laboratório, variando de acordo com a temperatura (Focks, 2007). Na forma adulta, os *Toxorhynchites* apresentam características únicas. O grande tamanho, sendo os maiores mosquitos já identificados, a probóscide dobrada, presença de escamas iridescentes com cores vivas e tufos de escamas laterais nos segmentos finais do abdômen os tornam facilmente reconhecíveis (Collins & Blackwell, 2000; Focks, 2007). Assim como os machos, as fêmeas são exclusivamente fitófagas, alimentam-se em flores e frutos com ajuda do seu grande aparelho bucal (Collins & Blackwell, 2000). Pouco se estuda sobre esse inseto na fase adulta, mas pesquisas demonstram que em *T. theobaldi*, ambos os sexos, apresentam IM semelhante ao de machos de mosquitos hematófagos, ou seja, adaptados para dietas ricas em açúcares (Godoy et al. 2015).

O caráter predatório das larvas, aliado à natureza nectarívora da fêmea adulta e à ausência de hematofagia, tornam o gênero *Toxorhynchites* útil para o controle biológico de vetores. Em estudos laboratoriais com a espécie *T. violaceus*, larvas de quarto instar, após um jejum de 48 horas, foram capazes de consumir um grande número de larvas de *A. aegypti* ao longo de 192 horas. Nas primeiras 24 horas, a taxa de sobrevivência das larvas de *A. aegypti* foi de 98%, mas houve um aumento progressivo da predação com o passar do tempo. A redução

mais acentuada ocorreu entre 96 e 120 horas e entre 168 e 192 horas, quando a taxa de sobrevivência de *A. aegypti* caiu para zero (Albeny et al. 2011).

A negligência a respeito do gênero cria lacunas em seu entendimento de forma geral e em uma maior utilização deles no controle biológico, sendo assim, é necessário estudar mais o gênero e aprender melhores mecanismos para utilizá-los como predadores naturais de insetos aquáticos.

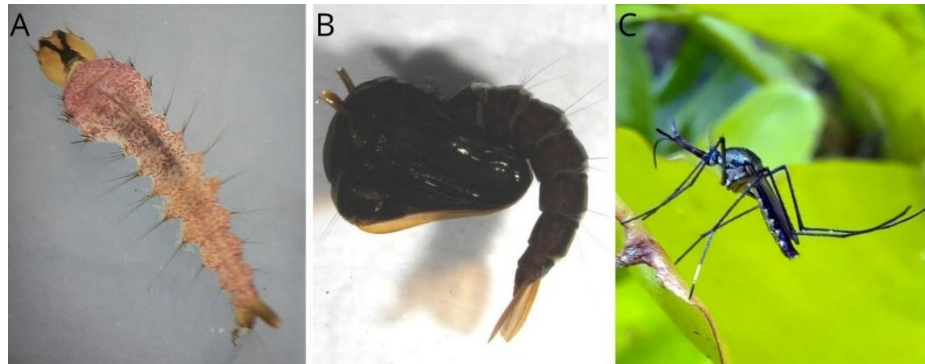


Figura 1: A: larva de *Toxorhynchites violaceus*. B: pupa de *Toxorhynchites theobaldi*. C: adulto macho de *T. violaceus* repousando em folha de bromélia. Fotografias: Gustavo Ferreira Martins.

1.5 *Lutzia*

O gênero *Lutzia* foi originalmente descrito por Theobald em 1903. Posteriormente, em 1932, foi proposto que *Lutzia* fosse considerado um subgênero do gênero *Culex* (discutido em Tanaka, 2003). No entanto, uma análise detalhada das características morfológicas das fases pupal e adulta de *Lutzia* e concluiu que as diferenças entre *Lutzia* e os subgêneros de *Culex* são suficientemente significativas para manter *Lutzia* como gênero válido e distinto (Tanaka, 2003). Atualmente *Lutzia* ainda se mantém como gênero apoiado por diferenças morfológicas em relação a *Culex*, contudo, análises filogenéticas corroboram a ideia de *Lutzia* pertencer ao subgênero de *Culex* (Chaiphongpachara et al., 2022). Dessa forma, mais estudos são necessários para esclarecer qual a posição de *Lutzia* em relação ao *Culex*.

O gênero *Lutzia* é composto por oito espécies, e são organizadas em três subgêneros: *Insulalutzia* (*L. shinonagai*), *Lutzia* (*L. allostigma*, *L. bigoti*) e *Metalutzia* (*L. agragensis*, *L. tigripes*, *L. vorax*, *L. fuscana*, *L. halifaxil*). As espécies desse gênero podem ser encontradas em diferentes regiões, incluindo a Australásia, Neotrópicos, Afrotropical e Sul do Paleártico (Wrubu, 2021).

Os ovos são depositados em grupo na superfície da água, possuem uma coloração marrom, são arredondados na extremidade anterior e mais pontiagudos na extremidade

posterior apresentando um formato sub-fusiformes com tamanho que varia de 749-752 μm de comprimento e 151-154 μm de largura (Kaur & Kirti, 2015). A postura de ovos é feita em locais com presença de água como ocos de árvores e recipientes naturais com alto teor de matéria orgânica (<https://mosquito-taxonomic-inventory.info/>).

Larvas do primeiro instar de *L. tigripes* não apresentam comportamento predatório, nessa fase inicial, alimentam-se de exúvias. A predação ativa tem início a partir do segundo instar, quando as larvas passam a consumir presas vivas, principalmente larvas de outros mosquitos, como *Culex*, *Aedes* e *Armigeres*. Esse comportamento é caracterizado pela captura e consumo direto das presas por meio de mandíbulas bem desenvolvidas. A eficiência predatória aumenta progressivamente com o desenvolvimento larval: no segundo instar, uma única larva pode consumir, em média, 8 larvas de *Culex* em 48 horas; no quarto instar, esse número pode chegar a 20 larvas em dois dias, totalizando entre 400 e 500 presas ao longo de todo o ciclo larval. O tempo necessário para consumir cada presa varia conforme o tamanho da larva-alvo: aproximadamente seis minutos para espécies pequenas como *A. albopictus*, 10 minutos para *Culex*, e até 15 minutos para presas maiores, como *Armigeres obturbans*. (<https://mosquito-taxonomic-inventory.info/>; Moirangthem et al., 2018).

Larvas de *L. fuscanus* apresentam comportamento predatório em todos os seus instares, atacando preferencialmente a junção entre cabeça e tórax das presas. Essas presas incluem principalmente larvas de quironomídeos, mas também diversas espécies de mosquitos, como *A. albopictus*, *C. sitiens*, *C. quinquefasciatus* e *A. sinensis*. Os ataques ocorrem desde a superfície até o fundo da água, e em situações de escassez de presas, as larvas podem recorrer ao canibalismo (Jin et al. 2006).

Adultos de *Lutzia* apresentam grande porte e manchas claras nos fêmures anterior e médio (Somboon & Harbach, 2019). Existem relatos de que as fêmeas se alimentam de sangue, contudo, não foi demonstrado que espécies de *Lutzia* sejam vetoras de patógenos humanos, uma vez que as fêmeas se alimentam principalmente de animais domésticos e aves (Moser et al., 2009). Em laboratório, o hábito hematófago não pôde ser confirmado em fêmeas de *L. bigoti*, que não se alimentaram quando foram ofertadas fontes de sangue humano, de galinha e vaca. Esse comportamento sugere que a espécie pode não ser hematófaga ou que apresente hábitos alimentares mais complexos do que os observados em mosquitos estritamente hematófagos (Rocha & Martins, 2024).

Pelo exposto acima, existe uma carência de informações sobre o gênero *Lutzia*. É necessário que mais estudos sejam desenvolvidos, pois existem diversas lacunas em relação a sua filogenia que precisam ser esclarecidas para gerar uma classificação mais precisa. Também falta esclarecer se fêmeas adultas realmente se alimentam de sangue e se podem atuar como vetores de patogênese e aprofundar mais sobre o processo de digestão das presas pelas larvas.



Figura 2: A: larva L4 de *Lutzia bigoti*. B: fêmea de *L. bigoti*. C: macho de *L. bigoti*. Adaptado de Rocha, 2023.

1.6 Sistema digestivo de larvas de mosquitos

Nos mosquitos, o sistema digestivo larval apresenta um formato tubular e alongado, revestido por epitélio simples. Ele é responsável pela digestão e absorção dos nutrientes provenientes dos alimentos ingeridos e, em associação com os túbulos de Malpighi participam também da eliminação de resíduos metabólicos (Gullan & Cranston, 2014; Nation, 2022). Morfologicamente, divide-se em três regiões distintas: intestino anterior (IA), intestino médio (IM) e intestino posterior (IP) (Chapman, 1998).

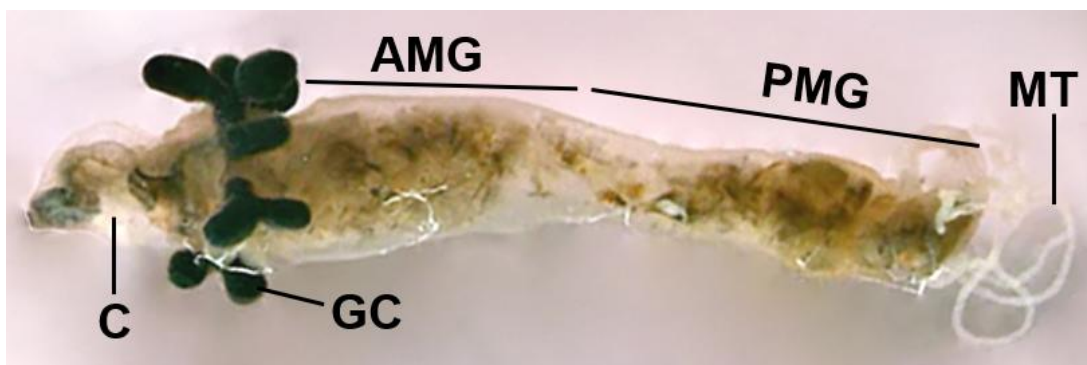


Figura 3: Sistema digestivo de quarto instar de larva de *Toxorhynchites theobaldi*. c: cardia; GC: ceco gástrico; AMG: intestino médio anterior; PMG: intestino médio posterior; MT: túbulos de Malpighi. Adaptado de Godoy et al., 2023.

1.6.1 Intestino anterior

Em larvas de mosquitos, o intestino anterior constitui a primeira porção do trato digestivo, formado pela boca, faringe e esôfago (Chapman, 1998). O alimento é capturado e ingerido pela boca, conduzido pela faringe e transportado ao longo do esôfago. Na transição para o intestino médio localiza-se o proventrículo, uma estrutura muscular que regula a passagem do alimento. Associada a essa região encontra-se a cárdia, um segmento especializado que, além de controlar a entrada do conteúdo alimentar, é responsável pela secreção da matriz peritrófica (MP) do tipo II, em larvas e adultos (Chapman, 1998; Terra, 2001).

1.6.4 Intestino médio

O IM é a porção do sistema digestivo que conecta o IA ao IP, desempenhando papel fundamental na digestão, secreção de enzimas digestivas e absorção de nutrientes (Chapman, 1998; Nation, 2022). Externamente, o órgão apresenta fibras musculares dispostas em camadas circulares e longitudinais, que, por meio de contrações coordenadas, produzem aos movimentos peristálticos, facilitando o deslocamento do conteúdo intestinal e auxiliando na mistura e transporte dos alimentos e nutrientes (Bernick et al. 2007; Chapman et al., 2013).

O epitélio simples do IM é constituído por três tipos principais de células: digestivas, enteroendócrinas e regenerativas (Holtof et al., 2019). As células digestivas, as mais numerosas nesse órgão, são responsáveis pela secreção de enzimas e atuam diretamente na digestão e absorção de nutrientes (Caccia et al., 2019; Nation, 2022). Além de suas funções digestivas, o IM sintetiza a matriz peritrófica (MP), que atua como uma barreira física, dificultando a entrada de patógenos, e desempenha funções fisiológicas importantes. Estudos com larvas de flebotomíneos, como *Lutzomyia longipalpis*, demonstraram que a matriz peritrófica (MP) participa do estabelecimento de um fluxo de contracorrente no espaço endoperitrófico (Malta et al., 2025). Esse fluxo permite a reciclagem de enzimas digestivas, otimiza a digestão e contribui para a manutenção da homeostase intestinal, regulando o pH luminal e o transporte de íons e água (Holtof et al., 2019; Terra et al., 2023).

Nas larvas de mosquitos, o IM é dividido em três regiões ao longo do eixo anteroposterior: cecos gástricos (CG), IM anterior e IM posterior. Os CG consistem em oito apêndices conectados à cárdia, a região responsável pela produção da MP larval (Clements, 2023; Terra, 2001).

Em *A. aegypti* e *Culex pipiens*, os CG são compostos predominantemente por dois tipos celulares: as células transportadoras de íons e as células digestivas (Volkman & Peters 1989a). As células transportadoras de íons, localizadas no terço distal do CG, possuem transportadores na membrana apical e basolateral responsáveis pelo controle de íons essenciais, como H⁺, Na⁺,

K^+ e Cl^- (Patrick et al., 2006; D'silva; O'donnell, 2020). Já as células digestivas, distribuídas nos dois terços proximais, desempenham um papel fundamental na degradação e absorção de nutrientes (Volkman & Peters 1989a).

O epitélio do CG apresenta adaptações que favorecem suas funções digestivas e absorptivas. Ele é formado por células achatadas que facilitam a troca de moléculas simples por difusão ou transporte ativo. Sua borda em escova, composta por numerosas microvilosidades, amplia a superfície de contato, otimizando a absorção e a troca de substâncias entre o lúmen e a hemolinfa (Billingsley & Lehane, 1996; Lange, 2011; Alberts et al., 2017). Essas microvilosidades também abrigam proteínas de membrana e enzimas digestivas, tornando o CG um local essencial para a digestão final de carboidratos e proteínas (Neira et al., 2008; Lange, 2011).

O IM anterior e IM posterior formam um tubo contínuo que conduz o bolo alimentar (Lehane & Billingsley, 2012). A borda em escova das células epiteliais do IM anterior é relativamente fina. Essas microvilosidades abrigam transportadores, enzimas e trocadores de íons que participam do processo de absorção de substâncias (Lange, 2011).

Em *Anopheles gambiae*, foi relatado um baixo número de transcritos relacionados ao metabolismo de glicose e aminoácidos no IM anterior. Por outro lado, transcritos associados ao metabolismo e à absorção de lipídios foram detectados na mesma região (Neira et al., 2008). Embora análises transcriptômicas não estejam disponíveis para outras espécies, a presença de gotículas lipídicas no IM anterior foi observada em larvas de *A. aegypti* e *T. theobaldi*, o que sugere uma possível conservação funcional dessa região entre diferentes espécies de culicídeos (Godoy et al., 2023).

O IM posterior compartilha características morfológicas com os CG, destacando-se a especialização da membrana apical das células epiteliais, que apresenta uma borda em escova alta. Essa estrutura amplia consideravelmente a área de contato com o lúmen, favorecendo a absorção de nutrientes (Neira et al., 2008; Lange, 2011). Em larvas de *A. aegypti*, *An. gambiae* e *T. theobaldi*, observa-se que tanto o IM posterior quanto os CG exibem essa organização celular (Godoy et al., 2023). Além disso, análises transcriptômicas em *An. gambiae* revelam elevada expressão de genes relacionados ao metabolismo de carboidratos e proteínas em ambas as regiões, demonstrando que o IM posterior desempenha papel ativo na digestão e absorção desses nutrientes (Neira et al., 2008).

No final do desenvolvimento larval, o IM passa por transformações estruturais significativas, preparando-se para a fase pupal (Fernandes et al., 20214; Godoy et al., 2023). Como os mosquitos são insetos holometábolos, o trato gastrointestinal sofre intensa

remodelação durante a metamorfose, caracterizada por eventos coordenados de apoptose, proliferação e diferenciação celular, os quais são fundamentais para adaptar o sistema digestivo ao novo regime alimentar (Buszczak & Seagraves, 2000; Ray et al., 2009; Clements, 2023; Godoy et al., 2023).

No período larval, o epitélio intestinal é predominantemente constituído por células digestivas que aumentam progressivamente de tamanho para acompanhar o crescimento do órgão (Hakim et al., 2010). As células regenerativas, proliferam ativamente ao longo dos estágios larvais, atingindo sua máxima abundância no último ínstar. Essas células são essenciais tanto para a renovação contínua do epitélio quanto para a formação do novo revestimento intestinal durante a metamorfose (Hakim et al., 2010; Caccia et al., 2019; Godoy et al., 2023).

1.6.3 Intestino posterior

A transição entre o IM e o IP é caracterizada pela inserção dos túbulos de Malpighi, responsáveis por coletar excretas da hemolinfa e liberá-las no lúmen do IP. Essa região é dividida em três partes: piloro, íleo e reto. O piloro funciona como uma válvula reguladora e é o ponto de origem dos túbulos de Malpighi. O íleo é um segmento estreito que se conecta ao reto, uma porção mais alargada que se estende até o ânus (Chapman, 1998; Holtorf et al., 2019).

Assim como em outros insetos, o IP das larvas de mosquitos desempenha um papel essencial na excreção e regulação osmótica, promovendo a reabsorção seletiva de água e íons e ajustando a composição final da urina. Os túbulos de Malpighi produzem uma “pré-urina”, que é submetida ao processo de reabsorção no IP antes da eliminação dos resíduos junto ao bolo fecal, composto por materiais não digeridos e substâncias descartáveis (Farina et al., 2022; Nation, 2022).

1.6.5 Matriz peritrófica

A MP é uma matriz extracelular composta por quitina, proteínas e proteoglicanos, que envolve o bolo alimentar no IM, impedindo o contato direto entre o alimento e as células epiteliais. Ela desempenha um papel fundamental na compartimentação do processo digestivo, dividindo-o em dois espaços: endoperitrófico, envolvido pela MP, e ectoperitrófico, o que aumenta a eficiência da digestão (Lehane, 1997; Hegedus et al., 2009; Gullan & Cranston 2014). Além disso, a MP protege o epitélio intestinal contra a abrasão provocada pelos alimentos e serve como barreira contra patógenos presentes no alimento, impedindo o contato desses agentes com o epitélio e, assim, prevenindo infecções (Terra, 2001).

Nos mosquitos, existem dois tipos distintos de MP. O tipo 1, também encontrado em mosquitos adultos hematófagos, é sintetizado no IM posterior pelas células digestivas após a

ingestão de sangue ou alimentos particulados. Já o tipo 2, presente nas larvas de mosquitos e adultos não hematófagos, é continuamente sintetizado por células localizadas na cárdia (Shao et al., 2001; Terra, 2001; Whiten et al., 2018).

Apesar de ainda pouco estudada em relação aos adultos, a compreensão da biologia do IM das larvas de mosquitos predadores é fundamental, pois esse órgão é responsável pelo armazenamento de nutrientes essenciais para o desenvolvimento larval e, posteriormente, para os eventos de metamorfose, garantindo a sobrevivência na fase adulta (Truman & Riddiford 1999). Estudos sobre o IM de larvas e adultos não hematófagos buscam elucidar aspectos da morfologia e da fisiologia, as transformações ocorridas durante a metamorfose, bem como sua importância no crescimento larval (Godoy et al., 2023; Barbosa et al., 2024; Rocha & Martins 2024; Rocha & Martins. 2025). No entanto, pesquisas sobre larvas predadoras e seus processos digestivos ainda são escassas. Dessa forma, tornam-se necessários os novos estudos para a avaliação a digestão do alimento, ou seja, das presas nessas larvas.

2. OBJETIVOS

- Descrever a morfologia do intestino médio de larvas de *T. violaceus* e *L. bigoti*.
- Investigar a morfologia do IM e as modificações do órgão após a ingestão de larvas de *A. aegypti* por larvas de *T. violaceus* e *L. bigoti*.
- Analisar diferença entre *T. violaceus* e *L. bigoti* na organização do epitélio intestinal, na retenção e processamento do bolo alimentar, após diferentes tempos de ingestão do *A. aegypti*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Larvas predadoras

Larvas de *L. bigoti* (L3 e L4) foram coletadas na Mata do Paraíso (Fragmento de Mata Atlântica que pertence à UFV (latitudes de 20° 41'20"S 20° 49' 35"S e longitudes de 42° 41'20" W e 42° 54' 27" W). Larvas de *T. violaceus* (L3 e L4) foram coletadas em reservatórios de água em bacias foliares de bromélias na zona rural do Município de Coimbra (Autorização de coleta SISBIO número 56917-5). As coletas foram feitas em baldes cheios com água pluvial ou de aquífero, servindo como local de procriação de larvas. Elas foram coletadas com pipetas de Pasteur (três mL) e a coleta na zona rural foi feita com auxílio de pipetas de Pasteur (oito mL). As larvas foram transferidas individualmente para o insetário do Departamento de Biologia Geral da UFV, e mantidas em condições controladas com a temperatura $26^{\circ} \pm 2^{\circ}$ C, fotoperíodo de 12 horas, separadas individualmente em recipientes plásticos com água deionizada e alimentadas com larvas de *A. aegypti*.

3.2 *A. aegypti*

Larvas (L3 e L4) de *A. aegypti* (linhagem Campos de Goytacazes – RJ) foram obtidas no insetário. Elas foram criadas em bandejas de plástico com água de torneira filtrada e decolorada e alimentadas com ração para tartaruga (Reptolife), sob condições controladas com temperatura $26^{\circ} \pm 2^{\circ}$ C, umidade relativa do ar entre 70-80% e fotoperíodo de 12 horas.

3.3 Experimento

As larvas predadoras (L4) ficaram por 24 horas em jejum após a coleta, posteriormente foram alimentadas com larvas de *A. aegypti* (L4) (uma presa por predador) e foram dissecadas em tempos após a ingestão [zero horas (não alimentada), uma hora, três horas, cinco horas, 16h e 24h]. Para cada espécie predadora, foram utilizadas no mínimo três larvas em cada grupo de tempo.

3.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As larvas foram dissecadas em PBS e o IM fixado em glutaraldeído a 2,5% (tampão sacarose/cacodilato, 0,1 M, pH 7,2) por um período mínimo de 24 horas. Posteriormente, os IM foram desidratados em série crescente de etanol e mantidos em etanol 100%.

Em seguida, os IM desidratados foram submetidos à secagem em ponto crítico com o auxílio do equipamento Balzers CPD 030. As amostras secas foram montadas em suportes de alumínio utilizando fita dupla face e, posteriormente, metalizadas com ouro utilizando o metalizador Quorum Q150RS.

A análise e documentação das imagens foram realizadas em dois microscópios eletrônicos de varredura: Leo 1430VP e JEOL JSM-6010LA. O preparo das amostras e a análise no MEV Leo 1430VP foram conduzidos no Núcleo de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Já o MEV JEOL JSM-6010LA foi utilizado no Laboratório de Microscopia Eletrônica de Varredura do Departamento de Física da UFV.

3.5 Microscopia óptica

As larvas foram dissecadas no estágio L4 com auxílio de uma lupa em solução salina tamponada com fosfato (PBS 0,1M; pH 7,2). Os IM foram fixados em solução Zamboni (paraformaldeído 4% e ácido pícrico 0,4% em PBS) por no mínimo 24 horas. Em seguida foram lavados com água destilada e desidratados em solução de etanol em série crescente (30%, 50%, 70% e 100%). Após a lavagem, o material foi pré-incluído em uma solução de etanol e resina (1:1) e posteriormente incluído em historesina Leica com catalisador e à vácuo, por 24 horas, para a polimerização. Após polimerização, as amostras foram seccionadas em micrótomo (Reichert Jung 2050) com navalhas de vidro em uma espessura de 5 μ m. As secções foram acomodadas em lâminas de vidro e coradas com

hematoxilina/eosina (HE), azul de bromofenol e marcadas com DAPI. Após a coloração, as lâminas foram montadas com meio de montagem Entellan e lamínula de vidro e fotografadas no microscópio de luz Olympus BX53 do Laboratório de Sistemática Molecular (BEAGLE-UFV), foram feitas fotografias de secções de interesse para o experimento.

3.6 Marcação por DAPI

Secções foram lavadas em tampão PBS e incubadas com solução de DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol; Biotium Inc., Hayward, CA, EUA; diluição 1:500) por uma hora, visando a coloração dos núcleos celulares. Após a incubação, as amostras foram novamente lavadas com PBS e montadas em lâminas com solução de sacarose a 50%.

As lâminas foram analisadas e fotografadas em microscópio de fluorescência Olympus BX53, disponível no Laboratório de Citogenética de Insetos do Departamento de Biologia Geral da UFV.

3.7 Detecção de lipídeos (impregnação por ósmio)

Intestinos médios foram dissecados e fixados em solução de glutaraldeído a 2,5% (em tampão cacodilato 0,1 M, pH 7,2) por, no mínimo, 24 horas. Para a detecção de lipídeos, os intestinos foram pós-fixados com tetróxido de ósmio a 1% em PBS por 1 hora, protegidos da luz. Após lavagens em PBS, os tecidos foram desidratados em série crescente de etanol até 100% e incluídos em Historesina (Leica). As secções obtidas foram coradas com hematoxilina e eosina e analisadas por microscopia de luz utilizando o microscópio Olympus BX53, pertencente ao Laboratório de Sistemática Molecular (BEAGLE – UFV).

3.8 Detecção de proteínas (azul de bromofenol)

Secções histológicas foram incubadas em solução de mercúrio bromofenol (100 mL de ácido acético a 2%, 0,05 g de azul de bromofenol e 1,5 g de cloreto de mercúrio) por duas horas. Em seguida, elas foram lavadas com ácido acético a 0,5% por 10 minutos e, posteriormente, em água corrente por 15 minutos. Após esse processo, as secções foram montadas, analisadas e fotografadas em microscópio de luz Olympus BX53, no Laboratório de Sistemática Molecular (BEAGLE-UFV).

4. RESULTADOS

O intestino médio (IM) das larvas de *T. violaceus* e *L. bigoti* consiste em um órgão tubular, subdividido em distintas regiões (Figs. 1A e 2A). A cárdia delimita a transição entre o intestino anterior e o IM (Figs. 1A, 1B, 2A e 2B). Subjacentes à cárdia, localizam-se oito cecos gástricos (CG) saculares, dispostos ao redor da porção inicial do IM em ambas as espécies (Figs. 1A, 1B, 2A e 2B). Na sequência, o IM prolonga-se em um tubo alongado, composto por um

segmento anterior e outro posterior, sendo este último contínuo com o intestino posterior (Figs. 1A e 2A).

A cárdia possui forma bulbosa (Figs. 1B, 2B, 3A; 3C; 3D, 3E; 3F). Em *T. violaceus*, independentemente do grupo analisado, ela é bem desenvolvida e dilatada, com média de 780 μm de comprimento e 638 μm de largura (Figs. 3A; 3C; 3E). Em *L. bigoti*, ela é relativamente menos desenvolvida com 199 μm de comprimento e 197 μm de largura (Figs. 3D; 3F).

Os CG, apesar da equivalência numérica e posicional, apresentam diferenças em formato e aparência. Em *T. violaceus*, os CG são alongados e cilíndricos, com superfície externa pouco enrugada (Fig 1A; 1B). Em *L. bigoti*, os CG são digitiformes, e apresentam uma textura superficial mais irregular e com projeções celulares e fibras musculares aparentes (Fig 2B; 2C).

Em *T. violaceus*, em todos os tempos analisados, o IM anterior é mais dilatado, longo e volumoso em comparação ao IM posterior, que é ligeiramente mais estreito e menos expandido. O IM anterior possui 1.846 μm de comprimento e 638 μm de diâmetro, enquanto o IM posterior apresenta 672 μm de comprimento e 418 μm de diâmetro (Figs. 3A, 3C, 3E). Em *L. bigoti*, o IM anterior é mais alongado e estreito em relação ao IM posterior, que se apresenta mais curto e dilatado. Em *L. bigoti*, o IM anterior mede 2.579 μm de comprimento e 269 μm de diâmetro, ao passo que o IM posterior mede 1.114 μm de comprimento e 382 μm de diâmetro (Figs. 3B, 3D, 3F). Comparativamente, o IM de *T. violaceus* é mais curto e espesso, enquanto o de *L. bigoti* é mais longo e delgado (Figs. 3A-F).

Em ambas as espécies, o IM possui fibras musculares circulares e longitudinais envolvendo o órgão, além de traquéolas (Figs. 1A; 1C; e 2A; 2D). No lumen do IM, está presente a MP, que delimita o espaço endoperitrófico e atua no armazenamento e isolamento do bolo alimentar (Fig. 1D; 1E e 2D; 2E). A transição entre o IM e o IP é marcada pela inserção dos túbulos de Malpighi (Figs. 1A; 2A).

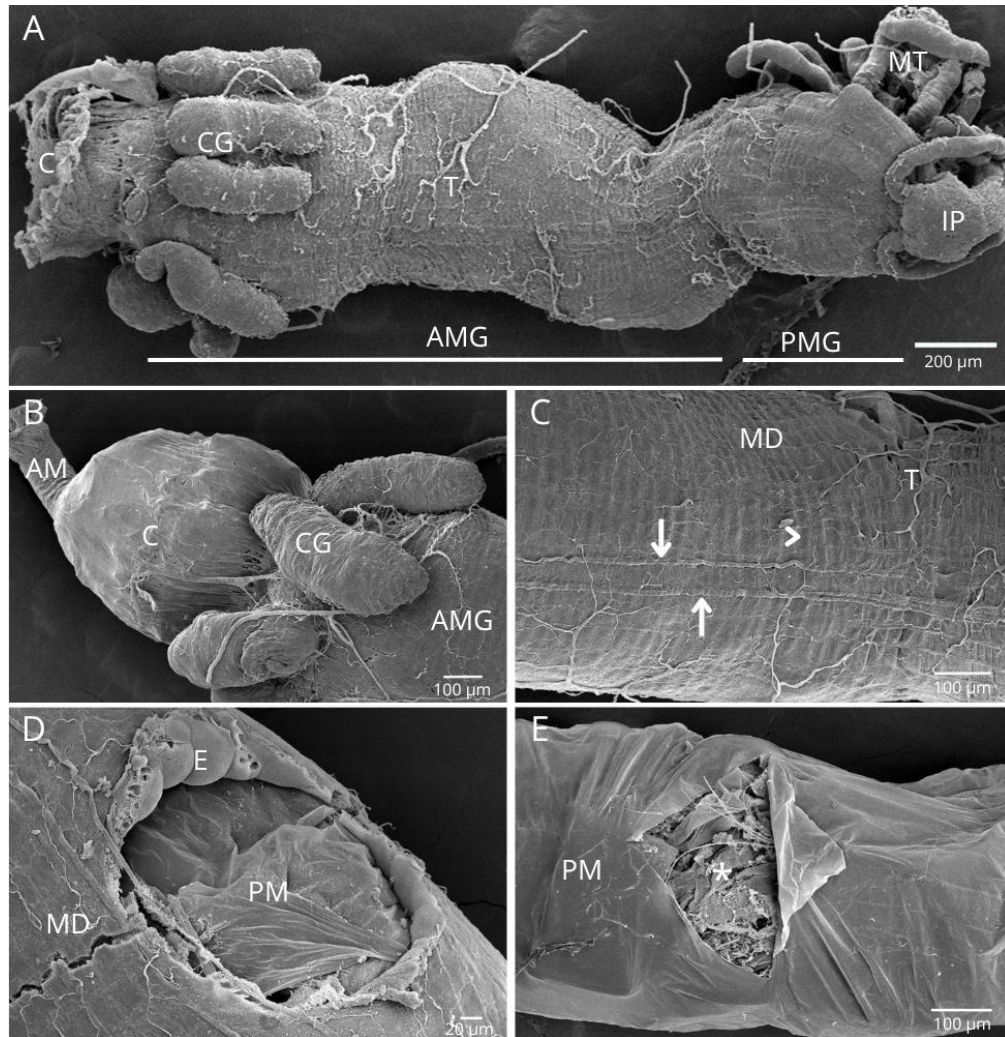


Figura 4: Micrografias eletrônicas de varredura do intestino médio de larvas de quarto instar de *Toxorhynchites violaceus*: **A:** 24 horas, **B:** zero horas (jejum), **C:** uma hora, **D:** três horas e **E:** cinco horas após a ingestão de uma larva de *Aedes aegypti*. **A:** intestino médio anterior (AMG) e intestino médio posterior (PMG), com traquéolas superficiais (T). A transição do PMG com o intestino posterior (IP) é marcada pela inserção dos túbulos de Malpighi (MT). CG: cecos gástricos (CG) e região da cárdia (C). **B:** região de transição do intestino anterior (AM) para o intestino médio anterior (AMG), com cego gástrico (CG) e cárdia (CA) em evidência. **C:** superfície do intestino médio (MD) com fibras musculares longitudinais em evidência (seta branca), traquéolas (T) e fibras circulares (cabeça de seta). **D:** detalhe do intestino médio (MD) com a parede rompida, evidenciando a superfície interna exposta (E) e matriz eritrófica (PM). **E:** detalhe da matriz peritrófica (PM) rompida e fora do MD, evidenciando o bolo alimentar (*).

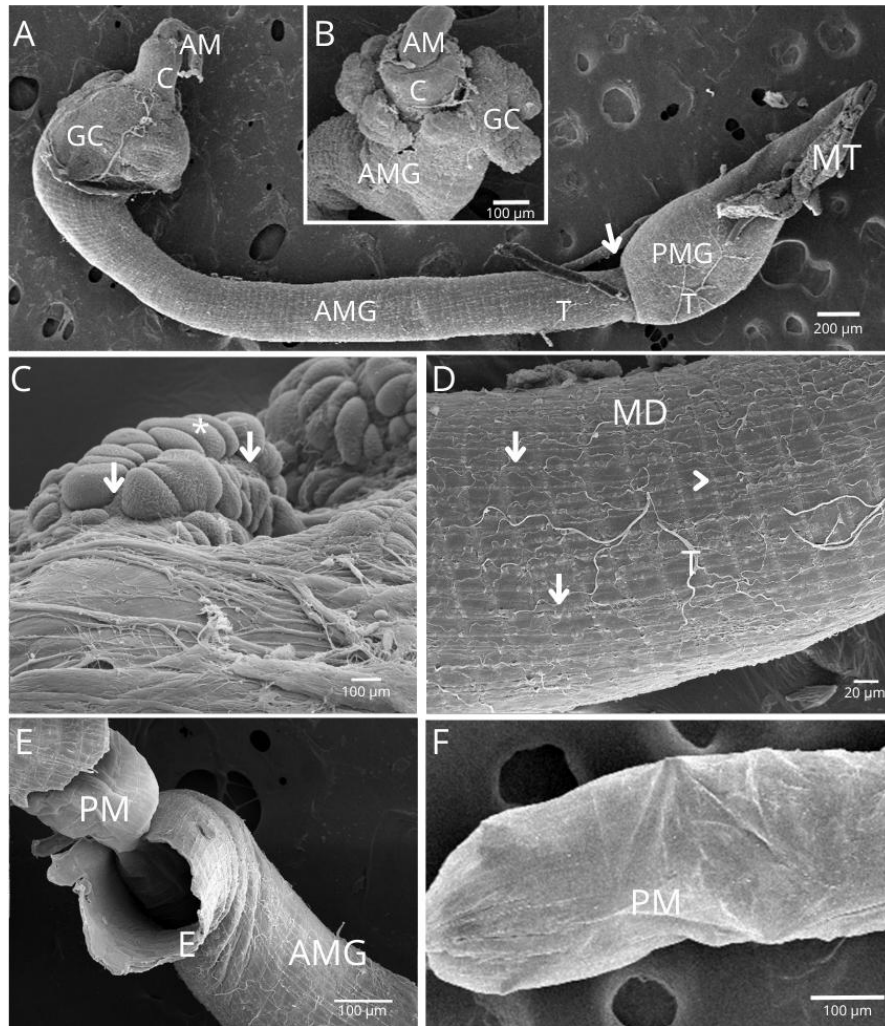


Figura 5: Micrografias eletrônicas de varredura do intestino médio de larvas de quarto instar de *Lutzia bigoti*. **A:** uma hora, **B:** 16 horas, **C:** zero horas, **D:** uma hora, **E:** cinco horas e **F:** 24 horas após a ingestão de uma larva de *Aedes aegypti*. **A:** intestino médio anterior (AMG) com transição (seta branca) para o intestino médio posterior (PMG), com traquéolas distribuídas (T) e inserção com túbulos de malpigh (MT) no fim do intestino médio posterior. Observa-se também a presença intestino anterior (AM), seguido pela cárdia (C) e cecos gástricos (CG). **B:** detalhe do intestino anterior (AM), cárdia (C), cecos gástricos (CG) e intestino médio anterior (AMG), sendo a região de transição entre o intestino anterior e intestino médio. **C:** superfície dos cecos gástricos em evidência, destacando as projeções celulares (*) e fibras musculares (setas) **D:** intestino médio (MD) com fibras longitudinais (setas). Observa-se também traquéolas (T) e fibras circulares (cabeça de seta). **E:** intestino médio anterior (AMG) rompido, com a superfície da parede exposta (E) evidenciando a matriz peritrófica (PM). **F:** matriz peritrófica (PM) exposta, com a presença de possível conteúdo alimentar (região dilatada).

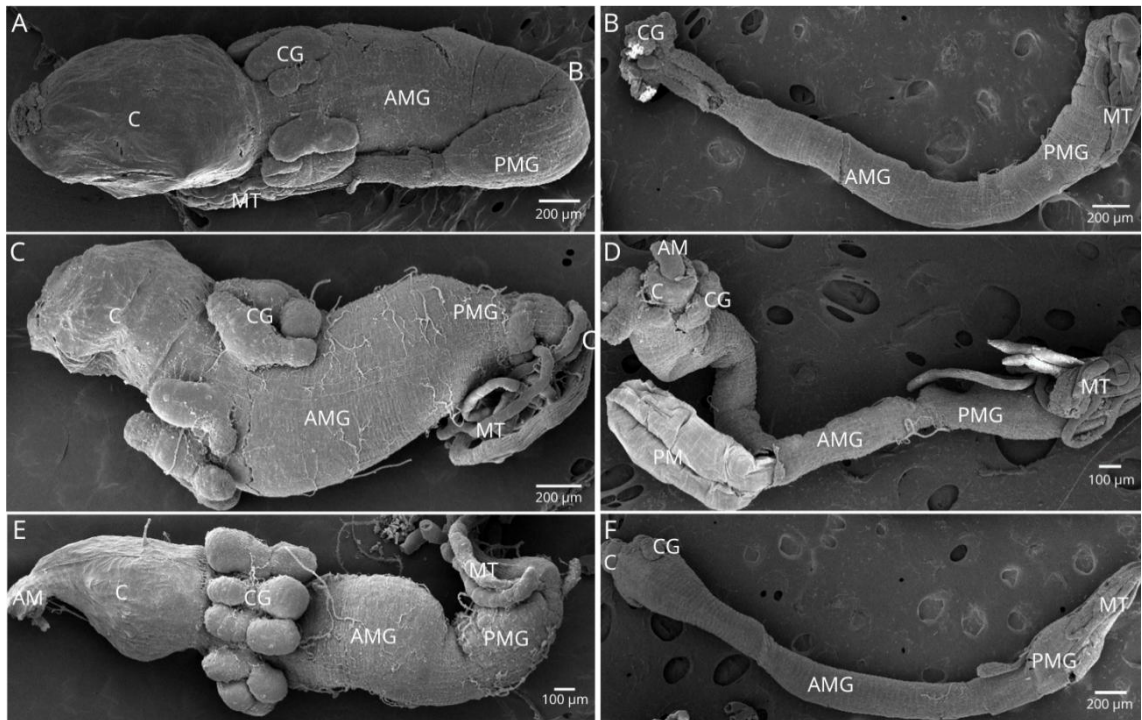


Figura 6: Micrografias eletrônicas de varredura do intestino médio (IM) de larvas de quarto instar de *Toxorhynchites violaceus* (A, C, E) e *Lutzia bigoti* (B, D, F). **A:** uma hora, **B:** uma hora, **C:** cinco horas, **D:** 16 horas, **E:** 24 horas, **F:** três horas após ingestão de larva de *Aedes aegypti*. **A, C e E:** IM anterior (AMG) mais largo em relação ao IM posterior (PMG), com cárdia (C) alta, ampla e dilatada. **B, C e F:** IM anterior (AMG) mais fino em relação ao IM posterior (PMG), com cárdia (C) pouco desenvolvida em altura e largura. AM: intestino anterior, CG: cecos gástricos, PM: matriz peritrófica, MT: túbulos de Malpighi.

4.1 Histologia

A cárdia, em *L. bigoti*, é formada pela invaginação do esôfago no ventrículo e apresenta três paredes concêntricas: interna, recorrente e externa. Sua parede interna corresponde à continuação do esôfago e delimita o lúmen esofágico; a parede recorrente se projeta em torno da interna, formando parte da válvula estomodeal; e a parede externa circunda o conjunto, conectando-se ao epitélio do IM. O epitélio da cárdia é simples e apresentou células cúbicas. O lúmen da cárdia, localizado entre as paredes recorrente e externa, é o local onde ocorre a secreção da membrana peritrófica (Fig. 4A).

O epitélio dos CG é composto majoritariamente por células digestivas que são achatadas, com os núcleos achatados/arredondados em todos os grupos das duas espécies (Figs. 4B-D). O citoplasma delas é predominantemente basofílico e na região apical há uma borda em escova alta e regular, voltada para o lúmen com sua base positiva para azul de bromofenol (Figs. 4B-F).

Em *T. violaceus*, o conteúdo luminal dos CG apresentou coloração variável, oscilando entre marrom claro e marrom escuro, além da presença de grânulos densos e pigmentados em todos os grupos experimentais (Fig. 4B; 4C; 4E). A coloração do lúmen e a quantidade de grânulos variam entre os tempos após a alimentação, mas sem um padrão específico para cada um deles. Por outro lado, em *L. bigoti*, o conteúdo luminal dos CG não apresenta coloração escura e nem a presença de grânulos (Figs. 4D; 4F).

Em *T. violaceus*, a transição entre o epitélio dos CG e o restante do IM anterior é de fácil identificação (Figs. 4B-C), sendo particularmente evidente no grupo de três horas após alimentação, que se destaca pela alta concentração de gotículas lipídicas nas células digestivas do IM anterior (Fig. 4B). Em contraste, em *L. bigoti*, a transição epitelial entre os CG e o IM anterior é menos abrupta, devido à escassez ou ausência de possíveis vesículas citoplasmáticas nos enterócitos do IM anterior (Figs. 4D). No CG observa-se também a membrana cecal (Fig. 4B), composta por uma fina camada que separa a região interna do lúmen do CG do lúmen do IM anterior, contudo foi registrada apenas em *T. violaceus*.

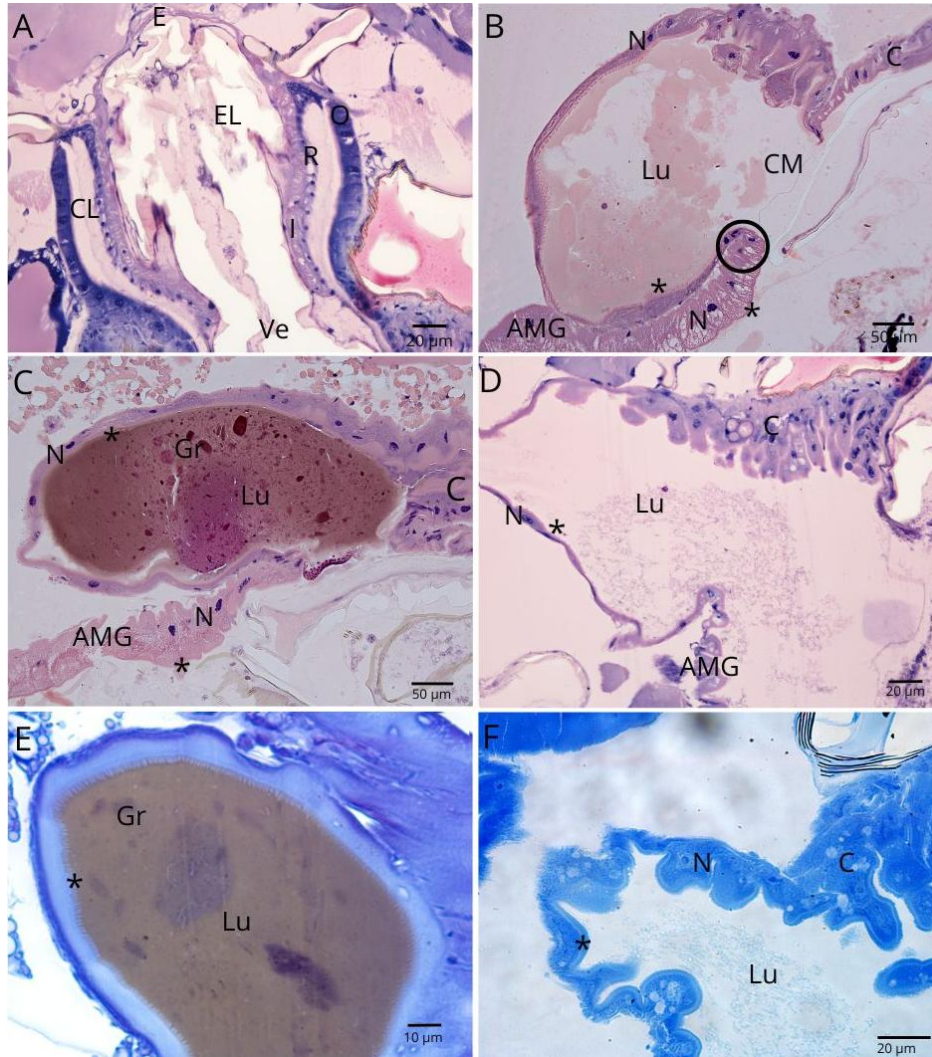


Figura 7: **A:** Secção histológica da cárdia de larva de *L. bigoti*. **B-F:** Secções histológicas do ceco gástrico (CG) de larvas de *Toxorhynchites violaceus* (B, C e E) e *Lutzia bigoti* (D e F). **A:** três horas, **B:** 24 horas, **C:** cinco horas, **D:** 24 horas, **E:** zero horas (jejum) e **F:** 24 horas após alimentação de uma larva de *Aedes aegypti*. **A:** cárdia em evidência, demonstrando a invaginação do esôfago no ventrículo e a formação das três paredes da cárdia: interna (I) recorrente (R) e externa (O). Observam-se também o lúmen do esôfago (EL) o lúmen da cárdia (CL) e a região ventricular (Ve) marcando o fim do intestino anterior e o início do intestino médio. **B:** transição (círculo preto) do CG com intestino médio anterior (AMG), observa-se a membrana cecal (CM), uma fina linha na região de saída do CG. **C:** presença de diversos grânulos (Gr) no lúmen do ceco gástrico. **D:** transição do CG com intestino médio anterior (AMG), lúmen (Lu) do CG sem presença de grânulos e coloração. **E-F:** base do CG positivo para coloração azul de bromofenol em *T. violaceus* e *L. bigoti*, respectivamente. N: núcleos, C: cárdia, *: borda em escova.

Na região apical das células epiteliais do IM anterior de ambas espécies, há uma borda em escova baixa e positiva para azul de bromofenol (Fig. 5A-B). O citoplasma das células digestivas é eosinofílico, indicando predominância de componentes básicos, enquanto os núcleos são basofílicos, compatível com seu conteúdo ácido (Figs. 6A-F; 7A-F).

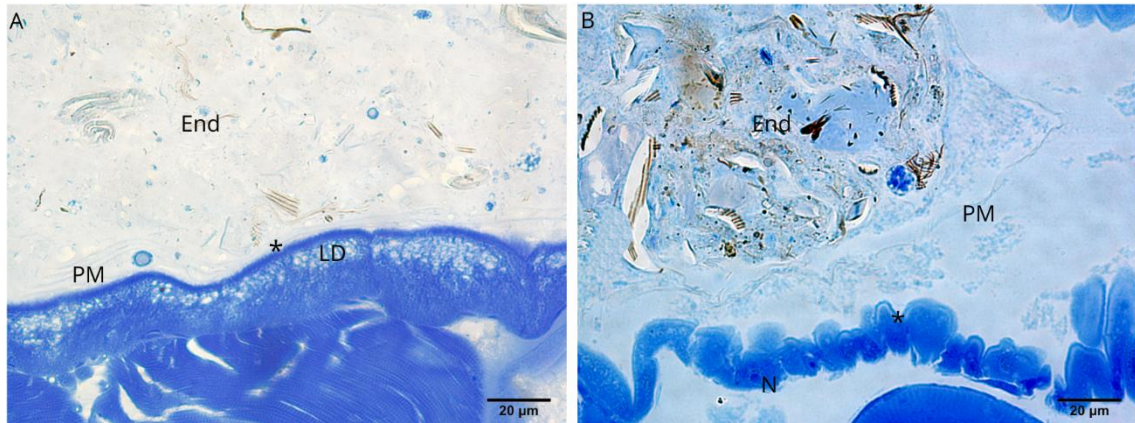


Figura 8: Secções histológicas do intestino médio (IM) anterior de larvas quarto instar de *Toxorhynchites violaceus* (A) e *Lutzia bigoti* (B) após consumo de uma larva de *Aedes aegypti*. **A:** IM anterior do grupo uma hora, borda em escova (*) marcada para azul de bromofenol. **B:** IM anterior do grupo cinco horas, borda em escova (*) marcada para azul de bromofenol. N: núcleo, PM: matriz peritrófica, End: espaço endoperitrófico. Coloração: azul de bromofenol.

O IM anterior de *T. violaceus* apresenta epitélio com células digestivas cuja forma varia entre cúbica e colunar, com núcleos achatados, esféricos ou alongados (Figs. 6A-F). No grupo de zero horas, predominam células colunares com núcleos alongados (Fig. 6A). No grupo de uma e cinco horas observa-se células cúbicas com núcleo esférico (Figs. 6B; 6D) e, em três horas, um epitélio com células mais achatadas e com núcleos também achatados (Figs. 6C). No grupo de 16 horas, não há um padrão morfológico constante, sendo identificadas células com as características variando entre cúbica a colunar (Figs. 6E-F). Já no grupo de 24 horas, as células voltam a apresentar forma colunar com núcleos alongados, semelhante ao observado no grupo zero horas (Fig. 6A). Em *L. bigoti*, por sua vez, todos os tempos analisados exibem um epitélio fino, variando entre pavimentoso e cúbico com um mesmo grupo podendo apresentar ambas características (Figs. 7A-F).

O citoplasma das células do IM anterior de *T. violaceus* apresenta alterações morfológicas ao longo do processo digestivo, permitindo a distinção dos grupos experimentais com base no padrão de morfológico (Figs. 6A-F). No grupo controle, não são detectadas vesículas (Fig. 6A). No grupo de uma hora, há um aumento na presença de possíveis vesículas, predominantemente localizadas na região apical do citoplasma (Fig. 6B). O grupo de três horas

caracteriza-se pela presença de possíveis vesículas desenvolvidas por quase todo o citoplasma (Fig. 6C). Cinco horas após a ingestão, a quantidade de possíveis vesículas diminui novamente, semelhante ao padrão observado no grupo de zero horas, sendo em muitos casos ausente (Fig. 6D). No grupo de 16 horas, algumas amostras apresentam possíveis vesículas dispersas por todo o citoplasma, enquanto outras mostram distribuição restrita à região apical (Figs. 6E–F). No grupo de 24 horas, o padrão é comparável ao grupo controle, com citoplasma pobre em vesículas ou desprovido delas (Fig. 6A). Já em *L. bigoti*, o padrão das possíveis vesículas citoplasmática é mais discreto e uniforme entre os grupos (Fig 7A-F). As possíveis vesículas são observadas apenas nos grupos de um, três e cinco horas (Fig. 7B; 7C; 7D), com distribuição difusa ao longo do citoplasma, sem o acúmulo acentuado característico de *T. violaceus*.

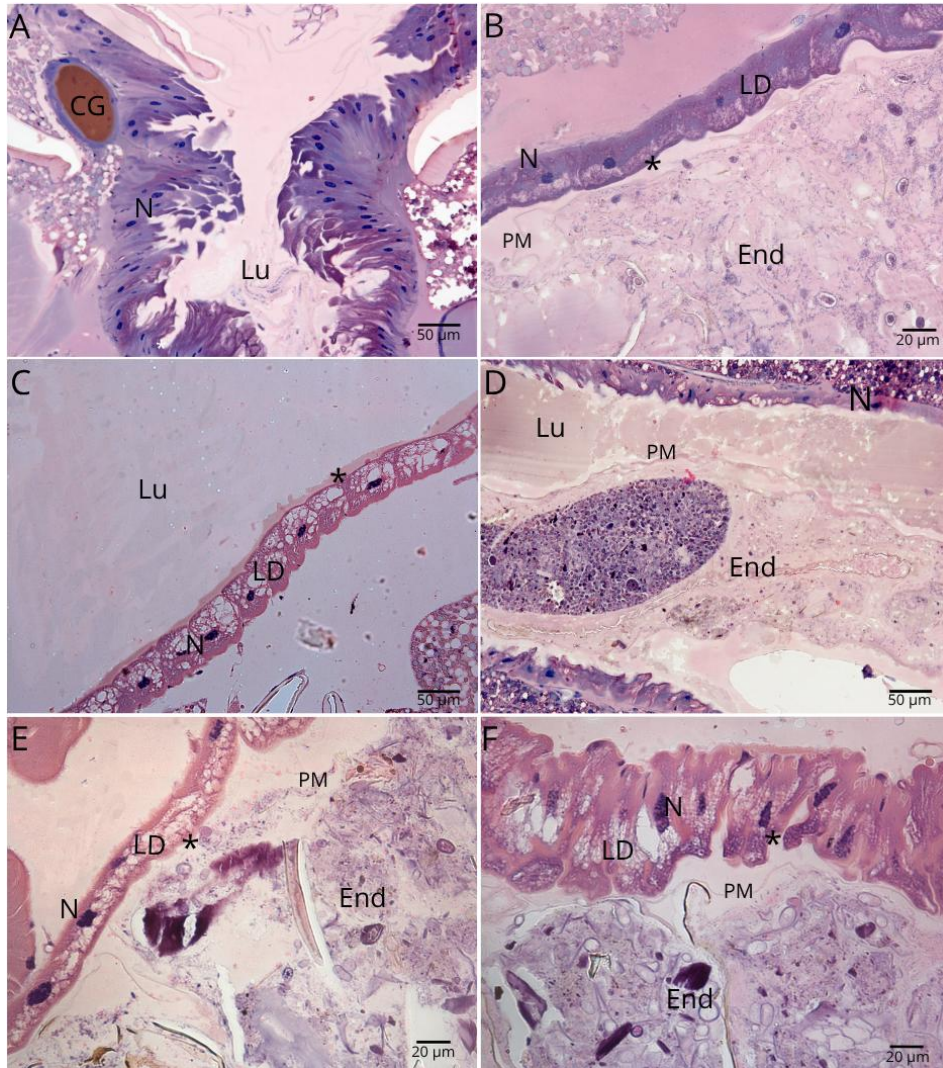


Figura 9: Secções histológicas do intestino médio (IM) anterior de larvas de quarto instar de *Toxorhynchites violaceus*. **A:** zero horas (jejum), **B:** uma hora, **C:** três horas, **D:** cinco horas, **E-F:** 16 horas após ingestão de uma larva de *Aedes aegypti*. **A:** epitélio colunar do IM anterior (AMG) com núcleos colunares (N). Ausência de gotículas lipídicas nesse estágio. Ceco gástrico (CG) presente à esquerda. **B:** epitélio cubico do IM anterior (AMG) e núcleo esférico (N). Pequenas gotículas lipídicas no ápice do citoplasma celular (LD). **C:** epitélio (AMG) e núcleo achatados (N). Nota-se gotículas lipídicas distribuídas por todo espaço citoplasmático (LD). **D:** epitélio cúbico com núcleo esférico e ausência de vesículas. **E:** epitélio (AMG) cúbico com núcleos achatados (N). Gotículas lipídicas distribuídas por todo o citoplasma (LD). **F:** epitélio (AMG) e núcleo colunar (N). Presença de gotículas lipídicas (LD) no citoplasma, mas não ocupam sua totalidade. Lu: lúmen; End: PM: matriz peritrófica; End: espaço endoperitrófico. Coloração: Hematoxilina e Eosina (HE).

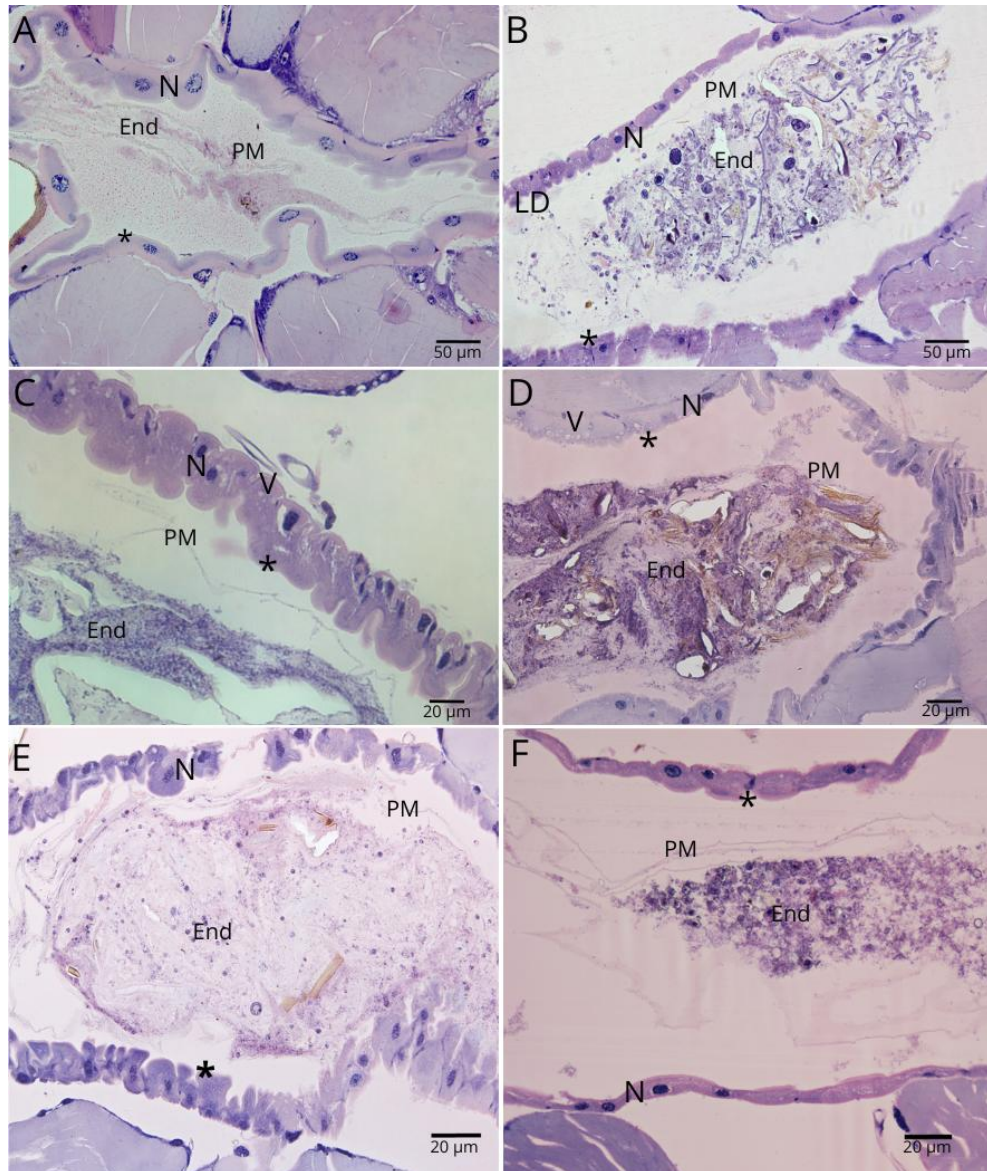


Figura 10: Secções histológicas do intestino médio (IM) anterior de larvas de quarto instar de *Lutzia bigoti*. **A:** zero hora (jejum), **B:** uma hora, **C:** três horas, **D:** cinco horas, **E:** 16 horas **F:** 24 horas após ingestão de uma larva de *Aedes aegypti*. **A:** epitélio pavimentoso ausência de gotículas lipídicas. **B:** epitélio cubico, com presença de gotículas lipídicas (LD) dispersas no citoplasma. **C:** epitélio cubico com possíveis pequenas vesículas dispersas no citoplasma (V). **D:** epitélio pavimentoso com possíveis pequenas vesículas (V) dispersas no citoplasma. **E:** epitélio cúbico, com ausência de vesículas citoplasmáticas. **F:** epitélio pavimentoso com ausência de vesículas citoplasmática. N; núcleo, *; borda em escova; V; possíveis vesículas, LG; gotículas lipídicas, PM; matriz peritrófica, End; espaço endoperitrófico. Coloração: Hematoxilina e Eosina (HE).

As células digestivas do IM posterior são colunares com núcleos alongados, geralmente localizados na porção basal das células (Figs. 8A-B). Sua borda em escova é positiva para bromofenol e, diferentemente do IM anterior, é mais alta e delgada (Figs. 8C-D). Essa característica demarca uma transição distinta entre o IM anterior e o posterior em ambas as espécies (Figs. 8E-F), bem como entre o IM posterior e o intestino posterior, sendo este último registrado, neste estudo, apenas em *T. violaceus* (Figs. 9A-B).

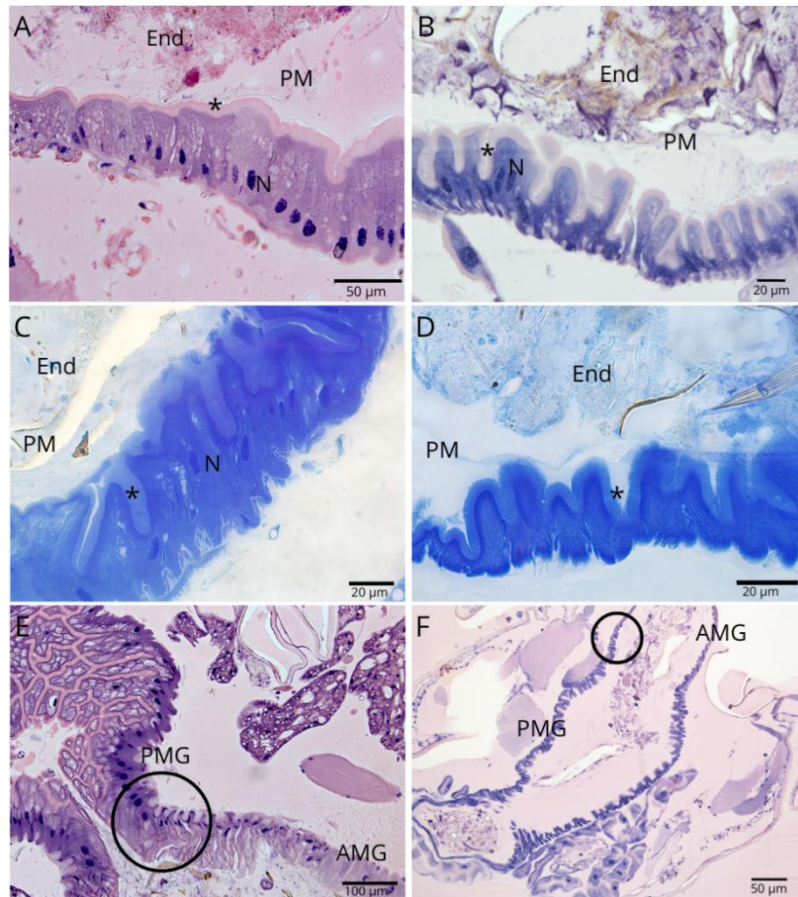


Figura 11: A-D: Secções histológicas do intestino médio (IM) posterior de *Toxorhynchites violaceus* e *Lutzia bigoti*. A: três horas, B cinco horas, C: uma hora, D: cinco horas após a ingestão de uma larva de *Aedes aegypti*. A-B: IM anterior com epitélio colunar, núcleo na região basal (N) e borda em escova (*) de *Toxorhynchites violaceus* e *L. bigoti* respectivamente. C-D: coloração azul de bromofenol, evidenciando a borda em escova no IM posterior de *T. violaceus* e *L. bigoti*, respectivamente. E-F: transição (círculo preto) entre o IM anterior (AMG) e o IM posterior (PMG) em *T. violaceus* e *L. bigoti* respectivamente, ambos cortes são referentes ao grupo 24 horas. Coloração: Hematoxilina e Eosina (HE)

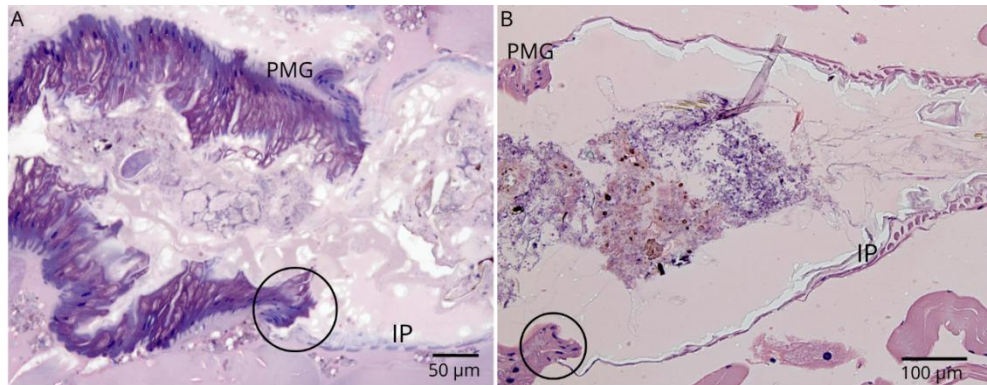


Figura 12: Secções histológicas evidenciando a transição (círculo preto) entre intestino médio posterior (PMG) e o intestino posterior (IP) em *Toxorhynchites violaceus*. PMG; intestino médio posterior, IP; intestino posterior. Coloração: Hematoxilina e Eosina (HE).

Em *T. violaceus* a impregnação por ósmio foi limitada nos CG, sendo pouco perceptível nos grupos uma e três horas (Figs. 10A-B). No IM anterior, os grupos experimentais de uma, três e 16 horas após a alimentação apresentam marcação positiva para a impregnação por ósmio, confirmando que as possíveis vesículas no citoplasma dos enterócitos observadas correspondem a gotículas lipídicas (Figs. 10D-E), enquanto o grupo de zero hora foi negativo para o teste citoquímico (Fig. 10C). Em *L. bigoti*, o epitélio IM anterior do grupo zero horas foi negativo para a impregnação por ósmio (Fig. 11A) em contraste com o grupo uma hora, que exibiu marcações distribuídas ao longo do desse segmento (Fig. 11B). No grupo de 24 horas, não se observa a marcação do epitélio do IM anterior, mas apresentou marcação positiva para lipídeo no espaço endoperitrófico (Fig. 11C). Em todos grupos analisados de ambas espécies não ocorre marcação para ósmio no IM posterior (Figs. 10E; 11D).

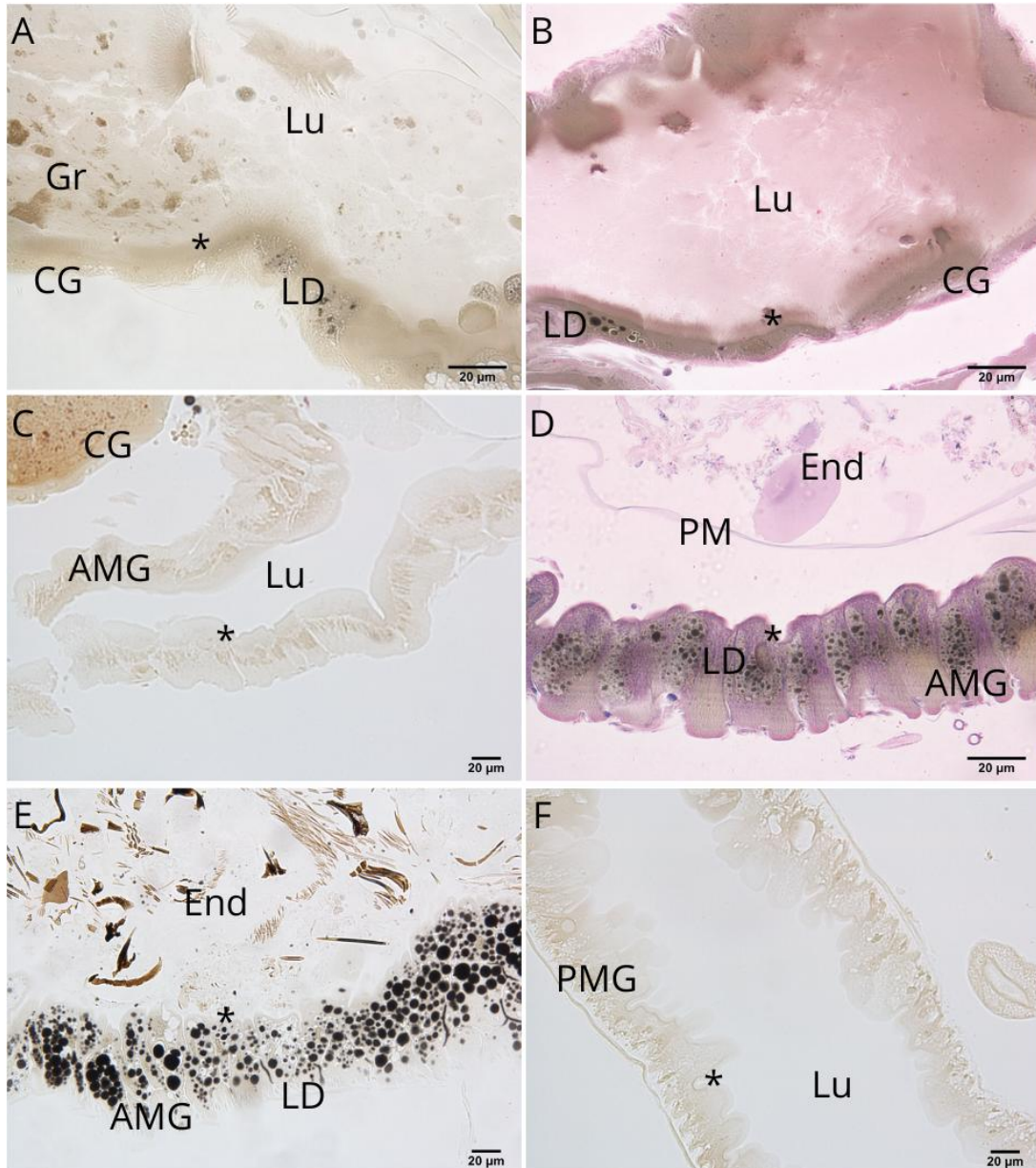


Figura 13: Impregnação por ósmio no intestino médio (IM) de larvas de *Toxorhynchites violaceus*. **A-B:** histologia do ceco gástrico (CG) do grupo uma e três horas após a ingestão de uma larva de *Aedes aegypti*, respectivamente, nota-se marcação positiva para ósmio devido as gotículas lipídicas (LD). **C:** IM anterior (AMG) e ceco gástrico (CG) de larvas zero horas, não demonstram impregnação positiva. **D:** IM anterior (AMG) do grupo uma hora com gotículas lipídicas (LD) no ápice celular. **E:** IM anterior (AMG) do grupo três horas com gotículas lipídicas (LD) difusas por todo enterócito. **F:** IM posterior (PMG) do grupo zero horas com ausência de gotículas lipídicas. **B e D:** lâminas contracoradas com HE. *: borda em escova, Gr; grânulos, PM: matriz peritrófica, End: espaço endoperitrófico.

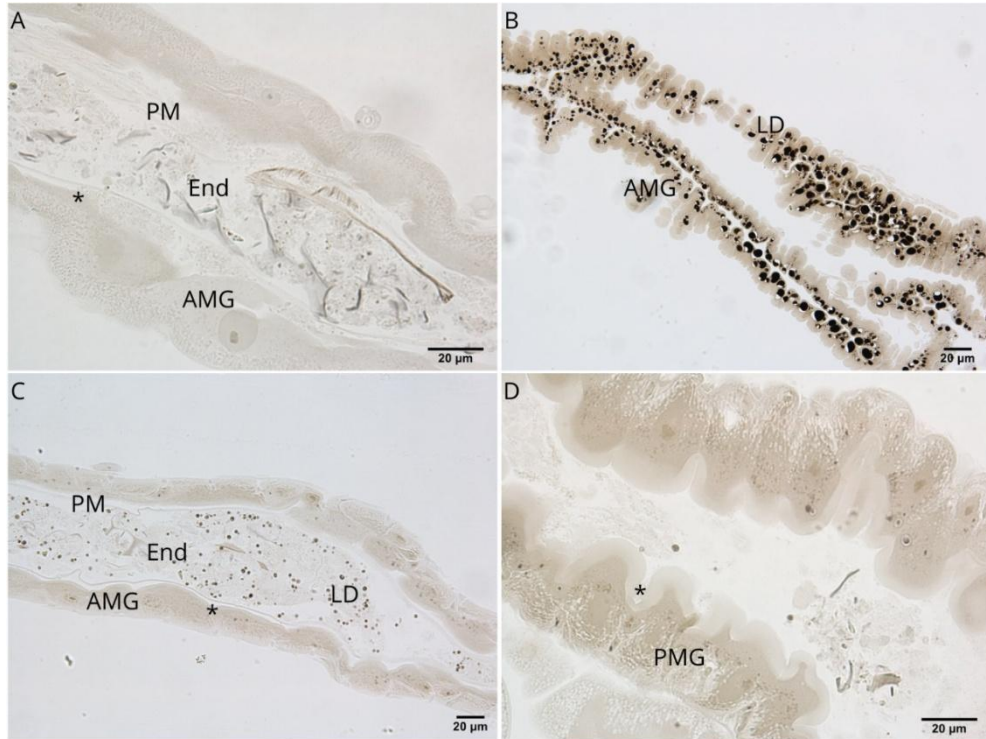


Figura 14: Impregnação por ósmio no intestino médio (IM) de larvas de *Lutzia bigoti*. **A:** IM anterior (AMG) do grupo zero horas, negativos para impregnação com ósmio devido à ausência de gotículas lipídicas. **B:** IM anterior (AMG) do grupo uma hora, positivo para ósmio devido a presença de gotículas lipídicas (LD). **C:** IM anterior (AMG) do grupo 24 horas, não se observa marcação para ósmio no epitélio do AMG, contudo, nota-se a presença de gotículas lipídicas (LD) no espaço endoperitrofico (End). **D:** IM posterior (PMG) do grupo zero horas, negativos para impregnação por ósmio. *: borda em escova, PM: matriz peritrófica.

4.2 Lúmen do intestino médio

A MP é observada em todos os grupos analisados de ambas as espécies, estendendo-se desde o IM anterior até o posterior, onde se posiciona próximo à borda em escova do epitélio, delimitando o bolo alimentar no espaço endoperitrofico (Figs 6A-F; 7A-F; 8A-D). Nos CG a MP está ausente, entretanto, observa-se uma fina estrutura separando o conteúdo dos CG do espaço ectoperitrofico, conhecida como membrana cecal, a qual também exerce papel compartimentalizador. (Fig. 3B)

Em *T. violaceus*, observa-se a presença de bolo alimentar no espaço endoperitrofico em todos os tempos experimentais (Figs. 6B-F; 12C), inclusive no grupo controle, submetido a jejum de 24 horas (Fig. 12A). Histologicamente, o bolo alimentar apresenta-se predominantemente amorfo, sem estrutura definida e, na maioria dos grupos analisados, sem a presença de restos celulares ou tegumento de *A. aegypti* (Figs. 12C-D) exceção ocorre no grupo

de uma hora, no qual foram observados, em pequenas quantidades, núcleos celulares morfologicamente íntegros no lúmen intestinal (Fig. 13A).

Em *L. bigoti*, a principal diferença está relacionada aos grupos controle e 24 horas (Figs. 12B; 12E; 12F), nos quais o espaço endoperitrófico encontra-se vazio ou, quando presente, o bolo alimentar apresenta quantidade muito reduzida em comparação a *T. violaceus* (Figs. 12A-F). Nos demais grupos, observa-se a presença de bolo alimentar com padrão amorfo, não sendo possível detectar restos celulares ou tegumento de *Aedes aegypti* em nenhuma das amostras, mesmo após marcação com DAPI (Figs. 7A-F; 13C-D).

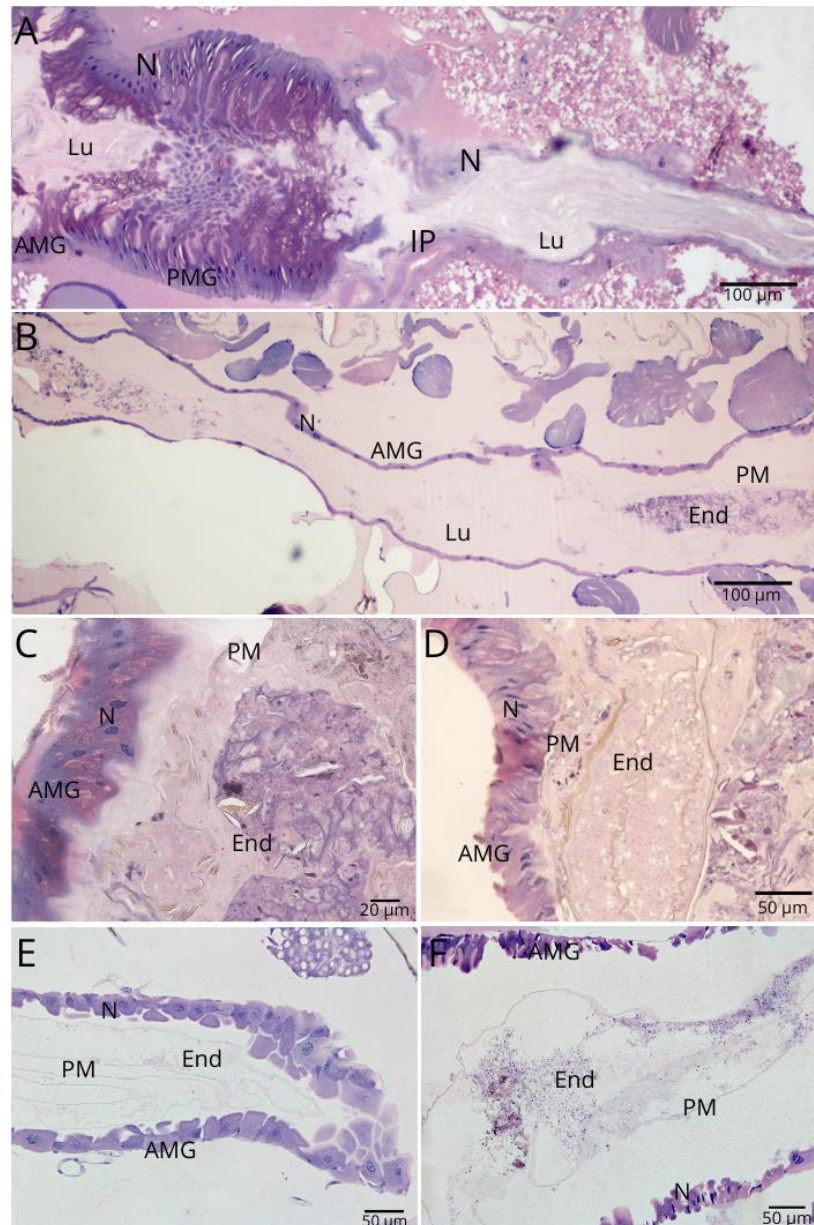


Figura 15: Secções histológicas do intestino médio de *Toxorhynchites violaceus* (A, C e D) e *Lutzia bigoti* (B, E e F). **A:** zero horas (jejum), **B:** 24 horas, **C:** zero horas (jejum), **D:** 24 horas, **E-F:** zero horas (jejum) após a ingestão de uma larva de *Aedes aegypti*. Observe que *T. violaceus* apresenta dualidade em zero horas, com lúmen (Lu) podendo apresentar ou não resto de bolo alimentar no espaço endoperitrófico (End) (A e C), enquanto em 24 horas o bolo alimentar está constantemente presente. Em *L. bigoti* (B, E, F), o lúmen (Lu) praticamente não apresenta bolo alimentar no espaço endoperitrófico (End), tanto nas amostras de zero quanto de 24 horas. N: núcleo, AMG: intestino médio anterior, PMG: intestino médio posterior, IP: intestino posterior, PM: matriz peritrófica, Lu: lúmen, End: espaço endoperitrofico. Coloração: Hematoxilina e Eosina (HE).

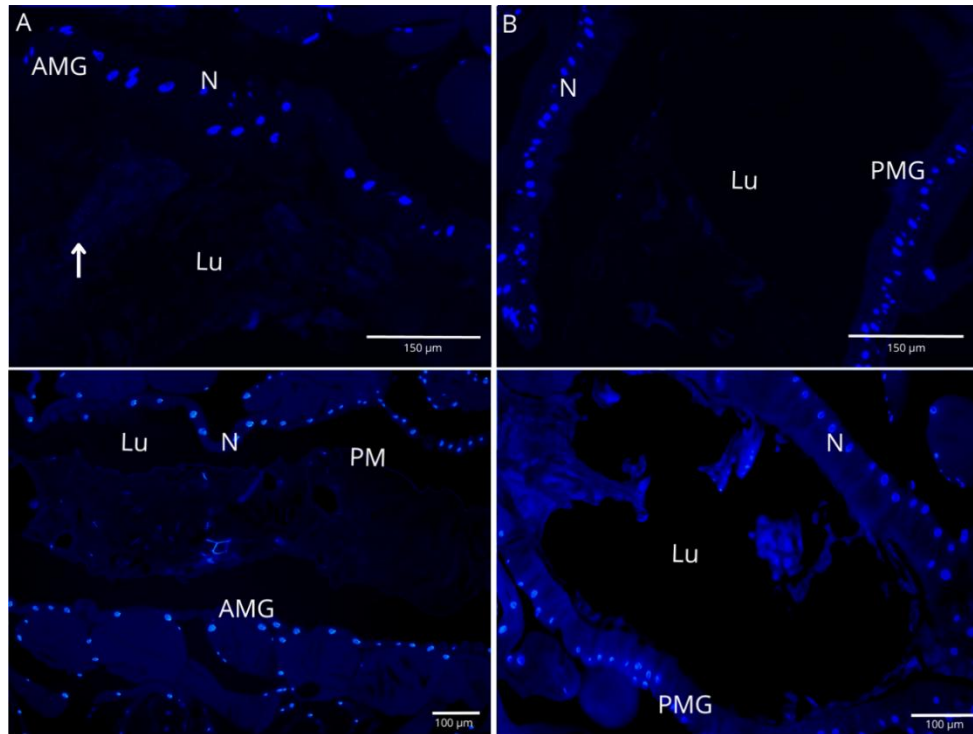


Figura 16: Microscopia de fluorescência de diferentes regiões do intestino de *Toxorhynchites violaceus* (A e B) e *Lutzia bigoti* (C e D) corado por DAPI. **A:** uma hora, **B:** três horas, **C:** cinco horas **D:** 16 horas após ingestão de uma larva de *Aedes aegypti*. **A:** região do intestino médio (IM) anterior, observa-se no lúmen (Lu) pequenas células (seta branca) positivas para marcação com DAPI. **B:** IM posterior (AMG) com marcação DAPI ausente no lúmen (Lu). **C-D:** IM anterior e IM posterior, respectivamente. Ambas regiões não apresentam marcação no Lúmen (Lu). N: núcleo, PM: matriz peritrófica.

5. DISCUSSÃO

O sistema digestivo de larvas de mosquito, crucial para sua sobrevivência e desenvolvimento, é morfologicamente e funcionalmente dividido em três regiões principais: o intestino anterior, que compreende a faringe, o esôfago e a cárdia; o IM, principal sítio de digestão enzimática e absorção de nutrientes; e o intestino posterior, que inclui o intestino reto e as papilas anais, desempenhando funções cruciais na osmorregulação e excreção (Lehane & Billingsley, 2012; Caccia et al., 2019). Nossas análises por microscopia eletrônica de varredura (MEV) revelaram que tanto *T. violaceus* quanto *L. bigoti* exibem essa configuração anatômica geral, sugerindo que a estratégia alimentar predatória não induz alterações morfológicas drásticas nesses segmentos macroscópicos do trato digestivo. Essa observação é consistente com a conservação da arquitetura básica do trato digestivo em diversas espécies de mosquitos, independentemente de seus hábitos alimentares específicos, embora adaptações em nível

celular e molecular sejam esperadas para otimizar a digestão de diferentes mosquitos (Terra & Ferreira, 1994; Neira, 2008; Lehane & Billingsley, 2012; Godoy et al., 2015)

A cárdia apresenta diferenças morfológicas entre as espécies analisadas. Em *Toxorhynchites violaceus*, ela é mais alongada e dilatada em comparação a *Lutzia bigoti*. Essas variações podem refletir diferenças funcionais, sugerindo que *T. violaceus* possui maior capacidade de produção da matriz peritrófica e/ou um controle mais eficiente da passagem do alimento para o intestino médio, aspectos possivelmente relacionados à sua fisiologia digestiva e ao manejo do bolo alimentar (Terra & Ferreira, 1994; Lehane, 1997; Holtof et al., 2019).

A morfologia observada nos CG de *L. bigoti*, caracterizada por projeções celulares evidenciados na MEV, contrasta com o aspecto mais uniforme observado em *T. violaceus*, e pode refletir variações na organização epitelial entre as espécies. Essas projeções das células digestivas podem estar associadas à presença de fibras musculares entre as células, as quais influenciam a conformação epitelial e a organização do tecido. Estudos anteriores demonstraram que os CG de larvas de *A. aegypti* são revestidos por musculatura estriada, composta por uma camada externa de músculos circulares e uma interna de músculos longitudinais (Jones & Zeve, 1968; Bernick et al., 2007). Essa disposição muscular pode contribuir para a movimentação do conteúdo luminal, favorecendo processos de absorção de nutrientes e secreção de enzimas digestivas.

Em ambas as espécies estudadas, o epitélio dos CG é constituído por células achatadas, característica indicativa de uma estrutura especializada na absorção e secreção ativa de moléculas (Muse et al., 2023). Além disso, observa-se a presença da borda em escova, uma especialização da membrana plasmática composta por microvilosidades (Lange 2011; Alberts et al., 2017). Essas microvilosidades desempenham papel ao aumentar a superfície de contato celular, o que potencializa a eficiência na troca de substâncias entre a célula e o lúmen intestinal (Alberts et al., 2017). Ademais, elas acomodam proteínas de membrana, como transportadores de glicose, enzimas, canais iônicos, bombas e trocadores, que garantem o funcionamento integrado dos processos de absorção e transporte celular (Lange, 2011). A positividade para a coloração com azul de bomofenol da borda em escova dos CG, observada em *T. violaceus* e *L. bigoti*, corrobora a presença e atividade local de enzimas digestivas, sugerindo a função desse segmento na degradação final de macromoléculas de carboidratos e proteínas, conforme demonstrado por estudos com transcriptoma dos CG em *A. gambiae* (Neira et al., 2008) e evidências histoquímicas em outras ordens de insetos (Ferreira & Terra, 1980).

Em *A. aegypti*, foi demonstrado que as microvilosidades das células digestivas dos CG incorporam ATPases, as quais são responsáveis pelo bombeamento ativo de prótons para o

lúmen intestinal, mecanismo fundamental para a geração de um gradiente eletroquímico que viabiliza tanto a absorção de nutrientes quanto o transporte iônico (Patrick et al., 2006). Desse modo, a marcação proteica observada na borda em escova dos CG em *T. violaceus* e *L. bigoti* também pode estar associada à atividade de ATPases próton-dependentes, indicando um possível papel na regulação iônica e na manutenção de um ambiente eletroquímico propício à digestão e absorção.

Nos CG de *A. aegypti*, também se observou adaptações morfofisiológicas associadas ao armazenamento de nutrientes, evidenciadas pelo acúmulo intracelular de glicogênio e lipídios (Jones & Zeve, 1968; Volkmann & Peters, 1989b). Esses achados estão em consonância com os resultados obtidos para *T. violaceus*, nos quais, nos grupos analisados uma e três horas após a alimentação, foram identificadas gotículas lipídicas impregnadas com ósmio nas células dos CG. Tal evidência sugere o papel dessa estrutura como sítio de reserva energética, indicando que os CG, além de atuarem na digestão terminal, também exercem funções de acúmulo e armazenamento de nutrientes nessas larvas de mosquitos predadores.

Apesar das semelhanças, em *T. violaceus*, o epitélio do IM anterior apresentou alterações morfológicas significativas ao longo do tempo após a alimentação. Nos grupos controle e com 24 horas, predominou a morfologia colunar. No grupo de 16 horas, verificou-se uma morfologia mista, com algumas amostras apresentando epitélio colunar e outros cúbicos. Já em uma hora, três horas e cinco horas, o epitélio assumiu predominantemente forma cúbica. Embora esse tipo de remodelamento epitelial seja mais frequentemente descrito em insetos hematófagos adultos (Hecker et al., 1974; Okuda et al., 2002; Okuda et al., 2005; Cui & Fraanz, 2020), os dados obtidos para as larvas de *T. violaceus* sugerem que esse mecanismo também pode ocorrer em estágios imaturos, podendo essa capacidade de remodelamento ser efetiva para maximizar a área de superfície de absorção e a eficiência enzimática em diferentes fases do processo digestivo. Em contraste, em *L. bigoti*, o epitélio manteve-se uma configuração entre pavimentoso e cúbico em todos os tempos analisados. A persistência dessa organização pode indicar uma estratégia digestiva mais constante e possivelmente mais rápida, otimizada para um processamento contínuo de alimento, em oposição a *T. violaceus*, cuja digestão aparenta ser mais lenta e gradual (Billingsley & Lehane, 1996).

No IM anterior de larvas de *T. theobaldi* foi observada a presença de gotículas lipídicas no citoplasma das células epiteliais, evidenciada por marcação por ósmio e indica sua possível função em relação à absorção de lipídios (Godoy et al., 2023). Em nossos resultados, essa impregnação foi detectada em *T. violaceus*, nos grupos alimentados por uma, três e 16 horas, e em *L. bigoti* no grupo de uma hora. Em *T. violaceus*, a impregnação por ósmio foi mais evidente

no grupo de três horas, indicando um possível pico de atividade digestiva e absorção lipídica nesse intervalo de tempo. Em *L. bigoti*, embora os grupos de três e cinco horas não tenham sido testados com a mesma técnica, foram detectadas possíveis vesículas citoplasmáticas cuja morfologia e localização sugerem envolvimento com o processamento ou transporte de lipídios. No grupo de 24 horas em *L. bigoti*, a ausência de marcação por ósmio ou presença de possíveis vesículas indica que a digestão e absorção de lipídios provavelmente já haviam sido finalizadas ou reduzidas. Da mesma forma, a ausência de marcação no grupo de zero horas, correspondente a indivíduos submetidos a jejum, sugere diminuição atividade digestiva. Nossos resultados reforçam a hipótese de que o IM anterior, embora pouco especializado para absorção de moléculas de proteínas e carboidratos, desempenha um papel relevante na absorção de lipídios em larvas predadoras (Ferreira & Terra, 1980; Neira et al., 2008). A atividade dessa região parece ser modulada tanto pelo tempo decorrido após a ingestão quanto por características fisiológicas específicas de cada espécie, refletindo a plasticidade metabólica e digestiva em resposta à disponibilidade e tipo de alimento.

No IM posterior de *T. violaceus* e *L. bigoti*, foram observadas células colunares altas com borda em escova que se corou por azul de bromofenol. Essa coloração indica concentração de proteínas na região apical, possivelmente associadas a transportadores de aminoácidos e carboidratos localizados na membrana das células digestivas (Lange, 2011). Tal observação é compatível com dados de expressão gênica que demonstram a expressão de genes relacionados à digestão e absorção dessas macromoléculas nessa porção do intestino, apontando uma possível semelhança funcional entre o IM posterior e os CG (Billingsley & Lehane, 1996; Neira et al., 2008; Lange, 2011).

A MP foi observada em todos os grupos das duas espécies, estendendo-se por quase toda a extensão do IM. Sua localização ocorre próximo à borda em escova do IM anterior e posterior, delimitando o bolo alimentar no espaço endoperitrófico. A MP, uma estrutura acelular composta por quitina e proteínas, envolve o bolo alimentar e o separa do epitélio intestinal (Lehane, 1997). Suas funções são múltiplas e cruciais para a digestão e proteção do inseto: ela atua como uma barreira física contra patógenos e toxinas ingeridas, facilita a digestão ao compartimentalizar as enzimas digestivas e o alimento, e pode influenciar a taxa de passagem do alimento pelo trato digestivo (Lehane, 1997; Hegedus et al., 2009). A integridade e a dinâmica da MP são, portanto, fatores importantes na eficiência digestiva e na defesa imunológica dessas larvas predadoras.

Nos CG de *T. violaceus*, foi detectada a presença da membrana cecal, uma fina camada possivelmente composta por quitina e proteínas, estruturalmente semelhante à MP. Sua função

parece estar relacionada ao papel de uma barreira semipermeável, separando os espaços ectoperitrófico e o conteúdo luminal do CG (Volkman & Peters, 1989b). Em estudos com *A. gambiae*, essa membrana mostrou-se parcialmente permeável a moléculas de até 42 kilodaltons (kDa), enquanto em *A. aegypti* a permeabilidade restringe-se a moléculas de 19,5 kDa (Edwards & Jacobs-Lorena, 2000). Em *T. theobaldi*, a membrana também está presente e, conforme discutido, sua menor esclerotização pode refletir um conteúdo reduzido de quitina, sugerindo maior permeabilidade em relação à de *A. gambiae* (Godoy et al., 2023). Embora não tenham sido realizados testes específicos para quantificar a permeabilidade da membrana cecal em *T. violaceus*, pode-se inferir que ela também atue como um “filtro molecular”, restringindo a entrada ou saída de determinadas substâncias. Essa compartimentalização pode estar associada a uma maior eficiência digestiva nos cecos gástricos, favorecendo processos localizados de digestão ou absorção. Essa compartimentalização também é reforçada pela observação da coloração escura do lúmen dos CG em *T. violaceus*, sugerindo acúmulo de resíduos metabólicos, grânulos pigmentares ou substâncias parcialmente digeridas, possivelmente retidas pela ação seletiva da membrana cecal. Outra hipótese é que esses grânulos correspondam a restos alimentares não completamente digeridos, transportados até os CG pelo fluxo contracorrente e submetidos à degradação final nessa região (Holtorf et al., 2019; Barroso et al., 2020.)

Em *T. violaceus*, observou-se a presença de bolo alimentar no lúmen intestinal em todos os tempos experimentais, inclusive no grupo controle, que foi submetido a jejum mínimo de 24 horas. Isto sugere uma digestão mais lenta e uma retenção prolongada do conteúdo alimentar no trato digestivo. Já em *L. bigoti*, registrou-se esvaziamento progressivo do lúmen ao longo do tempo, indicando um processamento digestivo mais rápido. Essas diferenças podem refletir distintas estratégias fisiológicas e ecológicas adotadas pelas espécies predadoras: enquanto a digestão gradual em *T. violaceus* pode estar relacionada a uma menor taxa metabólica ou à capacidade de manter reservas alimentares por mais tempo, a rápida eliminação do conteúdo em *L. bigoti* pode representar uma adaptação para maximizar a extração de nutrientes em curtos períodos de tempo, ambas as respostas, portanto, podem estar vinculadas a diferentes formas de aproveitamento e alocação de recursos durante o desenvolvimento larval (Boggs, 2009; Terra & Ferreira 2020).

Na análise histológica, em nenhuma espécie, independentemente do tempo experimental estudado, foram observados restos celulares de *A. aegypti*, prevalecendo o bolo alimentar com sua forma amorfa no lúmen intestinal. No entanto, microscopia de fluorescência revelou a presença de núcleos celulares de *A. aegypti* intactos no lúmen intestinal de *T. violaceus* apenas

no grupo de uma hora, enquanto em *L. bigoti* não foram detectados núcleos intactos em nenhum grupo. A presença de núcleos intactos sugere um processo digestivo mais lento em *T. violaceus* nesse período específico, permitindo restos celulares da presa permaneçam visíveis por mais tempo. A ausência de núcleos intactos em *L. bigoti* sugere uma digestão mais completa e rápida. Essa diferença pode estar relacionada à composição das enzimas digestivas ou às características estruturais e funcionais da MP em cada espécie, que influenciam a passagem de moléculas e, conseqüentemente, a degradação do material ingerido (Terra, 2001; Nation 2022).

A dieta das larvas de mosquitos predadores, como *T. violaceus* e *L. bigoti*, é um fator determinante nas adaptações morfológicas e fisiológicas do IM (Chapman & Douglas; 2012). A ingestão de larvas de *A. aegypti*, que são presas relativamente grandes e ricas em proteínas e lipídios, é fundamental para o desenvolvimento larval (Timmermann & Briegel, 199). A capacidade de *T. violaceus* de reter o bolo alimentar por mais tempo e de exibir plasticidade epitelial pode ser uma adaptação para maximizar a digestão e absorção de nutrientes, estratégia que pode contribuir para seu ciclo de metamorfose mais longo. Em contraste, a digestão mais rápida em *L. bigoti* pode ser otimizada para um consumo mais frequente de presas, onde a eficiência na assimilação é priorizada e pode contribuir para seu ciclo de vida mais rápido.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O intestino médio de *T. violaceus* e *L. bigoti* apresenta as subdivisões típicas descritas para outros dípteros, reforçando a conservação estrutural desse órgão ao longo da evolução de Culicidae. Apesar dessa semelhança geral, foram registradas diferenças morfoestruturais relevantes entre as duas espécies, como a conformação dos cecos gástricos, a organização do epitélio e a dinâmica do processamento do bolo alimentar. Essas variações refletem características intrínsecas a cada espécie, mais do que respostas diretas à ingestão de larvas de *A. aegypti*, e parecem estar associadas a estratégias fisiológicas distintas de digestão e aproveitamento de nutrientes.

Os resultados obtidos ampliam o entendimento sobre a biologia digestiva de mosquitos predadores e apontam que *T. violaceus* e *L. bigoti* utilizam mecanismos diferentes para explorar o mesmo recurso alimentar. Essas diferenças podem ter implicações diretas no potencial de cada espécie como agente de controle biológico, tornando necessário aprofundar investigações futuras em níveis histológicos, fisiológicos e moleculares. A elucidação desses aspectos contribuirá não apenas para compreender a diversidade de adaptações digestivas em culicídeos predadores, mas também para fundamentar estratégias mais eficazes e sustentáveis de manejo integrado de vetores.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albeny, D.S., Martins, G.F., Andrade, M.R., Krüger, R.F., Vilela, E.F. *Aedes aegypti* survival in the presence of *Toxorhynchites violaceus* (Diptera: Culicidae) fourth instar larvae. *Zoologia (Curitiba)* 28: 538-540, 2011.
- Albergaria, R.G., dos Santos Araújo, R., Martins, G.F. Morphological characterization of antennal sensilla in *Toxorhynchites theobaldi*, *Toxorhynchites violaceus*, and *Lutzia bigoti* adults: a comparative study using scanning electron microscopy. *Protoplasma* 261: 671–684, 2024.
- Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. *Fundamentos da Biologia Celular*. 2ª Ed. Porto Alegre: ARTMED, 2017.
- Barbosa, R.C., Godoy, R.S.M., Ferreira, P.G., Mendes, T.A.O., Ortigão, M.R., Ribeiro, J.M.C., Martins, G.F. Exploring the midgut physiology of the non-haematophagous mosquito *Toxorhynchites theobaldi*. *Open Biology* 14: 230437, 2024.
- Barroso, I.G., Fuzita, F.J., Ferreira, C., Terra, W.R. Midgut fluxes and digestive enzyme recycling in *Musca domestica*: a molecular approach. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 241: 110627, 2020.
- Becker, N., Petric, D., Zgomba, M., Boase, C., Madon, M., Dahl, C., Kaiser, A. *Mosquitoes and their control*. Springer Science & Business Media, 2010.
- Bernick, E.P., Moffett, S.B., Moffett, D.F. Organization, ultrastructure, and development of midgut visceral muscle in larval *Aedes aegypti*. *Tissue and Cell* 39: 277-292, 2007.
- Bertone, M. A., Wiegmann, B. M. True flies (Diptera). *The Timetree of Life*: 270-277, 2009.
- Billingsley, P.F., Lehane, M.J. Structure and ultrastructure of the insect midgut. In: *Biology of the insect midgut*, 3-30, Dordrecht: Springer Netherlands, 1996.
- Boggs, C.L. Understanding insect life histories and senescence through a resource allocation lens. *Functional Ecology* 23: 27-37, 2009.
- Buszczak, M., Segraves, W.A. Insect metamorphosis: out with the old, in with the new. *Current Biology* 10: R830-R833, 2000.
- Buzzi, Z.J. *Entomologia Didática*. Ed. Universidade Federal do Paraná, 1985.
- Caccia, S., Casartelli, M., Tettamanti, G. The amazing complexity of insect midgut cells: types, peculiarities, and functions. *Cell and Tissue Research* 377: 505-525, 2019.
- Cai, J. A., Christophides, G. K. Immune interactions between mosquitoes and microbes during midgut colonization. *Current Opinion in Insect Science* 63: 101195, 2024.
- Chaiphongpachara, T., Changbunjong, T., Laojun, S., Nutepsu, T., Suwandittakul, N., Kuntawong, K., Ruangsittichai, J. Mitochondrial DNA barcoding of mosquito species (Diptera: Culicidae) in Thailand. *PLoS One* 17: e0275090, 2022.

- Chapman, R.F. The insects: structure and function. Cambridge University Press, 1998.
- Chapman, R.F., Douglas, A.E., Simpson, S.J. The insects. Alimentary canal, digestion and absorption. [S.l: s.n.], 2012.
- Chapman, R.F., Kerkut, G.A., Gilbert, L.I. Structure of the digestive system. *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry, and Pharmacology* 165-211, 2013.
- Clements, A.N. The biology of mosquitoes: sensory reception and behaviour. Wallingford, UK: CABI, 1999.
- Clements, A.N. The biology of mosquitoes, Volume 1: Development, nutrition and reproduction. GB: Cabi, 2023.
- Collins, L.E., Blackwell, A. The biology of Toxorhynchites mosquitoes and their potential as biocontrol agents. *BiocontrolNews and Information* 21: 105N–116N, 2000.
- Collins, L.E., Blackwell, A. Colour cues for oviposition behaviour in *Toxorhynchites moctezuma* and *Toxorhynchites amboinensis* mosquitoes. *Journal of Vector Ecology: Journal of the Society for Vector Ecology* 25: 127-135, 2000.
- Consoli, R.A.G.B., Oliveira, R.L. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Editora Fiocruz, 1994.
- Courtney, G. W., Pape, T., Skevington, J. H., Sinclair, B. J. Biodiversity of Diptera. *Insect Biodiversity: Science and Society*: 229-278, 2017.
- Cui, Y., Franz, A.W.E. Heterogeneity of midgut cells and their differential responses to blood meal ingestion by the mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 127: 103496, 2020.
- Dambach, P. The use of aquatic predators for larval control of mosquito disease vectors: opportunities and limitations. *Biological Control* 150: 104357, 2020.
- De Almeida, A.P.G. Os mosquitos (Diptera, Culicidae) e a sua importância médica em Portugal: desafios para o século XXI. *Acta Médica Portuguesa* 24: 961-974, 2011.
- Donald, C.L., Siriyasatien, P., Kohl, A. *Toxorhynchites* species: a review of current knowledge. *Insects* 11: 747, 2020.
- D'Silva, N.M., O'Donnell, M.J. Mechanisms of transport of H⁺, Na⁺ and K⁺ across the distal gastric caecum of larval *Aedes aegypti*. *Journal of Insect Physiology* 121: 103997, 2020.
- Edwards, M.J., Jacobs-Lorena, M. Permeability and disruption of the peritrophic matrix and caecal membrane from *Aedes aegypti* and *Anopheles gambiae* mosquito larvae. *Journal of Insect Physiology* 46: 1313-1320, 2000.
- Farina, P., Bedini, S., Conti, B. Multiple functions of Malpighian tubules in insects: a review. *Insects* 13: 1001, 2022.

- Fernandes, K.M., Neves, C.A., Serrão, J.E., Martins, G.F. *Aedes aegypti* midgut remodeling during metamorphosis. *Parasitology International* 63: 506-512, 2014.
- Ferreira, C., Terra, W.R. Intracellular distribution of hydrolases in midgut caeca cells from an insect with emphasis on plasma membrane-bound enzymes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* 66: 467-473, 1980.
- Focks, D.A. *Toxorhynchites* as biocontrol agents. *Journal of the American Mosquito Control Association* 23: 118-127, 2007.
- Fontaine, A., Diouf, I., Bakkali, N., Missé, D., Pagès, F., Fusai, T., ... Almeras, L. Implication of haematophagous arthropod salivary proteins in host-vector interactions. *Parasites & Vectors* 4: 187, 2011.
- Forattini, O.P. Culicidologia Médica: Identificação. *Biologia, Epidemiologia* 2: 549, 2002.
- Foster, W.A., Walker, E.D. Mosquitoes (Culicidae). In *Medical and veterinary entomology*. Academic Press 261-325, 2019.
- Franz, A. W., Kantor, A. M., Passarelli, A. L., Clem, R. J. Tissue barriers to arbovirus infection in mosquitoes. *Viruses* 7: 3741-3767, 2015.
- Garibaldi, L.A., Steffan-Dewenter, I., Winfree, R., Aizen, M.A., Bommarco, R., Cunningham, S.A., et al. Wild pollinators enhance fruit set of crops regardless of honey bee abundance. *Science* 339: 1608–1611, 2013.
- Godoy, R.S., Fernandes, K.M., Martins, G.F. Midgut of the non-hematophagous mosquito *Toxorhynchites theobaldi* (Diptera: Culicidae). *Scientific Reports* 5: 15836, 2015.
- Godoy, R.S.M., Barbosa, R.C., Huang, W., Secundino, N.F.C., Pimenta, P.F.P., Jacobs-Lorena, M. & Martins, G.F. The larval midgut of *Anopheles*, *Aedes*, and *Toxorhynchites* mosquitoes (Diptera: Culicidae): a comparative approach in morphophysiology and evolution. *Cell and Tissue Research* 393: 297–320, 2023.
- Grimaldi, D., Engel, M. S. *Evolution of the Insects*. Cambridge University Press, Cambridge, UK, 2005.
- Gullan, P.J., Cranston, P.S. *The insects: an outline of entomology*. John Wiley & Sons, 2014.
- Hakim, R.S., Baldwin, K., Smagghe, G. Regulation of midgut growth, development, and metamorphosis. *Annual Review of Entomology* 55: 593–608, 2010.
- Harbach, R.E., Howard, T.M. Index of currently recognized mosquito species (Diptera: Culicidae). *European Mosquito Bulletin* 23: 1–66, 2007.
- Harbach, R.E., Kitching, I.J. Phylogeny and classification of the Culicidae (Diptera). *Systematic Entomology* 23: 327–370, 1998.

- Harbach, R.E. The Culicidae (Diptera): a review of taxonomy, classification and phylogeny. *Zootaxa* 1668: 591–638, 2007.
- Hecker, H. Structure and function of midgut epithelial cells in Culicidae mosquitoes (Insecta, Diptera). *Cell and Tissue Research* 184: 321–341, 1977.
- Hegedus, D., Erlandson, M., Gillott, C., Toprak, U. New insights into peritrophic matrix synthesis, architecture, and function. *Annual Review of Entomology* 54: 285–302, 2009.
- Holtof, M., Lenaerts, C., Cullen, D., Vanden Broeck, J. Extracellular nutrient digestion and absorption in the insect gut. *Cell and Tissue Research* 377: 397–414, 2019.
- Jin, L., Luo, J., Fu, Y., Xu, S. Prey and feeding behavior of larval *Culex (Lutzia) fuscans* (Diptera: Culicidae) in Shantou, Guangdong province, China. *Journal of Medical Entomology* 43: 785–786, 2006.
- Jones, J.C., Zeve, V.H. The fine structure of the gastric caeca of *Aedes aegypti* larvae. *Journal of Insect Physiology* 14: 1567–1575, 1968.
- Kaur, S., Kirti, J.S. SEM studies on egg architecture of *Lutzia (Metalutzia) fuscana* Wiedemann (Diptera: Culicidae). *Entomology and Applied Science Letters* 2: 4–6, 2015.
- Kozeretska, I., Serga, S., Kovalenko, P., Gorobchyshyn, V., Convey, P. *Belgica antarctica* (Diptera: Chironomidae): a natural model organism for extreme environments. *Insect Science* 29: 2-20, 2022.
- Krenn, H. W., Aspöck, H. Form, function and evolution of the mouthparts of blood-feeding Arthropoda. *Arthropod Structure & Development* 41: 101-118, 2012.
- Lange, K. Fundamental role of microvilli in the main functions of differentiated cells: Outline of an universal regulating and signaling system at the cell periphery. *Journal of Cellular Physiology*, 226: 896–927, 2011.
- Lehane, M.J, Billingsley, P.F (Eds.). *Biology of the insect midgut*. Springer Science & Business Media, 2012.
- Lehane, M.J. Peritrophic matrix structure and function. *Annual Review of Entomology* 42: 525-550, 1997.
- Lounibos, L. P., Nishimura, N., Escher, R. L., Juliano, S. A., & O'Meara, G. F. Surplus killing by predatory larvae of *Corethrella appendiculata*: prepupal timing and site-specific attack on mosquito prey. *Journal of Insect Behavior* 21: 47–54, 2008.
- Lutzia Theobald*, 1903. Mosquito Taxonomic Inventory, 2008. Disponível em: mosquito-taxonomic-inventory.myspecies.info/simpletaxonomy/term/6192. Acesso em: 25 fev. 2024.

- Malta, L.G.F., Ribeiro, B.S., Viegas-Melo, D., Pinho-Junior, M.S., Sant'Anna, M.R.V., Pereira, M.H., Gontijo, N.F. Intestinal flow and digestive parameters of *Lutzomyia longipalpis* larvae. *Journal of Insect Physiology* 161: 104748, 2025.
- Merritt, R.W., Courtney, G.W., Keiper, J.B. Diptera: (Flies, Mosquitoes, Midges, Gnats). In: *Encyclopedia of Insects*. Academic Press 284-297, 2009.
- Moirangthem, B. D., Singh, S. N., Singh, D. C. *Lutzia tigripes* (Diptera: Culicidae, Metalutzia) for the mosquito larval control: a new prospect of mosquito control. *Intl J Mosq Res* 5: 1-4, 2018.
- Moser, J.B., González, J.R., Guzmán, H., Liria, J. Primer registro para el estado Bolívar de *Culex (Lutzia) bigoti Bellardi*, 1862 (Diptera: Culicidae). *Boletín de Malariología y Salud Ambiental* 49: 313-315, 2009.
- Mullen, G. R., Durden, L. A. (Ed.). *Medical and veterinary entomology*. Academic Press, 2009.
- Muse, M. E., Shumway, K. R., Crane, J. S. Physiology, epithelialization. In: *StatPearls*. StatPearls Publishing, 2023.
- Narayanan Kutty, S., Wong, W. H., Meusemann, K., Meier, R., Cranston, P. S. A phylogenomic analysis of *Culicomorpha* (Diptera) resolves the relationships among the eight constituent families. *Systematic Entomology* 43: 434–446, 2018.
- Nation, J. L. *Insect physiology and biochemistry*. CRC Press, 2022.
- Neira Oviedo, M., Vanekeris, L., Corena-Mcleod, M. D. P., Linser, P. J. A microarray-based analysis of transcriptional compartmentalization in the alimentary canal of *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) larvae. *Insect Molecular Biology* 17: 61–72, 2008.
- Okuda, K., Caroci, A., Ribolla, P.E.M., de Bianchi, A.G., Bijovsky, A.T. Functional morphology of adult female *Culex quinquefasciatus* midgut during blood digestion. *Tissue and Cell* 34: 210-219, 2002.
- Okuda, K., Caroci, A., Ribolla, P.E.M., Marinotti, O., de Bianchi, A.G., Bijovsky, A.T. Morphological and enzymatic analysis of the midgut of *Anopheles darlingi* during blood digestion. *Journal of Insect Physiology* 51: 769-776, 2005.
- Pape, T., Blagoderov, V., Mostovski, M. B. Order Diptera Linnaeus, 1758. In: Zhang, Z.-Q. (Ed.) *Animal biodiversity: An outline of higher-level classification and survey of taxonomic richness*. *Zootaxa* 3148: 222-229, 2011.
- Patrick, M. L., Aimanova, K., Sanders, H. R., Gill, S. S. P-type Na^+/K^+ -ATPase and V-type H^+ -ATPase expression patterns in the osmoregulatory organs of larval and adult *Aedes aegypti* mosquitoes. *Journal of Experimental Biology* 209: 4638–4651, 2006.

- Potocka, M., Krzemińska, E. *Trichocera maculipennis* (Diptera) — an invasive species in Maritime Antarctica. *PeerJ* 6: e5408, 2018.
- Quiroz-Martínez, H., Rodríguez-Castro, A. Aquatic insects as predators of mosquito larvae. *Journal of the American Mosquito Control Association* 23: 110-117, 2007.
- Ray, K., Mercedes, M., Chan, D., Choi, C.Y., Nishiura, J.T. Growth and differentiation of the larval mosquito midgut. *Journal of Insect Science* 9: 55, 2009.
- Ribeiro, J. M., Francischetti, I. M. Role of arthropod saliva in blood feeding: sialome and post-sialome perspectives. *Annual Review of Entomology* 48: 73-88, 2003.
- Rocha, V. C. Morfologia da espermateca e intestino médio de *Lutzia bigoti* (Diptera; Culicidae).
- Rocha, V.C., Martins, G.F. The spermathecae of the mosquito *Lutzia bigoti* (Diptera: Culicidae). *International Journal of Tropical Insect Science* 1-9, 2025.
- Rocha, V.C., Martins, G.F. Midgut morphology of the predator mosquito *Lutzia bigoti* (Diptera: Culicidae) and its implications for feeding behavior. *Acta Tropica* 257: 107289, 2024.
- Rückert, C., Ebel, G.D. How do virus–mosquito interactions lead to viral emergence? *Trends in Parasitology* 34: 310-321, 2018.
- Shalan, E.A.-S., Canyon, D.V. Aquatic insect predators and mosquito control. *Tropical Biomedicine* 26: 223-261, 2009.
- Shao, L., Devenport, M., Jacobs-Lorena, M. The peritrophic matrix of hematophagous insects. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 47: 119-125, 2001.
- Siviter, H., Muth, F. Do novel insecticides pose a threat to beneficial insects? *Proceedings of the Royal Society B* 287: 20201265, 2020.
- Somboon, P., Harbach, R. E. *Lutzia (Metalutzia) Chiangmaiensis* n. sp. (Diptera: Culicidae), formal name for the Chiang Mai (CM) form of the genus *Lutzia* in Thailand. *Journal of Medical Entomology* 56: 1270-1274, 2019.
- Steffan, W. A., Evenhuis, N. L. Biology of *Toxorhynchites*. *Annual Review of Entomology* 26: 159–181, 1981.
- Sukupayo, P. R., Poudel, R. C., Ghimire, T. R. Nature's solution to *Aedes* vectors: *Toxorhynchites* as a biocontrol agent. *Journal of Tropical Medicine* 2024: 3529261, 2024.
- Tanaka, K. Studies on the pupal mosquitoes of Japan. *Jpn. J. Syst. Ent.* 9: 159–169, 2003.
- Terra, W. R. The origin and functions of the insect peritrophic membrane and peritrophic gel. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 47: 47–61, 2001.
- Terra, W.R., Ferreira, C. Evolutionary trends of digestion and absorption in the major insect orders. *Arthropod Structure & Development* 56: 100931, 2020.

- Terra, W.R., Ferreira, C. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* 109: 1-62, 1994.
- Terra, W.R., Ferreira, C., Silva, C.P. Midgut pH buffering, nutrient absorption, fluid fluxes, and enzyme recycling. In: *Molecular physiology and evolution of insect digestive systems*. Cham: Springer International Publishing 87-104, 2023.
- Timmermann, S. E., Briegel, H. Larval growth and biosynthesis of reserves in mosquitoes. *Journal of Insect Physiology* 45: 461-470, 1999.
- Truman, J. W., Riddiford, L. M. The origins of insect metamorphosis. *Nature* 401: 447-452, 1999.
- Truman, J. W. The evolution of insect metamorphosis. *Current Biology* 29: R1252-R1268, 2019.
- Venugopal, K., Hentzschel, F., Valkiūnas, G., Marti, M. *Plasmodium* asexual growth and sexual development in the haematopoietic niche of the host. *Nature Reviews Microbiology* 18: 177-189, 2020.
- Vogt, M. B., Lahon, A., Arya, R. P., Kneubehl, A. R., Clinton, J. L. S., Paust, S., Rico-Hesse, R. Mosquito saliva alone has profound effects on the human immune system. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 12: e0006439, 2018.
- Volkman, A., Peters, W. Investigations on the midgut caeca of mosquito larvae—II. Functional aspects. *Tissue and Cell* 21: 253-261, 1989a.
- Volkman, A., Peters, W. Investigations on the midgut caeca of mosquito larvae—II. Functional aspects. *Tissue and Cell* 21: 253-261, 1989b.
- Vontas, J., Kioulos, E., Pavlidi, N., Morou, E., Della Torre, A., Ranson, H. Insecticide resistance in the major dengue vectors *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 104: 126-131, 2012.
- Walter Reed Army Institute of Research. Walter Reed Biosystematics Unit. Disponível em: www.wrbu.si.edu. Acesso em: 25 fev. 2024.
- Whiten, S. R., Ray, W. K., Helm, R. F., Adelman, Z. N. Characterization of the adult *Aedes aegypti* early midgut peritrophic matrix proteome using LC-MS. *PloS One* 13: e0194734, 2018.
- Wiegmann, B. M., Trautwein, M. D., Winkler, I. S., Barr, N. B., Kim, J. W., Lambkin, C., ... & Yeates, D. K. Episodic radiations in the fly tree of life. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108: 5690-5695, 2011.
- Wilkerson, R. C., Linton, Y.-M., Strickman, D. *Mosquitoes of the World*. Johns Hopkins University Press, 2021.

Wu, D.D., Zhang, Y.P. Trypsin-like serine proteases and the evolution of hematophagy in mosquitoes. eLS.