

KENNER MORAIS FERNANDES

**Caracterização morfológica e da expressão de proteínas no intestino
médio de *Aedes aegypti* durante a metamorfose e submetido a
diferentes dietas**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2014

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

T

F363c
2014

Fernandes, Kenner Moraes, 1984-
Caracterização morfológica e da expressão de proteínas no
intestino médio de *Aedes aegypti* durante a metamorfose e
submetido a diferentes dietas / Kenner Moraes Fernandes. –
Viçosa, MG, 2014.
x, 81f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

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

1. *Aedes aegypti* - Morfologia. 2. Alimentação.
3. Metamorfose. 4. Proteínas. 5. Intestino médio .
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia
Geral. Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e
Estrutural. II. Título.

CDD 22. ed. 614.4323

KENNER MORAIS FERNANDES

Caracterização morfológica e da expressão de proteínas no intestino médio de *Aedes aegypti* durante a metamorfose e submetido a diferentes dietas

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

APROVADA: 14 de março de 2014

José Marcelo Ramalho Ortigão

Nelder de Figueiredo Gontijo

Patrícia Dias Games

Leandro Licursi de Oliveira

Gustavo Ferreira Martins
(Orientador)

Agradecimentos

Ao programa de pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural da UFV pela oportunidade e a Capes pela bolsa de Doutorado e ao CNPq e à Funarbe pelo suporte financeiro concedido ao projeto;

Ao meu orientador Gustavo Ferreira Martins pela confiança, paciência e amizade;

Aos meus coorientadores e conselheiros, Prof. José Eduardo Serrão e Clóvis Andrade Neves, pelo auxílio e valiosas sugestões na condução e finalização deste trabalho;

Aos professores do laboratório de Biologia Estrutural, Sérgio, Izabel, Lino e Adilson pelo apoio, auxílio e orientações;

A Prof.^a Maria Cristina Baracat, pela utilização do laboratório de Proteômica e Bioquímica de Plantas.

A Prof.^a Silvia das Graças Pompolo, por permitir a utilização do laboratório de Citogenética.

Aos funcionários do Departamento de Biologia Celular e Estrutural, em especial a Beth, que sempre esteve à disposição quando precisei;

As Sergetes: Marli, Carol, Susu, Michele, Daiane, Maytê, Kiki, Diane e Juliana, por todos os momentos divertidos que me proporcionaram;

Aos farelos: Lilian, Arlete, Jane, Fernandim, Odair, Rômulo, Sirlene, Katiane, Claudinha, Bife, Silvita, Josemar, Marcília, Maria Fernanda, Dani Valente, Camilo, Marilane, Renato Nunes, Matheus, Daniel, Paulo, Lucas, Fabiano, Mário, Edson, Marilane, Marcinha e Vinícius, pelo companheirismo e ensinamentos. Em especial ao Alex, pela amizade, auxílio e valiosos conselhos;

Aos guerreiros do laboratório de ultraestrutura: Marcelo Tchê, Edson Miro, Luiza, Poli, Patrícia, Douglas, Débora, Jamile, Deia, Mary, Maria, e Dodora; em especial a Madu e Dihego, pessoas sensacionais;

Aos amigos de Valadares: Zé Luiz, Pereira, Amilcar Abobrão, Amim, Chipam, Nedão, Russell, Fabio Inha, Rony, Cachorro, Boca, Desova, Renatinho Macarrão, Gerson, Marquim porteiro, Thiago Dentão, Rico, Saulo, Osmar, Moacir, Carlim, Netinho, Leozera, Fanu, Bolinha, Vinícius do Bar, Coxinha, Neguim, Pedrim, Lício, Betão, Vitim, Netim cabeça, Brunin Cabeça, Nilson Pezão e toda turma do bairro São Pedro;

A galera do Jiu Jitsu: Mestre Arlindão, Mestre Diegão, Matheus Sem Cueca e todos aqueles que me ajudaram a chegar à faixa azul;

Aos jovens guerreiros da república Babilônia: Júlio e Pedrim, sempre me faz rir;

Ao amigo Wagner Gonzaga, sempre disposto a ajudar e apoiar, obrigado;

Ao amigo e companheiro Marcos Jorge Junior que participou ao meu lado de todas as vitórias e derrotas dos últimos 12 anos;

Ao Prof. Max Pereira Gonçalves, mais que um professor, um amigo com quem interagi tantos anos e com quem participei de lutas que me trouxeram experiências e amadurecimento;

Aos meus antigos professores: Sandra, Denise, João, Elma, Deia, Dalva, Adriana, Wallace, Terezinha e em especial o professor Dirley Joaquim Henriques.

Aos meus professores de graduação e amigos: Edmilson Amaral, Estevaldo Conde, Nelson Saunders, Márcio Mendes e Waleska Bretas, pessoas de valor, com grande senso de amizade. A história já mostrou que muitos homens de valor nem sempre foram reconhecidos na sua época;

A alguns parentes, aqueles que sempre me apoiaram e aqueles que nunca apoiaram, mas pelos ao menos não torceram contra. Em especial agradeço meu tio Paulo, que sempre me apoiou incondicionalmente;

A minha amada namorada Fernanda Pereira da Silva, que me estimula (muito) a ser uma pessoa melhor, além de me apoiar incondicionalmente;

A minha tão amada avó, Vitória Medeiros (in memoriam) que além de ser minha segunda mãe, sempre foi uma pessoa fantástica a qual procuro sempre me espelhar;

A minha família, meus pais, Celso e Maria Eugênia e irmãos, Kennedy e Keysianne, pessoas que sempre foram exemplos de coragem, amor, determinação e perseverança;

A todos que, direta ou indiretamente, auxiliaram no desenvolvimento deste trabalho.

Sumário

Resumo	vii
Abstract.....	ix
1. Introdução.....	1
1.1. Mosquito <i>Aedes aegypti</i>	1
1.2. Intestino médio dos mosquitos	3
1.3. Células enteroendócrinas.....	4
1.4. As células regenerativas	5
1.5. Modificações do intestino médio durante o desenvolvimento pós-embriônico...	6
1.6. Controle biológico	7
1.7. Estudos de proteômica.....	9
2. Referências bibliográficas	12
3. Objetivos gerais	18
3.1. Objetivos específicos.....	18
Artigo 1.....	19
Artigo 2: Efeito do inseticida imidacloprid no desenvolvimento pós-embriônico do intestino médio do mosquito <i>Aedes aegypti</i>	26
Resumo	26
1. Introdução.....	27
2. Material e métodos	28
2.1. Mosquitos	28
2.2. Bioensaio de sobrevivência	28
2.3. Montagem total.....	29
2.4. Microscopia eletrônica de transmissão.....	30
2.5. Reação de TUNEL.....	30
2.6. Imunofluorescência - fosfo-histona H3	30
2.7. Imunofluorescência - FMRFamida.....	30
2.8. Controles.....	31
2.9. Análises estatísticas	31
3. Resultados.....	32
3.1. Análises de sobrevivência	32
3.2. Montagem total.....	32
3.3. Ultraestrutura	32

3.4. Dano celular.....	33
3.5. Proliferação celular.....	33
3.6. Células FMRFamida.....	33
4. Discussão.....	34
5. Referências bibliográficas.....	37
Artigo 3: Análise proteômica do intestino médio do mosquito <i>Aedes aegypti</i> durante o desenvolvimento pós-embrionário e de fêmeas submetidas à diferentes dietas.....	48
Resumo.....	48
1. Introdução.....	49
2. Materiais e métodos.....	51
2.1. Mosquitos e extração de proteínas.....	51
2.2. Eletroforese bidimensional (2-DE) e análise das imagens.....	51
2.3. Espectrometria de massa.....	52
2.4. Base de dados.....	52
3. Resultados.....	53
3.1. Separação e identificação de proteínas do intestino médio em gel 2-DE.....	53
3.2. Análise da expressão diferencial de proteínas no intestino médio em diferentes fases do desenvolvimento e com diferentes dietas.....	53
3.3. Proteínas relacionadas à maquinaria de tradução.....	54
3.4. Proteínas relacionadas à desintoxicação celular.....	54
3.5. Proteínas relacionadas com a produção de energia.....	54
3.6. Proteínas relacionadas ao metabolismo de aminoácidos e proteínas.....	54
3.7. Proteínas relacionadas com sinalização e transporte.....	55
3.8. Proteínas relacionadas com o citoesqueleto.....	55
3.9. Proteínas de função desconhecida.....	55
4. Discussão.....	56
5. Referencias bibliográficas.....	61
7. Figuras.....	71
Conclusões gerais.....	80

Resumo

FERNANDES, Kenner Morais, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2014. **Caracterização morfológica e da expressão de proteínas no intestino médio de *Aedes aegypti* durante a metamorfose e submetido a diferentes dietas.** Orientador: Gustavo Ferreira Martins.

Ao longo do seu desenvolvimento pós-embriônico, o mosquito *Aedes aegypti* passa parte do seu ciclo de vida no ambiente aquático, sendo que suas larvas se alimentam de microrganismos e matéria orgânica em decomposição. Após a metamorfose, os adultos alados emergem, e passam a se alimentar de seiva. Para maturação dos ovos, as fêmeas de *A. aegypti* necessitam do repasto sanguíneo. Essa plasticidade quanto ao tipo de alimentação só é possível graças às modificações que o intestino médio sofre ao longo da metamorfose, permitindo a adaptação do inseto a diferentes dietas dependendo da fase do desenvolvimento. Após a ingestão, o sangue é armazenado e digerido no intestino médio, que é o primeiro órgão do inseto que diversos vírus, como por exemplo, vírus Dengue e da febre amarela, são capazes de infectar o hospedeiro. No epitélio do intestino médio de *A. aegypti* há três tipos celulares: células digestivas (responsáveis pela digestão e absorção de nutrientes), regenerativas (células indiferenciadas) e enteroendócrinas (secretoras de neuropeptídeos). Durante a metamorfose, as células digestivas de *A. aegypti* são substituídas por novas células digestivas adultas através da diferenciação das células regenerativas. No presente trabalho aspectos morfológicos e bioquímicos referentes à metamorfose do intestino médio foram investigados, incluindo a diferenciação e a divisão das células regenerativas, e o número de células enteroendócrinas em diferentes fases do desenvolvimento de *A. aegypti* (larva 4º instar - L4, pupa branca - PB, pupas 24h -P24 e 48h -P48 após a ecdise e adultos recém-emergidos - RE). Adicionalmente, a expressão de proteínas sintetizadas pelo órgão nessas fases e em fêmeas adultas submetidas às dietas à base de açúcar (AA) e de sangue (AS) foi estudada. A morte das células digestivas e a proliferação das células regenerativas ocorrem de forma ordenada, em regiões específicas do órgão, iniciando na região anterior das L4 e passando para a região posterior nas P48 e RE. Os efeitos subletais do inseticida neocotinoide imidacloprid também foram testados no processo de remodelagem do intestino médio de *A. aegypti*. Para isso, larvas 3º instar (L3) foram tratadas com duas concentrações (3

e 15 ppm) do inseticida e o intestino médio foi analisado nas fases seguintes. Mesmo em concentrações subletais, o imidacloprid alterou o processo de remodelação do intestino médio, inibindo a proliferação e diferenciação das células regenerativas, e causando danos ao DNA nuclear delas, como atestado pela reação de TUNEL. Essa inibição acarretou a diminuição das populações das células digestivas e enteroendócrinas, sendo que o intestino médio dos RE é constituído, na maior parte, por células digestivas vacuolizadas e mal formadas. O imidacloprid possui potencial no controle de *A. aegypti*, pois, mesmo que o indivíduo chegue à fase adulta, do ponto de vista morfológico, seu intestino aparentemente não está apto para o processo de digestão. O intestino médio dos RE possui maior expressão de proteínas ligadas à produção de energia, metabolismo de proteínas, sinalização e transporte celulares. Os intestinos médios de AA e AS expressam mais proteínas ligadas ao processo de biossíntese de proteínas. Nas pupas se inicia a síntese das múltiplas proteínas essenciais para a formação e constituição do novo epitélio do órgão, mas o pico da expressão dessas proteínas ocorre no final do processo de formação do órgão no adulto recém-emergido. Já nos AA e AS há alta expressão de proteínas importantes para a digestão de açúcar e sangue, respectivamente. O presente trabalho é amplo, tratando de aspectos morfológicos e bioquímicos do intestino médio de *A. aegypti*, incluindo parte do repertório de proteínas diferencialmente expressas no órgão durante o desenvolvimento pós-embrionário e em diferentes condições alimentares. Processos morfofisiológicos que ocorrem ao longo do desenvolvimento e funcionamento desse órgão são cruciais para a sobrevivência dessa espécie vetora e são discutidos aqui neste trabalho.

Abstract

FERNANDES, Kenner Morais, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2014.
Morphological characterization and expression of proteins in the midgut of *Aedes aegypti* during metamorphosis and subjected to different diets. Orientador: Gustavo Ferreira Martins.

The larvae of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* live in the water, feeding on microorganisms and organic matter decomposition. After metamorphosis, adults emerge and feed on sap. However, for the maturation of eggs, the *A. aegypti* females need a blood meal. This variation of the diets is possible due to the midgut remodeling undergoes during metamorphosis, allowing adaptation to different diets depending on life stages. After ingestion, the blood is stored and digested into midgut, which is the first organ viruses, such as Dengue, yellow fever and other infect. The midgut epithelium of *A. aegypti* comprises three cell types: digestive (responsible for digestion and absorption of nutrients), regenerative (stem, undifferentiated cells) and enteroendocrine (neuropeptides secretory) cells. During metamorphosis, the digestive cells are replaced by new adult digestive cells by differentiation of regenerative ones. In the present study morphological and biochemical aspects of the metamorphosis of the midgut were investigated, including the differentiation and the quantification of dividing regenerative and enteroendocrine cells at different developmental stages [fourth instar larvae - L4, female white pupae - WP and pupae 24 and 48 h (P24 and P48, respectively) after ecdysis, and 50 newly-emerged (NE) adult females] by means light microscopy and transmission electron microscopy. In addition, the proteins synthesized by the midgut in these stages and in sugar- and blood-fed adult females (SA and BA, respectively) were also studied. The lysis of digestive cells, as well as the proliferation of regenerative cells, begin in the anterior region of L4 midgut. Simultaneously, the proliferation of regenerative cells begins in the anterior region of the larval midgut, moving to the posterior region in P48 and NE. The effects of the neocotinoid insecticide imidacloprid was also tested in the mosquito midgut. Third instar larvae (L3) were treated with two sublethal concentrations (3 and 15 ppm) of insecticide, and the midgut was examined in L4, P24, P48 and NE. Sublethal concentrations of imidacloprid inhibit the proliferation and differentiation of regenerative cells, often leading to cell damaged through their nuclear DNA

fragmentation. This inhibition has led to the reduction of the digestive and endocrine cell numbers, and the midgut of NE consists of mostly vacuolated/incompletely formed digestive cells. Therefore, the imidacloprid exposition during juvenile stages, impair the normal midgut development in NEs, and they may not be able to get/digest a blood meal. The midgut of NE has higher expression of proteins related to energy and protein metabolisms, cell signaling and transport. The midgut of SA and BA express more proteins associated to the protein biosynthesis process. In the midgut of pupae, several proteins essential for the organ remodeling are expressed, but the peak expression of these proteins occurs at the end of remodeling process in NE. Not surprisingly, in SA and BA there is a high expression of proteins associated to the digestion of sugar and blood, respectively. In the present work, several morphological and biochemical aspects of the midgut of *A. aegypti* are investigated, including the repertoire of differentially expressed proteins during midgut development and in the midguts of individuals under different feeding conditions. Morpho-physiological processes that occur during the development and functioning of this organ are crucial to the survival of this vector mosquito and are discussed.

1. Introdução

1.1. Mosquito *Aedes aegypti*

O *Aedes aegypti*, que é originário da África, e apesar do seu nome comum ser “mosquito da febre amarela”, hoje a maior preocupação na saúde pública é por ele ser o principal vetor da dengue. Isso devido à eficácia da vacina contra a febre amarela, tornando-a menos preocupante, embora ocorram alguns casos (Barrett & Higgs, 2007; Powell & Tabachnick, 2013).

O mosquito *A. aegypti* pertence à ordem Diptera, subordem Nematocera, família Culicidae, subfamília Culicinae, tribo Aedini, Gênero *Aedes*, Subgênero *Stegomyia* (Consoli & Oliveira, 1994) e é caracterizado pela sua adaptação ao ambiente urbano (Silva, 1994; Paupy et al., 2009). O *A. aegypti* é uma espécie doméstica, que se reproduz preferencialmente em água parada e limpa, acumulada em recipientes fabricados pelo homem, como latas, pneus, vasos etc, dentro ou perto das habitações. Essa característica faz com que esse vetor seja cada vez mais abrangente, já que o crescimento e urbanização das populações nas áreas tropicais ocorrem sem infraestrutura de saneamento, ampliando a ocorrência de dengue (Gubler, 1989; Rebêlo et al., 1999; Silva et al., 2008).

Os dípteros se desenvolvem através de metamorfose completa (holometabolía), e o ciclo de vida compreende quatro fases: ovo, larva (quatro estágios larvários), pupa e adulto (Consoli & Lourenço-de-Oliveira, 1994).

Os ovos são muito resistentes à dessecação, o que permite seu transporte para grandes distâncias, em recipientes secos, sendo o principal meio de dispersão. Mesmo após longo período de dessecação, assim que entram em contato com a água os ovos eclodem iniciando a fase larval (Neves & Silva 1995, Consoli & Lourenço-de-Oliveira 1994; Eiras, 2005).

As larvas passam por quatro estádios (L1, L2, L3, L4), que varia entre cinco a sete dias, dependendo da temperatura, alimentação e densidade larval no criadouro. Essa fase é o período de alimentação e crescimento, se alimentando de substâncias orgânicas, bactérias, fungos e protozoários existentes na água (Neves & Silva, 1989; Consoli & Lourenço-de-Oliveira, 1994).

Após o quarto estádio, a larva passa para o estágio de pupa, último estágio aquático, que pode durar em condições favoráveis de temperatura dois dias. As pupas não se alimentam e por isso raramente são afetadas pela ação de inseticidas. Essa fase é

de extrema importância, pois é o momento que ocorrer a metamorfose do estágio larval para o adulto (Neves & Silva, 1989; Consoli & Lourenço-de-Oliveira, 1994).

Na fase adulta, tanto os machos quanto as fêmeas se alimentam de néctar e suco vegetais até a fase de acasalamento. Após o acasalamento a fêmea necessita de sangue para a maturação dos ovos, onde a busca desse alimento ocorre durante o dia (ao amanhecer e ao anoitecer) (Gadelha & Toda, 1985).

As fêmeas de *A. aegypti* são preferencialmente antropofílicas, apresentam hábito alimentar diurno, intra e peridomiciliar, com picos pré-crepusculares. Após a alimentação sanguínea (hematofagia), as fêmeas buscam locais para oviposição, onde seus ovos são postos isoladamente nas paredes internas dos recipientes, próximos a lâminas d'água, que servirão de criadouros para o desenvolvimento de suas formas imaturas (quatro estádios larvais e pupa). Os criadouros dos mosquitos *A. aegypti* são muitas vezes artificiais (pneus, latas, garrafas, calhase outros recipientes) geralmente situados nas proximidades das habitações humanas, mostrando que seu habitat está diretamente relacionado às condições oferecidas pelo homem em seu ambiente domiciliar (Gadelha & Toda, 1985).

O mosquito adulto vive cerca de 30 dias e a cada oviposição, a fêmea coloca em torno de 50 a 200 ovos. Além disso, ela copula apenas uma vez com o macho, armazenando os espermatozoides em sua espermateca, realizando inúmeras posturas no decorrer de sua vida (Gadelha & Toda, 1985). No caso do mosquito infectado pelo vírus dengue, ele pode ser transmitido diretamente para sua progênie através dos ovos, caracterizando a transmissão vertical (transovariana), onde uma parte de seus descendentes já nasce infectado (Consoli & Lourenço-de-Oliveira, 1994).

Após ingestão de sangue contaminado com o vírus da dengue, as partículas virais precisam se ligar a receptores específicos do intestino médio do mosquito para estabelecer a infecção no órgão e, posteriormente, se replicar nas células epiteliais intestinais para poderem então, deixar o intestino. Uma vez que o vírus consegue deixar o intestino, ele passa para a hemocele podendo infectar órgãos secundários como os ovários e o corpo gorduroso. Por fim, é necessário estabelecer a infecção na glândula salivar. Para que esse mosquito seja considerado apto a transmitir o vírus, partículas virais precisam ser eliminadas juntamente com a saliva durante o repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado (Hardy et al., 1983, Woodring et al., 1996, Black IV et al., 2002).

Muitas doenças transmitidas por vírus, como a febre amarela, contam com vacinas ou medicamentos eficazes, . Entretanto no caso da dengue, embora seja bem conhecidas sua etiologia e seus mecanismos de transmissão, ainda não está disponível uma vacina eficaz. A dengue possui características clínicas amplas, variando de formas assintomáticas ou oligossintomáticas até as formas graves e letais, causando morbidade e mortalidade humana, tendo aproximadamente 2,5 bilhões de pessoas estão em área de risco, registrando cerca de 500.000 casos anualmente (Guzman & Kouri, 2002; Wilder-Smith & Schwartz, 2005).

1.2. Intestino médio dos mosquitos

O intestino médio das larvas e adultos de *A. aegypti* constitui-se de um tubo delimitado por um epitélio simples, responsável pela produção de enzimas digestivas e absorção dos produtos digeridos. Dentre as células principais que compõe o epitélio intestinal estão às células digestivas. Essas células são cilíndricas, altas e apresentam microvilosidades em sua porção apical, enquanto que na região basolateral, se observa inúmeras invaginações de membrana. Além das células digestivas, o epitélio do intestino médio de *A. aegypti* é composto de mais dois tipos celulares, as células regenerativas e as enteroendócrinas (Hecker et al., 1971; Hecker, 1977; Brown et al., 1985; Billingsley, 1990) que serão discutidas adiante.

O intestino médio na fase larval dos mosquitos é um tubo com diâmetro reativamente homogêneo, enquanto que o dos mosquitos adultos, incluindo *A. aegypti*, pode ser dividido em região anterior e posterior de acordo com a morfologia das células epiteliais, onde a região anterior do intestino médio do adulto está localizada no tórax e corresponde a mais delgada. Já o intestino posterior se localiza no abdômen e possui a formato de um saco aberto e expansível, participando ativamente do processo de digestão de sangue (Billingsley, 1990).

O intestino médio posterior de *A. aegypti* atua na síntese de enzimas digestivas e absorção de nutrientes. Suas células sofrem deformações quando o sangue é ingerido, e esse estresse mecânico é compensado pela presença de junções intercelulares na membrana celular lateral que mantém as células unidas (Billingsley, 1990). Além disso, elas são responsáveis pela formação da matriz peritrófica (Hecker, 1977), que em geral começa a ser sintetizada em torno do bolo alimentar logo nos primeiros 30 minutos após a ingestão do sangue. Muitas funções têm sido propostas para a matriz peritrófica dos mosquitos como: proteção física e contra patógenos, filtro semipermeável para as

proteínas do sangue e enzimas digestivas ou uma barreira de retenção para manutenção de inibidores de proteases da luz do intestino médio (Billingsley, 1990).

1.3. Células enteroendócrinas

O intestino médio é considerado o maior órgão endócrino dos mosquitos pela abundância de células enteroendócrinas, que apresentam positividade para alguns hormônios peptídeos encontrados em mamíferos, como por exemplo, o polipeptídeo pancreático e o FMRFamida (fenilalanina-metioninaarginina-fenilalanina-amida) (Moffett & Moffett, 2005). Estima-se que existam pelo menos 500 células enteroendócrinas no intestino médio de fêmeas adultas de *A. aegypti*, sendo que esse número é reduzido em torno de 45% nas primeiras seis horas após o repasto sanguíneo (Brown et al., 1985; Glattli et al., 1987). Apesar de estar em número expressivo, função dessas células não é conhecida.

O número de células enteroendócrinas varia de acordo com a idade das fêmeas de *A. aegypti*, sendo maior em fêmeas recém-emergidas em comparação com fêmeas alimentadas com dieta à base de açúcar, este número diminui ainda mais cerca de seis horas após o repasto sanguíneo. Além de diminuir em número, a imunorreatividade das células enteroendócrinas também diminui logo após o repasto, sugerindo que os peptídeos sejam secretados para a hemolinfa em decorrência da distensão do intestino médio logo após a alimentação sanguínea (Brown et al., 1986; Moffett & Moffett, 2005).

Pelo menos dois tipos de células enteroendócrinas foram descritos em *A. aegypti*, de acordo com a imunomarcção para anticorpos contra o neuropeptídeo FMRFamida: as células claras e as células escuras (marcadas fortemente), sendo que aproximadamente 25% dessas células são encontradas adjacentes às células regenerativas. Ambos os tipos podem ser ainda subdivididos em células abertas, que são afiladas na base e dilatadas na região apical, localizadas preferencialmente na superfície luminal com microvilosidades; e células fechadas, restritas à base do epitélio e sem microvilosidades (Brown et al., 1985). Além de serem positivas para FMRFamida, elas são também positivas para o neuropeptídeo SCP-I (peptídeo cardioativo, do inglês: *small cardioactive peptide*), porém, nos indivíduos adultos dos dois sexos, essas marcações para os dois peptídeos estão concentradas na região posterior do intestino médio (Moffett & Moffett, 2005).

Devido ao padrão de imunomarcção e sua localizaço coincidente com as fibras musculares, supostamente as células endócrinas atuam no nível parácrino. Nesse sentido, acredita-se que elas regulam as funções do epitélio digestivo e das células musculares, além de secretarem sinais na hemolinfa como uma forma de *feedback* para o sistema nervoso central, outras regiões do sistema digestivo e corpo gorduroso. Esses sinais representariam informações sobre o tipo, volume e composição do alimento ingerido. Outra característica que reforça essas hipóteses é o fato dessas células apresentarem projeções para a luz intestinal, que poderiam representar locais de liberaço de peptídeos moduladores, que atuariam no espaço ectoperitrófico (Moffett & Moffett, 2005).

1.4. As células regenerativas

Entre as células digestivas, encontram-se pequenas células regenerativas que podem estar isoladas, em pares ou formando pequenos agrupamentos denominados ninhos celulares que são encontrados ao longo de todo intestino médio dos insetos, incluindo os mosquitos (Brown et al., 1985; Hecker, 1971; Hecker, 1977), sendo fundamentais para a renovaço do epitélio digestivo (revisado por Billingsley & Lehane, 1996).

A renovaço das células digestivas ocorre durante todo o desenvolvimento pós-embrionário dos insetos através da diferenciaço das células regenerativas (Baldwin & Hakim, 1991; Baldwin et al., 1993; Loeb et al., 1999), que foram estudada em várias espécies de insetos de diferentes ordens como: Hymenoptera (Raes et al., 1994; Cruz-Landim et al., 1996; Martins et al., 2006), Isoptera (Cruz-Landim & Costa-Leonardo, 1990), Hemiptera (Werner et al., 1991) e Lepidoptera (Hakim et al., 1988; Baldwin & Hakim, 1991; Baldwin et al., 1993; Loeb et al., 1999).

Nas larvas de lepidópteros *Hyalophora cecropia* e *Manduca sexta* o crescimento do epitélio do ventrículo ocorre pelo aumento das células existentes ou através da reposiço das células diferenciadas por uma populaço de células regenerativas (Judy & Gilbert, 1970; Baldwin et al., 1996). Entretanto, não se tem conhecimento sobre a fonte das células regenerativas que aparecem durante esse processo. Em *A. aegypti*, não há relatos de migraço de células da hemolinfa para o intestino médio, mas, durante cada ecdise foi previamente descrito uma pequena populaço de células regenerativas basais que é mantida e aparentemente essas células originavam novas células digestivas durante cada ecdise. Além disso, não se observou

figuras de mitose no período de intermuda, sugerindo que elas apareceram antes ou durante a ecdise subsequente (Baldwin & Hakim, 1991).

A detecção da proliferação das células regenerativas ainda é bastante limitada pelo fato das mesmas se dividirem pouco e em curtos períodos do desenvolvimento embrionário dos insetos. Em *Drosophila melanogaster*, figuras de mitoses são raramente observadas em adultos, contudo, a marcação de proteínas relacionadas com processos mitóticos, como a fosfo-histona H3, mostrou que ocorre divisão das células regenerativas (Micchelli & Perrimon, 2006). A condensação da cromatina durante o ciclo celular envolve a fosforilação da proteína nuclear histona H3 que é fosforilada em três sítios (Ser10, Ser28 e Thr11) em diferentes organismos (Dai et al., 2005), inclusive *D. melanogaster* (Micchelli & Perrimon, 2006). Em *A. aegypti* a ocorrência ou não de mitose ainda não foi testada, mesmo já tendo sido descrito demonstrado uma possível proliferação das células regenerativas na metamorfose do intestino médio de *A. aegypti* (Ray et al., 2007).

1.5. Modificações do intestino médio durante o desenvolvimento pós-embrionário

Durante a metamorfose dos insetos holometábolos, o trato gastrointestinal é completamente remodelado, muitas células novas são formadas, enquanto outras morrem e algumas apenas se diferenciam (Buszczak & Seagraves, 2000). Essas modificações estão ligadas a alterações na alimentação, a qual, em geral, é diferente na larva e no adulto (Cruz-Landim et al., 1996). Assim, durante a metamorfose, o epitélio do intestino médio dos insetos holometábolos, é histolisado e a sua reorganização ocorre pela diferenciação das células regenerativas, para atender as exigências nutricionais dos insetos, que são diferentes entre a larva e o adulto. No caso específico de mosquitos hematófagos como o *A. aegypti*, a alimentação larval, que é baseada em matéria orgânica em decomposição, passa a ser de fluidos ou seivas vegetais e sangue nos adultos (Nishiura et al., 2003; Ray et al., 2007).

A renovação das células digestivas do intestino médio de *A. aegypti* se inicia pouco antes da ecdise (transição larva-pupa) através do processo de morte celular das células digestivas, descrito como “morte celular programada” (apoptose caspase-dependente) (Nishimura et al., 2003; Lockshin & Zakeri, 2004; Wu et al., 2006). Nesses trabalhos mostrou-se a presença de fatores ligados a ativação de caspases durante o processo de morte das células digestivas, o que para o intestino médio de insetos pode

não ser satisfatório para definir o tipo de morte celular (Lockshin & Zakeri, 2004; Daish, 2004; Denton et al., 2010). Os resultados do trabalho de Denton (2010) mostraram que no desenvolvimento do intestino médio de *D. melanogaster*, existe alta atividade de caspases, mas elas não estão relacionadas com o processo de morte celular das células digestivas larvais.

Em geral o desenvolvimento do epitélio do intestino médio dos insetos durante a metamorfose não ocorre de forma homogênea (Cruz-Landim et al., 1996; Pinheiro et al., 2006 Nardi et al., 2010), e culmina com a formação de duas regiões distintas considerando a densidade das diferentes populações celulares. Essas particularidades são evidenciadas também no desenvolvimento larval de *A. aegypti* e *Culex pipiens*, onde o crescimento da região anterior do intestino médio ocorre pelo aumento do tamanho das células digestivas, enquanto na região posterior ocorre aumento no número das mesmas (Ray et al., 2007).

Vários trabalhos relatam a diferenciação e proliferação das células regenerativas (às vezes consideradas células-tronco), no desenvolvimento de insetos (Butterworth et al., 1988; Nishimura et al., 2003; Wu, 2006; Ray et al., 2007; Illa-Bohaca & Montuenga, 2006). Muitos desses trabalhos lançaram mão da utilização de BrdU (5-bromo-2-deoxiuridina). A incorporação desse componente no DNA das células regenerativas indicou que as divisões das células regenerativas foram intensas em L4 (48 horas após a ecdise) de *A. aegypti*, o que seria uma preparação para a formação das novas células do intestino do adulto durante a pupação (Ray et al., 2007). Porém, as células digestivas do intestino médio são poliploides, sendo a síntese de DNA comum ao longo da diferenciação das células regenerativas, e os métodos de investigação utilizados como, por exemplo, a incorporação de BrdU, são apenas sugestivos quanto à ocorrência de proliferação, não comprovando que as mesmas passaram pelo período S da mitose (Butterworth & Rasch, 1986; Butterworth et al., 1988; Ray et al., 2007).

1.6. Controle biológico

Atualmente, o alvo mais vulnerável na cadeia de transmissão do vírus DENV é o vetor, e por isso, o controle vetorial é a forma mais eficaz de prevenção, a qual é integrante de muitos programas de saúde. Entretanto, esse controle não pode depender de um só método, ele deve dispor de várias alternativas, adequadas à realidade local, que permitam sua execução de forma integrada e seletiva. Para o controle eficaz é necessário alguns componentes como o controle biológico e o controle químico com

uso de inseticidas e repelentes, as armadilhas e o manejo da resistência à inseticidas (Tauil, 2002; Braga, 2007).

O controle químico é a estratégia mais comumente adotada para o controle de insetos vetores, utilizando inseticidas que originalmente foram desenvolvidos para a agricultura, sendo adaptados para o controle de vetores (Braga & Valle, 2007). No Brasil, o Ministério da Saúde exalta a utilização desses compostos para a redução da população de mosquitos e dessa maneira evitar a ocorrência de transmissão de vírus Dengue (Brasil, 2009).

Entre os inseticidas, o grupo dos neocotinoídeos foi o que mais cresceu no mercado, tendo como seu precursor comercial o imidacloprid. Assim como a nicotina, os neonicotinoídeos atuam no sistema nervoso central dos insetos como agonistas da acetilcolina nos receptores nicóticos pós-sinápticos (Nauen & Denholm, 2005). Além disso, os neonicotinoídeos podem causar danos ao intestino médio, como visto em *Apis mellífera* (Hymenoptera), onde as células digestivas e regenerativas ficaram altamente vacuolizadas no tratamento com *thiamethoxam* (Oliveira et al., 2013; Catae et al., 2014).

Inseticidas neurotóxicos pertencentes aos grupos dos organofosforados e piretróides são os compostos mais usados no controle de *A. aegypti*. Entretanto, o uso indiscriminado desses inseticidas nos últimos 30 anos tem ocasionado aumento nos níveis de resistência em populações de mosquitos em regiões da Ásia e América Latina (Rodríguez et al., 2007; Martins et al., 2009; Lima et al., 2011). Tais evidências são preocupantes, o que motiva a identificação de compostos capazes de substituir esses inseticidas comumente utilizados no seu controle.

O neonicotinoídeo imidacloprid apresenta um amplo espectro de atividade, persistência, versatilidade de aplicação na agricultura e por isso, embora imidacloprid possua baixa atividade larvicida e pupicida em comparação a outros inseticidas, seus efeitos subletais podem ser importantes na redução de populações de *A. aegypti* (Elbert et al., 2008; Jeschke et al., 2008; Tomé et al., 2014). Essa redução na população pode estar relacionada com as alterações causadas pelo imidacloprid no intestino médio, o que já foi descrito na barata *Gromphadorhina portentosa*, onde ocorreram alterações no metabolismo de carboidratos e na absorção de glicose (Sawczyn et al., 2012).

1.7. Estudos de proteômica

O genoma de um organismo é praticamente estático e constante em todas as células somáticas. Por outro lado, o perfil da expressão de proteínas é extremamente variável em distintas situações ou diferentes tipos celulares em um mesmo organismo, constituindo-se em um fluxo dinâmico respondendo a estímulos internos e externos (Wasinger et al., 1995; Wilkins et al., 1996).

Impulsionada pelo crescente número de informações obtidas a partir de sequências de DNA, a proteômica tornou-se uma das áreas mais importantes para caracterização da função de genes, de interações funcionais entre proteínas, e para fornecer uma visão dos mecanismos dos processos biológicos (Zhu et al., 2009). Assim, o proteoma pode definir o perfil de proteínas expresso em um tecido, célula ou sistema biológico em um dado momento (Westermeier & Naven, 2002).

Para a análise proteômica, a eletroforese bidimensional (2-DE) e a espectrometria de massa são ferramentas versáteis e são amplamente usadas. A eletroforese 2-DE aplica-se principalmente ao estudo funcional e comparativo da expressão proteica (Mann et al., 2001; Henzel et al., 2003).

As proteínas diferencialmente expressas, separadas por eletroforese 2-DE, são identificadas por espectrometria de massa (MS) (Yates et al., 2005). Inicialmente são utilizados equipamentos do tipo MS-TOF que geram um padrão de massa molecular de peptídeos trípticos da proteína de interesse, padrão que é comparado com bancos de sequências de proteínas traduzidas a partir de sequências gênicas e clivadas *in silico*, ou comparado com bancos peptídicos obtidos através de similaridade, denominados *mass-fingerprinting* (James et al., 1993).

A utilidade da proteômica não se limita à expressão diferencial, como ocorre na análise do transcriptoma. A proteômica permite, ainda, detalhar espacialmente alterações na expressão (por fracionamento celular), alterações na proteína após a tradução, e alterações nas interações proteína-proteína, com resolução temporal (Cox & Mann, 2007).

O intestino médio de mosquitos *A. aegypti* sofre metamorfose e muitas modificações estruturais durante o desenvolvimento, as quais podem ser uma adaptação à mudança no tipo de dieta. As larvas se alimentam de microorganismos e partículas orgânicas, enquanto que os adultos se alimentam de seiva vegetal e no caso das fêmeas, também de sangue (Billingsley, 1990; Merritt et al., 1992).

Embora a fase larval do *A. aegypti* seja um período de crescimento, nessa fase a dieta é pobre em carboidrato, e o açúcar utilizado pela larva é fornecido pelas dietas ricas em aminoácidos (Merritt et al., 1992). Corroborando isso, o perfil das enzimas digestivas sintetizadas pelas larvas de mosquitos indica que ele está equipado para hidrolisar as principais classes de nutrientes, como hidratos de carbono e proteínas. Entretanto a produção de enzimas digestivas nas larvas pode ser diferente entre as regiões anterior e posterior, sendo que a região anterior possui um pH alcalino de 10,5, ótimo para a atividade da quimotripsina, enquanto a região posterior possui um pH entre 7 e 8, adequado para a função da amilase (Merritt et al., 1992).

Após o crescimento, as larvas originam pupas, as quais não se alimentam. É nessa fase onde ocorre a metamorfose, incluindo o remodelamento do intestino médio (Ray et al., 2007), e possivelmente a biossíntese de proteínas essenciais na regulação do desenvolvimento.

Na fase adulta o intestino médio dos mosquitos é dividido em duas regiões, anterior e posterior, onde apenas a região posterior está envolvida na digestão de sangue. Embora a principal enzima do sistema digestivo dos mosquitos seja a tripsina, a presença de glicosidases na região anterior do órgão suporta a hipótese da sua participação na digestão de carboidratos (Billingsley, 1990). Duas horas após a alimentação sanguínea no intestino médio das fêmeas, se inicia a síntese e a secreção de tripsina, aminopeptidase e precursores da membrana peritrófica para o lúmen do órgão. Essa síntese aumenta 10 horas após a alimentação sanguínea, evidenciando vesículas secretoras de tripsina na região posterior (Billingsley, 1990).

As regiões do intestino médio dos mosquitos funcionam de forma independente uma da outra, podendo variar sua expressão proteica dependendo do tipo de dieta e da fase do desenvolvimento (Merritt et al., 1992; Billingsley, 1990; Billingsley & Hecker, 1991). Em *Anopheles stephensi*, a atividade da tripsina foi restrita ao lúmen da região posterior do intestino médio e sua atividade foi observada apenas em indivíduos alimentados com sangue (Billingsley & Hecker, 1991). Já a aminopeptidase e a α -glicosidase, foram identificadas tanto na região anterior quanto na posterior, mas após a alimentação com sangue, elas aumentam a atividade, e são detectadas no lúmen da região posterior do intestino médio (Billingsley & Hecker, 1991).

A partir de 2009 vários estudos do intestino médio de mosquito *A. aegypti* utilizaram uma abordagem proteômica. O primeiro trabalho analisou o perfil proteico das vesículas de membrana da borda escova do intestino médio de larvas 4º instar, o

qual identificou diversas proteínas, mas se observou a predominância da arginina quinase, actina e um alérgeno (Popova-Butler et al., 2009).

Outros estudos de proteômica com intestino médio de larvas 4º instar de *A. aegypti*, foram realizados buscando conhecer melhor os efeitos da toxina Cry11Aa de *Bacillus thuringiensis* sobre as células intestinais. Nesses trabalhos, sugeriram a relação da Cry11Aa com proteínas mitocondriais, actina, ATPsintase e sua ligação com a tripsina serino protease, mostrando a importância da proteômica nas análises toxicológicas (Bayyareddy et al., 2009; Cancino-Rodezno et al., 2012).

Já no intestino médio de *A. aegypti* adulto, a abordagem proteômica foi utilizada para evidenciar as proteínas diferencialmente expressas em mosquitos alimentados com açúcar e sangue. Entretanto, o perfil proteico foi semelhante nas duas dietas, com diferenças apenas na expressão de defensinas, que foram mais expressas mediante a alimentação sanguínea (Wasinpiyamongkol et al., 2010).

Através da proteômica, diversas informações também foram obtidas a respeito da infecção viral no intestino médio de *A. aegypti*. Em um trabalho foi realizado a comparação da infecção de dois tipos virais, Chikungunya e Dengue 2, onde ambas infecções modulam a expressão de proteínas ligadas a proteção celular, estruturais e redox . Entretanto, a expressão de algumas proteínas como a catalase e a glutathione transferase foi diferente entre os vírus, mostrando que o perfil proteico do intestino médio pode variar de acordo com o patógeno (Tchankouo-Nguetcheu et al., 2010). Além disso, recentemente foram identificadas possíveis proteínas que atuam como receptores para o vírus Dengue 2, entre elas, a enolase, beta-ARK e a caderina (Muñoz et al., 2013).

Sendo assim, estudos da bioquímica do sistema digestório de *A. aegypti* possuem potencial para uma maior compreensão da dinâmica das proteínas diferencialmente expressas, incluindo as alterações metabólicas, causadas pela idade ou tipo de dieta.

2. Referências bibliográficas

Baldwin KM, Hakim RS, Stanton GB. Cell-cell communication correlates with pattern formation in molting *Manduca sexta* midgut epithelium. *Dev Dyn* 1993;197:239-43.

Baldwin KM, Hakim RS. Growth and differentiation of the larval midgut epithelium during molt in the moth, *Manduca sexta*. *Tissue Cell* 1991;23:411-22.

Barrett AD, Higgs S. Yellow fever: a disease that has yet to be conquered. *Ann Rev Entomol* 2007;52:209-29.

Bayyareddy K, Andacht TM, Abdullah MA, Adang MJ. Proteomic identification of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* toxin Cry4Ba binding proteins in midgut membranes from *Aedes (Stegomyia) aegypti* Linnaeus (Diptera, Culicidae) larvae. *Insect Biochem Molec Biol* 2009;39:279-86.

Billingsley PF. & MJ Lehane. Structure and ultrastructure of the insect midgut, p. 3-30. In M.J. Lehane & P.F. Billingsley (eds.), *Biology of the Insect Midgut*. London, Chapman and Hall, 486p. 1996.

Billingsley PF. The midgut ultrastructure of hematophagous insects. *Annu Rev Entomol* 1990; 35:219-48.

Billingsley PF, Hecker H. Blood digestion in the mosquito, *Anopheles stephensi* Liston (Diptera: Culicidae): activity and distribution of trypsin, aminopeptidase, and α -glucosidase in the midgut. *J Med Entomol* 1991;28(6):865-71.

Black IV WC. Flavivirus susceptibility in *Aedes aegypti*. *Arch Med Res* 2002;33:379-88.

Braga IA, Valle D. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. *Epidemiol. Serv. Saúde: Brasília*. 2007;16(4):279-93.

Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Programa Nacional de Controle da Dengue – PNCD. Brasília, 2007.

Brown MR, Raikhel AS, Lea AO. Ultrastructure of midgut endocrine cells in the adult mosquito, *Aedes aegypti*. *Tissue Cell* 1985;17:709-21.

Buszczak M, Seagraves WA. Insect metamorphosis: out with the old, in with the new. *Current Biology* 2000;10:830-33.

Butterworth FM, Emerson L, Rasch EM. Maturation and degeneration of the fat body in the *Drosophila* larva and pupa as revealed by morphometric analysis. *Tissue Cell* 1988;20:255-68.

Cancino-Rodezno A, Lozano L, Oppert C, Castro J, Lanz-Mendoza H, Encarnacio S, Evans AE., Gill SS, Sobero M, Jurat-Fuentes JL, Bravo A. comparative proteomic analysis of *Aedes aegypti* larval midgut after intoxication with Cry11Aa toxin from *Bacillus thuringiensis*. *PLoS ONE* 2012;7(5):1-9.

Catae AF, Roat TC, Oliveira RA, Nocelli RCF, Malaspina O. Cytotoxic effects of thiamethoxam in the midgut and malpighian tubules of africanized *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Microsc Res Tech* 2014; DOI: 10.1002/jemt.22339.

Consoli RAGB, Oliveira RL. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Rio de Janeiro: FIOCRUZ; 1994.

Cox J & Mann M. Is proteomics the new genomics? *Cell* 2007;130:395-8.

Cruz-Landim C, Costa-Leonardo AM. Functional adaptations of the epithelium from different gut segments of *Grigiotermes bequaerti* (Isoptera, Termitidae, Apicotermitinae). *Revta Bras Entomol* 1990;34:669-78.

Cruz-Landim C, Silva-De-Moraes RLM, Serrão JE. Ultrastructural aspects of epithelial renewal in the midgut of adult worker bees (Hymenoptera, Apidae). *J Comp Biol* 1996;1(1/2):209-40.

Dai C, Chung, IJ, Krantz SB. Increased erythropoiesis in polycythemia vera is associated with increased erythroid progenitor proliferation and increased phosphorylation of Akt/PKB. *Exp Hematol* 2005;33:152-8.

Daish TJ, Mills K, Kumar S. *Drosophila* caspase DRONC is required for specific developmental cell death pathways and stress-induced apoptosis. *Dev Cell* 2004;7:909-15.

Shravage B, Simin R, Mills K, Berry DL, Baehrecke EH, et al. Autophagy, not apoptosis, is essential for midgut cell death in *Drosophila*. *Curr Biol* 2009;19:1741-6.

Gadelha DP, Toda AT. Biologia e comportamento do *Aedes aegypti*. *Rev Bras Malariol D Trop* 1985;3:29-36.

Glattli E, Rudin W, Hecker H. Immunoelectron microscopic demonstration of pancreatic polypeptide in midgut epithelium of hematophagous dipterans. *J Histochem Cytochem* 1987;35:891-6.

Gubler DJ. *Aedes aegypti* and *Aedes aegypti*-borne disease-control in the 1990s - top down or bottom up. *Am J Trop Med Hyg* 1989;40:571-8.

Guzman MG, Kouri G. Dengue: an update. *Lancet Infect Dis* 2002;2(1):33-42.

Hardy JL, Houk EJ, Kramer LD, Reeves WC. Intrinsic factors affecting vector competence of mosquitoes for arboviruses. *Ann Rev Entomol* 1983;28: 229-62.

Hecker H, Freyvogel TA, Briegel H, Steiger R. Ultrastructural differentiation of the midgut epithelium in female *Aedes aegypti* (L.) (Insecta, Diptera) imagines. *Acta Trop* 1971; 28:80-104.

Hecker H. Structure and function of midgut epithelial cells in Culicidae mosquitoes (Insect, Diptera). *Cell Tissue Res* 1977;1:321-41.

Henzel, WJ, Watanabe C, Stults JT. Protein identification: the origins of peptide mass fingerprinting. *J. Am. Soc. Mass Spectrom* 2003;14:931-42.

Illa-Bochaca I, Montuenga LM. The regenerative nidi of the locust midgut as a model to study epithelial cell differentiation from stem cells. *J Exp Biol* 2006;209:2215-23.

James P, Quadroni M, Carafoli E, Gonnet G. Protein identification by mass profile fingerprinting. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;195:58-64.

Jeffrey R Powell, Walter J Tabachnick. History of domestication and spread of *Aedes aegypti* - A review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2013;108(Suppl. I):11-17..

Lockshin RA, Zakeri Z. Apoptosis, autophagy, and more. *Int J Biochem Cell Biol* 2004;36:2405-19.

Loeb MJ, Jaffe H, Gelman DB, Hakim RS. Two polypeptide factors that promote differentiation of insect midgut stem cells in vitro. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 1999;40:129-40.

Mann M, Hendrickson RC, Pandey A. Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry. *Annu Rev Biochem* 2001;70:437-73.

Martins GF, Neves CA, Campos LA, Serrão JE. The regenerative cells during the metamorphosis in the midgut of bees. *Micron* 2006;37:161-8.

- Merritt RW, Dadd RH, Walker ED. Feeding behavior, natural food, and nutritional relationships of larval mosquitoes. *Annu Rev Entomol* 1992;37:349-76.
- Micchelli CA, Perrimon N. Evidence that stem cells reside in the adult *Drosophila* midgut epithelium. *Nature* 2006;439:475-9.
- Moffett SB, Moffett DF. Comparison of immunoreactivity to serotonin, FMRFamide and SCPb in the gut and visceral nervous system of larvae, pupae and adults of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. *J Insect Sci* 2005;5:20.
- Muñoz ML, Limón-Camacho G, Tovar R, Diaz-Badillo A, Mendoza-Hernández Guillermo, Black IV WC. Proteomic identification of dengue virus binding proteins in *Aedes aegypti* mosquitoes and *Aedes albopictus* Cells. *Biomed Res Int* 2013;1-11.
- Nardi JB, Bee CM, Miller LA. Stem cells of the beetle midgut epithelium. *J. Insect Physiol* 2010;56:296-303.
- Nauen R & Denholm I. Resistance of insect pests to neonicotinoid insecticides: Current status and future prospects. *Archives of insect biochemistry and physiology*, New York, v. 58, p. 200-15, 2005.
- Neves DP, Silva JE. *Entomologia médica: comportamento, captura, montagem*. COOPEMED, 112p. 1995.
- Nishiura JT, Ho P, Ray K. Methoprene interferes with mosquito midgut remodeling during metamorphosis. *J Med Entomol* 2003;40:498-507.
- Oliveira RA, Roat TC, Carvalho SM, Malaspina O. Side-effects of thiamethoxam on the brain and midgut of the africanized honeybee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Environ Toxicol* 2013. doi: 10.1002/tox.21842.
- Popova-Butler A, Dean DH. Proteomic analysis of the mosquito *Aedes aegypti* midgut brush border membrane vesicles. *J Insect Physiol* 2009;55:264-72.
- Raes H, Verbeke M, Meulemans W, Coster W. Organization and ultrastructure of the regenerative crypts in the midgut of the adult worker honeybee (*Apis mellifera* L.). *Tissue Cell* 1994;26:231-8.
- Ray K, Mercedes M, Chan D, Choi CY, Nishiura JT. Growth and differentiation of the larval mosquito midgut. *J Insect Sci* 2007;9:1-13.

Rebêlo, JMM. Distribuição de *Aedes aegypti* e do Dengue no Estado do Maranhão, Brasil. Cad Saúde Pública 1999;15(3):477-86.

Sawczyn T, Dolezych B, Klosok M, Augustyniak M, Stygar D, Buldak RJ, Kukla M, Michalczyk K, Karcz-Socha I, Zwirska-Korczala K. Alteration of carbohydrates metabolism and midgut glucose absorption in *Gromphadorhina portentosa* after subchronic exposure to imidacloprid and fenitrothion. J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng 2012;47(11):1644-51.

Tauil PL. Aspectos críticos do controle do dengue no Brasil. Cad. Saúde Pública. Rio de Janeiro. 2002;18:867-71.

Tchankouo-Nguetcheu S, Khun H, Pincet L, Roux P, Bahut M, Huerre M, Guette C, Choumet V. Differential protein modulation in midguts of *Aedes aegypti* infected with Chikungunya and Dengue 2 Viruses. PLoS ONE 2010;5(10):1-11.

Tomé HVV, Pascini TV, Dângelo RAC, Guedes RNC, Martins GF. Survival and swimming behavior of insecticide-exposed juveniles of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. Parasites & Vectors 2014.

Wasinger VC, Cordwell SJ, Cerpa-Poljak A, Yan JX, Gooley AA, Wilkins MR. Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. Electrophoresis 1995;16(7):1090-4.

Wasinpiyamongkol L, Patramool S, Luplertlop N, Surasombatpattana P, Doucoure S, Mouchet F, Séveno M, Remoue F, Demetree E, Brizard J, Jouin P, Biron DG, Thomas F, Dorothée Missé. Blood-feeding and immunogenic *Aedes aegypti* saliva proteins. Proteomics 2010;10:1906-16.

Werner K, Moutairou K, Werner G. Formation and structure of the surface coat in the midgut of a waterstrider *Gerris najas* Deg. (Heteroptera: Gerridae). Int J Insect Morphol Embryol 1991;20:69-77.

Westermeier, R. & Naven, T. Proteomics in practice - a laboratory manual of proteome analysis. Weinheim:Wiley-VCH, p. 315. 2002.

Wilder-Smith A, Schwartz E. Dengue intravelers. N Engl J Med 2005;353(9):924-32.

Wilkins MR, Sanchez JC, Gooley AA, Appel RD, Humphery-Smith I, Hochstrasser DF. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. Biotechnol Genet Eng Rev 1996;13:19-50.

Wilkins MR, Sanchez JC, Williams KL e Hochstrasser DF. Current challenges and future applications for protein maps and post-translational vector maps in proteome projects. *Electrophoresis* 1996;17(5):830-8.

Woodring JL. Biology of Disease Vectors. In: Marquardt WC, Beaty BJ, editores. Natural cycles of vector-borne pathogens. Colorado: University Press of Colorado; P. 51-72. 1996.

Wu Y, Parthasarathy R, Bai H, Palli SR. Mechanisms of midgut remodeling: juvenile hormone analog methoprene blocks midgut metamorphosis by modulating ecdysone action. *Mech Dev* 2006;123:530-47.

Yates RD, Gilchrist A, Howell K.E, Bergeron JJ. Proteomics of organelles and large cellular structures. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005;6:702-14.

Zhang N, Chen R, Young N, Wishart D, Winter P, Weiner JH, Li L. Comparison of SDS- and methanol-assisted protein solubilization and digestion methods for *Escherichia coli* membrane proteome analysis by 2-D LC-MS/MS. *Proteomics* 2007;7: 484-93.

Zhu W, Smith JW, Huang C. Mass Spectrometry-based label-free quantitative proteomics. *J Biomed Biotechnol* 2010;1-6.

3. Objetivos gerais

1- Descrever as mudanças na morfologia do intestino médio de fêmeas de *A. aegypti* durante a metamorfose, em condições normais e diante da exposição ao inseticida imidacloprid.

2- Estudar a expressão proteica do intestino médio de fêmeas de *A. aegypti* nas fases larval, pupal e adulta, e submetidas a diferentes dietas à base de açúcar e sangue.

3.1. Objetivos específicos

- Estudar as populações de células enteroendócrinas, regenerativas e digestivas durante a metamorfose e em fêmeas adultas de *A. aegypti*;

- Estudar o processo de remodelação do intestino médio durante a metamorfose de *A. aegypti*;

- Estudar o efeito do inseticida imidacloprid na remodelação do intestino médio de *A. aegypti*;

- Ajustar os métodos de preparo de extratos solúveis e de eletroforese 2-DE do intestino médio de *A. aegypti*;

- Detectar *spots* diferencialmente expressos no intestino médio de *A. aegypti* em diferentes fases do seu desenvolvimento e submetidos a diferentes dietas.

- Realizar análises de espectrometria de massas do intestino médio de *A. aegypti* e

- Buscar informações e ensaios funcionais em bancos de dados a serem realizados com as proteínas identificadas no intestino médio de *A. aegypti*.

Artigo 1

Parasitology International 63 (2014) 506–512



Contents lists available at ScienceDirect

Parasitology International

journal homepage: www.elsevier.com/locate/parint



Aedes aegypti midgut remodeling during metamorphosis



Kenner Moraes Fernandes, Clóvis Andrade Neves, José Eduardo Serrão, Gustavo Ferreira Martins*

Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural, Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa (DBG/UFV), Campus Universitário, Viçosa, Minas Gerais, CEP 36570-900, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 July 2013

Received in revised form 21 December 2013

Accepted 16 January 2014

Available online 26 January 2014

Keywords:

Midgut

Development

Aedes aegypti

Endocrine cells

Stem cells

Regenerative cells

ABSTRACT

The *Aedes aegypti* midgut is restructured during metamorphosis; its epithelium is renewed by replacing the digestive and endocrine cells through stem or regenerative cell differentiation. Shortly after pupation (white pupae) begins, the larval digestive cells are histolyzed and show signs of degeneration, such as autophagic vacuoles and disintegrating microvilli. Simultaneously, differentiating cells derived from larval stem cells form an electron-dense layer that is visible 24 h after pupation begins. Forty-eight hours after pupation onset, the differentiating cells yield an electron-lucent cytoplasm rich in microvilli and organelles. Dividing stem cells were observed in the fourth instar larvae and during the first 24 h of pupation, which suggests that stem cells proliferate at the end of the larval period and during pupation. This study discusses various aspects of the changes during midgut remodeling for pupating *A. aegypti*.

© 2014 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Midgut morphology varies with development stage in *Aedes aegypti*. In the larval stage, it is composed of a tube with its posterior region slightly wider than the anterior, but in the adult stage, the anterior region is thinner and the posterior has the shape of an expandable sac, which accommodates the blood after feeding. Despite such differences, larval and adult *A. aegypti* midguts are composed of a single multifunctional epithelial layer externally coated by muscle fibers [1,2].

The *A. aegypti* midgut epithelium consists of three cell types: digestive, stem (also known as regenerative) and enteroendocrine. The digestive cells have microvilli, produce digestive enzymes and absorb digestion products. Among such cells are small, undifferentiated, stem cells that may be isolated, in pairs or in small clusters, throughout the *A. aegypti* midgut [3–5]. Enteroendocrine cells presumably regulate such functions as digestive epithelium, intestinal muscle cell and nervous system functions by secreting substances into the hemolymph [3,6,7].

During metamorphosis, the *A. aegypti* midgut epithelium is histolyzed and reconstructed through the differentiation and proliferation of stem cells [8,9]. Although such cells differentiate and proliferate during development for different insects [9–14], including adult *Drosophila melanogaster* [15,16], in *A. aegypti*, such cells likely only divide until the initial pupation stage [3,5,8].

A. aegypti midgut histolysis begins shortly before ecdysis, when the larvae develop into pupae, and is described as “programmed cell

death” (caspase-dependent apoptosis) [8,12]. However, such apoptosis includes factors related to caspase activation, which might not be the mechanism in an insect’s midgut because observations from *D. melanogaster* development suggest that such enzymes are not involved in digestive cell death during ecdysis (larva-pupa), even when such enzymes are highly active [17–19].

The midgut is a well-studied organ in adult *A. aegypti*, the site for blood digestion and the “gateway” for various pathogens through the ingestion of contaminated blood. Such pathogens include arboviruses (such as dengue and yellow fever arboviruses) and the avian malaria protozoa *Plasmodium gallinaceum* [20–22]. Therefore, studies on this organ are important to establish strategies for blocking such pathogens’ transmissions. Accordingly, interference with normal midgut development may reduce nutrient absorption and storage in larvae, which may reduce adult fertility. Thus, detailed knowledge on *A. aegypti* midgut development may yield targets that negatively affect fertility and facilitate population control.

Although the *A. aegypti* midgut has been well studied, several aspects of its changes during pupation have not been well explored. Herein, we describe certain changes to the *A. aegypti* midgut epithelium during pupation, including larval digestive cell replacement in adults.

2. Materials and methods

2.1. Mosquitoes

The *A. aegypti* specimens (PP-Campos strain, Campos dos Goytacazes) were collected from a colony maintained in the insectary of the Department of General Biology, Federal University of Viçosa (Universidade

* Corresponding author. Tel.: +55 31 3899 3492; fax: +55 31 3899 2549.

E-mail addresses: kennerbio@yahoo.com.br (K.M. Fernandes), claneves@ufv.br (C.A. Neves), jserrao@ufv.br (J.E. Serrão), gmartins@ufv.br (G.F. Martins).

Federal de Viçosa – UFV), which is raised in plastic trays with dechlorinated water and is provided with turtle feed (Reptolife).

Fifty fourth instar larvae (L4), 150 female pupae in different stages [white pupa (WP) collected immediately after ecdysis and pupae 24 and 48 h (P24 and P48, respectively) after ecdysis] and 50 newly emerged (NE) adult females were used.

2.2. Histology

The midguts were dissected in a saline solution for insects (0.1 M NaCl, 20 mM KH_2PO_4 or 20 mM Na_2HPo_4) and fixed in Zamboni's fixative [23] for 2 h. After fixation, ten midguts from each phase were separated and washed with distilled water, dehydrated in a graded series of increasing ethanol (70–100%), embedded in historesin (Historesin, Leica), cut into 3- μm sections, stained with hematoxylin–eosin (HE) or Xäidine Ponceau (XP), mounted in Eukitt medium (Fluka) and photographed using an optical Olympus BX60 microscope coupled with digital Olympus Q-Color3 camera.

2.3. Transmission electron microscopy (TEM)

The samples were separated and dissected in 0.1 M sodium cacodylate (pH 7.2) and fixed in 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate (pH 7.2) for 2 h. After fixation, the midgut fragments were washed in the same buffer and postfixed in 1% osmium tetroxide for 2 h in the dark. Following postfixation, the specimens were washed twice in 0.1 M PBS, dehydrated in an ascending ethanol dilution series (70–100%) and pre-infiltrated in LR White resin solution and 100% ethanol (2:1) for 1 h. Subsequently, the samples were embedded in pure resin and maintained at room temperature for 16 h, followed by polymerization in gelatin capsules (Electron Microscopy Sciences) at 60 °C for 24 h.

Ultrathin sections were placed on copper grids and contrasted for 20 min in 1% aqueous uranyl acetate and lead citrate. The samples were observed and photographed using a SEM Zeiss EM 109 at the Microscopy and Microanalysis Unit of the Federal University of Viçosa (Núcleo de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal de Viçosa – NMM-UFV).

2.4. Immunofluorescence

After fixation in Zamboni's fixative, the midguts were washed three times for 30 min each in PBS with 1% Triton X-100 (PBST) and then incubated for 24 h at 4 °C in anti-FMRamide primary antibody solution (Sigma) (1:400) with 1% PBST. Thereafter, the samples were washed with PBS three times (5 min each) and incubated with a fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated secondary antibody (Sigma) (1:500) in PBS for 24 h at 4 °C followed by three washes with PBS. The nuclei were stained with DAPI (diamidino-2-phenylindole) for 30 min and mounted in anti-fading solution Mowiol (Fluka). The slides were analyzed and photographed using an Olympus BX60 epifluorescence microscope with a WB filter, as previously described.

The proliferating cell observations were validated using antibodies that identify the nuclear protein phospho-histone H3 *in situ* [24]. Thus, the midguts were previously washed and fixed as described above then incubated for 24 h at 4 °C in an anti-phospho-histone H3 primary antibody solution (Cell Signaling) (1:100) in 1% PBST. After this step, the samples were washed three times with PBS and incubated with an FITC-conjugated secondary antibody (Sigma) (1:500) in PBS for 24 h at 4 °C, followed by three 10-min washes with PBS [25]. The slides were mounted in Mowiol, analyzed and photographed using an epifluorescence microscope or a Zeiss LSM 510 confocal microscope at the NMM-UFV.

For the control, midguts from each mosquito developmental stage were used and treated as described above, except for incubation with

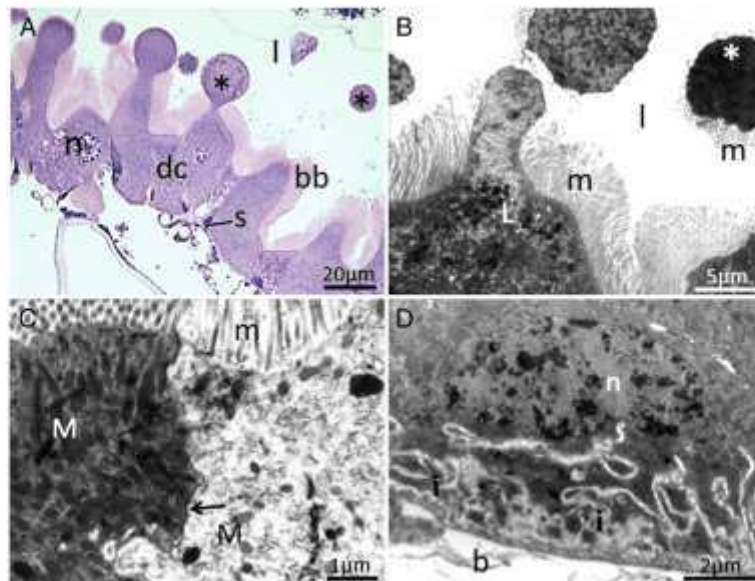


Fig. 1. *A. aegypti* L4 midgut. [A] Digestive cells (dc) stained with HE, which include developed brush borders (bb) and apocrine secretions released as bubbles (*). [B] Digestive cell apical region with developed microvilli (m). Notably, certain cell parts (*) that detach in the lumen. (l) direction are lined by microvilli. [C] Lateral contact between two digestive cell apical regions; one is electron-lucent, the other is electron-dense. They are joined by septate junctions (arrow). Several mitochondria (M) are shown in the cell apices; they are more abundant in the electron-dense cell. [D] Digestive cell basal region with cell membrane invaginations (i). b—basal lamina; L—lysosome-like structures; n—digestive cell nucleus; s—stem cell.

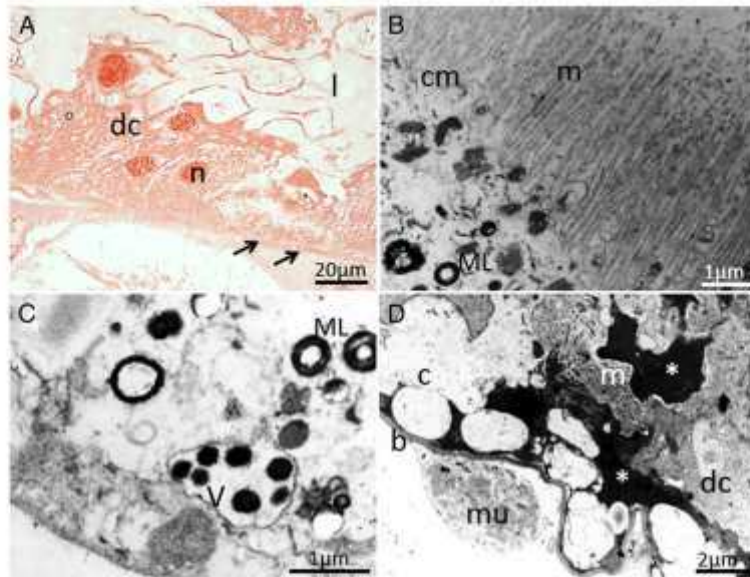


Fig. 2. *A. oegypti* WP midgut. [A] Digestive cells (dc) in the larval epithelium stained with XP, degenerating and detaching in the direction of the lumen (l). Simultaneously, a differentiating cell layer (arrows) is apparent under the digestive cells. [B] and [C] Larval digestive cells in the degeneration process with an electron-lucent cytosol, degenerating microvilli (m), several autophagic vacuoles (V) and multilamellar bodies (ML). [D] The differentiating cells (*) are highly electron-dense and present microvilli (m); b—basal lamina; c—cavity; mu—muscle; n—nucleus; cm—cell membrane.

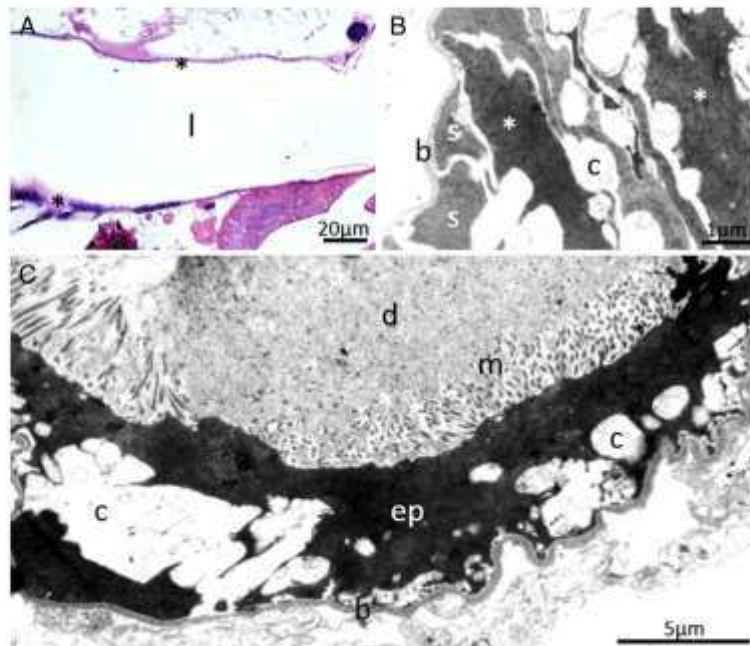


Fig. 3. *A. oegypti* P24 midgut. [A] Thin layer of differentiating cells (*). [B] Basal epithelial region with differentiating electron-dense cells (*) and stem cells (s) that have settled on the basal lamina (b). [C] Differentiating electron-dense cells that form a new epithelial cell layer with short microvilli (m). Cell cavities (c) are shown in the basal region, and "debris" (d) is apparent in the lumen of the midgut, l—midgut lumen.

the anti-FMRamide (Fig. 1', - supplementary data) and phospho-histone H3 (Fig. 2', - supplementary data) primary antibodies.

3. Results

The *A. aegypti* L4 midgut includes a simple epithelium primarily composed of digestive columnar cells and stem cells in the basal region surrounded by an outer muscle layer. The L4 digestive cells have a well-developed brush border at the apical region, and a nucleus with predominantly decondensed chromatin (Fig. 1A). The TEM data show that the microvilli and numerous mitochondria develop at the apex of such cells, whereas labyrinthine structures are formed through cell membrane invagination in the basal region. These cells appear electron-dense with numerous organelles or electron-lucent with few organelles joined by septate junctions (Fig. 1B–D).

Further in L4, basophilic structures are released from the apex of the digestive cells via apocrine secretion and detached as “bubbles” that protrude from the cell apex toward the intestinal lumen (Fig. 1A–B). Under TEM, such structures appeared coated with a membrane, and they preserve the microvilli and characteristics similar to the originating cell apex (Fig. 1B).

In *A. aegypti* WP, the digestive cells begin to clearly degenerate. These cells detach from the basement membrane, which no longer has a brush border; their cytoplasm is disintegrated, but their nuclei remain visible with more condensed and fragmented chromatin (Fig. 2A). The basal region shows a conspicuous layer of stem cells, with a predominantly euchromatic nucleus (Fig. 2A). Under TEM, the WP digestive cells are highly electron-lucent with microvilli during

degeneration, several autophagic vacuoles and multilamellar bodies (Fig. 2B–C); however, the stem cells initiate the differentiation process by forming a continuous layer of irregular and highly electron-dense cells under the old cells. At this stage, the new digestive cells present poorly developed microvilli (Fig. 2D).

The P24 midgut includes a thin layer of digestive cells without an apparent brush border (Fig. 3A). TEM also shows the remains (debris) of larval epithelial cells in advanced degeneration as well as highly electron-dense digestive cells that have better developed microvilli compared with WP (Fig. 3B–C). Throughout the midgut restructuring process, cavity formation was observed at the digestive cells' base (Fig. 3C).

In the 48 h following pupation initiation (P48), the newly formed digestive cells have a clear cytoplasm with few vacuoles and a euchromatic nucleus and without brush border (Fig. 4A). Under TEM, the new digestive cells are electron-lucent with a mitochondria-rich cytoplasm, electron-lucent matrix and large nuclei with decondensed chromatin. At this stage, one can identify the stem cells that will be part of the adult *A. aegypti* midgut epithelium (Fig. 4B–C).

The phospho-histone H3-positive cells in the midgut are few (a few dozen) for each *A. aegypti* developmental stage studied (Fig. 5A–D). Such cells have small nuclei and are located in the basal portion of the intestinal epithelium, which coincides with the stem cells' location, and are concentrated in specific regions throughout the organ. In addition, these cells were observed in the anterior region of the L4 midgut, medially in WP (not shown) as well as in P24 and P48 and in NE posterior regions (Fig. 5A–E). The number of labeled nuclei was not significantly different for L4 and pupae, which had 25 phospho-histone H3

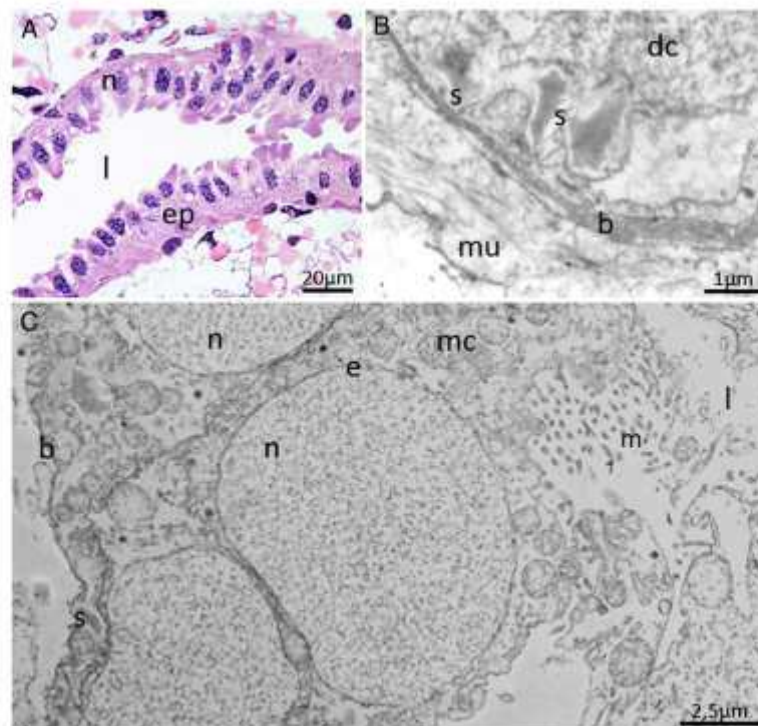


Fig. 4. *A. aegypti* P48 midgut. [A] Digestive epithelium (ep) reconstituted and with tall cells and decondensed chromatin. [B] Stem cells (s) near the basal lamina (b). [C] Electron-lucent epithelial cells in advanced differentiation and with a cytoplasm rich in mitochondria (mc) and large nuclei (n) with decondensed chromatin. dc—differentiating electron-lucent cell; e—nuclear envelope; m—microvilli; mu—muscle.

immune-reactive cells, on average. However, newly emerged adults had fewer labeled cells than L4 and pupae, which varied greatly between specimens (0–20 mitotic cells) ($P < 0.05$) (Fig. 5F).

FMRamide enteroendocrine cells are located in the *A. aegypti* posterior midgut (Fig. 6A), and the numbers of such cells vary throughout development (Fig. 6B). The L4 has 32 cells on average, whereas the WP and P24 have only 13 cells/individual, on average. The numbers of such cells are not significantly different for WP and P24; however, after the epithelium is renewed in P48, the number of endocrine cells increases to 50 cells/individual, on average. After pupation, the number of such cells increases to 140 cells/NE ($P < 0.05$) (Fig. 6B).

4. Discussion

The *A. aegypti* midgut L4 digestive cells release portions of the cell apex, which is similar to “bubbles”, into the lumen and has been described as apocrine secretion, which is related to the defense mechanism against bacteria and protects the intestinal epithelium immediately before remodeling [26]. Such structures were also observed in the adult bee midgut and are likely related to the digestion process because they are apparently formed by lysosomal matter released with the feed [27]. TEM analyses showed that such vesicles have similar matter as the apical cytoplasm, which preserves the cell membrane and the brush border, and suggests that such vesicles are the first signs of digestive cell degeneration, which begins at the end of L4 in *A. aegypti* [8,9].

The *A. aegypti* midgut loses almost the entire larval epithelium 18 h after ecdysis [8]; in the WP and P24, the intestinal epithelium was continually renewed in expanding differentiating cells, which formed new digestive cells in adults. After L4 ecdysis to pupa, the WP digestive cells degenerate and shed from the basement membrane into the midgut lumen. Simultaneously, differentiating electron-dense cells near the basal membrane were observed under the degenerating digestive cells, which characterizes the *A. aegypti* midgut digestive cell renewal process and is due to differentiating stem cells that originate from the L4 [8,9].

Stem cell division is initiated in the L4 and completed in the early pupae [8]; adult *A. aegypti* do not undergo mitosis in the midgut [3,5]. However, phospho-histone H3-positive cells (i.e., cells in mitosis) are present in both immature and NE. Such NE cells are likely stem cell remnants from midgut metamorphosis because such cells are only located at the end of this organ's posterior region at reduced numbers. Interestingly, such mitotic cells are concentrated in specific midgut regions during mosquito development, wherein proliferation is initiated in the anterior L4 region and ends in the posterior P48 region. Such cell proliferation advances along the midgut and switches to the posterior region in P48.

The timing of cell division differs between the anterior and the posterior midgut in both *A. aegypti* and *Culex pipiens* [8,28]. Shortly before ecdysis, cell proliferation begins at the anterior midgut of *A. aegypti* L4 stage and this may be associated with the onset of midgut histolysis [8]. Similarly, in *D. melanogaster*, it has been observed that the process of cell death was initiated from the anterior midgut of newly formed prepupae before proceeding to the posterior regions [29] without

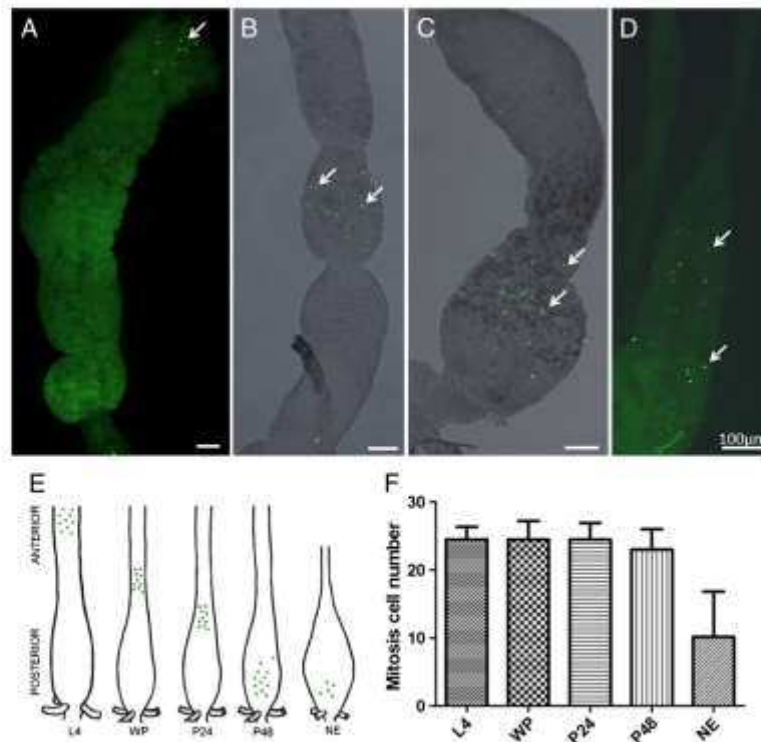


Fig. 5. PhosphoH3-immunoreactive cells in the midgut of *A. aegypti*. [A–D] Whole mounts of the midgut observed under epifluorescence microscope (A and D) and confocal microscope (B and C). Arrows point the phosphoH3-immunoreactive cell nuclei (green) in the anterior region of the L4 midgut [A], medially in P24 [B] and in the P48 [C] as well as in the NE posterior region [D]. [E] Scheme illustrating immunoreactive cells (green dots) distribution and locations according to the developmental stage (L4, WP, P24, P48 and NE). [F] Number of phosphoH3-immunoreactive cells at different developmental stages. In the NE (*), the number of mitotic cells is significantly lower than for less mature stages. Vertical bars represent the standard deviation.

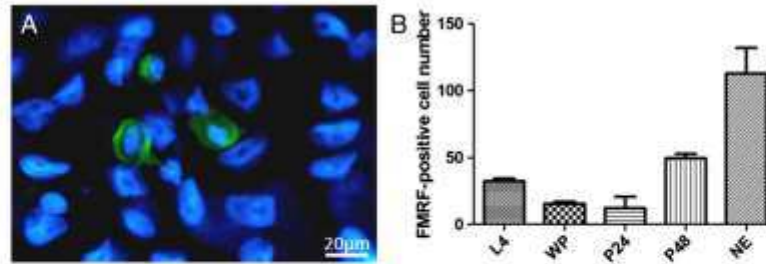


Fig. 6. Enteroendocrine (FMRF-immunoreactive) cells in the *A. aegypti* midgut. [A] FMRF-immunoreactive cells (green) in the posterior region of the organ in L4. The nuclei (blue) are stained with DAPI. [B] Number of enteroendocrine (FMRF-immunoreactive) cells at different development stages (L4, WP, P24, P48 and NE). Vertical bars represent the standard deviation.

known evidence of a relationship between stem cell and digestive larval cell death. Conversely, this and temporal separation of cell division reported in the midgut of dipterans has not been reported for other species like Collembola, Lepidoptera and Coleoptera [30–33].

As with the digestive cells, the enteroendocrine cells are formed *de novo* from the stem cells [13,37] and must differentiate 24 h after pupation begins, when the number of FMRF-positive enteroendocrine cells increases. This increase also coincides with onset of stem cell proliferation in the midgut posterior region, which could be explained by the enhanced consumption of undifferentiated cells to form new endocrine cells [8,9].

In this study, FMRF-positive enteroendocrine cells were observed at each developmental stage of *A. aegypti*. This may be the case for other insects in the context that the FMRF-positive enteroendocrine cells are concentrated in the posterior parts of the adult midgut [6,34,35] and have persisted despite the midgut remodeling [6,34,36]. The presence of FMRF-positive enteroendocrine cells in the course or after the midgut remodeling with regards to its physiological roles are yet to be understood.

Even with the increase endocrine cell numbers during pupation, the NE *A. aegypti* have fewer cells than L4, which may be due to the NE that have not fed on blood; this process includes major changes to the organ, including the increased numbers of such cells [6,38]. FMRFamide-positive cells were identified in the central nervous system during *D. melanogaster* metamorphosis, which suggests that they are necessary during development [39]. During *A. aegypti* midgut remodeling, neural and endocrine coordination may be necessary, even in the pupal stage, which does not include feeding.

The *A. aegypti* midgut remodeling begins immediately before the pupal stage, wherein observations indicate that the digestive cells are in a cell death process (“programmed cell death”, caspase-dependent apoptosis) [8,12]. The TEM results show that the cell death is most similar to autophagy, which was observed in midgut digestive cells from additional insects during metamorphosis. This type of cell death differs from apoptosis; thus, it was defined as autophagic cell death [17]. Corroborating this finding, autophagy inhibition during *D. melanogaster* midgut development delayed digestive cell degradation, even for such cells with high caspase activity, which suggests that autophagy is essential for midgut remodeling [19]. In conclusion, the study herein suggests that the WP likely histolized through autophagic cell death.

Acknowledgments

We would like to thank to CNPq, CAPES and Fundação Arthur Bernardes (FUNARBE) for financial support and to the Center for Microscopy and Microanalysis (UFV) for technical support.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.parint.2014.01.004>.

References

- Bernick EP, Moffet SB, Moffet DF. Organization, ultrastructure, and development of midgut visceral muscle in larval *Aedes aegypti*. *Tissue Cell* 2007;39:277–92.
- Billingsley PF. The midgut ultrastructure of hematophagous insects. *Annu Rev Entomol* 1990;35:219–48.
- Brown MR, Raikhel AS, Lea AO. Ultrastructure of midgut endocrine cells in the adult mosquito, *Aedes aegypti*. *Tissue Cell* 1985;17:209–21.
- Hecker H, Freyvogel TA, Briegel H, Steiger R. Ultrastructural differentiation of the midgut epithelium in female *Aedes aegypti* (L.) (Insecta, Diptera) imagines. *Acta Trop* 1971;28:80–104.
- Hecker H. Structure and function of midgut epithelial cells in Culicidae mosquitoes (Insect, Diptera). *Cell Tissue Res* 1977;132:1–41.
- Moffet SB, Moffet DF. Comparison of immunoreactivity to serotonin, FMRFamide and 5CYPs in the gut and visceral nervous system of larvae, pupae and adults of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. *J Insect Sci* 2005;5:20.
- Gantli E, Rudin W, Hecker H. Immunoelectron microscopic demonstration of pancreatic polypeptide in midgut epithelium of hematophagous dipterans. *J Histochem Cytochem* 1987;35:891–4.
- Nishiura JT, Ho P, Ray K. Methoprene interferes with mosquito midgut remodeling during metamorphosis. *J Med Entomol* 2003;40:498–507.
- Ray K, Mercedes M, Chan D, Choi CY, Nishiura JT. Growth and differentiation of the larval mosquito midgut. *J Insect Sci* 2007;9:1–13.
- Baldwin KM, Hakim RS. Growth and differentiation of the larval midgut epithelium during molt in the moth, *Manduca sexta*. *Tissue Cell* 1991;23:411–22.
- Baldwin KM, Hakim RS, Stanton GB. Cell–cell communication correlates with pattern formation in molting *Manduca sexta* midgut epithelium. *Dev Dyn* 1993;197:239–43.
- Wu Y, Parthasarathy R, Bai H, Palli SR. Mechanisms of midgut remodeling: juvenile hormone analog methoprene blocks midgut metamorphosis by modulating ecdysone action. *Mech Dev* 2006;123:530–47.
- Illa-Bochara I, Montuenga LM. The regenerative nidi of the locust midgut as a model to study epithelial cell differentiation from stem cells. *J Exp Biol* 2006;209:2215–23.
- Martins GF, Neves CA, Campos LA, Serrão JE. The regenerative cells during the metamorphosis in the midgut of bees. *Micron* 2006;37:161–8.
- Micchelli CA, Perrimon N. Evidence that stem cells reside in the adult *Drosophila* midgut epithelium. *Nature* 2006;439:475–9.
- O’Brien LE, Soliman SS, Li X, Bilder D. Altered modes of stem cell division drive adaptive intestinal growth. *Cell* 2011;147:603–14.
- Lockshin RA, Zakari Z. Apoptosis, autophagy, and more. *Int J Biochem Cell Biol* 2004;36:2405–19.
- Dai H, Mills K, Kumar S. *Drosophila* caspase DRUNC is required for specific developmental cell death pathways and stress-induced apoptosis. *Dev Cell* 2004;7:909–15.
- Denton D, Shrivastava B, Simon R, Mills K, Berry DL, Baehrecke EH, et al. Autophagy, not apoptosis, is essential for midgut cell death in *Drosophila*. *Curr Biol* 2008;18:1741–6.
- Gupta L, Kumar S, Han YS, Pimenta PPT, Barillas-Mury C. Midgut epithelial responses of different mosquito-*Plasmodium* combinations: the actin cone zipper repair mechanism in *Aedes aegypti*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:4010–5.
- Molina-Cruz A, Gupta L, Richardson J, Bennett K, Black W, Barillas-Mury C. Effect of mosquito midgut trypsin activity on dengue-2 virus infection and dissemination in *Aedes aegypti*. *Am J Trop Med Hyg* 2005;72:631–7.
- Pennington JE, Wells MA. The midgut adult: structure and function. In: Marquarr WC, editor. *Biology of disease vectors*. Amsterdam: Elsevier; 2004. p. 289–95.
- Stefanini M, De Martino C, Zamboni L. Fixation of ejaculated spermatozoa for electron microscopy. *Nature* 1967;216:173–4.
- Precors U, Landsberg G, Scheidtmann KH. Novel mitosis-specific phosphorylation of histone H3 at Thr11 mediated by Dkl/ZIP kinase. *Nucleic Acids Res* 2003;31:878–85.
- Cruz LC, Araújo VA, Falho MCQ, Serrão JE, Neves CA. Proliferation and cell death in the midgut of the stingless bee *Melipona quadrifasciata* anthidioides (Apidae, Meliponini) during metamorphosis. *Apidologie* 2013;44:458–66.
- Oliveira CD, Tadei WP, Abdalla FC. Occurrence of apocrine secretion in the larval gut epithelial cells of *Aedes aegypti* L., *Anopheles albimanis* Lynch-Artibáizaga and *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae): a defense strategy against infection by *Bacillus sphaericus* Neide? *Neotrop Entomol* 2009;38:624–31.

- [27] Cruz-Landim C, Silva-De-Moraes RLM, Serrão JE. Ultrastructural aspects of epithelial renewal in the midgut of adult worker bees (Hymenoptera, Apidae). *J Comp Biol* 1996;1(1):209–40.
- [28] Nishiura JT, Smouse D. Nuclear and cytoplasmic changes in the *Galex pilicornis* (Diptera: Culicidae) alimentary canal during metamorphosis and their relationship to programmed cell death. *Ann Entomol Soc Am* 2000;93:282–90.
- [29] Jang C, Baebrecke EH, Thummel CS. Steroid regulated programmed cell death during *Drosophila* metamorphosis. *Development* 1997;124:4673–83.
- [30] Rost MM. Ultrastructural changes in the midgut epithelium in *Pedura aquatica* L. (Insecta, Collembola, Arthropodea) during regeneration. *Arthropod Struct Dev* 2006;35:69–76.
- [31] Tettamanzi G, Grimaldi A, Casarelli M, Ambrosetti E, Pappi B, Congiu T, et al. Programmed cell death and stem cell differentiation are responsible for midgut replacement in *Heliothis virescens* during prepupal instar. *Cell Tissue Res* 2007;330:345–59.
- [32] Parthasarathy K, Pali RR. Proliferation and differentiation of intestinal stem cells during metamorphosis of the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Dev Dyn* 2008;237:893–908.
- [33] Nardi JB, Bee CM, Miller LA. Stem cells of the beetle midgut epithelium. *J Insect Physiol* 2010;56:296–303.
- [34] An Y, Nakajima T, Suzuki K. Immunohistochemical demonstration of mammalian- and FMRFamide-like peptides in the gut innervation and endocrine cells of the wild silkworm, *Antheraea yamamai* (Lepidoptera: Saturniidae) during diapause and post-diapause of pharate first-instar larvae. *Eur J Entomol* 1998;95:185–96.
- [35] Veenstra JA. Peptidergic paracrine and endocrine cells in the midgut of the fruit fly maggot. *Cell Tissue Res* 2009;336:309–23.
- [36] Zilhan D, Sauman I, Sehgal F. Peptidergic innervation and endocrine cells of insect midgut. *Arch Insect Biochem Physiol* 1993;22:113–22.
- [37] Ohlsten B, Spradling A. The adult *Drosophila* posterior midgut is maintained by pluripotent stem cells. *Nature* 2006;439:470–4.
- [38] Brown MR, Crim JW, Lea AO. FMRFamide- and pancreatic polypeptide-like immunoreactivity of endocrine cells in the midgut of a mosquito. *Tissue Cell* 1986;18:419–28.
- [39] White K, Huetten T, Punsal P. Neuropeptide-FMRFamide-like immunoreactivity in *Drosophila*: development and distribution. *J Comp Neurol* 1986;247:430–8.

Artigo 2

Efeito do inseticida imidacloprid no desenvolvimento pós-embrionário do intestino médio do mosquito *Aedes aegypti*

Kenner Moraes Fernandes¹; Wagner Gonçalves Gonzaga¹; Franciane Rosa Miranda¹; Tales Vicari Pascini²; Hudson Vaner Ventura Tomé²; José Eduardo Serrão¹ e Gustavo Ferreira Martins^{1*}

1- Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, MG, 36570-900

2- Departamento de Entomologia, Universidade Federal de Viçosa, MG, 36570-900

Resumo

O mosquito *Aedes aegypti* é um dos principais vetores dos vírus Dengue e da febre amarela, os quais causam grande morbidade e mortalidade humana. Os esforços para combater a dengue se baseiam principalmente no controle do inseto vetor, e o uso de inseticidas tem sido o método mais viável. O intestino médio é um órgão bem estudado em *A. aegypti*, sendo o local onde ocorre a digestão sanguínea e a porta de entrada de vários patógenos, tornando-se um importante alvo de estudos. Aqui, foram investigados em laboratório o efeito do inseticida imidacloprid na sobrevivência dos insetos e os efeitos subletais no processo de proliferação e diferenciação das células regenerativas durante o desenvolvimento do intestino médio. Além disso, ele foi capaz de interferir negativamente na diferenciação das células digestivas, levando a malformação do intestino médio dos adultos.

1. Introdução

O mosquito *Aedes aegypti* é um dos principais vetores dos vírus da febre amarela e dengue os quais causam grande morbidade e mortalidade humana (Alphey et al., 2013). Os esforços para combater a dengue se baseiam principalmente no controle do inseto vetor, e o uso de inseticidas tem sido o método mais utilizado (Pridgeon et al., 2008; Coelho et al., 2009; Allan et al., 2011).

Atualmente, inseticidas neurotóxicos pertencentes aos grupos dos organofosforados e piretróides são os compostos mais usados no controle de *A. aegypti*. Entretanto, o uso indiscriminado desses inseticidas nos últimos 30 anos tem ocasionado aumento nos níveis de resistência em populações de mosquitos em regiões da Ásia e América Latina (Rodríguez et al., 2007; Martins et al., 2009; Lima et al., 2011). Tais evidências são alarmantes no que se refere à redução de populações de *Aedes aegypti*, o que motiva a identificação de compostos capazes de substituir esses inseticidas comumente utilizados no seu controle.

O neonicotinoide imidacloprid apresenta um amplo espectro de atividade, persistência e versatilidade de aplicação na agricultura e por isso se tornou um dos pesticidas mais utilizados no mundo (Elbert et al., 2008; Jeschke et al., 2008). Entretanto, pouca informação é conhecida sobre seus efeitos em *A. aegypti* (Antonio-Arreola et al., 2011). Embora imidacloprid possua baixa atividade larvicida e pupicida em comparação a outros inseticidas, seus efeitos subletais podem ser importantes na redução de populações de *A. aegypti* (Tomé et al., 2014).

O intestino médio de *A. aegypti* é o local onde ocorre a digestão sanguínea e é a porta de entrada de vários patógenos, incluindo vírus, tornando-se um importante alvo de estudos para bloquear a transmissão desses organismos. Esse órgão é formado por um epitélio simples envolto por duas camadas musculares (Billingsley et al., 1990). No epitélio do intestino médio de *A. aegypti* há três tipos celulares: células digestivas, regenerativas e enteroendócrinas. As células digestivas são colunares e dotadas de microvilosidades, sendo responsáveis pela produção de enzimas digestivas e absorção de nutrientes. As pequenas células regenerativas (também chamadas de células-tronco) são células indiferenciadas, responsáveis pela renovação das células do epitélio do intestino médio através da diferenciação celular. As células enteroendócrinas supostamente regulam as funções do epitélio digestivo, das células musculares e sistema

nervoso, por meio da secreção de substâncias para a hemolinfa (Hecker, 1971; Hecker, 1977; Brown et al., 1985; Glattli et al., 1987; Moffett & Moffett, 2005).

Durante a metamorfose, as células digestivas de *A. aegypti* se degeneram e a reposição dessas células ocorre pela diferenciação e proliferação das células regenerativas (Nishiura et al., 2003; Ray et al., 2007). A renovação do intestino médio ocorre em tempos diferentes nas regiões anterior e posterior, sugerindo que esse processo é bastante complexo (Fernandes et al., 2014), e alterações no decorrer do processo de reestruturação do intestino médio durante a metamorfose podem ser prejudiciais para o mosquito *A. aegypti*. Portanto, as interferências no desenvolvimento do intestino médio possuem potencial de inviabilizar o processo de hematofagia, e, por conseguinte, reduzir a fecundidade das fêmeas.

No presente trabalho, nós investigamos os efeitos do inseticida imidacloprid na sobrevivência e no desenvolvimento do intestino médio de *A. aegypti*. Além da letalidade, foi demonstrado pela primeira vez, como efeitos subletais de imidacloprid podem interferir negativamente no desenvolvimento desse vetor, constituindo um potencial para o controle das suas populações.

2. Material e métodos

2.1. Mosquitos

Os exemplares de *A. aegypti* (linhagem PPCampos, Campos dos Goytacazes) foram obtidos de uma colônia mantida no insetário do Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal de Viçosa (UFV), criados em bandejas de plástico contendo água desclorada e alimentadas com ração de tartaruga (Reptolife® - Alcon).

Cento e setenta larvas de 4º instar (L4), 510 pupas fêmeas de diferentes estágios [pupa de cor branca (PB) obtida imediatamente após a ecdise de L4, pupas com 24 e 48h (P24 e P48) após a ecdise] e 170 fêmeas adultas recém-emergidas (RE) foram utilizadas para os ensaios.

Os insetos foram mantidos a 25 ± 5 °C, umidade relativa de $75 \pm 10\%$ e fotoperíodo 12:12 L:D.

2.2. Bioensaio de sobrevivência

O inseticida comercial Evidence® WG (700 g a.i./L de imidacloprid); formulação em grânulos dispersos em água (Bayer CropScience, São Paulo, SP, Brasil)

foi diluído em água para obtenção das concentrações finais de 0,15, 1,5, 3,0, 6,0 e 15,0 ppm.

Larvas de terceiro instar (L3) foram transferidas para os frascos plásticos de 500 mL contendo 200 mL da solução de imidacloprid e 10 mg de alimento. A sobrevivência dos insetos foi monitorada a cada hora nas primeiras 12 horas. Posteriormente a sobrevivência foi monitorada a cada 24 h durante 10 dias, tempo suficiente para todos os insetos alcançarem a fase adulta. Durante a avaliação da sobrevivência, os insetos incapazes de se locomover mediante estímulos com um pincel foram considerados mortos e descartados. Cada tratamento (diferentes concentrações) e o controle foram repetidos quatro vezes, sendo cada um correspondendo a um frasco com 25 larvas.

2.3. Montagem total

Para todas as análises comparativas do presente trabalho, utilizamos duas concentrações subletais de imidacloprid, uma fraca de três ppm e a mais forte de 15 ppm.

Os intestinos médios de 20 indivíduos de cada fase e tratamento foram dissecados em solução fisiológica para insetos (0.1 M NaCl, 20 mM KH_2PO_4 , 20 mM Na_2HPO_4) e fixados em Zamboni (paraformaldeído/ácido pícrico) (Stefanini et al., 1967) por 2 h. Após a fixação, 10 intestinos foram corados com diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Biotium) por 30 min e montados em solução de Mowiol (Sigma-Aldrich), analisadas e fotografadas no microscópio de epifluorescência Olympus BX-60, com sistema de captura de imagem Olympus Q-Color3™.

Seis áreas de cada região do intestino médio (anterior e posterior) foram aleatoriamente fotografadas no microscópio de fluorescência com a lente objetiva de 40x (área total = 0,414 mm²) (Fernandes et al., 2010). Nas imagens de montagem total foram feitas as contagens de células em diferenciação ou digestivas não completamente diferenciadas (ambas aqui tratadas simplesmente como células digestivas) nas pupas e células digestivas (células digestivas propriamente ditas, com núcleos maiores e presentes na região apical do epitélio digestivo) e células regenerativas (células com núcleos pequenos presentes na região basal do epitélio digestivo) (Ray et al., 2007). Foram considerados 20 núcleos de células digestivas e 10 de células regenerativas para medidas das áreas por imagem. As células enteroendócrinas e as células em divisão foram contadas em todo o intestino médio. Todas as medidas e a contagem de células foram feitas com o auxílio do programa Image-Pro Plus 4.5 (Media Cybernetics).

2.4. Microscopia eletrônica de transmissão

Dez indivíduos de cada fase, controle e tratados, foram dissecados em tampão cacodilato de sódio 0,1 M pH 7,2 e fixados em glutaraldeído 2,5% no mesmo tampão por 2 h. Após a fixação, fragmentos do intestino médio foram lavados com o tampão e pós-fixados em tetróxido de ósmio 1% por 2 h no escuro. Em seguida as amostras foram desidratadas em série crescente de etanol (70-100%) e embebidos em resina LR White (Eletron Microscopy Sciences) de acordo com protocolo do fabricante.

Secções ultrafinas foram contrastadas por 20 min em acetado de uranila aquosa 1% e citrato de chumbo (Reynolds, 1963). As amostras foram observadas em microscópio eletrônico de transmissão (MET) Zeiss EM 109 no Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV (NMM).

2.5. Reação de TUNEL

A fragmentação do DNA nuclear foi identificada *in situ* pelo o kit de detecção de morte celular TUNEL (Roche). Secções histológicas de 3 µm do intestino médio de cada fase e tratamento foram tratados com proteinase K (10-20 µg/mL em 10 mM Tris/HCl, pH 7.4-8) durante 60 min à 37 °C, lavados com PBS e incubados por mais 60 min na solução de TUNEL a 37 °C. Após o tratamento, as lâminas foram montadas, analisadas e fotografadas no microscópio de fluorescência.

2.6. Imunofluorescência - fosfo-histona H3

As células em divisão foram marcadas *in situ* pelo anticorpo anti-histona H3 fosforilada (fosfo-histona H3) (Preuss, 2003). Dez intestinos médios de cada fase e tratamento foram fixados e lavados como descrito acima e incubados por 24 h a 4 °C em solução de anticorpo primário anti-fosfo-histonaH3 (Cell Signaling) (1:100) em PBST 1%. As amostras foram lavadas 3 vezes com PBS e incubadas com anticorpo secundário conjugado com FITC (Sigma) (1:500) em PBS por 24 h a 4 °C, seguida das 3 lavagens de 10 min com PBS. Os núcleos foram corados com DAPI e o citoesqueleto com faloidina-rodamina (Sigma), ambos por 30 min. As lâminas foram montadas, analisadas e fotografadas como as montagens totais.

2.7. Imunofluorescência - FMRFamida

Para detecção de células enteroendócrinas, após a fixação em Zamboni, 10 intestinos médios de cada fase e tratamento foram submetidos a 3 lavagens de 30 min

cada em tampão fosfato de sódio contendo 1% de Triton X-100 (PBST) e em seguida incubados por 24 h a 4 °C em solução de anticorpo primário anti-FMRFamida (Peninsula Lab) (1:400) em PBST 1%. Após essa etapa, as amostras foram lavadas com PBS 3 vezes (5 min cada) e incubadas com anticorpo secundário conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Sigma) (1:500) em PBS por 24 h a 4 °C, seguida das três lavagens com PBS. Os núcleos foram corados com DAPI por 30 min e montados em solução de Mowiol. As lâminas foram analisadas em microscópio de epifluorescência.

2.8. Controles

Para o controle negativo da reação de TUNEL foram utilizadas secções de cinco intestinos médios de cada fase do ciclo de vida do mosquito e incubados sem a presença da enzima transferase.

Seis intestinos médios de L4 foram utilizados como controle positivo para detecção das células em divisão e células enteroendócrinas, pois as mesmas estão presentes na L4 de *A. aegypti* (Nishiura et al., 2003; Moffett & Moffett, 2005). Para o controle negativo da imunofluorescência foram utilizados cinco intestinos médios de cada fase do ciclo de vida do mosquito, sendo tratados como descrito anteriormente, exceto pela incubação com anticorpos primários anti- FMRFamida e anti-fosfo-histona H3.

2.9. Análises estatísticas

Os resultados do bioensaio de sobrevivência foram analisados pelo procedimento não-paramétrico (procedimento LIFETEST - SAS, 2008), no qual as curvas de sobrevivência foram obtidas usando estimadores Kaplan-Meyer. Os insetos que alcançaram a emergência na fase adulta foram classificados como dados censurados. Os resultados referentes às medidas e contagem de células foram submetidos à análise de variância (ANOVA) para as variáveis com distribuição normal e teste de Kruskal-Wallis, quando constatada distribuição não-normal.

3. Resultados

3.1. Análises de sobrevivência

Os dados das análises de sobrevivências de *A. aegypti* mostraram diferença significativa para as diferentes concentrações de imidacloprid utilizadas (Log-rank test, $\chi^2 = 238.65$, $df = 5$, $P < 0,001$). Após 10 dias, houve diminuição concentração-dependente na sobrevivência mediante exposição, onde a maior concentração de imidacloprid causou a morte de cerca de 80% dos insetos ao final da avaliação. No entanto, a concentração de 0,15 ppm foi similar ao controle quanto à sobrevivência ($P > 0,05$) (Fig. 1).

3.2. Montagem total

A morfologia do intestino médio de *A. aegypti* foi afetada pela exposição Ao imidacloprid em ambas concentrações (3 e 15 ppm), com as modificações notadas na região anterior das L4 e na região posterior nas fases seguintes (PB, P24, P48, RE), caracterizadas pela desorganização das células digestivas e regenerativas, a deformação dos núcleos das células digestivas e regiões vazias (sem células) em relação ao controle. Entretanto não ocorreram diferenças entre os indivíduos tratados (Figs. 2 e 3).

O número das células digestivas só não variou entre os controles e insetos expostos a imidacloprid nas PB. Entretanto, a partir das P24, houve aumento no número de células digestivas no controle, enquanto o número de células não se alterou até a emergência dos adultos nos insetos expostos a imidacloprid ($P < 0,05$) (Fig. 3A).

O número de células regenerativas foi maior nas L4, porém diminuiu a partir de P24 nos insetos controle. Por outro lado, nos indivíduos expostos a imidacloprid, esse número, embora inicialmente menor nas L4, aumentou ao longo do desenvolvimento, sendo que na concentração de 15 ppm houve maior número de células regenerativas ($P < 0,05$) (Fig. 3B).

3.3. Ultraestrutura

As células do intestino médio das L4 de *A. aegypti* não se diferenciaram muito na ultraestrutura em relação aos controles (publicados em Fernandes et al., 2014), com exceção de um aumento no número de corpos multilaminares na região apical e vacúolos eletrolucos na região basal das células digestivas dos indivíduos expostos a imidacloprid (Figs. 4A e B).

As células digestivas das PB apresentaram sinais de degeneração tanto no controle quanto nos insetos expostos a imidaclopride. Entretanto, no controle o citoplasma dessas células foram eletrolucidas com diversos vacúolos autofágicos e corpos multivesiculares, enquanto que nas pupas oriundas de exposições a imidacloprid, havia grandes vesículas eletrolucidas na região basal e uma desorganização na estrutura das microvilosidades (Figs. 4C e D).

No epitélio do intestino médio das PB havia células em processo de diferenciação, restando *debris* das células digestivas larvais. Durante o processo de renovação do epitélio ocorreu a formação de cavidades na região basal das células em diferenciação. Porém, nos indivíduos expostos ao inseticida, as células regenerativas possuíam citoplasma com grandes vacúolos, ocupando quase todo citoplasma, e a membrana plasmática em algumas células estava rompida, liberando o conteúdo celular para o lúmen do intestino médio (Figs. 4E e F).

Os indivíduos expostos a imidacloprid que sobreviveram nas 48h após a pupação (P48) e os que chegaram à fase adulta (RE) apresentaram células digestivas com o citoplasma totalmente vacuolizado e em algumas células o rompimento total das suas membranas (Fig. 5).

3.4. Dano celular

Foi detectada a fragmentação de DNA nas L4 e PB do grupo controle, enquanto que nos insetos expostos as duas concentrações de imidacloprid havia células positivas para a reação de TUNEL em todas as fases do desenvolvimento, incluindo P24, P48 (Fig. 6A) e RE.

3.5. Proliferação celular

As células positivas para fosfo-histona H3 estavam presentes em todas as fases do desenvolvimento de *A. aegypti* em quantidade constante no intestino médio, enquanto nos insetos expostos a soluções de 3e 15 ppm de imidacloprid, células marcadas ocorreram em menor número do que no controle, exceto nas PB ($P < 0,05$) (Figs. 3C e 6B).

3.6. Células FMRFamida

As células enteroendócrinas foram encontradas na região posterior do intestino médio das L4 dos insetos do grupo controle, enquanto que nos insetos expostos ao

inseticida havia muitas células FMRF-positivas na região média anterior do órgão. Nas L4 expostas a imidacloprid havia mais células FMRF-positivas em relação ao grupo controle. Entretanto, a partir de P24 o número dessas células aumentou nos RE, o que não foi observado nas L4 oriundas de soluções de imidacloprid ($P < 0,05$) (Figs .3D e 6C).

4. Discussão

Os resultados de mortalidade sugerem que o imidacloprid é mais tóxico para larvas do que para adultos de *A. aegypti*, como visto por Paul et al. (2006). Essa susceptibilidade de *A. aegypti* ao imidacloprid já havia sido comprovada em outros trabalhos com larvas e adultos de mosquitos (Song et al., 1997; Paul et al., 2006; Pridgeon et al., 2008). Porém, o menor efeito do imidacloprid nos adultos pode estar relacionado com a presença do citocromo P450, importante para o metabolismo de diversos inseticidas, e que apresenta maiores níveis de expressão em adultos (Paul et al., 2006).

O efeito tóxico do imidacloprid no intestino médio de *A. aegypti* ocorre inicialmente na região anterior das L4, com a deformação dos núcleos das células digestivas e espaços deixados por células mortas, progredindo ao longo do desenvolvimento até a região posterior. Essas alterações podem ser explicadas por uma interferência na proliferação das células regenerativas que ocorre concomitante com o início da morte das células digestivas na região anterior do intestino médio das L4 pouco antes da muda para pupa (Nishiura et al., 2003; Ray et al., 2007; Fernandes et al., 2014). Em outras palavras, as células digestivas morrendo por efeito do imidacloprid ou pela morte celular durante a metamorfose não estão sendo substituídas por novas células.

Nos indivíduos do controle, o número de células digestivas em diferenciação aumenta a partir das P24, enquanto a quantidade de células regenerativas diminui. Isso pode ser explicado pelo processo de diferenciação celular, onde as células regenerativas são “consumidas” por originarem as novas células digestivas dos adultos (Nishiura et al., 2002; Nishiura et al., 2003). Nos indivíduos expostos a imidacloprid, as células digestivas/diferenciação ocorrem em menores proporções de L4 a RE, enquanto o número de células regenerativas aumenta a partir das P24, principalmente nos expostos a 15 ppm de imidacloprid. Esses dados mostram que as células regenerativas dos

indivíduos expostos ao inseticida não estão se diferenciando, sugerindo que imidacloprid interfere na reconstrução do epitélio intestinal, por impedir a diferenciação celular em células digestivas. Adicionalmente, a queda do número de células regenerativas nas L4 expostas a imidacloprid pode ser explicada por uma redução na proliferação dessas células, que ocorre após a passagem de L3-L4 (Ray et al., 2007).

As células digestivas das L4 estão no início do processo de degeneração que ocorre no final da fase de L4 e termina 18 h após a pupação (Nishiura et al., 2003; Ray et al., 2007). Como as células digestivas das L4 e PB estão normalmente em processo de morte celular (Fernandes et al., 2014), inviabilizou-se a caracterização dos efeitos de imidacloprid nessas fases do desenvolvimento ao MET. Nas P24 do grupo controle, havia células em diferenciação em maior quantidade, caracterizando a renovação do epitélio após a morte das células digestivas larvais no intestino médio de *A. aegypti* (Nishiura et al., 2003; Ray et al., 2007; Fernandes et al., 2014). Entretanto, nos indivíduos expostos a imidacloprid, essas células foram alteradas, apresentando citoplasma altamente vacuolizado e rompimento da membrana plasmática. Esse aspecto de morte celular também foi encontrado nas P48 e nos RE, mostrando que o efeito citotóxico do imidacloprid persiste por todo o desenvolvimento, impedindo a reconstrução do epitélio digestivo durante a metamorfose de *A. aegypti*.

A degeneração das células digestivas larvais tem início na região anterior do intestino médio e inicia pouco antes da transição L4-pupa e prossegue até por volta de 18h após o início da pupação (Nishiura et al., 2002; Nishiura et al., 2003). Entretanto, nos indivíduos expostos a imidacloprid, as células (regenerativas e digestivas/em diferenciação) TUNEL-positivas apareceram após o final da degeneração das células digestivas larvais. Isso sugere que o efeito citotóxico do imidacloprid se iniciou nas células regenerativas das L4 e interferiu negativamente mais uma vez na reestruturação do intestino médio de *A. aegypti*. Essa interferência diz respeito à fragmentação do DNA nuclear, e seus efeitos no metabolismo do intestino médio merecem ser estudados no futuro.

Durante a remodelação do intestino médio de *A. aegypti* ocorre proliferação de células regenerativas. Esse processo ocorre de forma coordenada, tendo regiões de proliferação ao longo do intestino, iniciando na região anterior das L4 e prosseguindo para a região posterior dos RE (Fernandes et al., 2014). Por isso, interferências nesse processo pode comprometer a metamorfose e a sobrevivência do indivíduo, mesmo que ele atinja a fase adulta. O imidacloprid diminuiu o número de células fosfohistona H3-

positivas durante o período de remodelação do intestino médio, com exceção das PB, que apresenta um aumento. Esse aumento de células fosfohistona H3-positivas na região média posterior das PB indica uma possível resposta aos efeitos tóxicos de imidacloprid, na tentativa de repor as células regenerativas perdidas. Por outro lado, a diminuição no número de células em proliferação é drástica o bastante para a manutenção do intestino médio ao longo da vida do mosquito adulto, pois, não há mitose nas células regenerativas dos mosquitos *A. aegypti* adultos (Brown et al., 1985; Hecker, 1977), com exceção dos RE (Fernandes et al., 2014). Apesar de imidacloprid agir agonisticamente em receptores nicotínicos da acetilcolina em neurônios (Cassida et al., 2004), sua ação sobre a proliferação das células regenerativas pode ter ocorrido de forma indireta, ainda desconhecida (Moffett & Moffett, 2005).

As células enteroendócrinas (FMRF-positivas) estão presentes em todas as fases do desenvolvimento de *A. aegypti*, porém, sempre localizadas na região posterior do intestino médio (Moffett & Moffett, 2005). Assim como as células digestivas, essas células também se originam da diferenciação das células regenerativas (Illa-Bochaca & Montuenga, 2006; Ohlstein & Spradling, 2006), o que supostamente ocorre a partir das P24, quando o número dessas células aumenta (Fernandes et al., 2014). Entretanto nas L4 tratadas com imidacloprid o número dessas células é maior em comparação ao controle e estão localizadas na região mais anterior do intestino médio, o que sugere sua participação na remediação dos efeitos tóxicos do inseticida, através dos seus peptídeos moduladores, que podem atuar informando os danos causados pelo imidacloprid ou estimulando a proliferação celular (Moffett & Moffett, 2005).

As células enteroendócrinas não se renovam após a metamorfose do intestino médio, possivelmente em consequência da não diferenciação das células regenerativas sob o efeito do imidacloprid. A falta de células enteroendócrinas pode ser danosa para o intestino médio dos adultos de *A. aegypti*, pois elas são essenciais para a digestão, sinalizando informações sobre o tipo, volume e composição do alimento ingerido (Brown et al., 1986; Moffett & Moffett, 2005).

Os dados aqui obtidos mostram que além da letalidade, efeitos subletais de imidacloprid no desenvolvimento pós-embrionário do intestino médio de *A. aegypti* podem ser importantes no que se refere ao controle de suas populações. O tratamento com imidacloprid afetou a remodelação do órgão, inibindo a proliferação e diferenciação das células regenerativas, muitas vezes levando-as a morte. Assim, nossos resultados sugerem que imidacloprid exposto às larvas possui alto potencial no

controle de *A. aegypti*, pois mesmo com a emergência dos adultos, o seu intestino médio está constituído, na maior parte, por células digestivas mal formadas. Porém, estudos a campo devem ser realizados nesse contexto.

5. Referências bibliográficas

Allan, SA. Susceptibility of adult mosquitoes to insecticides in aqueous sucrose baits. *J Vector Ecol* 2011; 36(1):59-67.

Alphey L, McKemey A, Nimmo D, Oviedo MN, Lacroix R, Matzen K, Beech C. Genetic control of *Aedes* mosquitoes. *Ann Trop Med Parasitol* 2013; 107:170-9.

An Y, Nakajima T, Suzuki K. Immunohistochemical demonstration of mammalian- and FMRFamide-like peptides in the gut innervation and endocrine cells of the wild silkworm, *Antheraea yamamai* (Lepidoptera: Saturniidae) during diapause and post-diapause of pharate first-instar larvae. *Eur J Entomol* 1998; 95:185-96.

Antonio-Arreola, GE, López-Bello, R, Romero-Moreno, DK, Sánchez D. Laboratory and Field evaluation of the effects of neonicotinoid imidacoprid on the oviposition response of *Aedes (Stegomyia) aegypti* Linnaeus (Diptera: Culicidae). *Mem.Inst. Oswaldo Cruz* 2011; 106(8), 997-1001.

Baldwin KM, Hakim RS, Stanton GB. Cell-cell communication correlates with pattern formation in molting *Manduca sexta* midgut epithelium. *Dev Dyn* 1993; 197:239-43.

Baldwin KM, Hakim RS. Growth and differentiation of the larval midgut epithelium during molt in the moth, *Manduca sexta*. *Tissue Cell* 1991; 23: 411-22.

Bernick EP, Moffet SB, Moffett DF. Organization, ultrastructure, and development of midgut visceral muscle in larval *Aedes aegypti*. *Tissue Cell* 2007; 39:277-92.

Billingsley PF. The midgut ultrastructure of hematophagous insects. *Annu Rev Entomol* 1990; 35:219-48.

Brown MR, Crim JW, Lea AO. FMRFamide- and pancreatic polypeptide-like immunoreactivity of endocrine cells in the midgut of a mosquito. *Tissue Cell* 1986; 18:419-28.

Brown MR, Raikhel AS, Lea AO. Ultrastructure of midgut endocrine cells in the adult mosquito, *Aedes aegypti*. *Tissue Cell* 1985; 17:709-21.

Cassida JE, Quistad GB (2004) Why insecticides are more toxic to insects than people: The unique toxicology of insects. *J Pestic Sci* 29: 81-86.

Coelho, JS, Santos, NDL, Napoleão, TH, Gomes, FS, Ferreira, RS, Zingali, RB. et al. Effect of *Moringa oleifera* lectin on development and mortality of *Aedes aegypti* larvae. *Chemosphere* 2009; 77, 934-938.

Cruz-Landim C, Silva-De-Moraes RLM, Serrão JE. Ultrastructural aspects of epithelial renewal in the midgut of adult worker bees (Hymenoptera, Apidae). *J Comp Biol* 1996; 1(½):209-40.

Daish TJ, Mills K, Kumar S. *Drosophila* caspase DRONC is required for specific developmental cell death pathways and stress-induced apoptosis. *Dev Cell* 2004; 7:909-15.

Shravage B, Simin R, Mills K, Berry DL, Baehrecke EH, et al. Autophagy, not apoptosis, is essential for midgut cell death in *Drosophila*. *Curr Biol* 2009; 19:1741-6.

Elbert A, Hass M, Springer B, Thielert W, Nauen R. Applied aspects of neonicotinoid uses in crop protection. *Pest Manag Sci* 2008; 64: 1099-105.

Fernandes KM, Neves CA, Serrão JE, Martins GF. *Aedes aegypti* midgut remodeling during metamorphosis. *Parasitol Int* 2014;63(3):506-512.

Glattli E, Rudin W, Hecker H. Immunoelectron microscopic demonstration of pancreatic polypeptide in midgut epithelium of hematophagous dipterans. *J Histochem Cytochem* 1987; 35:891-96.

Gupta L, Kumar S, Han YS, Pimenta PFP, Barillas-Mury C. Midgut epithelial responses of different mosquito-*Plasmodium* combinations: The actin cone zipper repair mechanism in *Aedes aegypti*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102:4010-5.

Hecker H, Freyvogel TA, Briegel H, Steiger R. Ultrastructural differentiation of the midgut epithelium in female *Aedes aegypti* (L.) (Insecta, Diptera) imagines. *Acta Trop* 1971; 28:80-104.

Hecker H. Structure and function of midgut epithelial cells in Culicidae mosquitoes (Insect, Diptera). *Cell Tissue Res* 1977; 1:321-41.

Illa-Bochaca I, Montuenga LM. The regenerative nidi of the locust midgut as a model to study epithelial cell differentiation from stem cells. *J Exp Biol* 2006; 209:2215-23.

Jeschke P, Nauen R. Neonicotinoids - from zero to hero in insecticide chemistry. *Pest Manag Sci* 2008; 64:1084-1098.

Jiang C, Baehrecke EH, Thummel CS. Steroid regulated programmed cell death during *Drosophila* metamorphosis. *Development* 1997; 124:4673-83.

Lima EP, Paiva MHS, de Araújo AP, da Silva EVG, da Silva UM, de Oliveira LN. et al.. Insecticide resistance in *Aedes aegypti* populations from Ceará, Brazil. *Parasit Vectors* 2011;4,5.

Lockshin RA, Zakeri Z. Apoptosis, autophagy, and more. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36:2405-19.

Martins AJ, Lins RMMD, Linss JGB, Peixoto AA, Valle D. Voltage-gated sodium channel polymorphism and metabolic resistance in pyrethroid-resistant *Aedes aegypti* from Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 2009; 81:108-15.

Martins GF, Neves CA, Campos LA, Serrão JE. The regenerative cells during the metamorphosis in the midgut of bees. *Micron* 2006; 37:161-8.

Micchelli CA, Perrimon N. Evidence that stem cells reside in the adult *Drosophila* midgut epithelium. *Nature* 2006; 439:475-9.

Moffett SB, Moffett DF. Comparison of immunoreactivity to serotonin, FMRFamide and SCPb in the gut and visceral nervous system of larvae, pupae and adults of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. *J Insect Sci* 2005; 5:20.

Molina-Cruz A, Gupta L, Richardson J, Bennet K, Black W, Barrilas-Mury C. Effect of mosquito midgut trypsin activity on dengue-2 virus infection and dissemination in *Aedes aegypti*. *Am J Trop Med Hyg* 2005; 72:631-7.

Nardi JB, Bee CM, Miller LA. Stem cells of the beetle midgut epithelium. *J of Insect Physiol* 2010; 56:296-303.

Nishiura JT, Ho P, Ray K. Methoprene interferes with mosquito midgut remodeling during metamorphosis. *J Med Entomol* 2003; 40:498-507.

Nishiura JT, Smouse D. Nuclear and cytoplasmic changes in the *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) alimentary canal during metamorphosis and their relationship to programmed cell death. *Ann Entomol Soc Am* 2000; 93:282-90.

- O'Brien LE, Soliman SS, Li X, Bilder D. Altered modes of stem cell division drive adaptive intestinal growth. *Cell* 2011; 147:603-14.
- Ohlstein B, Spradling A. The adult *Drosophila* posterior midgut is maintained by pluripotent stem cells. *Nature* 2006; 439:470-4.
- Oliveira CD, Tadei WP, Abdalla FC. Occurrence of apocrine secretion in the larval gut epithelial cells of *Aedes aegypti* L., *Anopheles albitarsis* Lynch-Arribálzaga and *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae): a defense strategy against infection by *Bacillus sphaericus* Neide? *Neotrop Entomol* 2009; 38:624-31.
- Parthasarathy R, Palli RR. Proliferation and differentiation of intestinal stem cells during metamorphosis of the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Dev Dynam* 2008; 237:893-908.
- Paul A, Harrington LC, Scott JG. Evaluation of Novel Insecticides for Control of Dengue Vector *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* 2006; 43(1):55-60.
- Pennington JE, Wells MA. The midgut adult: structure and function. In: Marquart WC, editor. *Biology of Disease Vectors*. Amsterdam: Elsevier; 2004, p. 289-95.
- Preuss U, Landsberg G, Scheidtmann KH. Novel mitosis-specific phosphorylation of histone H3 at Thr11 mediated by Dlk/ZIP kinase. *Nucleic Acid Res* 2003; 31:878-85.
- Pridgeon JW, Pereira RM, Becnel JJ, Allan SA, Clark GG, Linthicum KJ. Susceptibility of *Aedes aegypti*, *Culex quinquefasciatus* Say, and *Anopheles quadrimaculatus* Say to 19 pesticides with different modes of action. *J. Med. Entomol.* 2008; 45(1), 82-7.
- Ray K, Mercedes M, Chan D, Choi CY, Nishiura JT. Growth and differentiation of the larval mosquito midgut. *J Insect Sci* 2007; 9:1-13.
- Reynolds, E.S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol* 1963; 17:208.
- Rodríguez MM, Bisset JA, Fernández D. Levels of insecticide resistance and resistance mechanisms in *Aedes aegypti* from some Latin American countries. *J Amer Mosq Contr Assoc* 2007; 23:420-29.

- Rost MM. Ultrastructural changes in the midgut epithelium in *Podura aquatica* L. (Insecta, Collembola, Arthropleona) during regeneration. *Arthropod Struct Dev* 2006; 35:69-76.
- Song MY, Stark JD, Brown JJ. Comparative toxicity of four insecticides, including imidacloprid and tebufenozide, to four aquatic arthropods. *Environ Toxicol Chem* 1997; 16(12):2494-500.
- Stefanini MC, Zamboni L. Fixation of ejaculated spermatozoa for electron microscopy. *Nature* 1967; 216:173-4.
- Tettamanti G, Grimaldi A, Casartelli M, Ambrosetti E, Ponti B, Congiu T, Ferrarese R, Rivas-Pena ML, Pennacchio F, Eguileor M. Programmed cell death and stem cell differentiation are responsible for midgut replacement in *Heliothis virescens* during prepupal instar. *Cell Tissue Res* 2007; 330:345-59.
- Tomé HVV, Pascini TV, Dângelo RAC, Guedes RNC, Martins GF. Survival and swimming behavior of insecticide-exposed juveniles of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. *Parasites & Vectors* 2014 (submetido).
- Veenstra JA. Peptidergic paracrine and endocrine cells in the midgut of the fruit fly maggot. *Cell Tissue Res* 2009 ;336:309-23.
- White K, Hurteau T, Punsal P. Neuropeptide-FMRamide-like immunoreactivity in *Drosophila*: development and distribution. *J Comp Neurol* 1986; 247: 430-8.
- Wu Y, Parthasarathy R, Bai H, Palli SR. Mechanisms of midgut remodeling: juvenile hormone analog methoprene blocks midgut metamorphosis by modulating ecdysone action. *Mech Dev* 2006; 123:530-47.
- Žitňan D, Šauman I, Sehnal F. Peptidergic innervation and endocrine cells of insect midgut. *Arch Ins Biochem Physiol* 1993; 22:113-32.

6. Figuras

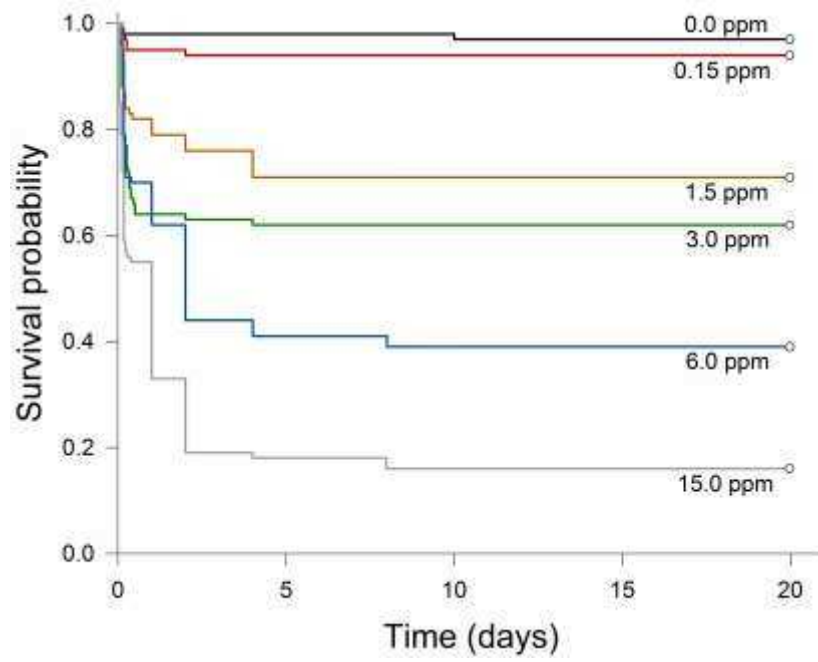


Fig.1. Sobrevivência de *A. aegypti* submetidos ao tratamento com diferentes concentrações de imidacloprid.

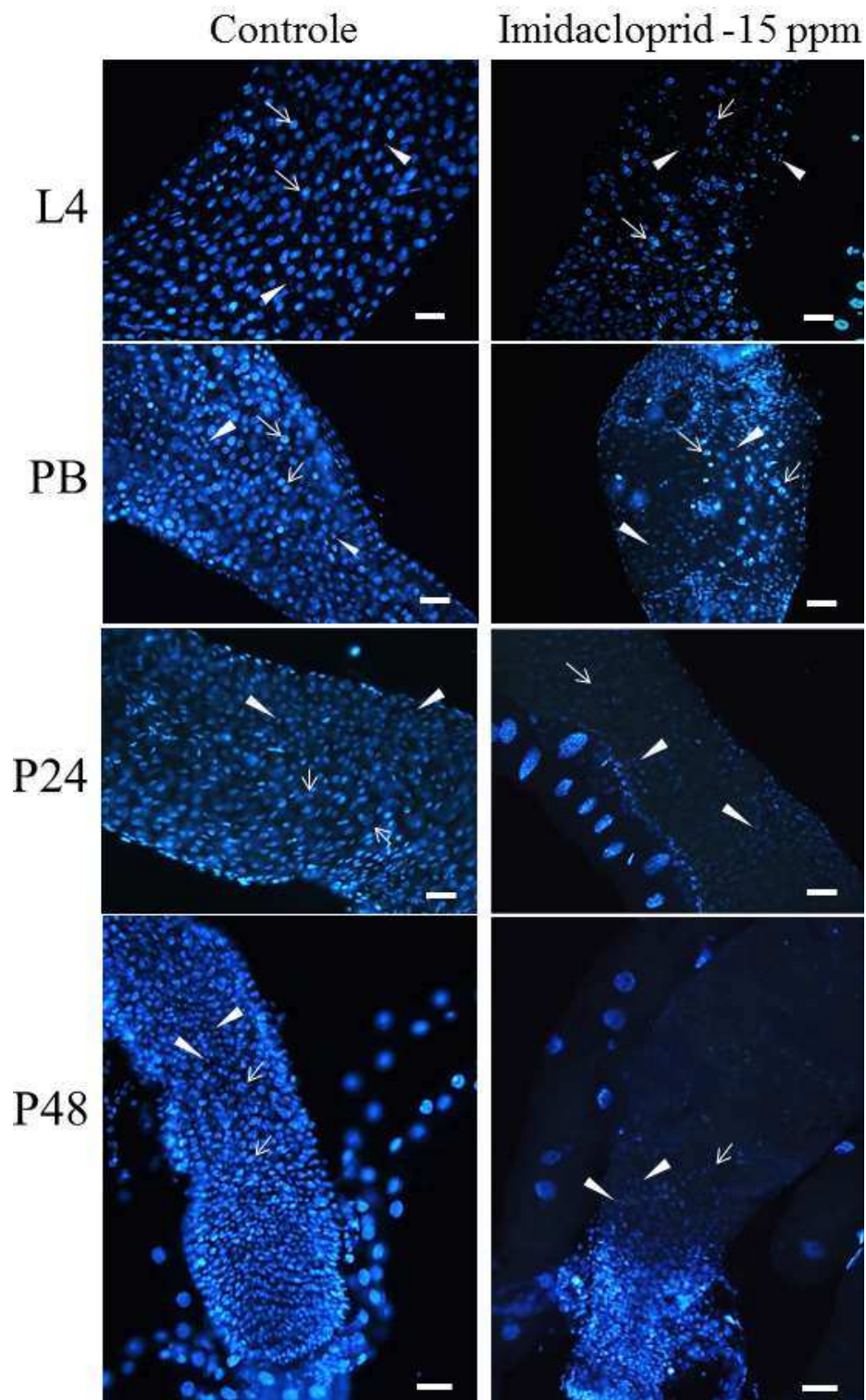


Fig.2. Montagens totais do intestino médio de *A. aegypti* nas fases de L4, PB, P24 e P48 tratados (painel da direita) e não tratados (painel da esquerda) com imidacloprid 15 ppm. O órgão foi corado com DAPI (azul) para evidênciação dos núcleos das células. Seta - célula digestiva ou em diferenciação; ponta de seta - célula regenerativa. Barras: 60 μ m.

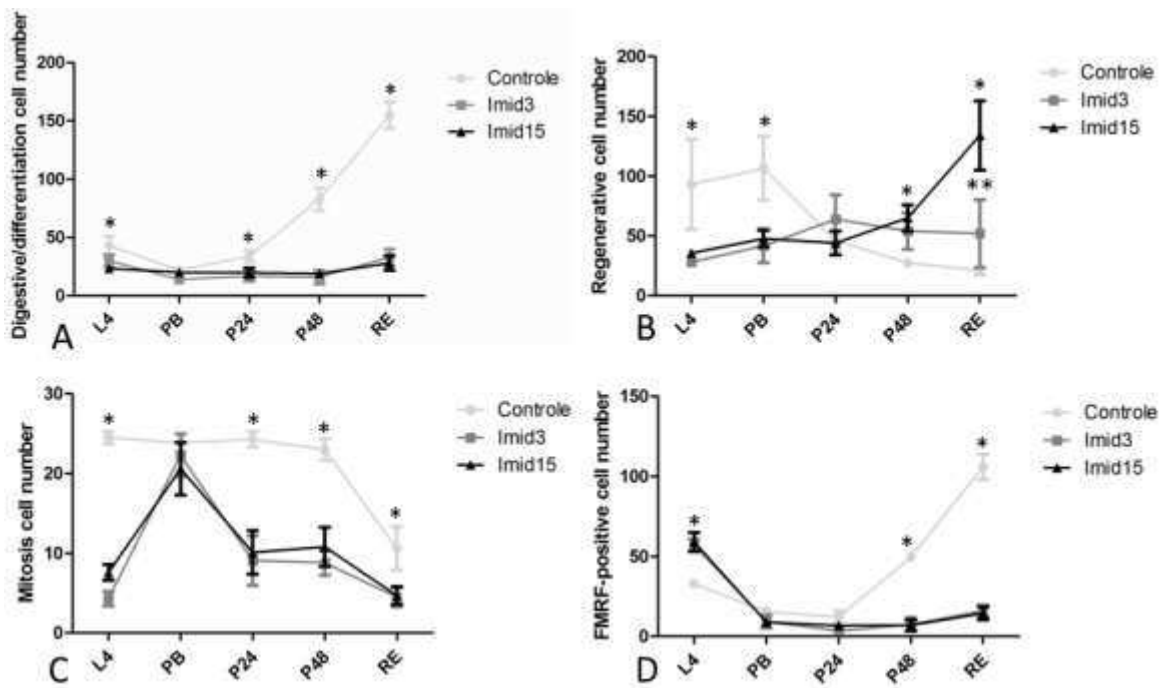


Fig.3. Número das células digestivas/diferenciação, regenerativas, mitóticas (fosfoH3-*imunorreativas*) e enteroendócrinas (FMRF-*imunorreativas*) no intestino médio de *A. aegypti* em diferentes fases do desenvolvimento (L4, PB, P24, P48 e RE), de indivíduos tratados e não tratados com imidacloprid em diferentes concentrações (imid3 e imid15). Barras verticais representam o desvio padrão. Médias com símbolos (*) diferem significativamente a 5% de significância pelo teste de Tukey.

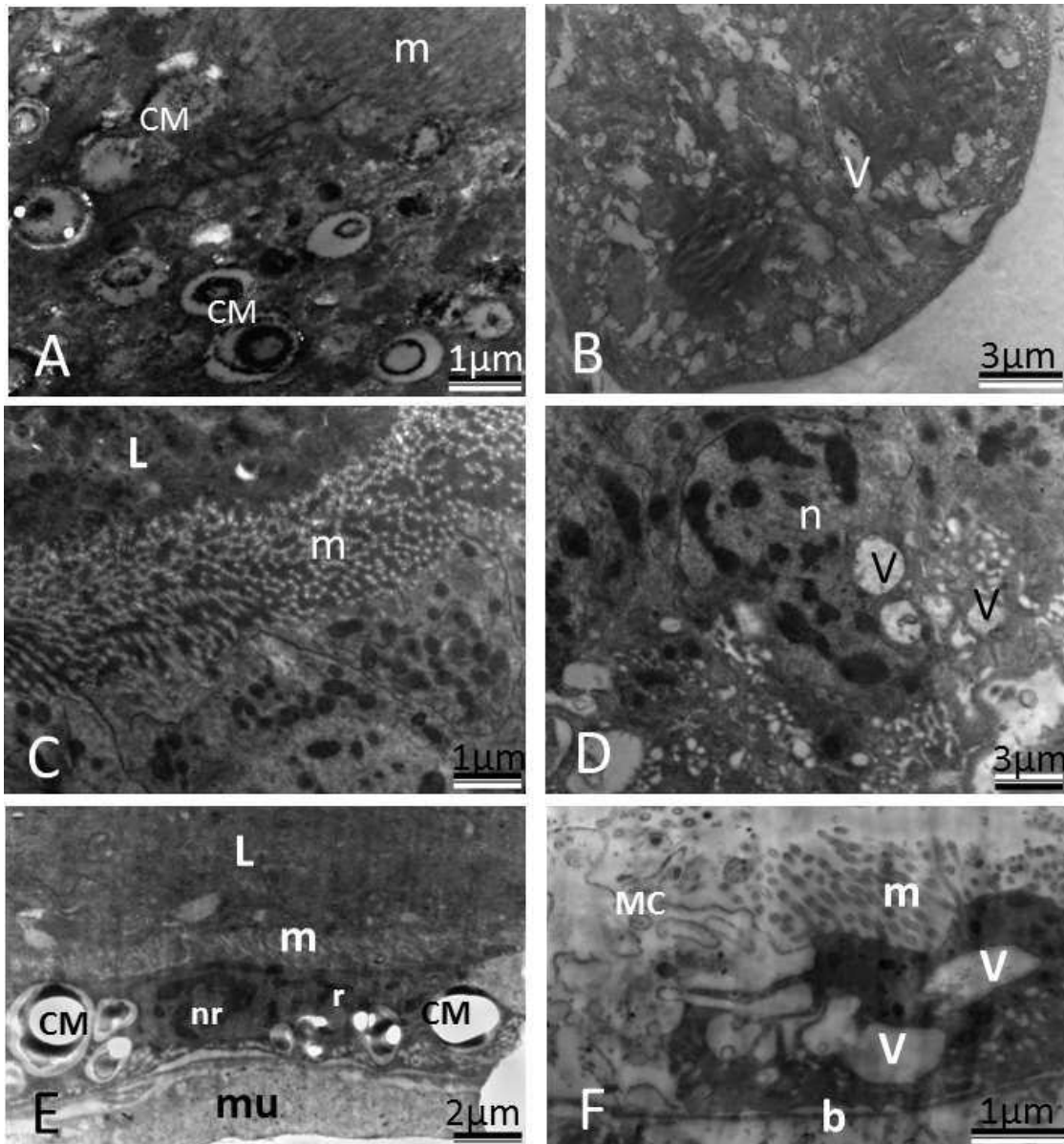


Fig.4. Micrografias eletrônicas do intestino médio de *A. aegypti* nas fases de L4, PB e P24, tratados com imidacloprid. **A e B.** Região apical das células digestivas de L4, destacando numerosos corpos multilamelares (CM) e microvilosidades (m) e região basal rica em estruturas semelhantes a vacúolos eletrolucentes (V). **C e D.** Região apical e basal das células digestivas de PB, com microvilosidades alteradas (m) e grandes vacúolos eletrolucentes (V) ocupando o citoplasma. **E e F.** Nas P24, observa-se uma fina camada de células regenerativas em diferenciação (r) com o citoplasma tomado por imensos corpos multilamelares (CM); membrana citoplasmática rompida (MC) e vacúolos eletrolucentes (V) em F. b- lâmina basal; L- lúmen; n- núcleo das células digestivas; nr – núcleo das células regenerativas; mu - músculo.

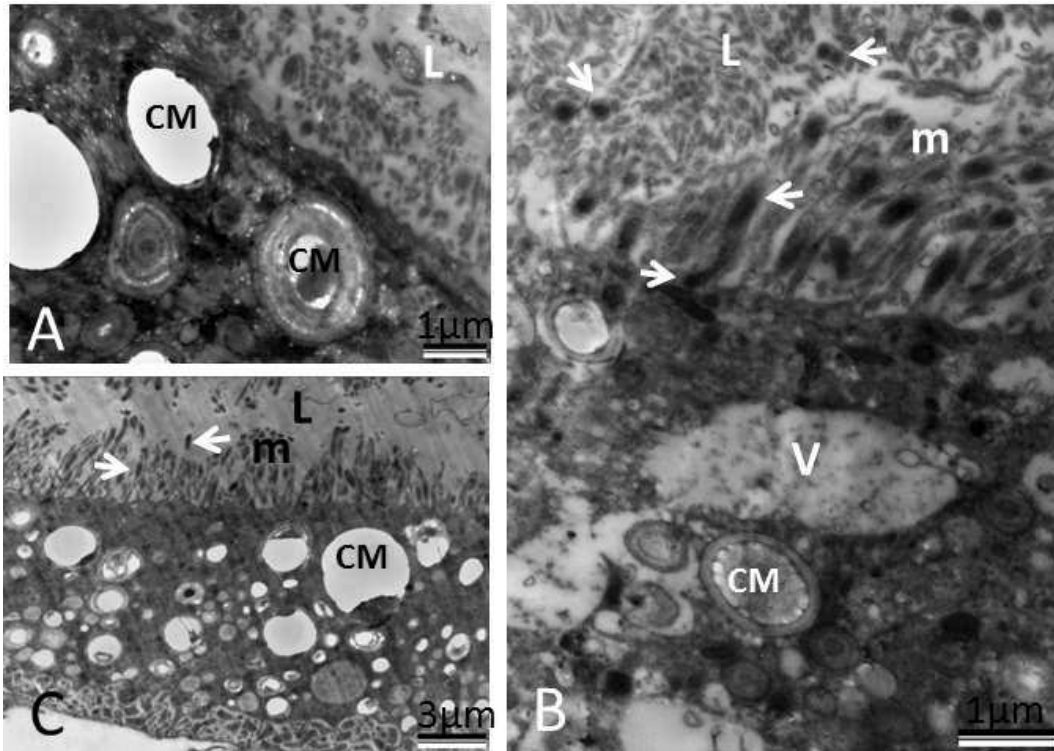


Fig.5. Micrografias eletrônicas do intestino médio de *A. aegypti* nas fases de P48 e RE, tratados com imidacloprid. **A e B.** Nas P48, as células digestivas/em diferenciação são eletrolucentes e com citoplasma tomado por vesículas (V) e corpos multilamelares (CM). Na região apical observam-se mitocôndrias (setas) nas microvilosidades e no lúmen (L). **C.** Os adultos RE possuem o mesmo aspecto das P48, com citoplasma tomado por vesículas eletrolucentes (V), corpos multilamelares (CM) e mitocôndrias (setas) no lúmen (L).

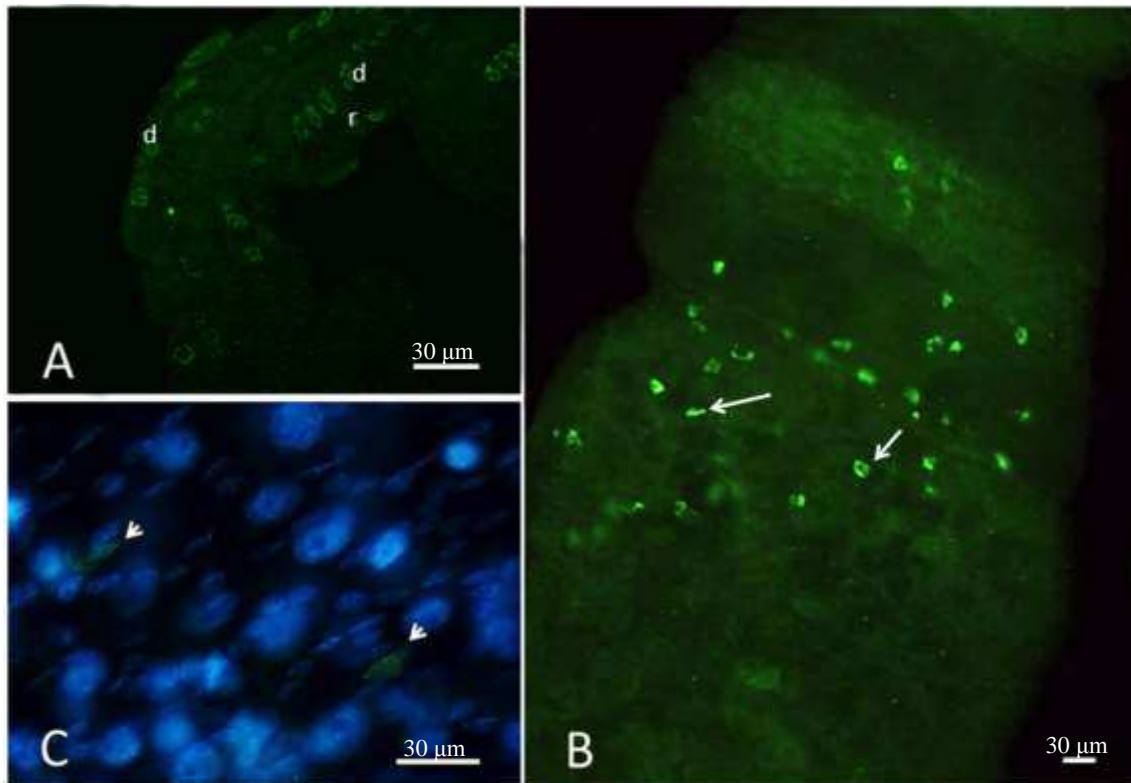


Fig.6. Células positivas para a reação de TUNEL, fosfoH3- e FMRF-imunorreativas do intestino médio de *A. aegypti* expostos a imidacloprid. **A.** Núcleos de células digestivas (d) e regenerativas (r) de P48, positivas para a reação de TUNEL marcados de verde fluorescente. **B.** Núcleos de células fosfoH3-imunorreativas (setas) na região média posterior das PB. **C.** Células FMRF-imunorreativas (pontas de setas) na região média anterior de L4, núcleos corados com DAPI (azul).

Artigo 3

Análise proteômica do intestino médio do mosquito *Aedes aegypti* durante o desenvolvimento pós-embrionário e de fêmeas submetidas à diferentes dietas

Kenner Morais Fernandes¹; Marcos Jorge Júnior²; Maria Cristina Baracat² e Gustavo Ferreira Martins¹

1- Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, MG, 36570-900

2- Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa, MG, 36570-900

Resumo

No presente trabalho analisamos a expressão proteica do intestino médio de *Aedes aegypti* durante as fases de larva (quarto instar, L4), pupa e adulta, sendo que na fase adulta, foram estudadas fêmeas recém-emergidas (RE), alimentadas com açúcar (AA) e sangue (AS). Para separação e identificação das proteínas utilizamos a eletroforese bidimensional, seguida da espectrometria de massa. Detectamos 13 spots nas L4, 95 em pupas, 90 nos RE e 76 nos AA ou AS. Quarenta e seis proteínas foram identificadas, entre elas, 33 foram diferencialmente expressas. No intestino médio das L4 há uma maior expressão de serpinas, enquanto que nas pupas, a maioria das proteínas identificadas era menos expressa em relação aos RE, AA e AS. A maior parte das proteínas ligadas à produção de energia, metabolismo de proteínas, sinalização e transporte foram mais expressas nos RE, enquanto que as proteínas relacionadas ao processo de tradução tiveram maior expressão nos mosquitos alimentados (AA e AS). Pela quantidade de proteínas mais expressas no intestino médio dos RE, sugerimos que ele está metabolicamente mais ativo, em comparação com o das L4, pupas e os dos mosquitos alimentados (AA e AS). No presente trabalho foram identificadas diversas proteínas diferencialmente expressas do intestino médio durante o desenvolvimento e alimentação de *A. aegypti*, sendo um importante passo para a compreensão dos processos bioquímicos da digestão em mosquitos.

1. Introdução

O mosquito *Aedes aegypti* é uma espécie altamente antropofílica e cosmopolita, sendo um dos principais vetores dos vírus da febre amarela e dengue, causadores de grande morbidade e mortalidade humana. Atualmente existem aproximadamente 2,5 bilhões de pessoas estão em área de risco e são registrados cerca de 500.000 casos de dengue anualmente (Guzman and Kouri, 2002; Alphey et al., 2013).

Por ser uma espécie anautógena, as fêmeas de *A. aegypti* necessitam de realizar a alimentação sanguínea para que ocorra o desenvolvimento ovariano, seguido da postura de ovos. Após as fêmeas realizarem a alimentação sanguínea, o sangue ingerido fica armazenado no intestino médio, onde ocorrem a digestão e a absorção de nutrientes. O intestino médio ainda serve como porta de entrada de patógenos (incluindo o vírus Dengue) que podem ser ingeridos juntos com o sangue, o que torna o órgão alvo de estudos para se traçar estratégias de bloqueios da transmissão de patógenos (Woodring et al., 1996; Black et al., 2002). Embora o genoma do mosquito *A. aegypti* tenha sido sequenciado (Nene et al., 2007), o que possibilitou estudos aprofundados da função gênica, através de técnicas como transcriptoma ou microarranjos de RNA (Sessions et al., 2009; Baron et al., 2010), devemos levar em conta que os níveis de expressão do mRNA nem sempre são equivalentes aos níveis de expressão proteica. Por isso, a proteômica é uma ferramenta essencial para demonstrar as modificações na expressão gênica ao nível pós transcricional. -

Vários estudos com expressão gênica de intestino médio de mosquito utilizaram uma abordagem proteômica (Bayyareddy et al., 2009; Popova-Butler et al., 2009; Wasinpiyamongkol et al., 2010; Tchankouo-Nguetcheu et al., 2010; Cancino-Rodezno et al., 2012; Muñoz et al., 2013). Por exemplo, análises do intestino médio de larvas 4º instar (L4) de *A. aegypti* intoxicados com Cry11Aa, sugerem sua ligação com proteínas mitocondriais, assim como o papel essencial da actina e da ATPsintase na defesa do organismo contra o estresse oxidativo causado pela toxina (Bayyareddy et al., 2009; Cancino-Rodezno et al., 2012).

Durante o ciclo de vida do *A. aegypti* que inclui a passagem do ambiente aquático para o terrestre, o intestino médio sofre várias modificações, incluindo modificações morfológicas e de expressão gênica. Essas modificações permitem ao inseto mudar sua dieta, quando o mesmo deixa de se alimentar de detritos em

decomposição e passa a se alimentar de seiva de vegetais e sangue (no caso da fêmea). A alimentação sanguínea causa grandes mudanças morfológicas e bioquímicas no intestino médio do adulto, ocorrendo deformação do epitélio e a alta síntese de proteínas da membrana peritrófica e de tripsina na região posterior do órgão (Billingsley, 1990). Essas peculiaridades da alimentação sanguínea também são o foco de estudos, levando em conta que é através do sangue contaminado que ocorre a transmissão dos vírus (Muñoz et al., 2013).

Entretanto, os intestinos médios de fêmeas de *A. aegypti* submetidos às dietas à base de açúcar e sangue (3 e 10 dias após a alimentação), surpreendentemente tiveram expressão proteica semelhante, sendo encontradas diferenças apenas quanto à expressão das defensinas, que foram mais expressas nos indivíduos alimentados com sangue (Wasinpiyamongkol et al., 2010). Apesar disso, deve-se considerar o momento da digestão em que foi estudada a expressão gênica, sendo que o intestino médio está em alta atividade de síntese 24h após a alimentação de sangue (Hecker et al., 1977; Perrone & Spielman, 1988). A expressão gênica no intestino médio também pode também ser modificada mediante a presença de patógenos. Em *A. aegypti* infectados com os vírus CHIK e DENV-2, a expressão de uma variedade de proteínas ligadas às vias reguladoras, metabólicas e estruturais do intestino médio foi modulada pelos patógenos (Tchankouo-Nguetcheu et al., 2010). Além disso, recentemente foram identificadas proteínas do intestino médio ligadas à infecção pelo vírus DENV-2, entre elas, a enolase, beta-ARK, e caderina, que podem atuar como receptores e o fator de alongação EF-1 alfa/Tu, importante para a replicação viral (Muñoz et al., 2013).

O intestino médio de *A. aegypti* é completamente remodelado durante a metamorfose, quando ocorrem a degeneração do epitélio larval e a formação de um novo epitélio a partir da fase de pupa (Nishiura et al., 2003; Ray et al., 2007; Fernandes et al., 2014). Esse processo de transformação do intestino médio é bastante complexo, o que nos motivou a busca de novas descobertas sobre as alterações nas fases do desenvolvimento. O presente trabalho teve como objetivo estudar o perfil proteico do intestino médio do vetor *A. aegypti* nas fases de larva, pupa e adulto (recém-emergidos e alimentados com açúcar e sangue). Além disso, examinamos as possíveis funções destas proteínas durante o ciclo de vida e a alimentação do mosquito, contribuindo para uma melhor compreensão da dinâmica do funcionamento intestino médio em diferentes condições alimentares.

2. Materiais e métodos

2.1. Mosquitos e extração de proteínas

Os exemplares de *A. aegypti* (linhagem PPCampos, Campos dos Goytacazes) foram obtidos de uma colônia mantida no insetário do Departamento de Biologia Geral da UFV, criados em bandejas de plástico contendo água deionizada e alimentadas com ração de tartaruga (Reptolife®-Alcon). Os insetos foram mantidos em condições controladas de temperatura ($25 \pm 5^\circ\text{C}$), umidade relativa ($75 \pm 5\%$) e fotoperíodo (12:12 L:D).

Foram utilizados de 200 mosquitos de cada fase: larvas de 4º instar (L4), fêmeas de pupas entre 24 a 48 horas após a ecdise, fêmeas adultas recém-emergidas (RE) e fêmeas adultas com 3-4 dias de idade, mantidas com solução de açúcar (sacarose 10%) (AA) e fêmeas submetidas à alimentação sanguínea (AS) em camundongo anestesiado com Dopalen (Ceva). No caso das AS, os intestinos foram dissecados 24h após o repasto, sendo que a matriz peritrófica foi descartada.

Após a dissecação, os intestinos médios foram transferidos para 50 μL de PBS a 4°C contendo 1 mM de tiourea, 1 mM de benzamida e 1 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF), sonificados 3 vezes por 1 min. e centrifugados a $14000 \times g$, por 10 minutos a 4°C . No sobrenadante, foram adicionados 150 μL de acetona gelada aos intestinos, sendo mantidos a -20°C durante 3 h. Após esse período, o material foi centrifugado a $14000 \times g$, por 10 minutos a 4°C . O precipitado resultante foi ressuspenso em 50 μL de solução de solubilização, composta de 7 M ureia, 2% CHAPS (p/v) and 2 M tiourea e quantificados usando o método de Bradford.

2.2. Eletroforese bidimensional (2-DE) e análise das imagens

A eletroforese 2-DE foi realizada no Laboratório de Proteômica e Bioquímica de Proteínas da Universidade Federal de Viçosa, onde foram utilizadas três repetições biológicas de cada fase dos indivíduos, e um gel 2-DE foi desenvolvido para cada réplica biológica. Cada fita, Immobiline DryStrip pH 3-10, 7 cm (GE Healthcare), foi hidratada, por 20 h (durante à noite) com 125 μL de uma solução contendo 85 μg de proteínas adicionados de Destreak (GE Healthcare), ditioneitol (DTT) 40 mM e 2% (v/v) de IPG Buffer pH 3-10 (GE Healthcare). A focalização foi realizada com o aparelho Ettan IPGphor3™ (GE Healthcare), de acordo com as instruções do fabricante.

Após a focalização isoelétrica (IEF), as fitas foram reduzidas por 15 min em 5 mL de tampão contendo Tris-HCl 75 mM pH 8,8 contendo DTT 1%, ureia 6 M, glicerol 30% (v/v), SDS 2% (p/v) e azul de bromofenol 0,002% (p/v), em seguida as fitas alquiladas nos mesmo tampão, substituindo o DTT por iodocetamida 2,5%. A segunda dimensão foi realizada em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE) a 12,5%T. As proteínas foram visualizadas utilizando coloração de coomassie brilliant blue (CBB) G- 250 (Neuhoff et al., 1985). Os géis 2-DE foram digitalizadas a 300 dpi utilizando Scanner Imagem III (GE Healthcare), e analisados por Image Master III (GE Healthcare). O teste de análises de variância (ANOVA) foi feito com o mesmo programa (Image Master III).

2.3. Espectrometria de massa

As identificações dos spots foram realizadas no Centro de Espectrometria de Massa da Universidade de Aveiro (Portugal), onde os spots de interesse foram lavados três vezes com 25 mM de bicarbonato de amônio/50 % acetonitrila (ACN), uma vez com ACN e seco em SpeedVac (Thermo Savant). Foram adicionados aos spots secos 25 µL de solução de clivagem contendo 10 µg/µL de tripsina porcina (Promega) em bicarbonato de amônio 40 mM mais 10% de ACN e incubadas por 16 h a 37 °C.

A extração dos peptídeos tripsinizados foi realizada por adição de 5 % de ácido fórmico (AF)/50% de ACN três vezes e liofilizados. Os peptídeos foram então ressuspendidos em 10 µL de ácido fórmico 0,1% /50% de ACN. As amostras foram misturadas (1:1) com matriz ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico preparado em ACN 50%/AF 0,1 %. Os espectros de massa dos peptídeos foram obtidos num espectrômetro de massa MALDI-TOF/TOF (4800 Proteomics Analyzer, Ab Sciex, Europa) no modo positivos no intervalo de massa entre 800 e 4500 Da. Os espectros de massa foram calibrados internamente com picos de autodigestão de tripsina e da matriz ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico.

2.4. Base de dados

Os espectros foram processados e analisados pela Global Protein Server Workstation (Applied Biosystems), que utiliza o software interno MASCOT (Matrix Ciência, Londres, Reino Unido). A tolerância de massas foram de 25 ppm e tolerância massa do fragmento de íon foi de 0,3 Da. Identificações positivas foram aceitas com até 95% de nível de confiança.

As proteínas identificadas foram divididas em seis grupos: proteínas relacionadas à maquinaria de tradução, proteínas relacionadas desintoxicação celular, proteínas relacionadas à produção de energia, proteínas relacionadas com o metabolismo de proteínas e aminoácidos, proteínas relacionadas com sinalização e transporte, proteínas relacionadas ao citoesqueleto e proteínas com função desconhecidas.

3. Resultados

3.1. Separação e identificação de proteínas do intestino médio em gel 2-DE.

Em géis de 7 cm com 85 µg de proteínas aplicadas, detectamos 76 spots nos AA ou AS, 90 nos RE, 95 em pupas e 13 nas L4. Aproximadamente 17% de todos os spots, 46 no total, foram identificados por MS e MS-MS. O banco de dados NCBI foi utilizado através do Mascot para cada spot (Tab.1 e 2).

No perfil proteico das L4, não encontramos muitos spots, o que nos impossibilitou de fazer uma análise comparativa com os demais géis, restringindo as análises aos indivíduos adultos (AS, AA, RE) e às pupas. Nas pupas e nos RE os perfis são bem parecidos entre si, o que também acontece entre os adultos alimentados (AS e AA). As análises dos géis mostraram que os mosquitos alimentados com açúcar e sangue expressam menos proteínas em relação aos RE e as pupas, mas algumas delas em grandes quantidades, com ponto isoelétrico variando de 3 a 6, enquanto que os RE e pupas produzem um número maior de proteínas. (Fig.1, 2 e 3).

Algumas proteínas foram identificadas em mais de um spot, fato explicado pela fragmentação de suas partículas durante a purificação e separação e pelas modificações pós-traducionais como a fosforilação e a glicosilação, que podem alterar o ponto isoelétrico e a massa das proteínas (Popova-Butler et al., 2009).

3.2. Análise da expressão diferencial de proteínas no intestino médio em diferentes fases do desenvolvimento e com diferentes dietas.

Para analisarmos e compararmos a expressão proteica entre os indivíduos, fizemos três géis de cada fase com a mesma quantidade de proteínas (85 µg). As análises dos géis permitiram a quantificação e a comparação entre os indivíduos de cada

proteína identificada através da intensidade dos spots, demonstradas em imagens 3D (Fig.4-10).

3.3. Proteínas relacionadas à maquinaria de tradução.

Identificamos quatro proteínas envolvidas na tradução: HspA5 (AS16), lepA_II (EF4) (AS33) e EF1 (AS55). O nível de expressão de HspA5 e dos fatores de alongamento EF4 e EF1 se diferenciaram entre os indivíduos, sendo mais abundantes nos AS ($P < 0,05$) (Fig.4).

3.4. Proteínas relacionadas à desintoxicação celular.

As nossas análises mostraram diferenças significativas entre os indivíduos com relação às proteínas envolvidas na desintoxicação celular (Fig.5). Foram identificadas cinco proteínas: catalase, aldo ceto redutase (AKRs), piridina nucleotídeo-dissulfeto oxidorredutase e uma glutationa-S-transferase (GST). A catalase, a AKR e a GST são mais expressas nos RE, sendo que, a catalase, é inexpressiva nos demais estágios ($P < 0,05$). A piridina nucleotídeo-dissulfeto oxidorredutase foi menos expressa nas pupas ($P < 0,05$).

3.5. Proteínas relacionadas com a produção de energia.

Foram identificadas 13 proteínas relacionadas com a produção de energia, sendo quatro delas correspondentes à F1 ATP sintase (RE37, A59, AA46 e AS54) duas glicerol-3-fosfato desidrogenase (A1 e A47), duas citrato sintase (RE39 e RE44), duas enolase (RE60 e AS30) e creatina quinase (RE64) (Fig. 6). As duas glicerol-3-fosfato desidrogenases, a creatina quinase, a enolase do spot RE60 e uma citrato sintase (A39) foram mais expressas no RE, enquanto que a outra citrato sintase (RE44) não se diferenciou entre os adultos, mas foi menos expressa nas pupas ($P < 0,05$). Já a enolase do spot AS30 foi mais expressa nos adultos alimentados ($P < 0,05$).

A expressão da ATP sintase variou entre os spots correspondentes a essa proteína nos diferentes indivíduos, sendo ela mais expressa nos RE (RE37 e RE59) e nos alimentados AA e AS (AS54), e menos expressa na pupa (AA46) ($P < 0,05$).

3.6. Proteínas relacionadas ao metabolismo de aminoácidos e proteínas.

Foram identificadas nove proteínas envolvidas no metabolismo de aminoácidos e proteínas: glutamato desidrogenase (RE35), proteína dissulfeto isomerase (PDI)

(RE58), aspartato aminotransferase (AS58), duas inibidoras da serino protease (serpin) (L81 e L82), três tripsinas serino proteases (AS40, P6) e uma calreticulina (RE34) (Fig. 7). A glutamato desidrogenase, aspartato aminotransferase e a calreticulina (RE34) foram mais expressas nos RE ($P < 0,05$), enquanto que a PDI foi menos expressa nas pupas ($P < 0,05$). Já as serino proteases tiveram diferenças entre os spots identificados, sendo que a proteína do spot AS40 foi mais expressa nos RE e AS, enquanto que a do spot P6 foi mais expressa nas pupas ($P < 0,05$). Embora os géis de L4 não tenham sido incluídos na análise comparativa, notamos dois spots diferenciados em relação às outras fases, os quais foram identificamos como sendo duas serpinas, que aparentemente estão mais expressas nas L4 (Fig. 2).

3.7. Proteínas relacionadas com sinalização e transporte.

Foram identificadas três proteínas envolvidas na sinalização celular, proteína 14-3-3 (RE72), proteína 14-3-3 epsilon (YWHAE) (RE71) e a WD40-repeat (RE38). Já com relação ao transporte, encontramos a RabGEF (RE48), duas proteínas que formam canais iônicos dependentes de voltagem (VDAC) (RE41 e AS62) e uma V-ATPase (AS18) (Fig. 8). Os RE possuem maior expressão de ambas as proteínas de sinalização e a proteína de transporte RabGEF ($P < 0,05$). Entretanto, as VDAC se diferenciaram entre os spots identificados, onde no spot AS62 foi mais expressa nos AS e AA, enquanto que o spot RE41 e a V-ATPase tiveram menor expressão nas pupas ($P < 0,05$).

3.8. Proteínas relacionadas com o citoesqueleto.

Foram identificados três spots correspondentes à actina (RE65/AS28, A75 e P12) e tubulina (25AS) (Fig.9). As proteínas actina e tubulina são menos expressas nas pupas ($P < 0,05$).

3.9. Proteínas de função desconhecida.

Foram identificadas duas proteínas que possuem domínio comum de diferentes famílias sendo denominadas hexoquinase/HSP70/superfamília actina (RE69 e RE70) (Fig.10). Já as hexoquinase/HSP70/superfamília actina, correspondentes aos spots RE69 e RE70 foram mais expressos nos RE ($P < 0,05$).

4. Discussão

O intestino médio das pupas e dos RE de *A. aegypti* possuem um perfil proteico semelhante, com o número maior de spots em relação aos outros indivíduos, enquanto que nos adultos alimentados (AA e AS) observamos uma quantidade maior de spots altamente expressos. Isso sugere que as fases de pupa e RE necessitam de uma variedade maior de proteínas, que irão atuar na formação e diferenciação das células digestivas, enquanto que os intestinos médios dos AA e AS já estão totalmente formados, sendo necessária apenas a alta expressão de proteínas específicas para a digestão do alimento.

A HspA5 é uma isoforma da chaperona Hsp70, que auxiliam no dobramento e montagem de proteínas, além de direcionar proteínas mal-formadas para degradação (Wisniewska et al., 2010). A maior expressão da HspA5 no intestino médio em AA e AS reflete a necessidade de maior produção de proteínas específicas para digestão, levando em conta que essa é a principal forma da Hsp70 no retículo endoplasmático, essencial para a montagem de proteínas (Hendershot et al., 1994; Brewer & Hendershot 2005).

O fator de alongamento EF4 não havia sido relatado em intestino médio de *A. aegypti* (Bayyareddy et al., 2009; Popova-Butler et al., 2009; Wasinpiyamongkol et al., 2010; Tchankouo-Nguetcheu et al., 2010; Cancino-Rodezno et al., 2012; Muñoz et al., 2013), e pouco se sabe sobre sua função, mas por ser homóloga à EF1, sabe-se que ele é essencial para a síntese proteica e para a viabilidade das células (Fan et al., 2010; Pecha et al., 2011). Além disso, foi visto que a expressão da EF1 é aumentada em *A. aegypti* infectados com vírus DENV- 2, provavelmente auxiliando na replicação viral (Muñoz et al., 2013). No presente trabalho a alta expressão dos fatores de alongamento nos AS, foi compatível com os resultados para HspA5, mostrando que os AS necessitam de maior síntese proteica, talvez por ser um alimento mais complexo que açúcar (Billingsley, 1990).

Entre as enzimas antioxidantes, a catalase, a AKR e a GST foram muito mais expressas nos RE. A catalase e a GST participam no sistema de defesa contra agentes oxidantes nos insetos, agindo nas espécies reativas de oxigênio (ROS) (Corona & Robinson 2006; Jaramillo-Gutierrez et al., 2009). Entretanto, essas duas últimas podem ter funções distintas diante da infecção por patógenos, como visto em *A. aegypti* infectados com vírus DENV- 2 e CHIKV, onde a catalase foi mais expressa no

infectado com DENV- 2, enquanto a GST foi mais expressa no CHIKV (Tchankouo-Nguetcheu et al., 2010). Outra proteína antioxidante ligada à proteção celular é a AKR, que tem como propósito principal diminuir os aldeídos e cetonas para álcoois primários e secundários, tendo sua expressão aumentada em indivíduos infectados com CHIKV, assim como a GST (Altschul et al., 1997; Tchankouo-Nguetcheu et al., 2010). A alta expressão das proteínas de proteção contra radicais livres e patógenos pode ter relação com a mudança do meio aquático para o terrestre após emergirem, quando deixar de viver na água, torna o indivíduo propício a toxinas ou infecções.

A família da proteína piridina nucleotídeo-dissulfeto oxidorreductase inclui oxidases e peroxidases, sendo relacionada com a produção de ATP em *Aedes albopictus* (Saboia-Vahia et al., 2012). A sua baixa expressão nas pupas é explicada por ela está em fase de renovação do intestino, sem a ocorrência de digestão e sem a necessidade de alta produção de ATP.

A ATP sintase foi descrita em intestino médio de *A. aegypti* como proteína ligada à produção de ATP (Michael et al., 2009; Popova-Butler et al., 2009), enquanto que as glicerol-3-fosfato desidrogenase, creatina quinase e a citrato sintase são enzimas envolvidas na glicólise (Altschul et al., 1997; Thompson, 2000; Kim & Dang, 2005). O fato dessas proteínas ligadas à produção de energia ser mais expressas nos RE, nos leva a inferir que o final do processo de formação do intestino médio requer uma necessidade maior de energia do que o processo digestivo.

Embora a enolase atue na glicólise, devemos levar em conta que ela é uma proteína multifuncional, atuando em outros processos, como na transcrição e regulação gênica (Kim & Dang, 2005). Além disso, foi sugerido recentemente seu papel como receptor para o vírus DENV-2, auxiliando-o na infecção do intestino médio (Muñoz et al., 2013). Por isso, acreditamos que embora tenha spots de enolase mais expressos nos RE e nos adultos alimentados com açúcar e sangue, ela possivelmente está atuando em vias diferentes.

Quando analisamos as proteínas relacionadas ao metabolismo de aminoácidos e proteínas, observamos a alta expressão da tripsina serino protease, no intestino médio de RE e pupas, mesmo não ocorrendo alimentação nessas fases. Entretanto, essas serino proteases podem ser sintetizadas como zimogênios, precursoras inativas que são posteriormente clivadas para gerar formas ativas (Altschul et al., 1997). Outro papel importante das serino proteases no intestino médio dos insetos é sua participação na

resposta imune inata, ativando a cascata de profenoloxidase na hemolinfa (Lehane et al., 1997; Hamilton et al., 2002; Tong et al., 2005).

Enquanto que o intestino médio de AA e AS e pupas sintetizam tripsina, a L4 expressa em grandes quantidades a serpina, uma inibidora de serino protease. Deve-se considerar que o processo de metamorfose do intestino médio tem início em L4, ocorrendo morte das células digestivas (Ray et al., 2009; Fernandes et al., 2014). Por isso sugerimos que as serpinas podem atuar na inibição de proteases de patógenos que estariam presentes no lúmen do intestino médio, durante a metamorfose. Além disso, devemos acrescentar que, além de regular as proteases, as serpinas estariam inibindo também a imunidade inata, atuando na regulação da via de sinalização da profenoloxidase, como visto em adulto de *Drosophila melanogaster* (Suwanchaichinda & Kanost, 2009), o que talvez seja necessário durante a histólise do intestino médio.

Outras três proteínas relacionadas ao metabolismo de proteínas foram mais expressas nos RE: glutamato desidrogenase e a aspartato aminotransferase, que atuam na organização estrutural dos aminoácidos (transaminação, descarboxilação, desaminação oxidativa) (Altschul et al., 1997; Saboia-Vahia et al., 2012) e a PDI, que atua na estabilização e junção de proteínas através da formação de ligações dissulfeto, ocorrentes no momento da dobra para sua formação tridimensional (Wilkinson & Gilbert, 2004). Por ser uma proteína multifuncional a PDI é altamente expressa diante da infecção do intestino médio pelo vírus CHIKV, provavelmente atuando na replicação, traduzindo e/ou participando da encapsidação viral, se tornando um importante alvo de estudo (Tchankouo-Nguetcheu et al., 2010). A alta expressão dessas proteínas na fase de RE pode ser explicado pelo intestino médio ainda estar em desenvolvimento (Fernandes et al., 2014), sendo necessário a formação de muitas proteínas para o término de sua formação.

Outra proteína diferencialmente expressa no intestino médio de RE foi a calreticulina, uma proteína do retículo endoplasmático que atua no dobramento de glicoproteínas e homeostase de Ca²⁺. A calreticulina também tem funções extracelulares, atuando em tumores, cicatrização e reconhecimento de células apoptóticas (Tarr et al., 2010). Essa proteína parece ter um papel importante nas glândulas salivares de *A. albopictus* durante a infecção pelo vírus DENV-2, onde foi altamente expressa (Zhang et al., 2013).

Assim como as enzimas ligadas à produção de energia e ao metabolismo de proteínas as proteínas que participam da sinalização e transporte também foram mais

expressas nos RE. As proteínas 14-3-3 e a proteína WD40-repeat são multifuncionais, participando de diversos processos e funções biológicas como o ciclo celular, apoptose, migração, diferenciação, transdução de sinal e regulação da transcrição, sendo alvo de estudos para diversas doenças humanas (Mhawech, 2005; Stirnimann et al., 2010). Entretanto, nos intestinos médios de *A. aegypti* infectados com o vírus CHIKV, as proteínas WD-repeat foram mais expressas e se associaram à partícula viral (Tchankouo-Nguetcheu et al., 2010), enquanto que as proteínas 14-3-3 tiveram a expressão reduzida no intestino médio de *A. albopictus* infectados com vírus DENV-2 (Zhang et al., 2013), indicando que possuem papéis diferentes nas infecções, dependendo do tipo de vírus.

Para que os processos de metabolismo proteico e sinalização celular ocorram, as células eucarióticas dependem da regulação correta do tráfico de vesículas intracelulares, que é responsável pelo armazenamento, digere e transportam material biológico, além de funcionar como compartimentos para reações químicas. As RabGEF são responsáveis pela regulação da Rab GTPase, tornando-as determinantes para o direcionamento das vesículas, o que seria mais necessário no RE, já que possui maior expressão de proteínas de metabolismo proteico e sinalização. (Altschul et al., 1997; Blümer et al., 2013).

As VDACs e as V-ATPases são proteínas responsáveis pelo transporte de íons através de membranas. As VDACs regulam o fluxo de metabolitos principalmente aniônicos, participam do processo de morte celular induzida por mitocôndrias, sendo consideradas responsáveis pela manutenção das funções mitocondriais (Lemasters et al., 2006). Essas proteínas são as mais abundantes na membrana externa das mitocôndrias, o que explica sua alta expressão nos AA e AS, já que nas pupas e nos RE o intestino médio está em fase de remodelação, contendo um número muito menor de mitocôndrias e organelas em geral (Altschul et al., 1997; Fernandes et al., 2014). Já as V-ATPase são bombas de prótons comuns em células eucarióticas, responsáveis pela acidificação de endossomos, lisossomos, vesículas secretoras e homeostase do pH (Wieczorek et al., 2009). No intestino médio *A. aegypti* ela foi relacionada à hidrólise de ATP (Michael et al., 2009; Popova-Butler et al., 2009) e com a alcalização do lúmen na região anterior (Onken et al., 2008).

A actina é uma das mais abundantes proteínas estruturais das células eucarióticas, que junto com a tubulina constituem o citoesqueleto, responsável pela dinâmica celular (forma da célula, crescimento celular, divisão, transporte intracelular e

diferenciação celular) (Khaitlina et al., 2001). Elas foram menos expressas nas pupas, o que é coerente, já que nessa fase o epitélio do intestino médio é formado de pequenas células em diferenciação, sendo que quanto menor as células, menos actina seria necessária para manter sua estrutura, incluindo as microvilosidades (Fernandes et al., 2014).

Com relação às duas proteínas hexoquinase/HSP70/superfamília actina, que tiveram maior expressão no RE, devemos considerar que elas podem ter diferentes funções, já que possuem um domínio comum para hexoquinase, actina e HSP70 (Altschul et al., 1997). Podemos sugerir que elas atuam como hexoquinases nos RE, atuando no metabolismo de carboidratos, participando ativamente do processo de produção de energia, o qual está mais ativo nos RE.

Após as análises comparativas, podemos sugerir que no intestino médio das pupas se inicia a síntese das múltiplas proteínas essenciais para a formação e constituição do novo epitélio do intestino médio, mas o pico da expressão dessas proteínas ocorre no final do desenvolvimento, correspondente à fase de RE.

Nos AA e AS, os perfis proteicos do intestino médio foram semelhantes, eles possuem menos spots que as pupas e os RE, mas muitos deles com alta expressão. As proteínas responsáveis pelo processo de tradução foram mais expressas nos alimentados, o que nos permite sugerir uma intensa biossíntese proteica voltada à produção de proteínas específicas para a digestão.

Nosso estudo identificou diversas proteínas diferencialmente expressas no intestino médio durante o desenvolvimento e alimentação, sendo um importante passo para a compreensão dos processos bioquímicos da digestão em mosquitos. Experimentos com manipulação dos níveis das proteínas diferencialmente expressas ainda serão necessários para definir o papel do repertório de proteínas no processo de desenvolvimento e alimentação dos mosquitos *A. aegypti*.

5. Referencias bibliográficas

- Alphey L, McKemey A, Nimmo D, Oviedo MN, Lacroix R, Matzen K, Beech C. Genetic control of *Aedes* mosquitoes. *Pathogens and Global Health* 2013;107:170-9.
- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs" *Nucleic Acids Res* 1997;25:3389-402.
- An Y, Nakajima T, Suzuki K. Immunohistochemical demonstration of mammalian- and FMRFamide-like peptides in the gut innervation and endocrine cells of the wild silkmoth, *Antheraea yamamai* (Lepidoptera: Saturniidae) during diapause and post-diapause of pharate first-instar larvae. *Eur J Entomol* 1998;95:185-96.
- Baldwin KM, Hakim RS, Stanton GB. Cell-cell communication correlates with pattern formation in molting *Manduca sexta* midgut epithelium. *Dev Dyn* 1993;197:239-43.
- Baldwin KM, Hakim RS. Growth and differentiation of the larval midgut epithelium during molt in the moth, *Manduca sexta*. *Tissue Cell* 1991;23:411-22.
- Baron OL, Ursic-Bedoya RJ, Lowenberger CA, Ocampo CB. Differential gene expression from midguts of refractory and susceptible lines of the mosquito, *Aedes aegypti*, infected with Dengue-2 virus. *J Insect Sci* 2010;10(41):1-23.
- Bayyareddy K, Andacht TM, Abdullah MA, Adang MJ. Proteomic identification of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* toxin Cry4Ba binding proteins in midgut membranes from *Aedes (Stegomyia) aegypti* Linnaeus (Diptera, Culicidae) larvae. *Insect Biochem Molec Biol* 2009;39:279-86.
- Bernick EP, Moffet SB, Moffett DF. Organization, ultrastructure, and development of midgut visceral muscle in larval *Aedes aegypti*. *Tissue Cell* 2007;39:277-92.
- Billingsley PF. The midgut ultrastructure of hematophagous insects. *Annu Rev Biochem Sci* 2005;30:142-50.
- Black WCt, Bennett KE, Gorrochotegui-Escalante N, Barillas-Mury CV, Fernandez-Salas I, et al. Flavivirus susceptibility in *Aedes aegypti*. *Arch Med Res* 2002;33:379-88.

Brennan LJ, Keddie BA, Braig HR, Harris HL. The endosymbiont *Wolbachia pipientis* induces the expression of host antioxidant proteins in an *Aedes albopictus* cell line. PLoS ONE 2008;3:1-8.

Brewer JW, Hendershot LM. Building an antibody factory: a job for the unfolded protein response. Nature Immunol 2005;6:23-9.

Brown MR, Crim JW, Lea AO. FMRamide- and pancreatic polypeptide-like immunoreactivity of endocrine cells in the midgut of a mosquito. Tissue Cell 1986;18:419-28.

Brown MR, Raikhel AS, Lea AO. Ultrastructure of midgut endocrine cells in the adult mosquito, *Aedes aegypti*. Tissue Cell 1985;17:709-21.

Cancino-Rodezno A, Lozano L, Oppert C, Castro J, Lanz-Mendoza H, Encarnacio S, Evans AE., Gill SS, Sobero M, Jurat-Fuentes JL, Bravo A. Comparative proteomic analysis of *Aedes aegypti* larval midgut after intoxication with Cry11Aa toxin from *Bacillus thuringiensis*. PLoS ONE 2012;7(5):1-9.

Cancino-Rodezno A, Lozano L, Oppert C, Castro J, Lanz-Mendoza H, Encarnacio S, Evans AE., Gill SS, Sobero M, Jurat-Fuentes JL, Bravo A. Comparative proteomic analysis of *Aedes aegypti* larval midgut after intoxication with Cry11Aa toxin from *Bacillus thuringiensis*. PLoS ONE 2012;7(5):1-9.

Cassida JE, Quistad GB. Why insecticides are more toxic to insects than people: the unique toxicology of insects. J Pestic Sci 2004;29:81-6.

Choumet V, Carmi-Leroy A, Laurent C, Lenormand P, Rousselle JC. The salivary glands and saliva of *Anopheles gambiae* as an essential step in the *Plasmodium* life cycle: a global proteomic study. Proteomics 2007;7:3384-94.

Corona M, Robinson GE. Genes of the antioxidant system of the honeybee: annotation and phylogeny. Insect Mol Biol 2006;15:687-701.

Cruz-Landim C, Silva-De-Moraes RLM, Serrão JE. Ultrastructural aspects of epithelial renewal in the midgut of adult worker bees (Hymenoptera, Apidae). J Comp Biol 1996;1(½):209-40.

Daish TJ, Mills K, Kumar S. *Drosophila* caspase DRONC is required for specific developmental cell death pathways and stress-induced apoptosis. Dev Cell 2004;7:909-15.

Denton D, Shrivage B, Simin R, Mills K, Berry DL, Baehrecke EH, et al. Autophagy, not apoptosis, is essential for midgut cell death in *Drosophila*. *Curr Biol* 2009;19:1741-6.

Elbert A, Hass M, Springer B, Thielert W, Nauen R (2008) Applied aspects of neonicotinoid uses in crop protection. *Pest Manag Sci* 64: 1099-105.

Fan Y, Schlierf M, Gaspar AC, Dreux C, Kpebe A, et al. *Drosophila* translational elongation factor-1gamma is modified in response to DOA kinase activity and is essential for cellular viability. *Genetics* 2010;184:141-54.

Fernandes KM, Neves CA, Serrão JE, Martins GF. *Aedes aegypti* midgut remodeling during metamorphosis. *Parasitol Int* 2014;63(3):506-512.

Gilmour KM. Perspectives on carbonic anhydrase. *Comp Biochem Physiol Part A* 2010;157:193-7.

Glattli E, Rudin W, Hecker H. Immunoelectron microscopic demonstration of pancreatic polypeptide in midgut epithelium of hematophagous dipterans. *J Histochem Cytochem* 1987;35:891-6.

Gupta L, Kumar S, Han YS, Pimenta PFP, Barillas-Mury C. Midgut epithelial responses of different mosquito-*Plasmodium* combinations: The actin cone zipper repair mechanism in *Aedes aegypti*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:4010-5.

Guzman MG, Kouri G. Dengue: an update. *Lancet Infect Dis* 2002;2(1):33-42.

Hamilton JV, Munks RJL, Lehane SM, Lehane MJ. Association of midgut defensin with a novel serine protease in the blood-sucking fly *Stomoxys calcitrans*. *Insect Mol Biol* 2002;11(3):197-205.

Hecker H, Freyvogel TA, Briegel H, Steiger R. Ultrastructural differentiation of the midgut epithelium in female *Aedes aegypti* (L.) (Insecta, Diptera) imagines. *Acta Trop* 1971;28:80-104.

Hecker H. Structure and function of midgut epithelial cells in Culicidae mosquitoes (Insect, Diptera). *Cell Tissue Res* 1977;1:321-41.

Hendershot LM, Valentine VA, Lee AS, Morris SW, Shapiro DN. Localization of the gene encoding human Bip/Grp78, the endoplasmic-reticulum cognate of the Hsp70 family, to chromosome-9q34. *Genomics* 1994;20:281-4.

Illa-Bochaca I, Montuenga LM. The regenerative nidi of the locust midgut as a model to study epithelial cell differentiation from stem cells. *J Exp Biol* 2006;209:2215-23.

Jaramillo-Gutierrez G, Rodrigues J, Ndikuyeze G, Povelones M, Molina-Cruz A. Mosquito immune responses and compatibility between *Plasmodium* parasites and anopheline mosquitoes. *BMC Microbiol* 2009;9:154.

Jeschke P, Nauen R (2008) Neonicotinoids - from zero to hero in insecticide chemistry. *Pest Manag Sci* 64: 1084-98.

Jiang C, Baehrecke EH, Thummel CS. Steroid regulated programmed cell death during *Drosophila* metamorphosis. *Development* 1997;124:4673-83.

Khaitlina SY. Functional specificity of actin isoforms. *Int. Rev. Cytol* 2001;202:35-98.

Kim JW, Dang CV. Multifaceted roles of glycolytic enzymes. *Trends Biochem Sci* 2005;30:142-50.

Lehane MJ, Wu D, Lehane SM. Midgut-specific immune molecules are produced by the blood-sucking insect *Stomoxys calcitrans*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:11502-7.

Lemasters JJ, Holmuhamedov E. Voltage-dependent anion channel (VDAC) as mitochondrial governor--thinking outside the box. *Biochim Biophys Acta* 2006;1762(2):181-90.

Lockshin RA, Zakeri Z. Apoptosis, autophagy, and more. *Int J Biochem Cell Biol* 2004;36:2405-19.

Markus Pecha, Zhala Karima,¹ Hiroshi Yamamoto^{a,1}, Madoka Kitakawa^c, Yan Qind, and Knud H. Nierhaus^a. Elongation factor 4 (EF4/LepA) accelerates protein synthesis at increased Mg²⁺ concentrations. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;108(8):3199-203.

Martins GF, Neves CA, Campos LA, Serrão JE. The regenerative cells during the metamorphosis in the midgut of bees. *Micron* 2006;37:161-8.

Mhaweche P. 14-3-3 proteins—an update. *Cell Research* 2005;15(4):228-36.

Micchelli CA, Perrimon N. Evidence that stem cells reside in the adult *Drosophila* midgut epithelium. *Nature* 2006;439:475-9.

Moffett SB, Moffett DF. Comparison of immunoreactivity to serotonin, FMRFamide and SCPb in the gut and visceral nervous system of larvae, pupae and adults of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. *J Insect Sci* 2005;5:20.

- Molina-Cruz A, Gupta L, Richardson J, Bennet K, Black W, Barrilas-Mury C. Effect of mosquito midgut trypsin activity on dengue-2 virus infection and dissemination in *Aedes aegypti*. *Am J Trop Med Hyg* 2005;72:631-7.
- Muñoz ML, Limón-Camacho G, Tovar R, Diaz-Badillo A, Mendoza-Hernández Guillermo, Black IV WC. Proteomic identification of dengue virus binding proteins in *Aedes aegypti* mosquitoes and *Aedes albopictus* cells. *Biomed Res Int* 2013;1-11.
- Nardi JB, Bee CM, Miller LA. Stem cells of the beetle midgut epithelium. *Journal of Insect Physiology* 2010;56:296-303.
- Nene V, Wortman JR, Lawson D, Haas B, Kodira C, et al. Genome sequence of *Aedes aegypti*, a major arbovirus vector. *Science* 2007;316:1718-23.
- Neuhoff V, Stamm R, Eibl H. Clear background and highly sensitive protein staining with Coomassie Blue dyes in polyacrylamide gels: a systematic analysis. *Electrophoresis* 1985;6:427-48.
- Nishiura JT, Ho P, Ray K. Methoprene interferes with mosquito midgut remodeling during metamorphosis. *J Med Entomol* 2003;40:498-507.
- Nishiura JT, Smouse D. Nuclear and cytoplasmic changes in the *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) alimentary canal during metamorphosis and their relationship to programmed cell death. *Ann Entomol Soc Am* 2000;93:282-90.
- O'Brien LE, Soliman SS, Li X, Bilder D. Altered modes of stem cell division drive adaptive intestinal growth. *Cell* 2011;147:603-14.
- Ohlstein B, Spradling A. The adult *Drosophila* posterior midgut is maintained by pluripotent stem cells. *Nature* 2006;439:470-4.
- Oliveira CD, Tadei WP, Abdalla FC. Occurrence of apocrine secretion in the larval gut epithelial cells of *Aedes aegypti* L., *Anopheles albiparvus* Lynch-Arribálzaga and *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae): a defense strategy against infection by *Bacillus sphaericus* Neide? *Neotrop Entomol* 2009;38:624-31.
- Onken H, Moffett SB., Moffett DF. Alkalinization in the isolated and perfused anterior midgut of the larval mosquito, *Aedes aegypti*. *J. Insect Sci* 2008;8(46):1-20.

Parthasarathy R, Palli RR. Proliferation and differentiation of intestinal stem cells during metamorphosis of the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Dev Dynam* 2008;237:893-908.

Pennington JE, Wells MA. The midgut adult: structure and function. In: Marquart WC, editor. *Biology of Disease Vectors*. Amsterdam: Elsevier; 2004, p. 289-95.

Popova-Butler A, Dean DH. Proteomic analysis of the mosquito *Aedes aegypti* midgut brush border membrane vesicles. *J Insect Physiol* 2009;55:264-72.

Preuss U, Landsberg G, Scheidtmann KH. Novel mitosis-specific phosphorylation of histone H3 at Thr11 mediated by Dlk/ZIP kinase. *Nucleic Acid Res* 2003;31:878-85.

Ray K, Mercedes M, Chan D, Choi CY, Nishiura JT. Growth and differentiation of the larval mosquito midgut. *J Insect Sci* 2007;9:1-13.

Rey J, Dehmelt L, Mazel T, Wu YW, Bastiaens P, Goody RS. RabGEFs are a major determinant for specific Rab membrane targeting. *J Cell Biol* 2013;200(3):287-300.

Rost MM. Ultrastructural changes in the midgut epithelium in *Podura aquatica* L. (Insecta, Collembola, Arthropleona) during regeneration. *Arthropod Struct Dev* 2006;35:69-76.

Saboia-Vahia L, Borges-Veloso A, Cuervo P, Junqueira M, Mesquita-Rodrigues C, BC, Barbosa DG, De Jesus JB. Protein expression in the midgut of sugar-fed *Aedes albopictus* females. *Parasites & Vectors* 2012;5:290.

Sessions OM, Barrows NJ, Souza-Neto JA, Robinson TJ, Hershey CL. Discovery of insect and human dengue virus host factors. *Nature* 2009;458:1047-50.

Shevchenko A, Tomas H, Havlis J, Olsen JV, Mann M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat Protoc* 2006;1:2856-60.

Stefanini, M., C. De Martino, Zamboni L. Fixation of ejaculated spermatozoa for electron microscopy. *Nature* 1967;216:173-4.

Stirnemann CU, Petsalaki E, Russell RB, Müller CW. WD40 proteins propel cellular networks. *Trends Biochem Sci*. 2010;35(10):565-74.

Suwanchaichinda C, Kanost MR. The serpin gene family in *Anopheles gambiae*. *Gene* 2009;442:47-54.

- Tarr JM, Young PJ, Morse R, Shaw DJ, Haigh R, Petrov PG, Johnson SJ, Winyard PG, Eggleton P.A Mechanism of release of calreticulin from cells during apoptosis. *J. Mol. Biol* 2010;401:799-812.
- Tchankouo-Nguetcheu S, Khun H, Pincet L, Roux P, Bahut M, Huerre M, Guette C, Choumet V. Differential protein modulation in midguts of *Aedes aegypti* infected with Chikungunya and Dengue 2 viruses. *PLoS ONE* 2010;5(10):1-11.
- Tettamanti G, Grimaldi A, Casartelli M, Ambrosetti E, Ponti B, Congiu T, Ferrarese R, Rivas-Pena ML, Pennacchio F, Eguileor M. Programmed cell death and stem cell differentiation are responsible for midgut replacement in *Heliothis virescens* during prepupal instar. *Cell Tissue Res* 2007;330:345-59.
- Thompson SN. Pyruvate cycling and implications for regulation of gluconeogenesis in the insect, *Manduca sexta* L. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;274:787-93.
- Tong Y, Jiang H, Kanost MR. Identification of plasma proteases inhibited by *Manduca sexta* serpin-4 and serpin-5 and their association with components of the prophenol oxidase activation pathway. *J Biol Chem* 2005;280:14932-42.
- Veenstra JA. Peptidergic paracrine and endocrine cells in the midgut of the fruit fly maggot. *Cell Tissue Res* 2009;336:309-23.
- Vennestrom J, Jensen PM. *Ixodes ricinus*: the potential of two-dimensional gel electrophoresis as a tool for studying host-vector-pathogen interactions. *Exp Parasitol* 2007;115: 53-8.
- Wasinpiyamongkol L, Patramool S, Luplertlop N, Surasombatpattana P, Doucoure S, Mouchet F, Séveno M, Remoue F, Demetree E, Brizard J, Jouin P, Biron DG, Thomas F, Missé D. Blood-feeding and immunogenic *Aedes aegypti* saliva proteins. *Proteomics* 2010;10:1906-16.
- White K, Hurteau T, Punsal P. Neuropeptide-FMRFamide-like immunoreactivity in *Drosophila*: development and distribution. *J Comp Neurol* 1986;247:430-8.
- Wieczorek H, Beyenbach KW, Huss M, Vitavska O. Vacuolar-type proton pumps in insect epithelia. *J Exp Biol* 2009;212:1611-9.
- Wilder-Smith A, Schwartz E. Dengue in travelers. *N Engl J Med* 2005;353(9):924-32.

Wilkinson B, Gilbert HF. Protein disulfide isomerase. *Biochim. Biophys. Acta* 2004;1699:35-44.

Wisniewska M, Karlberg T, Lehtio L, Johansson I, Kotenyova T, Moche M, ler HS. Crystal Structures of the ATPase Domains of four human Hsp70 isoforms: HSPA1L/Hsp70-hom, HSPA2/Hsp70-2, HSPA6/Hsp70B, and HSPA5/BiP/GRP78. *PLoS ONE* 2010;5(1):e8625.

Woodring JL, Higgs S, Beaty BJ (1996) Natural cycles of vector-borne pathogens. In Marquardt WC, ed. Elsevier: Burlington, MA, USA. *The Biology of Disease Vectors*. pp 51-72.

Wu Y, Parthasarathy R, Bai H, Palli SR. Mechanisms of midgut remodeling: juvenile hormone analog methoprene blocks midgut metamorphosis by modulating ecdysone action. *Mech Dev* 2006;123:530-47.

Xu W, Kimelman D. Mechanistic insights from structural studies of beta-catenin and its binding partners. *Journal of Cell Science* 2007;120:3337-44.

Zhang M, Zheng X, Wu Y, Gan M, He A, Li Z, Zhang D, Wu X, Zhan X. Differential proteomics of *Aedes albopictus* salivary gland, midgut and C6/36 cell induced by dengue virus infection. *Virology* 2013;444(1-2):109-18.

Žitňan D, Šauman I, Sehnal F. Peptidergic innervation and endocrine cells of insect midgut. *Arch Ins Biochem Physiol* 1993;22:113-32.

Tab.1. Proteínas do intestino médio de *A. aegypti* identificadas por MS/MS

Amostra	Código	Proteína	Sequência	Ion Score/C.I. %	Protein Score/C.I., %
L481	gi 157116805	Serine proteinase inhibitors (serpins)	FKIEFDLCLKETLEK	115/100	161/100
L482	gi 157116805	Serine proteinase inhibitors (serpins)	FKIEFDLCLKETLEK	108/100	166/100
P6	gi 108877579	Trypsin-like serine protease	YNNPQFHNDIALVK	58/100	91/100
RE1	gi 403182713	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	LISWYDNEFGYSNR	65/100	119/100
RE3	gi 94468602	Catalase [<i>A. aegypti</i>]	IWPQAEFLIPVGR	28/97	77/99
RE34	gi 157113061	Calreticulin family	FFNDEENDKGLQTSQDAR	30/96	82/100
RE37	gi 157131648	F1 ATP synthase alpha, central domain.	EAYPGDVVYLSHR	55/100	124/100
RE38	gi 157168005	WD40	FSPNHSNPIIVSAGWDR	61/100	122/100
RE39	gi 108871874	Citrate synthases	ALGVLASLVWDR	60/100	129/100
RE41	gi 157124666	Voltage-dependent anion channel (VDAC)	EFGGLIYQR	35/99	72/99
RE44	gi 108871874	Citrate synthases	LPVVAATYR	22/90	43/100
RE47	gi 403182713	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	LISWYDNEFGYSNR	50/100	50/100
RE58	gi 108884060	Protein disulfide isomerase (PDI)	FVTAQALPLIVDFSHETAQK	68/100	149/100
RE59	gi 108881686	F1 ATP synthase beta	IINVIGEPIDER	21/17	99/100
RE60	gi 157121051	Enolase	GNPTVEVDLVTDLGLFR	88/100	191/100
RE64	gi 157120956	Arginine or creatine kinase [<i>A. aegypti</i>]	AVQQQLIDHFLFK	43/100	125/100
RE65	gi 301641424	Actin partial [<i>A. aegypti</i>]	SYELPDGQVITIGNER	68/100	125/100
RE66	gi 157106889	Actin [<i>A. aegypti</i>]	SYELPDGQVITIGNER	55/100	133/100
RE67	gi 108880329	Aldo-keto reductases (AKRs)	LVPITSAAGHPYHPFEKEEF	56/100	56/100
RE68	gi 157114623	Pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase	DGSKQELEFDVLLVSVGR	79/100	145/100
RE69	gi 108879763	Sugar kinase/HSP70/actin superfamily	SYELPDGQVITIGNER	36/98	71/100
RE70	gi 108879763	Sugar kinase/HSP70/actin superfamily	SYELPDGQVITIGNER	63/100	105/100
RE71	gi 108872600	14-3-3 epsilon	LGLALNFSVFYIEILNSPDR	32/97	63/98
RE72	gi 157114501	14-3-3 protein	LGLALNFSVFYIEILNSPDK	125/100	147/100
RE75	gi 301641424	Actin partial [<i>A. aegypti</i>]	SYELPDGQVITIGNER	60/100	88/100
RE76	gi 157130286	Glutathione S-transferase (GST)	LVTLNSEVIPFYLEKLDDIAR	83/100	235/100
AS16	gi 94468818	HSPA5	IEIESFYEGDDFSETLTR	34/99	34/99
AS18	gi 312373354	V/A-type ATP synthase catalytic subunit A	R.VGYEYELVGEIIR.L	41/99	123/100
AS25	gi 357604983	Alpha_tubulin	R.NLDIERPTYTNLNR.L	39/99	105/100
AS28	gi 158301772	Actin	K.SYELPDGQVITIGNER.F	27/99	97/100
AS30	gi 108882996	Enolase	R.GNPTVEVDLKTAKGLFR.A	30/99	95/100
AS33	lcl 75929	lepA_II (EF4)	R.AGQVGYLVCMNRTVK.E	21/99	92/100
AS62	gi 108882772	Voltage-dependent anion channel (VDAC)	K.AMQYLGLMR.S	22/99	84/100

Tab.2. Proteínas do intestino médio de *A. aegypti* identificadas por MS

Amostra	Código	Proteína	Best Protein Mass	Protein Score/C.I., %
RE35	gi 108873332	Glutamate dehydrogenase	251546	66/99
AA46	gi 357606304	ATP synthase	59495	129/100
AS40	gi 108876659	Trypsin-like serine protease	29844	78/100
AS54	gi 332023250	F1 ATP synthase alpha, central domain	59389	79/100
AS55	gi 32187519	Elongation factor 1-alpha (EF1-alpha)	32292	62/96
AS58	gi 108871015	Aspartate aminotransferase (AAT); Provisional	39559	55/83

7. Figuras

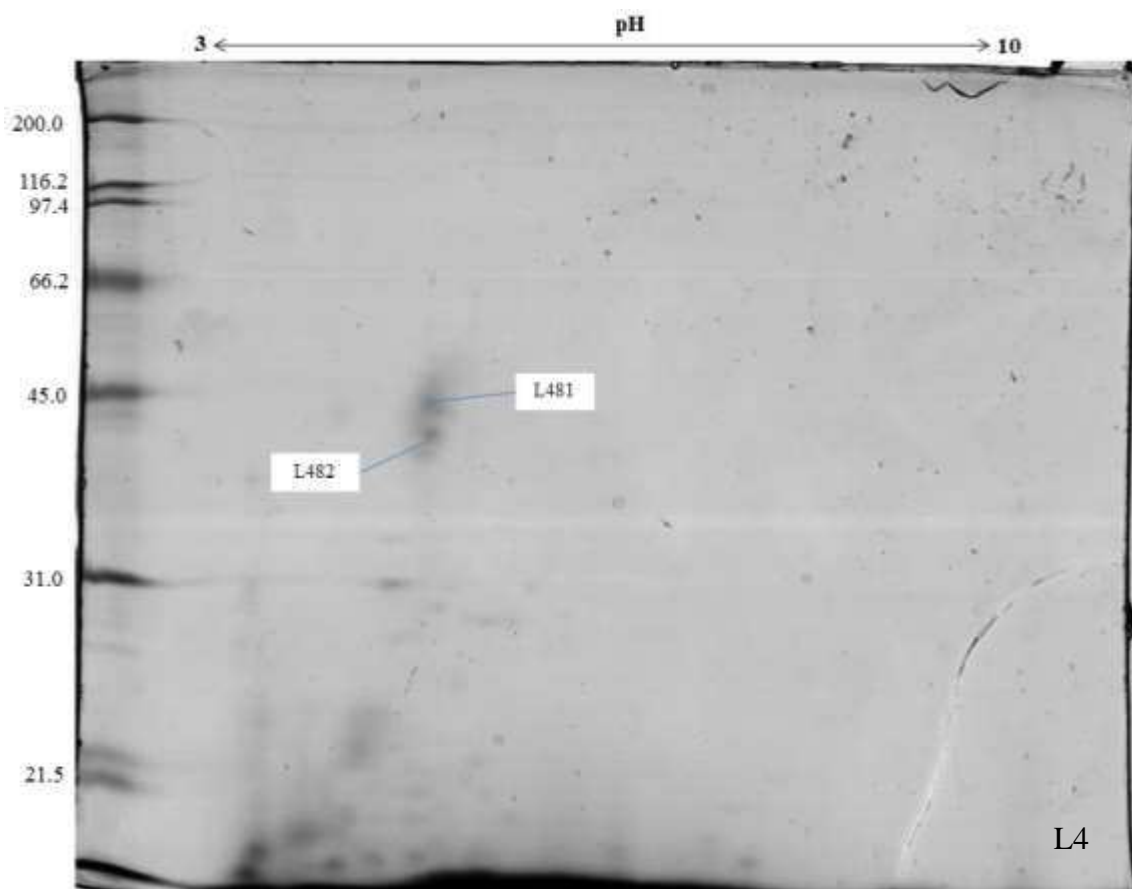


Fig.1. Perfil bidimensional do extrato de proteínas do intestino médio de L4 de *A. aegypti*. Spots identificados estão indicados.

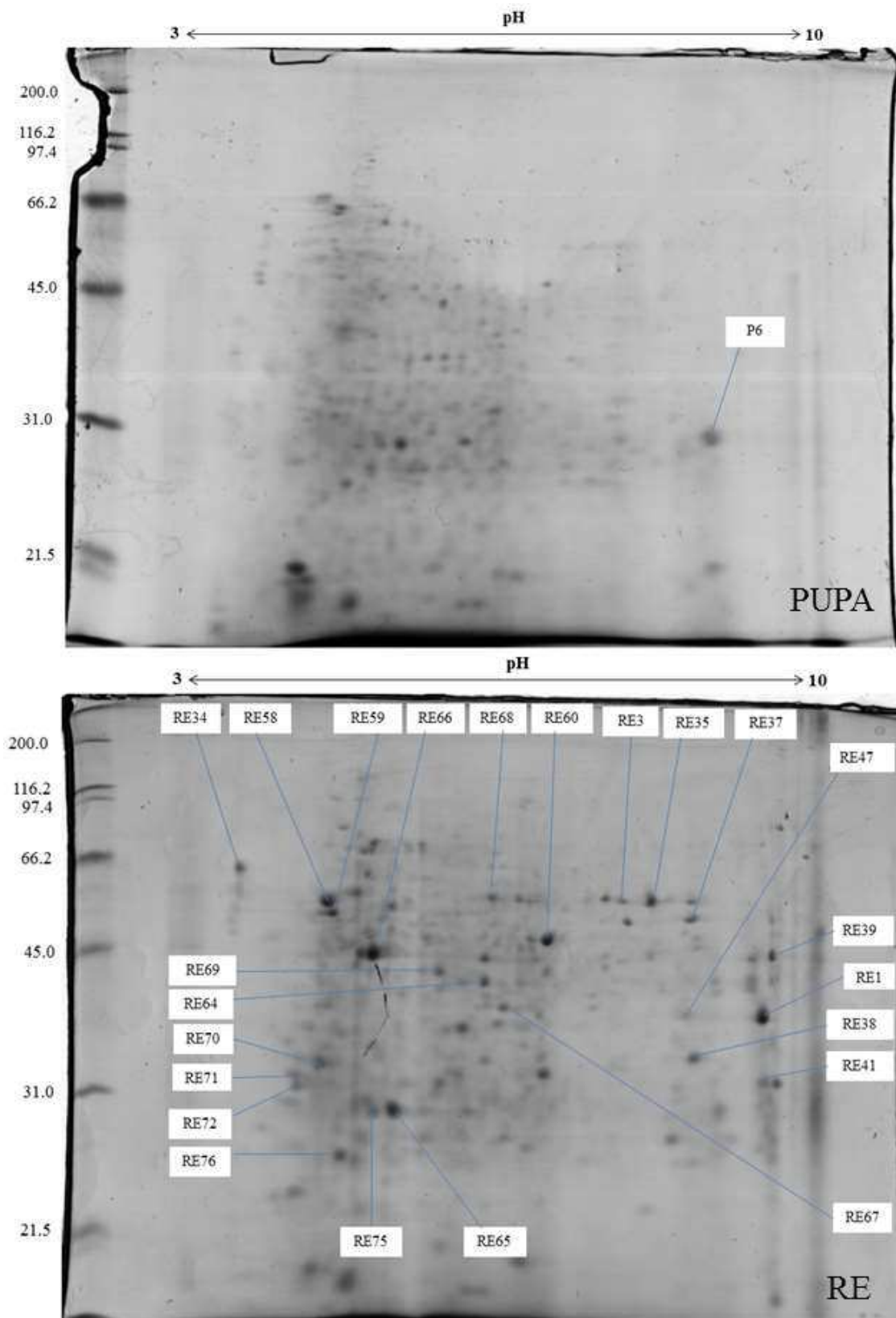


Fig.2. Perfil bidimensional do extrato de proteínas do intestino médio dos mosquitos adultos de *A. aegypti* nas fases de pupa e RE. Spots identificados estão indicados.

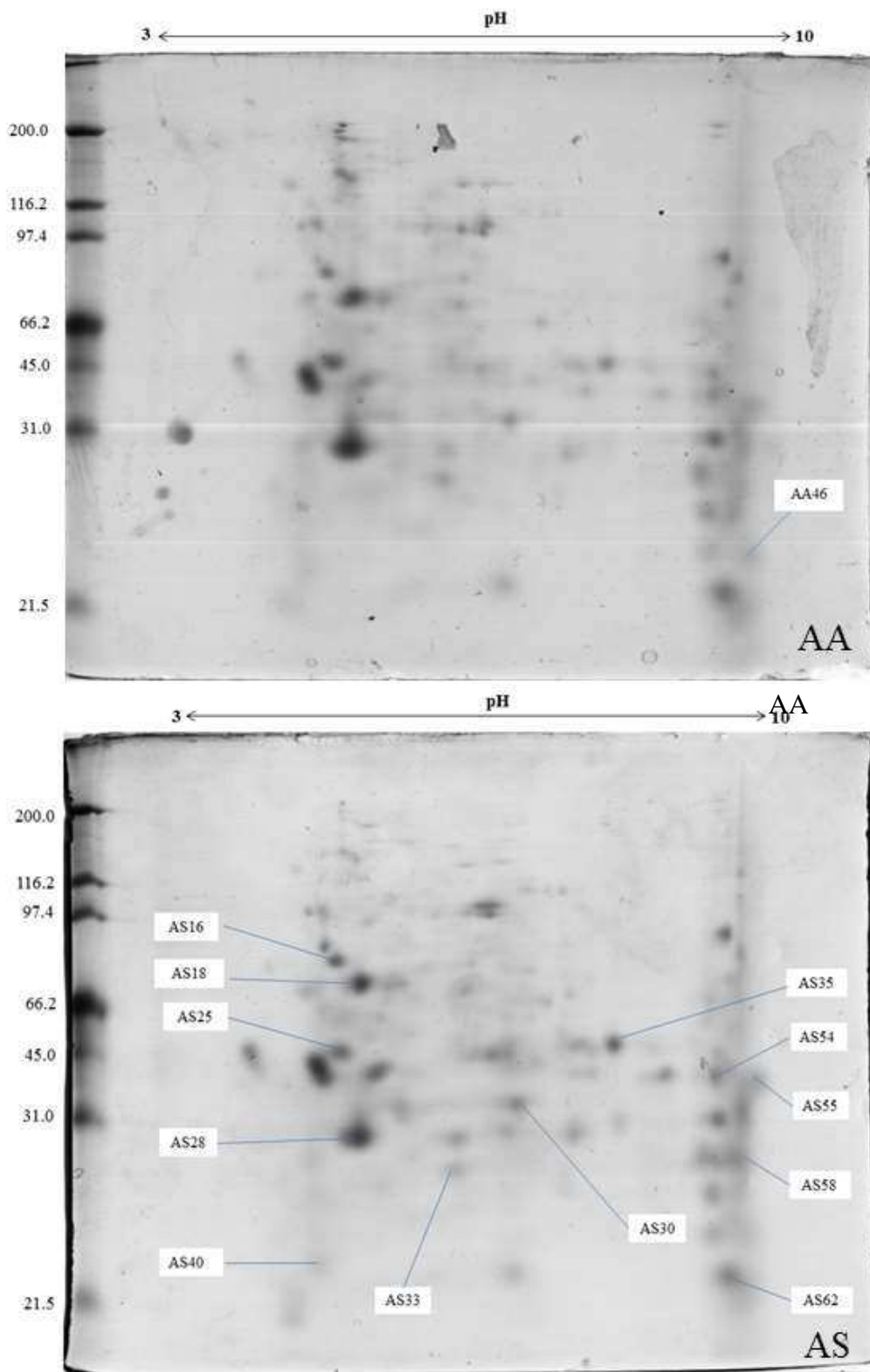


Fig.3. Perfil bidimensional do extrato de proteínas do intestino médio dos mosquitos adultos de *A. aegypti* alimentados com açúcar (AA) (A) e sangue (AS) (B). Spots identificados estão indicados.

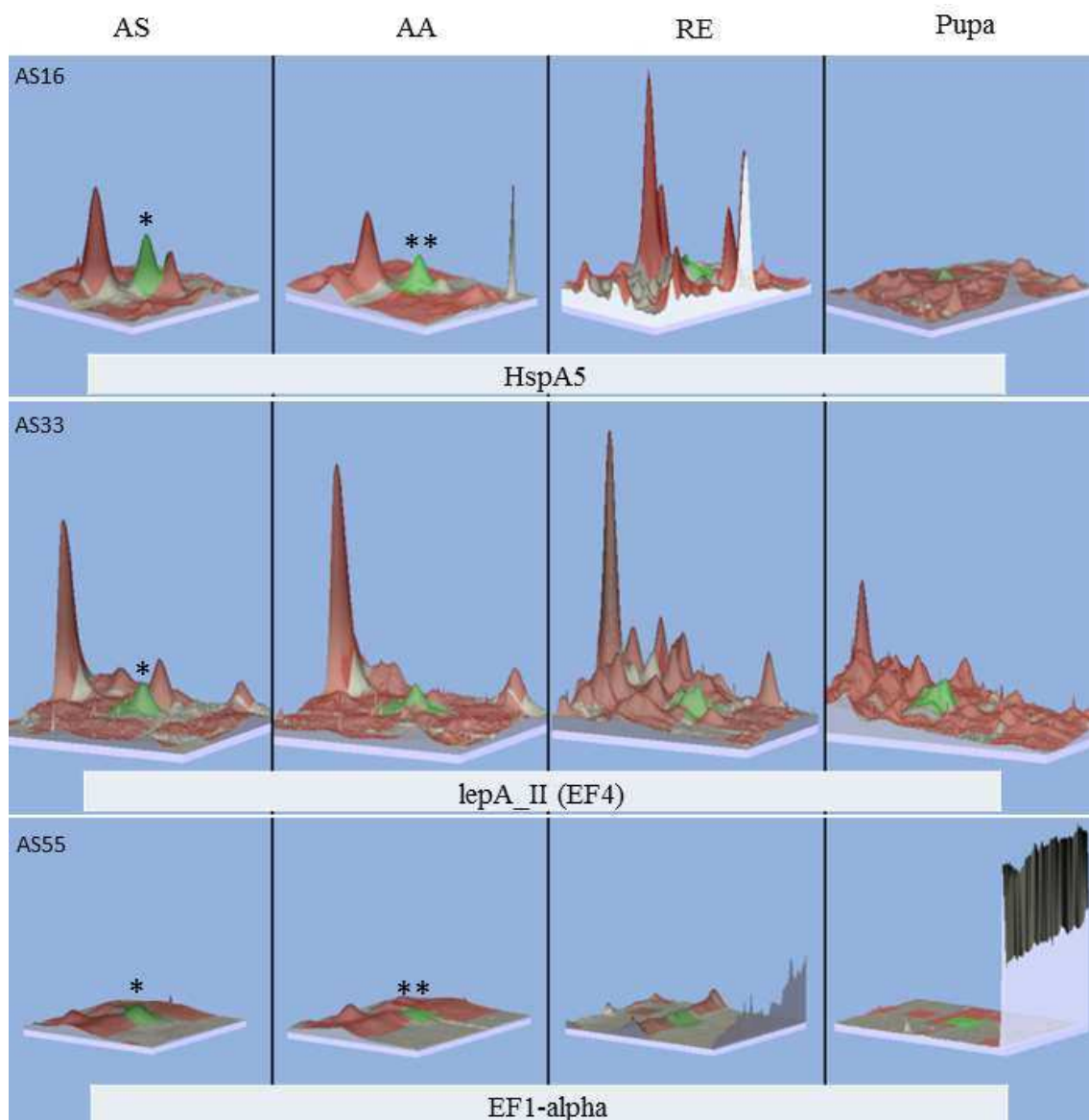


Fig.4. Análise comparativa em 3D dos spots das proteínas do intestino médio do mosquito *A. aegypti* envolvidas na maquinaria de tradução. Em verde o spot da proteína identificada em pupas, RE, AA e AS. (*) Spots diferencialmente expressos.

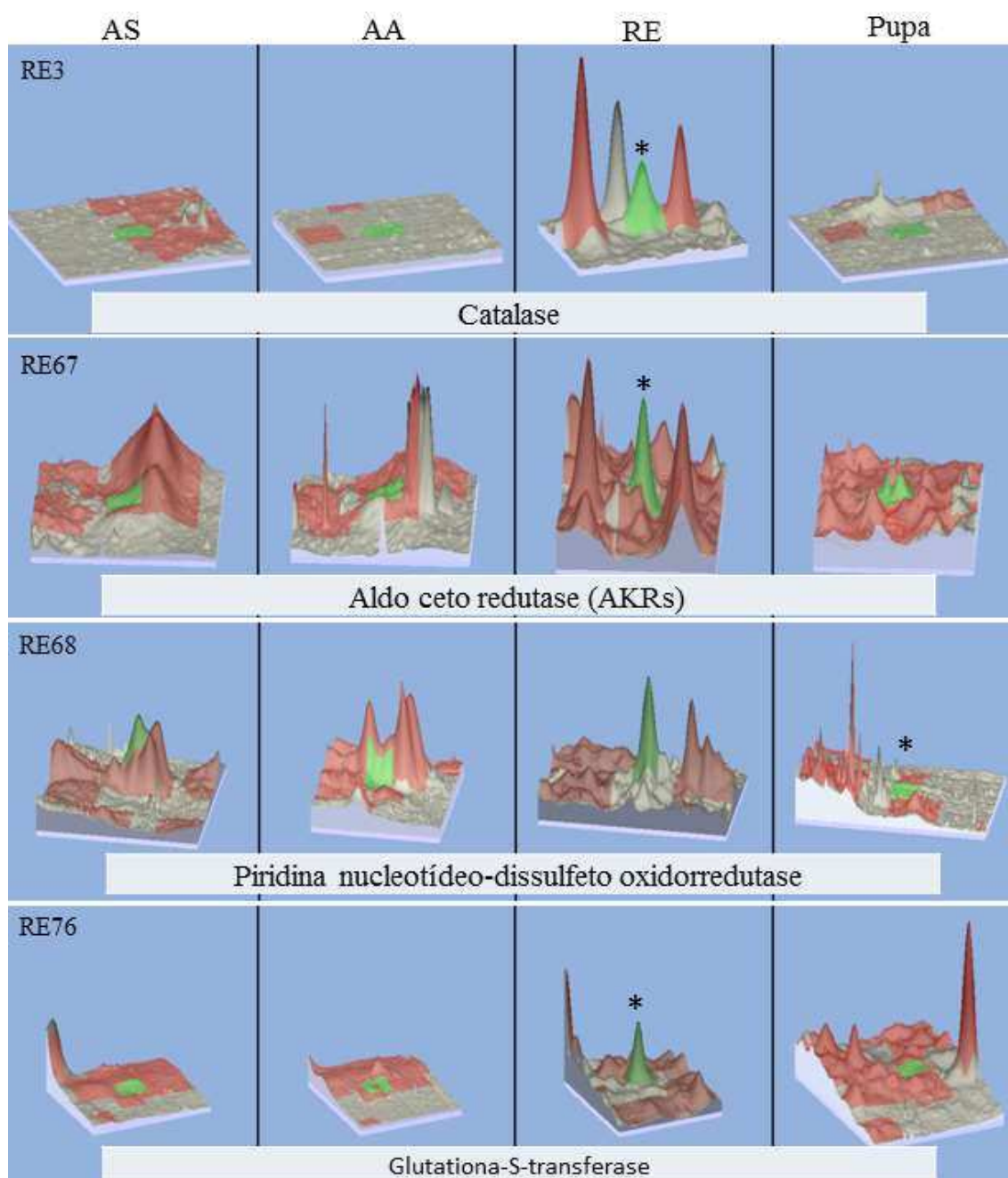


Fig.5. Análise comparativa em 3D dos spots das proteínas do intestino médio do mosquito *A. aegypti* envolvidas na desintoxicação celular. Em verde o spot da proteína identificada em pupas, RE, AA e AS. (*) Spots diferencialmente expressos.

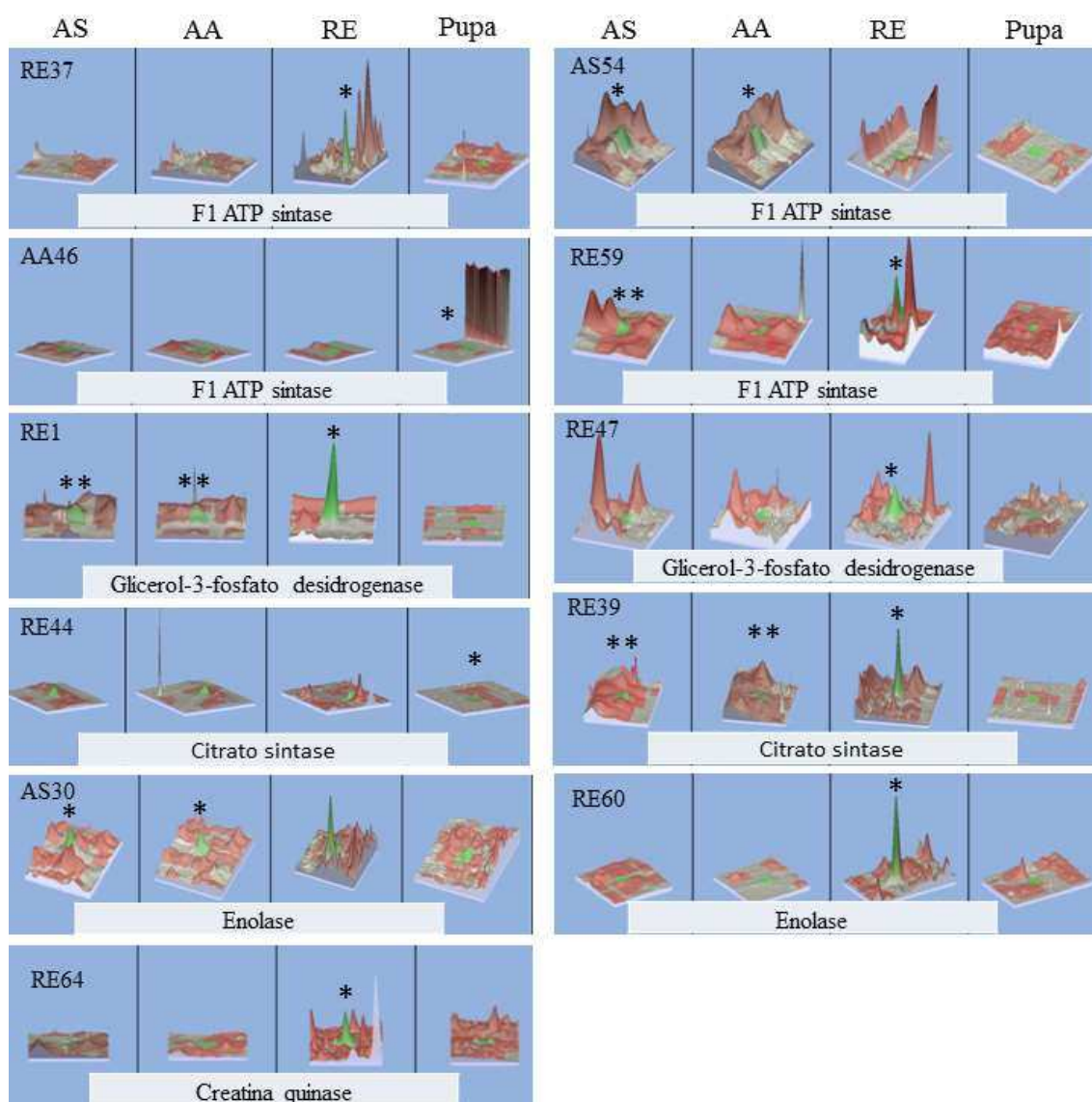


Fig.6. Análise comparativa em 3D dos spots das proteínas do intestino médio do mosquito *A. aegypti* envolvidas na produção de energia. Em verde o spot da proteína identificada em pupas, RE, AA e AS. (*) Spots diferencialmente expressos.

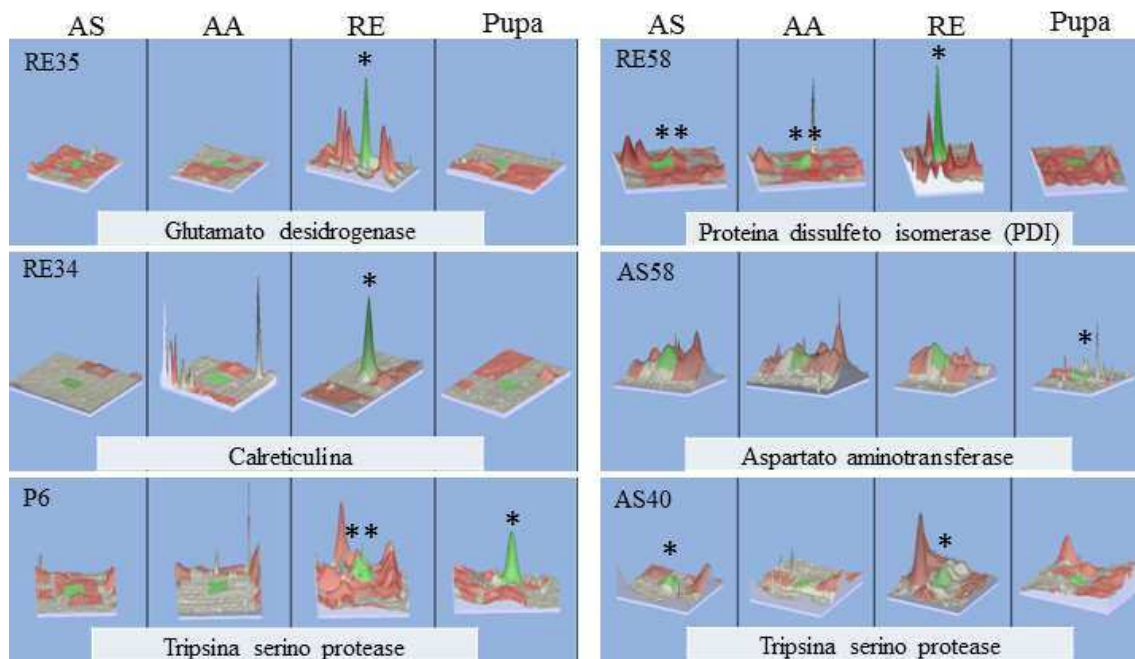


Fig.7. Análise comparativa em 3D dos spots das proteínas do intestino médio do mosquito *A. aegypti* envolvidas no metabolismo de aminoácidos e proteínas. Em verde o spot da proteína identificada em pupas, RE, AA e AS. (*) Spots diferencialmente expressos.

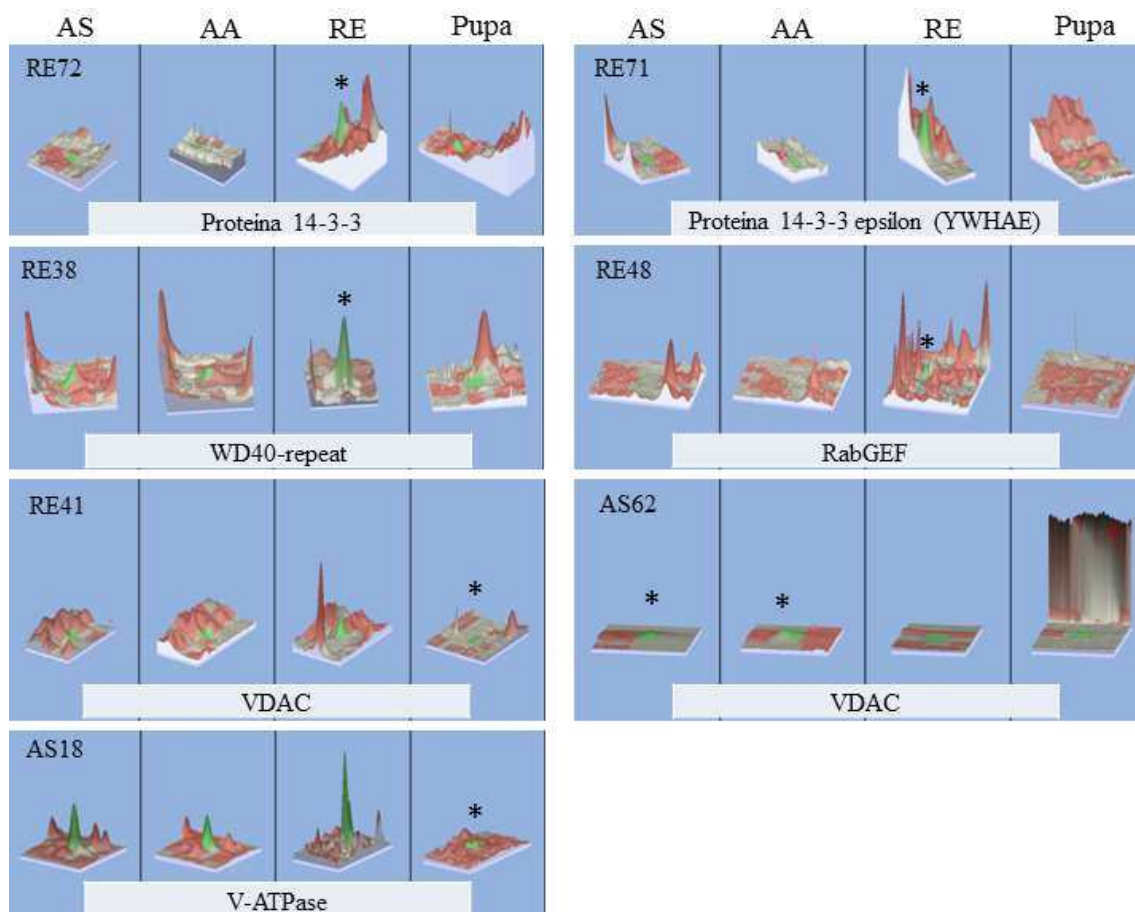


Fig.8. Análise comparativa em 3D dos spots das proteínas do intestino médio do mosquito *A. aegypti* envolvidas com a sinalização e transporte celular. Em verde o spot da proteína identificada em pupas, RE, AA e AS. (*) Spots diferencialmente expressos.

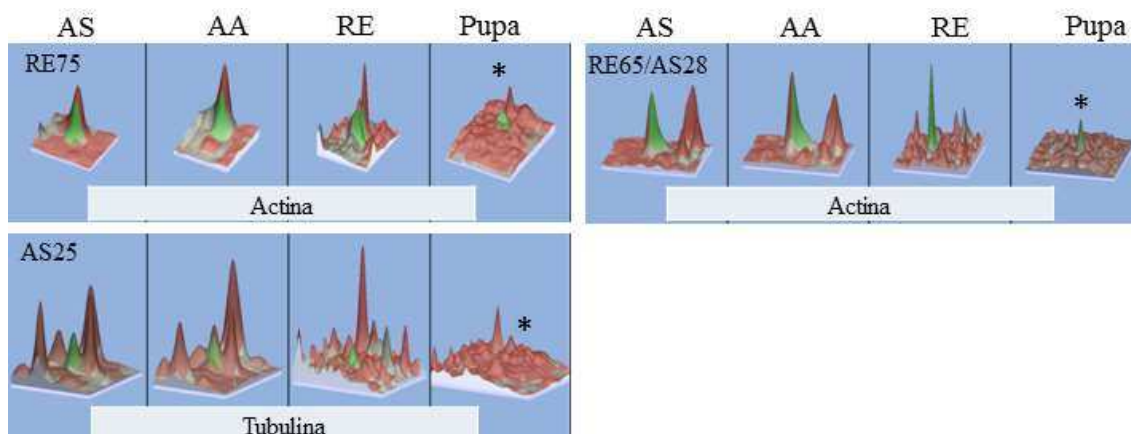


Fig.9. Análise comparativa em 3D dos spots das proteínas do intestino médio do mosquito *A. aegypti* associadas ao citoesqueleto. Em verde o spot da proteína identificada em pupas, RE, AA e AS. (*) Spots diferencialmente expressos.

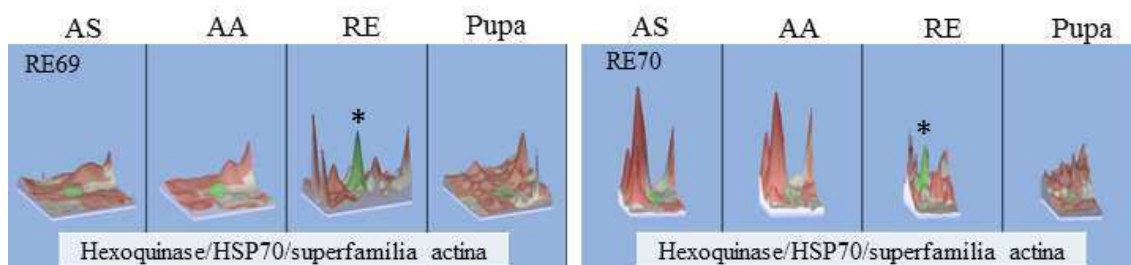


Fig.10. Análise comparativa em 3D dos spots das proteínas do intestino médio do mosquito *A. aegypti* com função desconhecida. Em verde o spot da proteína identificada em pupas, RE, AA e AS. (*) Spots diferencialmente expressos.

Conclusões gerais

A remodelação do intestino médio de *A. aegypti* se inicia pouco antes da pupação, onde se inicia o processo de morte celular das células digestivas. Os resultados de TEM mostram que essa morte celular é mais semelhante à autofagia, e não a apoptose dependente de caspase, descrita por outros autores.

O final da reposição das células regenerativas larvais acontece na fase de pupa, 18h após a ecdise (Ray et al., 2007), restando assim apenas as células regenerativas que se diferenciarão, formando o novo epitélio. Entretanto, ao mesmo tempo em que está ocorrendo a morte das células digestivas, as células regenerativas se diferenciam e dividem, processos que ocorrem até no início da fase adulta.

A remodelação do intestino médio de *A. aegypti* é bastante dinâmica e complexa. A divisão das células regenerativas se inicia na região anterior do intestino médio das L4 e termina na região posterior nos RE, demonstrando que durante o desenvolvimento existem regiões específicas onde as células em divisão se concentram no órgão.

Além da letalidade, os efeitos subletais de imidacloprid no desenvolvimento pós-embrionário do intestino médio de *A. aegypti* podem ser importantes para o controle de suas populações. Isso porque o imidacloprid em concentrações subletais afetou a remodelação do órgão, inibindo a proliferação e diferenciação das células regenerativas, muitas vezes levando-as à morte. Assim, nossos resultados sugerem que larvas expostas ao inseticida possuem alto potencial no controle de *A. aegypti*, pois mesmo com a emergência dos adultos, o seu intestino médio está constituído, na maior parte, por células digestivas mal formadas. Porém, estudos a campo devem ser realizados nesse contexto.

O intestino médio das L4 aparentemente está expressando poucas proteínas, enquanto que nas pupas se inicia a síntese das múltiplas proteínas essenciais para a formação e constituição do novo epitélio do intestino médio. Entretanto, o pico da expressão dessas proteínas ocorre no início da fase adulta, fase final do desenvolvimento.

Já o intestino médio dos mosquitos alimentados (AA e AS), não possui a mesma quantidade de spots que as pupas e os RE, mas possui muitos spots que estão superexpressos, possivelmente relacionados a proteínas ligadas a digestão de sangue ou açúcar.

No presente estudo foram mostrados dados importantes sobre a biologia do intestino médio do mosquito vetor *A. aegypti*, confirmando que esse órgão é um alvo em potencial para o controle de populações e bloqueio de entrada dos patógenos, através de interferências durante a metamorfose do órgão. Contudo, a manipulação das proteínas diferencialmente expressas e a Identificação de marcadores moleculares são necessárias para definir a dinâmica do intestino médio de *A. aegypti*.