

FRANCIANE ROSA MIRANDA

**DESENVOLVIMENTO PÓS-EMBRIONÁRIO DO INTESTINO
MÉDIO E EFEITO DA CAFEÍNA E DA BORRA DE CAFÉ EM
Aedes aegypti (DIPTERA: CULICIDAE)**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2019

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

T

Miranda, Franciane Rosa, 1992-
M672d Desenvolvimento pós-embriônário do intestino médio e
2019 efeito da cafeína e da borra de café em *Aedes aegypti* (Diptera:
Culicidae) : desenvolvimento e efeito larvicida em *Aedes aegypti*
/ Franciane Rosa Miranda. – Viçosa, MG, 2019.
vi, 51f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui apêndice.

Orientador: Gustavo Ferreira Martins.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Mosquitos. 2. Insetos - Metamorfose. 3. Bioinseticidas.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia
Animal. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e
Estrutural. II. Título.

CDD 22. ed. 595.772

FRANCIANE ROSA MIRANDA

**DESENVOLVIMENTO PÓS-EMBRIONÁRIO DO INTESTINO
MÉDIO E EFEITO DA CAFEÍNA E DA BORRA DE CAFÉ EM
Aedes aegypti (DIPTERA: CULICIDAE)**

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

APROVADA: 22 de fevereiro de 2019.



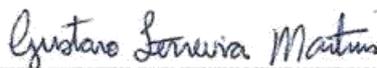
Carolina Gonçalves dos Santos



Wagner Faria Barbosa



Kenner Moraes Fernandes
(Coorientador)



Gustavo Ferreira Martins
(Orientador)

Agradecimentos

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural da UFV pela oportunidade, a Capes pela bolsa de Mestrado e ao CNPq pelo apoio financeiro;

Ao meu orientador Gustavo Ferreira Martins pela confiança e paciência;

Ao meu coorientador Kenner Morais Fernandes, por toda ajuda e amparo;

Aos Profs. José Eduardo Serrão, Jorge Abdala Dergam dos Santos, Sílvia das Graças Pompolo por permitir a utilização dos laboratórios;

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

À minha amada família, meus pais, Francisco e Rosana e minhas irmãs Flaviane e Fabiana, pelo amor, orações e apoio incondicional. Ao meu namorado Danilo, pelo companheirismo, paciência e por me incentivar sempre.

Aos meus tios e primos que sempre me apoiaram e torceram por mim. Ao meu amado avô, José Rosa (*in memoriam*), que sempre foi uma pessoa extraordinária, ao qual me inspiro todos os dias. A todos meus amigos que estiveram presente em minha caminhada, em especial a Gessica e Priscila, pelos conselhos, incentivos e orações.

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

SUMÁRIO

RESUMO	v
ABSTRACT	vi
1. Introdução.....	1
1.1. Biologia do mosquito <i>Aedes aegypti</i>	1
1.2. Intestino médio dos mosquitos.....	2
1.3. Modificações do intestino médio durante o desenvolvimento pós-embriônico	3
1.4. Formas de controle e métodos alternativos	5
2. Objetivos	6
3. Referências bibliográficas	6
Capítulo 1: Cell death and autophagy in the midgut of <i>Aedes aegypti</i> during the metamorphosis	12
Abstract	12
1. Introduction	12
2. Materials and Methods	13
2. 1. Mosquitoes.....	13
2.2. Histology	14
2.3. Immunostaining	14
2.4. Statistical analysis	14
3. Results	14
4. Discussion.....	20
5. References	21
Capítulo 2: Efeitos da cafeína e da borra de café sobre larvas do mosquito <i>Aedes aegypti</i> (Diptera: Culicidae)	25
Resumo.....	25
1. Introdução.....	25
2. Materiais e métodos	27
2.1. Mosquitos	27
2.2. Borra de café e cafeína	27
2.3. Sobrevivência.....	28
2.4. Análise comportamental.....	28
2.5. Morfologia do intestino médio.....	29
2.6. Imunomarcção	29

2.7. Análises estatísticas	30
3. Resultados e discussão	31
3.1. CAF, BCC e BCD reduzem a sobrevivência larval e o tempo de vida dos adultos de <i>A. aegypti</i>	31
3.2. CAF, BCC e BCD afetam a atividade locomotora de larvas de <i>A. aegypti</i> ..	34
3.3. O tratamento com CAF, BCC e BCD alteram a morfologia do intestino médio das larvas de <i>A. aegypti</i>	36
4. Conclusão	43
5. Referências bibliográficas	43
Apêndice 1.....	49
Apêndice 2.....	49
Conclusões gerais.....	50

RESUMO

MIRANDA, Franciane Rosa, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2019. **Desenvolvimento pós-embriônico do intestino médio e efeito da cafeína e da borra de café em *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)**. Orientador: Gustavo Ferreira Martins. Coorientador: Kenner Morais Fernandes.

O mosquito *Aedes aegypti* é o vetor de importantes arboviroses humanas, responsáveis pela alta mortalidade e morbidade humana. Esses insetos são holometábolos, com ciclo de vida dividido em quatro fases distintas. A primeira fase é composta pelos ovos, caracterizados pela sua alta resistência à dessecação, após a eclosão, temos a segunda fase que corresponde as larvas, separadas em quatro estádios. Após o quarto estádio larval forma-se as pupas, que caracteriza o início dos processos de metamorfose. A fase adulta é caracterizada pelo dimorfismo sexual, onde as fêmeas de *A. aegypti* necessitam da refeição de sangue, para maturação dos ovários e conseqüentemente a ovogênese. O intestino médio é um órgão importante no mosquito *A. aegypti*, atuando em diferentes processos fisiológicos, além de estar associado a multiplicação e transmissão de diferentes patógenos. O epitélio do intestino médio é formado por três tipos celulares: células digestivas, responsáveis pela digestão e absorção de nutrientes, células regenerativas ou células tronco, e a células enteroendócrinas. Todo o epitélio é completamente remodelado durante a metamorfose, que segue um padrão de descarte do epitélio do intestino médio larval e substituição por um novo epitélio nas pupas, que irá amadurecer formando o epitélio do adulto. O *A. aegypti* é alvo de diversos estudos relacionados ao seu controle, por ser um importante vetor. Há diferentes meios de controle do mosquito *A. aegypti*, que inclui métodos mecânicos, químicos e biológicos. O método químico, através do uso de inseticidas, tem sido o mais utilizado, porém, estes podem ser tóxicos e levar a resistência dos mosquitos. Assim, novos estudos têm sido feitos utilizando compostos naturais, com potenciais efeitos larvicidas. Compostos como a cafeína e a borra de café, tem demonstrado efeitos deletérios sobre o mosquito, podendo causar toxicidade, bloqueando o desenvolvimento larval, sendo um método promissor para o controle alternativo de *A. aegypti*.

ABSTRACT

MIRANDA, Franciane Rosa, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2019. **Post-embryonic development of the midgut and effect of caffeine and coffee grounds on *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae).** Advisor: Gustavo Ferreira Martins. Co-advisor: Kenner Morais Fernandes.

The *Aedes aegypti* mosquito is the vector of important human arboviruses responsible for high human mortality and morbidity. These insects are holometabolous, with life cycle divided in four distinct phases. At first, there are the eggs, characterized by their high resistance to desiccation, after hatching; the eggs originate the larvae, divided to in four stages. After the fourth larval stage, the pupae emerge, which characterizes the beginning of metamorphosis. The adult have sexual dimorphism, where the females require a blood meal, for maturation of the ovaries and consequently oogenesis. The midgut plays an important role in the *A. aegypti* mosquito, acting in different physiological processes, besides being associated with the replication and transmission of different pathogens. Three cell types form the midgut epithelium: digestive cells, regenerative cells or stem cells, and enteroendocrine cells. The entire epithelium is completely remodeled during metamorphosis, which follows a pattern of discarding of the larval midgut epithelium and replacement by a new epithelium in the pupae, which will mature to form the adult epithelium. *A. aegypti* is the target of several studies related to its control, being an important vector. There are different methods for controlling the mosquito, which includes mechanical, chemical and biological methods. The chemical method, through the use of insecticides, has been the most widely used; however, these can be toxic and lead to mosquito resistance. Thus, new studies have been done using natural compounds, with potential larvicidal effects. Compounds such as caffeine and used coffee grounds have shown deleterious effects on the mosquito, which can cause toxicity, blocking development before reaching the adult stage, showing that this compound has larvicidal activity, promising for the alternative control of *A. aegypti*.

1. Introdução

1.1. Biologia do mosquito *Aedes aegypti*

O *Aedes aegypti* apresenta grande interesse médico, que está relacionado com a sua capacidade vetorial de importantes arboviroses humanas, como a dengue, a febre amarela, a febre chikungunya e a transmissão do vírus Zika, que causam altos índices de mortalidade e morbidade humana (Morrison et al., 2008; Powell & Tabachnick, 2013). Este mosquito pertence à Ordem Diptera, família Culicidae e possui ampla distribuição, sendo encontrado em áreas urbanas por todo o mundo (Consoli & Oliveira, 1994; Powell & Tabachnick, 2013). Os adultos exibem hábitos antropofílicos e comportamento sinantrópico, associado à domesticidade, reproduzindo em habitats criados pelo homem, como também apresentam variações morfológicas e fisiológicas que lhes permitem utilizar uma ampla variedade de substratos como fonte de nutrientes essenciais à sua sobrevivência (Tabachnick & Powell, 1990; Silva et al., 2004; Powell & Tabachnick, 2013).

Os dípteros desenvolvem através de metamorfose completa (holometábolos), com ciclo de vida dividido em quatro principais fases: ovos, larvas (quatro estágios larvários), pupas e adultos (Consoli & Oliveira, 1994). Os ovos possuem alta resistência à dessecação, permitindo que permaneçam viáveis por longos períodos, além de auxiliar na dispersão em grandes distâncias (Powell & Tabachnick, 2013; Carvalho & Moreira, 2017). Após a eclosão dos ovos, se inicia a fase larval, separada em quatro estádios (L1, L2, L3 e L4), denominados instares (Consoli & Oliveira, 1994; Bernick et al., 2008). No final do quarto instar, dá início a fase de pupa, onde se iniciam os processos de metamorfose do estágio larval para adulto (Consoli & Oliveira, 1994; Moffett & Moffett, 2005; Carvalho & Moreira, 2017).

A fase adulta é caracterizada pelo dimorfismo sexual, marcado pela morfologia externa e interna. Os machos e as fêmeas adultos de *A. aegypti* alimentam-se de substâncias açucaradas, principalmente de origem vegetal, e somente as fêmeas alimentam-se de sangue (hematófago), necessário para maturação dos ovários e consequentemente a ovogênese (Rudin & Hecker, 1976; Billingsley, 1990; Carvalho & Moreira, 2017). O mosquito adulto vive cerca de 30 dias, onde as fêmeas copulam apenas uma vez, armazenando os espermatozoides em sua spermateca, realizando várias posturas ao longo de sua vida, podendo colocar aproximadamente 100 ovos por ciclo gonotrófico (Abreu et al., 2015; Carvalho & Moreira, 2017).

1.2. Intestino médio dos mosquitos

Para insetos holometábolos como o *A. aegypti*, o ciclo de vida caracteriza-se por modificações morfológicas e estruturais nas diferentes fases do desenvolvimento, que refletem na estrutura e função do intestino médio (Hakim et al., 2010). O intestino médio tem papel central em diversos aspectos da biologia do inseto, atuando nos processos fisiológicos, como também associado a multiplicação e transmissão de diferentes patógenos, desempenhando função importante na susceptibilidade à infecção nos insetos adultos (Billingsley, 1990; Wang et al., 2001).

O intestino médio é formado por um epitélio simples colunar e duas camadas musculares, sendo o principal local de digestão e absorção de nutrientes, além de participar dos processos de regulação iônica e osmótica (Hecker, 1977; Billingsley, 1990; Clark et al., 2005). O epitélio do intestino médio de *A. aegypti* cresce por dois mecanismos, caracterizados pelo aumento do tamanho das células ou substituição completa das células diferenciadas por uma nova população de células (Moffett & Moffett, 2005; Ray et al., 2009). O epitélio é composto por três tipos celulares, que se diferenciam em função, localização e distribuição, e podem ser denominadas: células digestivas, células regenerativas e células enteroendócrinas (Hecker et al., 1974; Hecker, 1977; Billingsley, 1990).

As células digestivas são colunares com microvilosidades na região apical, sendo responsáveis pela produção de enzimas digestivas, absorção dos produtos digeridos da alimentação e pela formação da matriz peritrófica (Rudin & Hecker, 1979; Terra, 1990; Fernandes et al., 2014). A matriz peritrófica tem como função a proteção física e contra patógenos do epitélio, atuando como um filtro semipermeável para proteínas do sangue, enzimas digestivas e diversas moléculas, e impedindo a obstrução das microvilosidades pelo material luminal (Hecker, 1977; Billingsley, 1990).

As células regenerativas, também chamadas de células-tronco, são indiferenciadas, encontradas na região anterior e posterior do intestino médio, localizadas entre as células digestivas, podendo estar isoladas ou em pares. São células pequenas, posicionadas na região basal do epitélio, com citoplasma eletrodense sem grânulos de secreção, e núcleos com cromatina condensada, sendo fundamentais para a renovação do epitélio digestivo (Hecker, 1977; Brown et al., 1985; Billingsley, 1990). Em *A. aegypti*, células em mitose estão presentes tanto em imaturos como nos adultos recém-emergidos, sendo concentradas em regiões específicas do intestino médio. A proliferação tem início na região anterior do intestino médio das larvas de quarto instar e termina na região

posterior das pupas 48 horas. Em adultos essas células apresentam em menor número e estão localizadas no final da região posterior (Ray et al., 2009; Fernandes et al., 2014).

As células enteroendócrinas estão localizadas no intestino médio posterior, na porção basal do epitélio, e cerca de 25% dessas células são encontradas adjacentes as células regenerativas, variando seu número ao longo do desenvolvimento (Billingsley, 1990; Fernandes et al., 2014). Foram descritos para *A. aegypti*, pelo menos dois tipos de células endócrinas, com base em suas densidades citoplasmáticas, sendo as células claras e as células escuras (Hecker, 1977; Billingsley, 1990). Ambos os tipos celulares podem ser subdivididos em células abertas, localizadas preferencialmente na superfície luminal, a qual são afiladas na base e dilatadas na região apical, onde encontra-se as microvilosidades, e as células fechadas, que são restritas à base do epitélio e não apresentam microvilosidades na região apical (Brown et al., 1985; Billingsley, 1990).

Estudos mostram que há aproximadamente 500 células endócrinas no intestino médio de *A. aegypti*, e devido a abundância desse tipo celular ele é considerado o maior órgão endócrino do mosquito (Brown et al., 1985; Veenstra et al., 1995; Moffett & Moffett, 2005). Essas células apresentam positividade para dois hormônios peptídicos encontrados em mamíferos, o polipeptídeo pancreático e o FMRFamida (fenilalanina-metionina-arginina-fenilalanina-amida) (Brown et al., 1986; Moffett & Moffett, 2005). Aproximadamente 50% das células endócrinas contém ambos os hormônios, localizados em vesículas no interior das células claras e escuras, sugerindo que eles são secretados e liberados localmente, sendo eficazes em células intestinais proximais, tendo assim uma função parácrina (Brown et al., 1986; Veenstra et al., 1995), podendo estar envolvidas na motilidade intestinal, na secreção de enzimas digestivas e na maturação dos ovócitos (Brown et al., 1985; Moffett & Moffett, 2005).

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

Durante a metamorfose, o trato gastrointestinal é completamente remodelado, atendendo às diferentes necessidades das larvas e dos mosquitos adultos, onde células novas são formadas, algumas se diferenciam e outras morrem (Buszczak & Segraves, 2000). Essas modificações estão ligadas às alterações na dieta, que nas larvas é baseada em matéria orgânica e microorganismos e nos adultos passa a ser fluidos vegetais e sangue. O processo de metamorfose, que inicia logo após a última muda larval, segue um padrão de descarte do epitélio do intestino médio larval e substituição por um novo

epitélio nas pupas, que irá amadurecer formando o epitélio do adulto (Cruz-Landim & Costa-Leonardo, 1996; Ray et al., 2009; Fernandes et al., 2014).

Durante a metamorfose, o epitélio do intestino médio sofre histólise, onde nas larvas ele é quase todo substituído e posteriormente reorganizado pelo processo de diferenciação e proliferação das células regenerativas. A histólise do intestino médio começa um pouco antes da ecdise, onde partes das células larvais podem ser liberadas para o lúmen ou sofrer apoptose, caracterizado como “morte celular programada” dependente de caspase, permitindo que seus nutrientes sejam armazenados e recapturado pelo epitélio da pré-pupa (Nishimura & Ray, 2003; Hakim et al., 2010; Fernandes et al., 2014).

Nas pupas o epitélio é renovado continuamente pela expansão de células em diferenciação, sugerindo que essas se dividem apenas até a fase inicial da pupação (Fernandes et al., 2014). As células em diferenciação no epitélio das pupas formarão as novas células digestivas e enteroendócrinas nos adultos. Essas células não sofrem mitose no intestino médio do adulto, atuando assim no processo de substituição das células epiteliais que são perdidas durante a metamorfose (Hakim et al., 2010; Fernandes et al., 2014).

O processo de apoptose e autofagia são importantes na remodelação e formação de um novo epitélio durante a metamorfose. Ambos processos intervêm ativamente no processo de degeneração do epitélio do intestino médio das larvas (Lockshin & Zakeri, 2004; Franzetti et al., 2012). A apoptose é um processo que leva a morte por fragmentação da membrana nuclear da célula, sendo regulada pelo próprio sistema endócrino do inseto, como também por agentes infecciosos e parasitários (Franzetti et al., 2012). Está relacionada a fatores de ativação da via de caspase, que constituem uma família de proteases, presentes na maioria das células como zimogênios inativos, que tornam ativos com uma sequência sinal de morte, atuando como iniciadores e executores da apoptose (Lockshin & Zakeri, 2004; Grivicich et al., 2007; Cooper et al., 2009). Esse processo desempenha um papel fundamental na remodelação, na eliminação de células que contêm patógenos intracelulares, células com o DNA danificado e que estão proliferando inadequadamente, contribuindo para o desenvolvimento do organismo e homeostase dos tecidos adultos (Wu et al., 2006; Hakim et al., 2010; Franzetti et al., 2012).

Outro processo importante no mecanismo de proteção é a autofagia, onde a célula envolve e digere parte do citoplasma em vesículas que se fundem aos lisossomos (Lockshin & Zakeri, 2004;). O processo de autofagia permite que as células reciclem

componentes celulares em degeneração e forneçam nutrientes para o animal durante o período de fome, atuando também durante os ciclos de desenvolvimento e maturação dos ovos no mosquito. Em muitos tecidos a autofagia é um meio que reduz a massa celular antes da apoptose, onde sua atividade é ativada na fase final da larva e atinge um nível elevado na pré-pupa (Lockshin & Zakeri, 2004; Denton et al., 2009; Franzetti et al., 2012).

1.4. Formas de controle e métodos alternativos

O combate às arboviroses humanas inclui o controle do inseto vetor, que pode ser feito tanto pela eliminação de criadouros, impedindo o vetor ao acesso a água, necessária para a postura dos ovos, como o uso de compostos químicos ou biológicos como larvicidas (Coelho et al., 2009; Allan, 2011; Alphey et al., 2013). Os inseticidas e piretróides organofosforados neurotóxicos, como o imidaclopride e o spinosad, ainda são os principais meios de controle de vetores, por possuírem ação rápida e eficaz, porém, podem ser tóxicos para organismos não-alvo (Tomé et al., 2014, 2015a; Brandt et al., 2016), além de ocasionar aumento nos níveis de resistência em populações de mosquitos, causando problemas no controle desses vetores (Braga & Valle, 2007; Lima et al., 2011). Com isso, são necessárias formas alternativas de controle do mosquito, que diminuam a toxicidade e os impactos ambientais, sendo potencialmente capazes de eliminar o mosquito (Laranja et al., 2003; Silva et al., 2004; Barreto et al., 2006; Procópio et al., 2015).

Formas alternativas de controle como produtos naturais oriundos de plantas tem se destacado, sugerindo que diversas plantas possuem substâncias com propriedades larvicidas. Essas substâncias interferem no desenvolvimento das larvas, impedindo a formação de adultos, possibilitando sua utilização no auxílio do controle alternativo de *A. aegypti*, além de ser um método de menor toxicidade e diminuição nos impactos ambientais causados pelos inseticidas (Cavalcanti et al., 2004; Coelho et al., 2009).

Diferentes extratos de plantas e substâncias de uso doméstico têm sido utilizados em estudos toxicológicos em vários organismos, incluindo o mosquito *A. aegypti*, como a cafeína, produto consumido pelo homem há vários séculos, sendo encontrada em chás, guaraná e no café. Estudos tem mostrado que a cafeína causa efeitos tóxicos nas larvas de *A. aegypti*, interferindo no desenvolvimento, impedindo que atinja a fase adulta (Laranja et al., 2003; Guirado & Bicudo, 2016), reduzindo significativamente a produtividade de adultos e diminuindo a taxa de oviposição (Laranja et al., 2006). Além

da cafeína, a borra de café (resíduo que fica após o café ser filtrado) é um produto de descarte, sendo livre de custo, é encontrada em todo mundo sendo de fácil acesso para toda a população. Em estudos utilizando a borra de café, tem demonstrado efeitos deletérios sobre o mosquito *A. aegypti*, afetando a eclosão de ovos, aumentando a mortalidade na fase larval, e diminuindo ou induzindo um atraso no desenvolvimento, limitando a produção de adultos, e diminuindo a longevidade destes (Laranja et al., 2003; Guirado & Bicudo, 2007). Além da cafeína, a borra de café contém outros compostos como aminoácidos, óleos essenciais e outros componentes, tais como taninos, ácidos e potássio, que podem causar toxicidade, estando envolvidos nos efeitos prejudiciais sobre *A. aegypti* (Laranja et al., 2003; Guirado & Bicudo, 2007; 2016), mostrando que esse composto tem atividade larvicida promissor para o controle alternativo do mosquito.

A presente dissertação é dividida em duas partes, na primeira parte demonstramos as principais modificações do intestino médio durante o desenvolvimento das larvas de 3º instar até o adulto recém emergido. Na outra parte, demonstramos os efeitos da cafeína e das borras de café na fase larval de *A. aegypti*, podendo ser um importante auxiliar no controle alternativo desse mosquito.

2. Objetivos

- Estudar as modificações do intestino médio de *A. aegypti* durante o desenvolvimento das larvas de 3º instar até o adulto recém-emergido, analisando a proliferação celular e o processo de morte.

- Estudar a sobrevivência da fase larval até a fase adulta e o comportamento dos mosquitos *A. aegypti*, submetidos a diferentes concentrações de cafeína e borras de café comum e descafeinada.

- Descrever as alterações morfológicas do intestino médio das larvas de *A. aegypti* submetidos a diferentes concentrações de cafeína e borras de café.

3. Referências bibliográficas

Abreu, F. V. S. De, Morais, M. M., Ribeiro, S. P., & Eiras, Á. E. Influence of breeding site availability on the oviposition behaviour of *Aedes aegypti*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 110, n. 5, p. 669–676, 2015.

Allan, S. A. Susceptibility of adult mosquitoes to insecticides in aqueous sucrose baits. Journal of Vector Ecology, v. 36, n. 1, p. 59–67, 2011.

Alphey, L., McKemey, A., Nimmo, D., Oviedo, M. N., Lacroix, R., Matzen, K., & Beech, C. Genetic control of *Aedes* mosquitoes. *Pathogens and Global Health*, v. 107, n. 4, p. 170–179, 2013.

Barreto, C. F., Cavasin, G. M., Silva, H. H. G. D., & Silva, I. G. D. Estudo das alterações morfo-histológicas em larvas de *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) submetidas ao extrato bruto etanólico de *Sapindus saponaria* Lin (Sapindaceae). *Revista De Patologia Tropical*, v. 35, n. 1, p. 37–57, 2006.

Bauer, P., Rudin, W., & Hecker, H. Ultrastructural changes in midgut cells of female *Aedes aegypti* L. (Insecta, Diptera) after starvation or sugar diet. *Cell and Tissue Research*, v. 177, n. 2, p. 215–219, 1977.

Bernick, E. P., Moffett, S. B., & Moffett, D. F. Organization, ultrastructure, and development of midgut visceral muscle in larval *Aedes aegypti*. *Tissue and Cell*, v. 39, n. 4, p. 277–292, 2007.

Bernick, E. P., Moffett, S. B., & Moffett, D. F. Ultrastructure and morphology of midgut visceral muscle in early pupal *Aedes aegypti* mosquitoes. *Tissue and Cell*, v. 40, n. 2, p. 127–141, 2008.

Billingsley, P. F. The midgut ultrastructure of hematophagous insects. *Annual Review of Entomology*, v. 35, n. 1, p. 219–248, 1990.

Braga, I. A., & Valle, D. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, v. 16, n. 4, p. 279–293, 2007.

Brandt, A., Gorenflo, A., Siede, R., Meixner, M., & Büchler, R. The neonicotinoids thiacloprid, imidacloprid, and clothianidin affect the immunocompetence of honeybees (*Apis mellifera* L.). *Journal of Insect Physiology*, v. 86, p. 40–47, 2016.

Brown, M. R., Crim, J. W., & Leat, A. O. FMRFamide and pancreatic polypeptide like immunoreactivity of endocrine cells in the midgut of a mosquito. *Tissue and Cell*, v. 18, n. 3, p. 419–428, 1986.

Brown, M. R., Raikhel, A. S., & Lea, A. O. Ultrastructure of midgut endocrine cells in the adult mosquito, *Aedes aegypti*. *Tissue and Cell*, v. 17, n. 5, p. 709–721, 1985.

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

Buszczak, M., & Segraves, W. A. Insect metamorphosis: out with the old, in with the new. *Current Biology*, v. 10, n. 22, p. 830–833, 2000.

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

Cavalcanti, E. S. B., Morais, S. M. D., Lima, M. A. A., & Santana, E. W. P. Larvicidal activity of essential oils from Brazilian plants against *Aedes aegypti* L. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 99, n. 5, p. 541–544, 2004.

Clark, T. M., Hutchinson, M. J., Huegel, K. L., Moffett, S. B., & Moffett, D. F. Additional morphological and physiological heterogeneity within the midgut of larval *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) revealed by histology, electrophysiology, and effects of *Bacillus thuringiensis* endotoxin. *Tissue and Cell*, v. 37, n. 6, p. 457–468, 2005.

Coelho, J. S., Santos, N. D., Napoleão, T. H., Gomes, F. S., Ferreira, R. S., Zingali, R. B. & Paiva, P. M. Effect of *Moringa oleifera* lectin on development and mortality of *Aedes aegypti* larvae. *Chemosphere*, v. 77, n. 7, p. 934–938, 2009.

Consoli, R. A. G.; Oliveira, R. L. De. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. In: SciELO. [s.l: s.n.]. v. 11p. 228p. 1994.

Cooper, D. M., Granville, D. J., & Lowenberger, C. The insect caspases. *Apoptosis*, v. 14, n. 3, p. 247–256, 2009.

Cruz-Landim, C., & Costa-Leonardo, A. M. Ultrastructure of cell renewal in the midgut of termites. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 91, n. 1, p. 129–130, 1996.

Denton, D., Shrivage, B., Simin, R., Mills, K., Berry, D. L., Baehrecke, E. H., & Kumar, S. Autophagy, not apoptosis, is essential for midgut cell death in *Drosophila*. *Current Biology*, v. 19, n. 20, p. 1741–1746, 2009.

Fernandes, K. M., Neves, C. A., Serrão, J. E., & Martins, G. F. *Aedes aegypti* midgut remodeling during metamorphosis. *Parasitology International*, v. 63, n. 3, p. 506–512, 2014.

Franzetti, E., Huang, Z. J., Shi, Y. X., Xie, K., Deng, X. J., Li, J. P., Li, Q. R., Yang, W. Y., Zeng, W. N., Casartelli, M., Deng, H. M., Cappellozza, S., Grimaldi, A., Xia, Q., Feng, Q., Cao, Y., & Tettamanti, G. Autophagy precedes apoptosis during the remodeling of silkworm larval midgut. *Apoptosis*, v. 17, n. 3, p. 305–324, 2012.

Furtado, R. F., Lima, M. G. De, Andrade Neto, M., Bezerra, J. N., & Silva, M. G. D. V. Atividade larvívica de óleos essenciais contra *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). *Neotropical Entomology*, v. 34, n. 5, p. 843–847, 2005.

Gooding, R. H. The digestive processes of haematophagous insects: IV. Secretion of trypsin by *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *The Canadian Entomologist*, v. 105, n. 4, p. 599–603, 1973.

Grivicich, I., Regner, A., & Rocha, A. B. D. Morte celular por apoptose. *Revista Brasileira de Cancerologia*, v. 53, n. 3, p. 335–343, 2007.

Guirado, M. M., & Bicudo, H. E. M. de C. Effect of used coffee grounds on larval mortality of *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae): suspension concentration and age versus efficacy. *BioAssay*, v. 2, n. 0, p. 1–7, 2007.

Guirado, M. M., & Bicudo, H. E. M. de C. Attractiveness of bioinsecticides caffeine and used coffee grounds in the choice of oviposition site by *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *International Journal of Mosquito Research IJMR*, v. 47, n. 3, p. 47–51, 2016.

Hakim, R. S., Baldwin, K., & Smagghe, G. Regulation of midgut growth, development, and metamorphosis. *Annual Review of Entomology*, v. 55, n. 1, p. 593–608, 2010.

Hecker, H., Brun, R., Reinhardt, C., & Burri, P. H. Morphometric analysis of the midgut of female *Aedes aegypti* (L.) (Insecta, Diptera) under various physiological conditions. *Cell and Tissue Research*, v. 152, n. 1, p. 31–49, 1974.

Hecker, H. Structure and function of midgut epithelial cells in culicidae mosquitoes (insecta, diptera). *Cell and Tissue Research*, v. 184, n. 3, p. 321–341, 1977.

Hecker, H., & Rudin, W. Morphometric parameters of the midgut cells of *Aedes aegypti* L. (Insecta, Diptera) under various conditions. *Cell and Tissue Research*, v. 219, n. 3, p. 619–627, 1981.

Laranja, A. T., Manzato, A. J., & Bicudo, H. E. M. D. de C. Caffeine effect on mortality and oviposition in successive generations of *Aedes aegypti*. *Revista de Saude Publica*, v. 40, n. 6, p. 1112–1117, 2006.

Laranja, A. T., Manzatto, A. J., & Bicudo, H. E. M. D. de C. Effects of caffeine and used coffee grounds on biological features of *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) and their possible use in alternative control. *Genetics and Molecular Biology*, v. 26, n. 4, p. 419–429, 2003.

Lehane, M. J. Peritrophic matrix structure and function. *Annual Review of Entomology*, v. 42, n. 1, p. 525–550, 1997.

Lima, E. P., Paiva, M. H. S., Araújo, A. P., Silva, É. V. G., Silva, U. M., Oliveira, L. N., Santana, A. E. G., Barbosa, C. N., Neto, C. C. P., Goulart, M. O., Wilding, C. S., Ayres, C. F. J., & Santos, M. A. V. de M. Insecticide resistance in *Aedes aegypti* populations from Ceará, Brazil. *Parasites and Vectors*, v. 4, n. 1, p. 1–12, 2011.

Lockshin, R. A., & Zakeri, Z. Apoptosis, autophagy, and more. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, v. 36, n. 12, p. 2405–2419, 2004.

Moffett, S. B., & Moffett, D. F. 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*. *Journal of Insect Science*, v. 5, n. 1, 2005.

Morrison, A. C., Zielinski-Gutierrez, E., Scott, T. W., & Rosenberg, R. Defining challenges and proposing solutions for control of the virus vector *Aedes aegypti*. *PLoS Medicine*, v. 5, n. 3, p. e68, 2008.

Nishiura J. T., Ho P., Ray K. Methoprene interferes with mosquito midgut remodeling during metamorphosis. *Journal of Medical Entomology*, v. 40, n. 4, p. 498–507, 2003.

Pólo, A. M. Efeito da cafeína no desenvolvimento de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): o significado biológico das alterações do padrão de síntese de esterases. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, [s.l.] 2014.

Powell, J. R., & Tabachnick, W. J. History of domestication and spread of *Aedes aegypti*-A Review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 108, n. October, p. 11–17, 2013.

Procópio, T. F., Fernandes, K. M., Pontual, E. V., Ximenes, R. M., Oliveira, A. R. C., Souza, C. de S., Melo, A. M. M. A., Navarro, D. M. A. F., Paiva, P. M. G., Martins, G. F., & Napoleão, T. H. *Schinus terebinthifolius* leaf extract causes midgut damage, interfering with survival and development of *Aedes aegypti* larvae. *PLoS ONE*, v. 10, n. 5, p. 1–19, 2015.

Ray, K., Mercedes, M., Chan, D., Choi, C. Y., & Nishiura, J. T. Growth and differentiation of the larval mosquito midgut. *Journal of Insect Science*, v. 9, n. 55, p. 1–13, 2009.

Rudin, W., & Hecker, H. Morphometric comparison of the midgut epithelial cells in male and female *Aedes aegypti* L. (Insecta, Diptera). *Tissue and Cell*, v. 8, n. 3, p. 459–470, 1976.

Rudin, W., & Hecker, H. Functional morphology of the midgut of *Aedes aegypti* L. (Insecta, Diptera) during blood digestion. *Cell and Tissue Research*, v. 200, n. 2, p. 193–203, 1979.

Satho, T., Dieng, H., Ahmad, M. H. I., Ellias, S. B., Hassan, A. A., Abang, F., Ghani, I. A., Miake, F., Ahmad, H., Fukumitsu, Y., Zuharah, W. F., Majid, A. H. A., Kassim, N. F. A., Hashim, N. A., Ajibola, O. O., Al-Khayyat, F. A., & Nolasco-Hipoliot, C. Coffee and its waste repel gravid *Aedes albopictus* females and inhibit the development of their embryos. *Parasites and Vectors*, v. 8, n. 1, p. 1–15, 2015.

Silva, H. H. G. D., Silva, I. G. D., Santos, R. M. G. D., Rodrigues Filho, E., & Elias, C. N. Larvicidal activity of tannins isolated of *Magonia pubescens* St. Hil. (Sapindaceae) against *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 37, n. 5, p. 396–399, 2004.

Tabachnick, W. J., & Powell, J. R. A worldwide survey of genetic variation in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Genetical Research*, v. 34, n. 3, p. 215–229, 1979.

Terra, W. R. Evolution of digestive systems of insects. *Annual Review of Entomology*, v. 35, n. 1, p. 181–200, 1990.

Tomé, H. V., Pascini, T. V., Dângelo, R. A., Guedes, R. N., & Martins, G. F. Survival and swimming behavior of insecticide-exposed larvae and pupae of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. *Parasites and Vectors*, v. 7, n. 1, p. 1–9, 2014.

Tomé, H. V. V., Barbosa, W. F., Corrêa, A. S., Gontijo, L. M., Martins, G. F., & Guedes, R. N. C. Reduced-risk insecticides in Neotropical stingless bee species: impact on survival and activity. *Annals of Applied Biology*, v. 167, n. 2, p. 186–196, 2015a.

Tomé, H. V. V., Barbosa, W. F., Martins, G. F., & Guedes, R. N. C. Spinosad in the native stingless bee *Melipona quadrifasciata*: regrettable non-target toxicity of a bioinsecticide. *Chemosphere*, v. 124, n. 1, p. 103–109, 2015b.

Veenstra, J. A., Lau, G.W., Agrícola, H. J., & Petzel, D. H. Immunohistological localization of regulatory peptides in the midgut of the female mosquito *Aedes aegypti*. *Histochemistry and Cell Biology*, v. 104, n. 5, p. 337-347, 1995.

Wang, P., Conrad, J. T., & Mohammed, S. Localization of midgut-specific protein antigens from *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) using monoclonal antibodies. *Journal of Medical Entomology*, v. 38, n. 2, p. 223–230, 2001.

Wu, Y., Parthasarathy, R., Bai, H., & Palli, S. R. Mechanisms of midgut remodeling: juvenile hormone analog methoprene blocks midgut metamorphosis by modulating ecdysone action. *Mechanisms of Development*, v. 123, n. 7, p. 530–547, 2006.

Capítulo 1

Cell death and autophagy in the midgut of *Aedes aegypti* during the metamorphosis

Abstract

The midgut of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) has a single layered epithelium and two external muscle layers. The epithelium is formed by digestive (enterocytes), regenerative (stem cells), and enteroendocrine cells. During the *A. aegypti* metamorphosis, there is an extensive cell renew in the larval midgut, with high digestive cell apoptosis and regenerative cell proliferation and differentiation. In the present work, we describe the morphological changes that occur during the midgut metamorphosis, focusing in the autophagy, apoptosis and cell proliferation processes. Autophagy precedes apoptosis, starting at fourth instar larvae (24 to 48h after ecdysis), but the two processes occur simultaneously in the pupae during metamorphosis. Cell proliferation and enteroendocrine FMRF-positive cells occur in all stages of development. Data suggest that autophagy plays an essential role in the degeneration of the midgut epithelium during the metamorphosis of *A. aegypti* and may be responsible for apoptosis activation in digestive cells.

1. Introduction

In mosquitoes, the midgut is the main gateway for pathogens such as viruses and protozoa, being an important target organ for vector control (Hardy et al., 1983; Black et al., 2002). The midgut of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) has a simple epithelium and two external muscle layers. This epithelium is formed by digestive cells (enterocytes), regenerative (stem) cells and enteroendocrine cells (Fernandes et al., 2014).

During the *A. aegypti* metamorphosis, there is extensive tissue renew in the midgut with digestive cell death and regenerative cell proliferation and differentiation (Nishiura et al., 2003; Ray et al., 2009). In early pupae of *A. aegypti*, digestive cells have many autophagosomes, indicating a possible role of the autophagy in the midgut remodeling (Fernandes et al., 2014), likely found in some organs of other insects, including *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae) (Denton et al., 2009).

Autophagy, associated with ATG protein family expression, is the main pathway related with cell homeostasis (Mizushima et al., 2011). The ATG-1 is a serine/threonine kinase (homologous to mammalian ULK1) which complex with ATG13, ATG17, ATG29 and ATG31, triggering autophagosomes origin (Mizushima, 2010; Noda & Fujioka, 2015). Furthermore, the ATG8 (homologous to mammalian LC3) play a role in autophagosomes growth and maturation (Cao & Klionsky, 2007; Slobodkin & Elazar, 2013).

In *D. melanogaster* adults, the enteroendocrine cells die and are constantly replaced by regenerative cell proliferation and differentiation (Illa-Bochaca & Montuenga, 2006; Micchelli & Perrimon, 2006; Ohlstein & Spradling, 2006). The regenerative cells are in the quiescent stage until their activation by the Upd cytokinin release by digestive cells, which promotes the secretion of other modulator proteins (Shirai et al., 2003; Jiang et al., 2009; Jiang & Edgar, 2009; Buchon et al., 2010). In addition, the enteroendocrine cells activate the regenerative cell proliferation, being part of the *D. melanogaster* midgut homeostasis (Amcheslavsky et al., 2014).

Although the pathways related with the control of midgut remodeling in mosquitoes are not completely elucidated, cell autophagy has been reported during the methamorphosis in *Lutzomyia longipalpis* and *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) (Malta et al., 2017). Although, *A. aegypti* is an important vector of Dengue, Chikungunya and ZIKA virus the cell processes of midgut remodeling during metamorphosis need to be explored. This study evaluated the occurrence of cell death and proliferation in the midgut of *A. aegypti* during the post-embryonic development.

2. Materials and Methods

2. 1. Mosquitoes

Aedes aegypti mosquitoes (PP-Campos, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brazil) were obtained from a colony at the Departamento de Biologia Geral of the Universidade Federal de Viçosa, maintained at the at $26 \pm 3^{\circ}\text{C}$, $70 \pm 10\%$ RH and 12 h photoperiod. For the experiments were used 50 individuals of each phase, being of third (L3) and fourth (L4-24h, L4-48h, and L4-72h after ecdysis) instar larvae; white pupae (WP), female pupae 12 hours after ecdysis (P12), female pupae 24 hours after ecdysis (P24), female pupae 48 hours after ecdysis (P48), newly-emerged adult females (NE) and adults 4 days (AD).

2.2. Histology

The insects were dissected in insect saline solution (0.1 M NaCl, 20 mM KH₂PO₄ and 20 mM Na₂HPO₄) and the midguts transferred to Zamboni's fixative solution (2% paraformaldehyde containing 15% picric acid in 0.1M sodium phosphate buffer) for 2h at room temperature. The midguts (10 for each developmental stage) were dehydrated in a graded ethanol series (70, 80, 90 and 99%) and embedded in historesin (Leica). Sections (3 µm thickness) were stained with hematoxylin and eosin and analyzed with Olympus BX60 light microscope with Q-Color3 digital camera (Olympus Corp., Tokyo, Japan).

2.3. Immunostaining

The midguts (10 for each developmental stage for each antibody) were dissected as described and transferred for Zamboni's fixative solution for 2 hr, washed three times for 30-minutes each in 0.1 M sodium phosphate buffer pH 7.2 (PBS), containing 1% Triton X-100 (PBST). Then, the samples were incubated for 24 hours at 4° C with primary antibodies: anti-FMRamide (Peninsula Laboratories, Inc., San Carlos, CA, USA) (1: 500) for enteroendocrine cell detection, anti-phosphohistone H3 (PH3) (1:200) for cell proliferation, anti-LC3A/B and anti-cleaved caspase-3 (1:500) for autophagy and apoptosis, respectively. Then, the samples were washed in PBS three times (5 min each) and incubated with the secondary antibody conjugated with fluorescein-isothiocyanate (1:500) (Sigma-Aldrich Brazil Ltda., São Paulo, SP, Brazil) followed by three washes of 5 minutes each with PBS. The nucleus was stained with TO-PRO-3 (1: 1000) (Life Technologies of Brazil Ltda., São Paulo, SP, Brazil) for 30 minutes. For the negative control, primary antibodies were omitted and substituted by PBS. The whole organs were mounted in slides with Mowiol solution and analyzed with Zeiss LSM 510 confocal microscope in the Núcleo de Microscopia e Microanálise (NMM-UFV).

2.4. Statistical analysis

The counts of positive cells for the antibodies tested were submitted to analysis of variance (ANOVA) at 5% of significance and Tukey's test. Morphometric analyzes were performed using Image Pro Plus 4.0 for (Windows Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA).

3. Results

The midgut morphology of L3 and L4-24h larvae of *A. aegypti* were similar, with well-developed columnar epithelium, apical brush border and homogeneous cell cytoplasm. In some midguts, there were some apical protrusions of the digestive cells to the lumen, which were negative for apoptosis and autophagy (Figs. 1, 3 and 4).

In L4-48h, the midgut posterior features some cytoplasm vacuoles, and negative for labeling of apoptosis. In L4-72h, there was increase in the epithelium vacuolization, with some apoptotic digestive cells in the anterior midgut portion (2.2 ± 0.7 cells), but with higher amount in the muscle cells, which showed autophagy in L4-48h and L4-72h (Figs. 1, 3 and 4).

The midgut epithelium degeneration onset in the early pupae (WP), including the high epithelium vacuolization, disappearance of the apical brush border and decrease in the number of digestive cells, which are detaching from the basement membrane. The amount of apoptotic digestive cells increased in WP (13.4 ± 1.7 cells, $p < 0.05$) (Fig 2 and 3) but remained restricted to the anterior portion of the midgut, including the muscles. Autophagy also increased throughout the midgut of WP (Figs. 2 and 4).

In 12h old pupae, the midgut epithelium was a flattened layer with all three cell types, many of them apoptotic (30.4 ± 8.8 cells) and few autophagic cells (5.0 ± 1.9 cells), mainly in the posterior midgut (Fig. 2, 3 and 4).

Also in the 24h old pupae, the number of caspase-3-positive cells decreased drastically (1.2 ± 1.7 cells) and they were not found in the 48h old pupae, adults newly emerged, and adults (Figs. 2 and 3). The number of autophagic cells reduced in the 48h old pupae and were not found in adult mosquitos (Figs. 2 and 4).

The proliferating cells (PH3-positive) were found in higher numbers in L3 (56.7 ± 18.7 cells) and L4-24h (41.6 ± 13.5 cells), and they decreased in L4-48h (13.0 ± 2.6 cells), and L4-72h (4.5 ± 0.8 cells), whereas during the pupal stage, the number of proliferating cells was similar (WP: 18.0 ± 12.3 , P24: 17.3 ± 5.4 and P48: 24.5 ± 11.5 cells, $p < 0.05$) (Figs. 5A and B). However, these cells were found in the anterior midgut portion in WP and in the posterior portion in P12h, P24h and P48h. In addition, PH3-positive cells were found in the posterior midgut region of 4-d old adults, but in low number (1.3 ± 1.2 cells, $p < 0.05$) (Figs. 5A and B).

FMRF-positive cells were found only in the posterior midgut with similar number in larvae (L3: 46.9 ± 23.8 , L4-24h: 42.7 ± 15.5 , L4-48h: 32.4 ± 12.6 and L4-72h: 33.7 ± 10.3 cells) and early pupae (27.3 ± 11.1 cells), and they decreased in the 12h old

pupae (9.0 ± 3.5 cells, $p < 0.05$). Then the number of these cells increased gradually until adult (NE: 106.0 ± 7.7 and AD: 135.5 ± 7.1 cells, $p < 0.05$) (Fig. 6A and B).

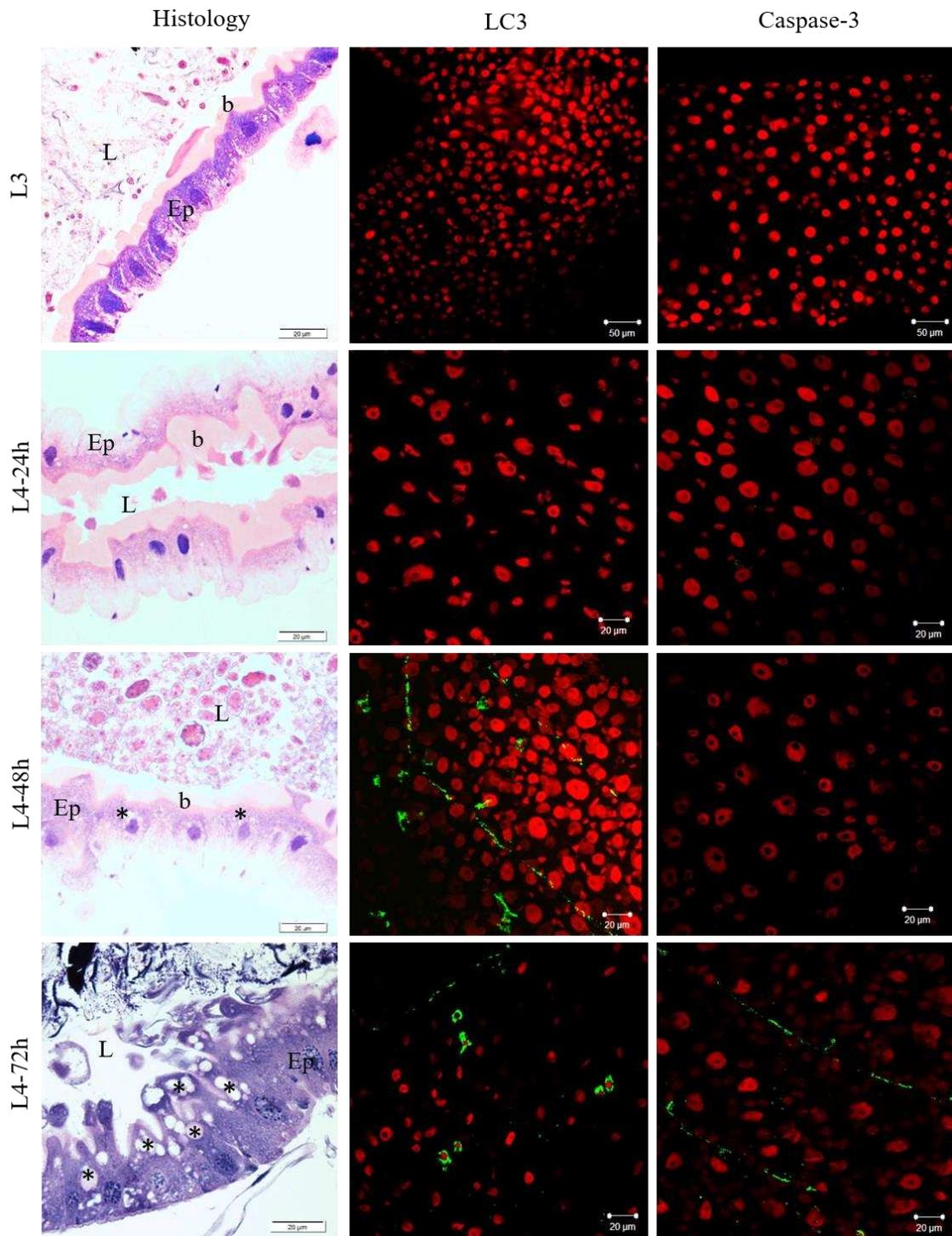


Fig. 1. Midgut of *A. aegypti* larvae. Histology and immunostaining for caspase-3 and LC3 in the midgut of L3, L4-24h, L4-48h and L4-72h of *A. aegypti*. **Ep**: epithelium; **L**: lumen; **b**: striated edge; *****: vacuoles. Green: caspase-3-positive and LC3-positive cells; Red: nuclei stained with TO-PRO-3.

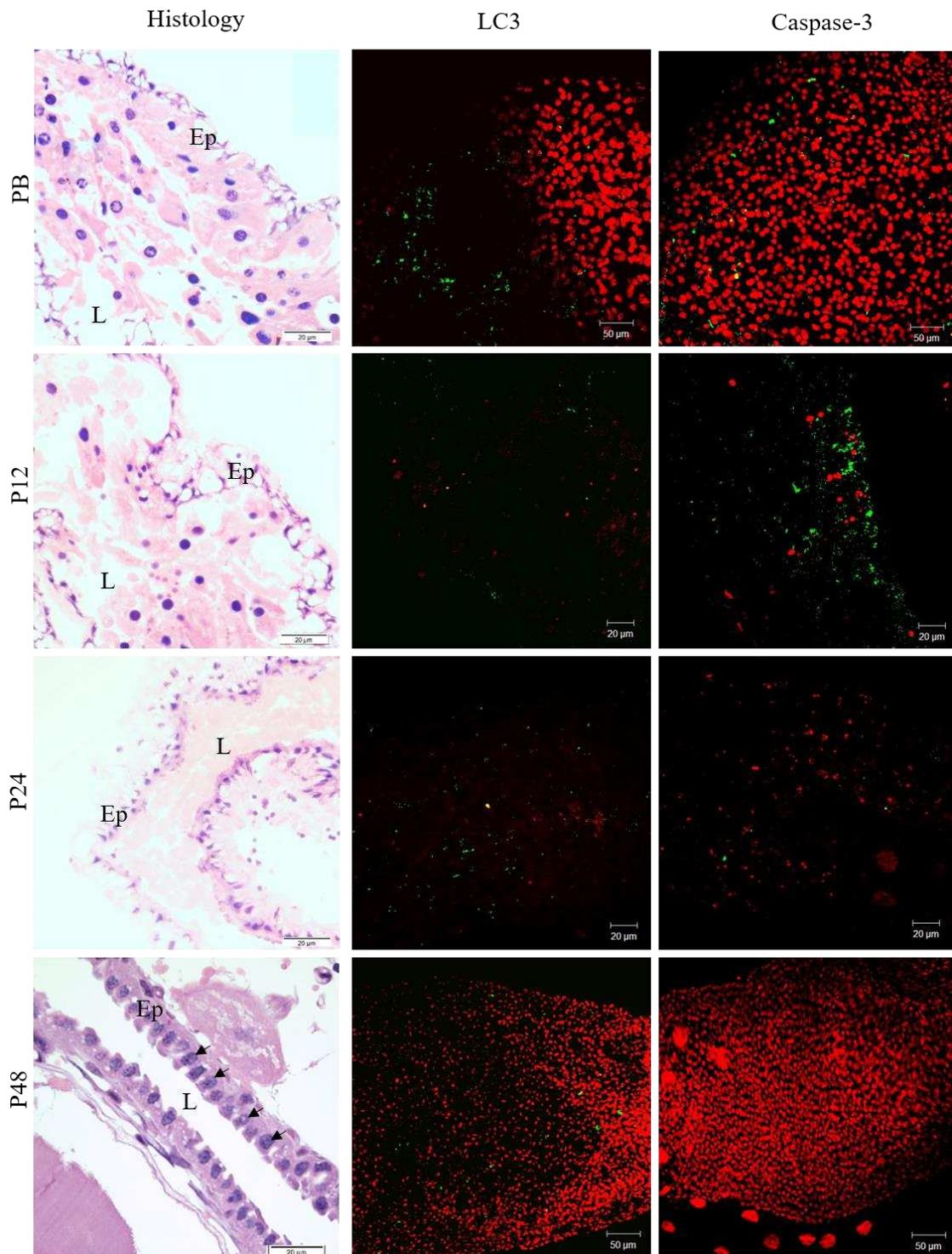


Fig. 2. Midgut of *A. aegypti* pupae. Histology and immunostaining for caspase-3 and LC3 in the midgut of WP, P12, P24 and P48 of *A. aegypti*. **Ep:** epithelium; **L:** lumen; **arrows:** nuclei. Green: caspase-3-positive and LC3-positive cells; Red: nuclei stained with TO-PRO-3.

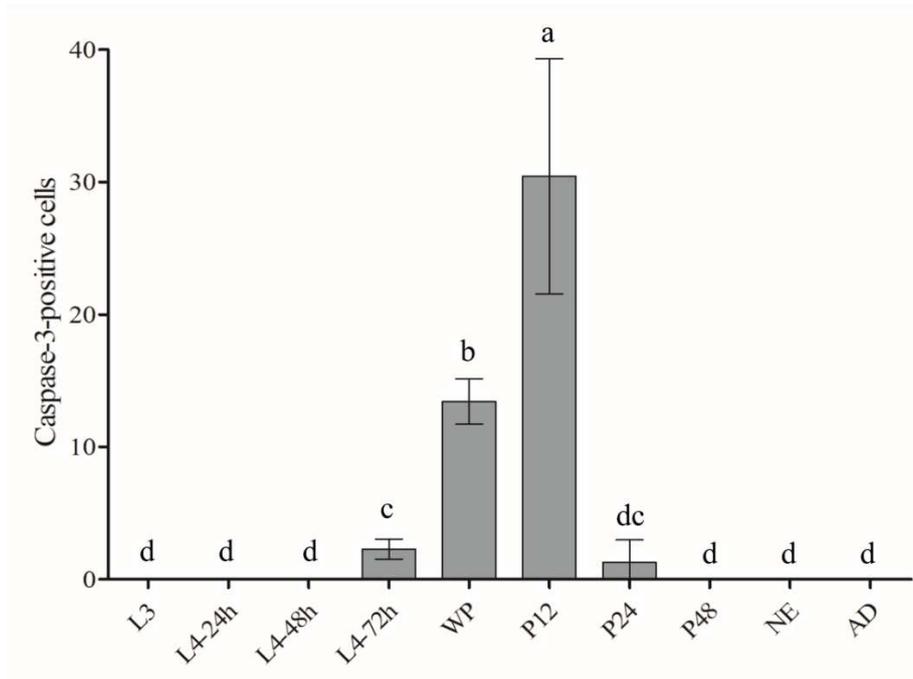


Fig. 3. Number of caspase-3-positive cells in the midgut of L3, L4-24h, L4-48h, L4-72h, WP, P12, P24, P48, NE and AD of *A. aegypti*. Mean and standard deviation (\pm SD) are shown (bars). Different letters indicate significant differences based on Tukey's HSD test ($p < 0.05$).

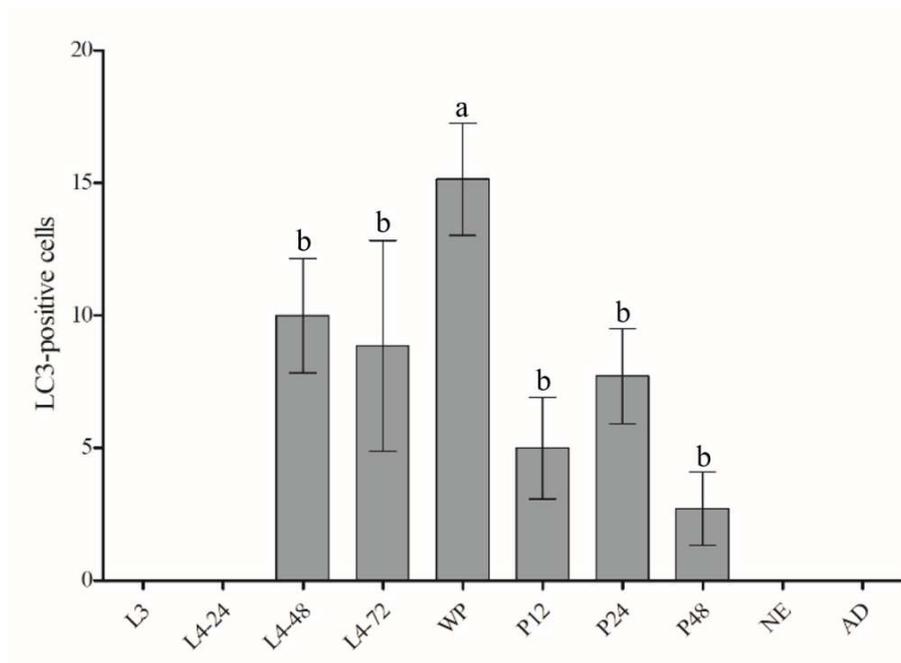


Fig. 4. Number of LC3-positive cells in the midgut of L3, L4-24h, L4-48h, L4-72h, WP, P12, P24, P48, NE and AD of *A. aegypti*. Mean and standard deviation (\pm SD) are shown (bars). Different letters indicate significant differences based on Tukey's HSD test ($p < 0.05$).

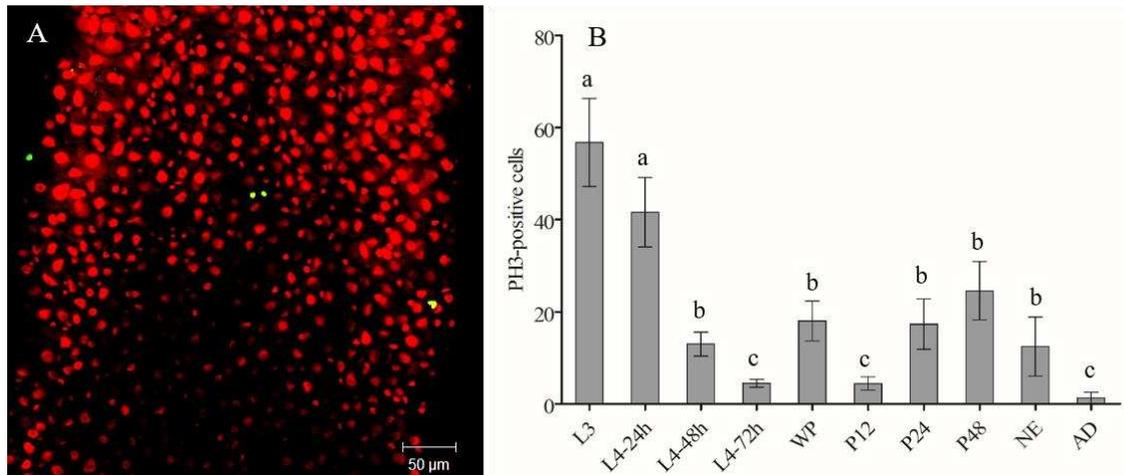


Fig. 5. A. Immunostaining for PH3 in the posterior midgut of L4-48h *A. aegypti*. Green: Nuclei of PH3-positive cells, Red: nuclei stained with TO-PRO-3. B. Number of PH3-positive cells in the midgut of L3, L4-24h, L4-48h, L4-72h, WP, P12, P24, P48, NE, and AD. Mean (bars) and standard deviation (\pm SD) are shown. Different letters indicate significant differences based on Tukey's HSD test ($p < 0.05$).

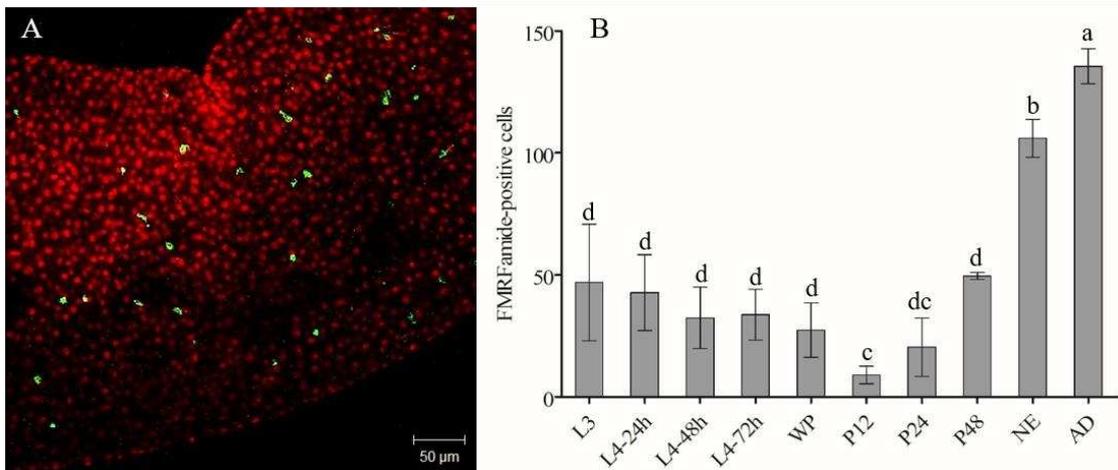


Fig. 6. A. Immunostaining for FMRF in the posterior midgut of L4-48h *A. aegypti*. Green: FMRF-positive cells, Red: nuclei stained with TO-PRO-3. B. FMRF-positive cells in the midgut of L3, L4-24h, L4-48h, L4-72h, WP, P12, P24, P48, NE, and AD. Mean (bars) and standard deviation (\pm SD) are shown. Different letters indicate significant differences based on Tukey's HSD test ($p < 0.05$).

4. Discussion

This study provides a better comprehension of the cell replacement process in the midgut of *A. aegypti*, associated with feeding behavior changes from larval to adult stages of the mosquito females. By assessing cell populations during midgut metamorphosis (from L3 to NE), we were able to describe the main changes in the midgut epithelium and the muscular tissue around it, following its degeneration and replacement. At the larval stage (L3 and L4-24h), there is a well-developed columnar epithelium with a prominent brush border without any evidence of vacuolization. However, were found some protrusions as “bubbles” in the digestive cell, which may be related with the releasing of digestive enzymes (Oliveira et al., 2009; Hakim et al., 2010) or as a defensive mechanism against bacteria that could invade/damage the midgut epithelium during its remodeling process (Fernandes et al., 2014). Interesting, no caspase-3-positive cell was detected in the larvae. On the other hand, apoptosis and autophagy are evident in the larval midgut visceral muscles. These muscles may play an important role during midgut morphogenesis, providing space and physical support for the epithelial cell migration and the new tissue establishment, any disruption in this process can impair the whole midgut remodeling process (Aghajanian et al., 2016).

In L4 with 72h, the digestive cells at the anterior midgut portion, there is high vacuolization, suggesting the beginning of apoptotic process (Denton et al., 2009). The larval midgut growth at this stage can be associated with an increase in number and cell size, which is related to regenerative cells division (Ray et al., 2009). At this stage, cells positive for cleaved caspase-3 were detected. Furthermore, after the onset of pupation, there are few regenerative cells in the midgut epithelium and the larval epithelial cells detach from the basal membrane and, are released into the midgut lumen. Therefore, regenerative cells form almost a new complete layer of cells, intermediate in size between the large larval digestive cells and the smaller muscle cells. In the WP, the differentiated cells of midgut epithelium begin to deteriorate, showing high vacuolization, loss of brush border and decrease in the digestive cell number, which detaches from the basal membrane as a result apoptosis and autophagy. The larval regenerative cells undergo differentiation and arise the pupal midgut epithelium (O'Brien, 1966; Fernandes et al., 2014).

In general, the *A. aegypti* midgut remodeling begins in late L4 before the pupal stage with digestive cells showing cell death features (caspase-dependent apoptosis). At early pupal stage, proliferating cells are concentrated in the anterior midgut portion

changing to the posterior midgut in P12, P24h and P48 representing a wave of midgut restructuring as described by Fernandes et al., (2014). On the other hand, the number of FMRF-positive cells is similar in L3 and early pupae, following a drop in P12h and an increase from P24h to the adults, suggesting high activity in the phases in which the digestive process occurs (Moffett & Moffett, 2005; Fernandes et al., 2014).

Although the role of FMRF-positive cells during midgut metamorphosis is not yet fully understood, enteroendocrine cells activate the proliferation of stem cells through the release of hormones in *D. melanogaster* (Amcheslavsky et al., 2014). Midgut histolysis start shortly before pupal ecdysis and seems to be a caspase-dependent event. Overall, our findings show the metamorphosis of *A. aegypti* midgut is a remodeling process in which larval cells undergo autophagic and apoptotic cell death, whereas regenerative cells proliferate and differentiates to build the adult midgut epithelium. In addition, cell proliferation occurs in the regenerative cells resulting in a new cell that will remain undifferentiated and another that follow the differentiation cascade as found in other insects (O'Brien, 1966; Ray et al., 2009; reviewed by Hakim et al., 2010).

5. References

Aghajanian, P., Takashima, S., Paul, M., Younossi-Hartenstein, A., & Hartenstein, V. Metamorphosis of the *Drosophila* visceral musculature and its role in intestinal morphogenesis and stem cell formation. *Developmental Biology*, v. 420, n. 1, p. 43–59, 2016.

Amcheslavsky, A., Song, W., Li, Q., Nie, Y., Bragatto, I., Ferrandon, D., Perrimon, N., & Ip, Y. T. Enteroendocrine cells support intestinal stem-cell-mediated homeostasis in *Drosophila*. *Cell Reports*, v. 9, n. 1, p. 32–39, 2014.

Black, W. C., Bennett, K. E., Gorrochótegui-Escalante, N., Barillas-Mury, C. V., Fernández-Salas, I., de Lourdes Muñoz, M., Farfán-Alé, J.A., Olson, K.E., & Beaty, B. J. Flavivirus susceptibility in *Aedes aegypti*. *Archives of Medical Research*, v. 33, n. 4, p. 379–388, 2002.

Buchon, N., Broderick, N. A., Kuraishi, T., & Lemaitre, B. *Drosophila* EGFR pathway coordinates stem cell proliferation and gut remodeling following infection. *BMC Biology*, v. 8, n. 1, p. 1, 2010.

Cao, Y., & Klionsky, D. J. Physiological functions of Atg6/Beclin 1: a unique autophagy-related protein. *Cell Research*, v. 17, n. 10, p. 839–849, 2007.

Cruz-Landim, C., & Costa-Leonardo, A. M. Ultrastructure of cell renewal in the midgut of termites. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 91, n. 1, p. 129–130, 1996.

Denton, D., Shrivage, B., Simin, R., Mills, K., Berry, D. L., Baehrecke, E. H., & Kumar, S. Autophagy, not apoptosis, is essential for midgut cell death in *Drosophila*. *Current Biology*, v. 19, n. 20, p. 1741–1746, 2009.

Fernandes, K. M., Neves, C. A., Serrão, J. E., & Martins, G. F. *Aedes aegypti* midgut remodeling during metamorphosis. *Parasitology International*, v. 63, n. 3, p. 506–512, 2014.

Franzetti, E., Huang, Z. J., Shi, Y. X., Xie, K., Deng, X. J., Li, J. P., Li, Q. R., Yang, W. Y., Zeng, W. N., Casartelli, M., Deng, H. M., Cappellozza, S., Grimaldi, A., Xia, Q., Feng, Q., Cao, Y., & Tettamanti, G. Autophagy precedes apoptosis during the remodeling of silkworm larval midgut. *Apoptosis*, v. 17, n. 3, p. 305–324, 2012.

Gonçalves W. G., Fernandes K. M., Santana W. C., Martins G. F. & Serrão J. E. Post-embryonic development of the Malpighian tubules in *Apis mellifera* (Hymenoptera) workers: morphology, remodeling, apoptosis, and cell proliferation. *Protoplasma*, v. 255, n. 2, p. 585–599, 2018.

Gonçalves W. G., Fernandes K. M., Santana W. C., Martins G. F., Zanucio J. C. & Serrão J. E. Post-embryonic changes in the hindgut of honeybee *Apis mellifera* workers: Morphology, cuticle deposition, apoptosis, and cell proliferation. *Developmental Biology*, v. 431, n. 2, p. 194–204, 2017.

Hakim, R. S., Baldwin, K., & Smagghe, G. Regulation of midgut growth, development, and metamorphosis. *Annual Review of Entomology*, v. 55, n. 1, p. 593–608, 2010.

Hardy, J. L., Houk, E. J., Kramer, L. D., & Reeves, W. C. Intrinsic factors affecting vector competence of mosquitoes for arboviruses. *Annual Review of Entomology*, v. 28, n. 1, p. 229–262, 1983.

Illa-Bochaca, I., & Montuenga, L. M. The regenerative nidi of the locust midgut as a model to study epithelial cell differentiation from stem cells. *Journal of Experimental Biology*, v. 209, n. 11, p. 2215–2223, 2006.

Jiang, H., & Edgar, B. A. EGFR signaling regulates the proliferation of *Drosophila* adult midgut progenitors. *Development*, v. 136, n. 3, p. 483–493, 2009.

Jiang, H., Patel, P. H., Kohlmaier, A., Grenley, M. O., McEwen, D. G., & Edgar, B. A. Cytokine/Jak/Stat signaling mediates regeneration and homeostasis in the *Drosophila* midgut. *Cell*, v. 137, n. 7, p. 1343–1355, 2009.

Jordão, B., Lehane, M., Terra, W., Ribeiro, A. F. & Ferreira, C. An immunocytochemical investigation of trypsin secretion in the midgut of the stablefly, *Stomoxys calcitrans*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 26, n. 5, p. 445–453, 1996.

Lemos, A. B., Adam, F. C., de Moura, K. R. S., de Moraes, L. B., & da Silva, O. S. Histological and histochemical characterization of the midgut of healthy *Aedes aegypti* larvae. *Annual Research & Review in Biology*, v. 22, n. 1, p. 1–15, 2018.

Malta, J., Heerman, M., Weng, J. L., Fernandes, K. M., Martins, G. F., & Ramalho-Ortigão, M. Midgut morphological changes and autophagy during metamorphosis in sandflies. *Cell and Tissue Research*, v. 368, n. 3, p. 513–529, 2017.

Micchelli, C. A., & Perrimon, N. Evidence that stem cells reside in the adult *Drosophila* midgut epithelium. *Nature*, v. 439, n. 7075, p. 475–479, 2006.

Mizushima, N. The role of the Atg1/ULK1 complex in autophagy regulation. *Current Opinion in Cell Biology*, v. 22, n. 2, p. 132–139, 2010.

Mizushima, N., Yoshimori, T., & Ohsumi, Y. The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, v. 27, n. 1, p. 107–132, 2011.

Moffett, S. B., & Moffett, D. F. 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*. *Journal of Insect Science*, v. 5, n. 1, 2005.

Neves C. A., Bhering L. L., Serrão J. E. & Gitirana L. B. FMRFamide-like midgut endocrine cells during the metamorphosis in *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Hymenoptera, Apidae). *Micron*, v. 33, n. 5, p. 453–460, 2002.

Neves C.A., Gitirana L. de B. & Serrão J. E. Ultrastructural study of the metamorphosis in the midgut of *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Apidae, Meliponini) worker. *Sociobiology*, v. 41, n. 1, p. 443–459, 2003.

Nishiura J. T., Ho P., Ray K. Methoprene interferes with mosquito midgut remodeling during metamorphosis. *Journal of Medical Entomology*, v. 40, n. 4, p. 498–507, 2003. Noda, N. N., & Fujioka, Y. Atg1 family kinases in autophagy initiation. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 72, n. 16, p. 3083–3096, 2015.

O'Brien, J. F. Origin and structural function of the basal cells of the larval midgut in the mosquito, *Aedes aegypti* Linnaeus. *Journal of the New York Entomological Society*, v. 74, n. 1, p. 59–63, 1996.

Ohlstein, B., & Spradling, A. The adult *Drosophila* posterior midgut is maintained

by pluripotent stem cells. *Nature*, v. 439, n. 7075, p. 470–474, 2006.

Oliveira, C. D., Tadei, W. P., & Abdalla, F. C. 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? *Neotropical Entomology*, v. 38, n. 5, p. 624–631, 2009.

Ray, K., Mercedes, M., Chan, D., Choi, C. Y., & Nishiura, J. T. Growth and differentiation of the larval mosquito midgut. *Journal of Insect Science*, v. 9, n. 55, p. 1–13, 2009.

Santos, D. E., Azevedo, D.O., Campos, L. A.O., Zanuncio, J.C. & Serrão, J.E. *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Apidae) fat body persists through metamorphosis with a few apoptotic cells and an increased autophagy. *Protoplasma*, v. 252, n. 2, p. 619–627, 2015.

Shirai, T., Maehara, A., Kiritooshi, N., Matsuzaki, F., Handa, H., & Nakagoshi, H. Differential requirement of EGFR signaling for the expression of defective proventriculus gene in the *Drosophila* endoderm and ectoderm. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 311, n. 2, p. 473–477, 2003.

Slobodkin, M. R., & Elazar, Z. The Atg8 family: multifunctional ubiquitin-like key regulators of autophagy. *Essays In Biochemistry*, v. 55, p. 51–64, 2013.

Teixeira, A.D., Fialho, M.C.Q., Zanuncio, J.C., Ramalho, F.S. & Serrão, J.E. Degeneration and cell regeneration in the midgut of *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae) during post-embryonic development. *Arthropod Structure and Development*, v. 42, n. 3, p. 237–246, 2013.

Capítulo 2

Efeitos da cafeína e da borra de café sobre larvas do mosquito *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)

Resumo

O mosquito *Aedes aegypti* tem grande importância médica por ser vetor de importantes arboviroses, e seu controle baseia-se principalmente no uso de compostos químicos, que podem ser tóxicos para indivíduos não-alvo ou levar a resistência nos mosquitos. Compostos naturais, como a cafeína e a borra de café usada têm demonstrado efeitos potenciais para o controle de mosquitos *A. aegypti*, bloqueando seu desenvolvimento antes de alcançar a fase de adulto. O intestino médio de *A. aegypti* é o local onde ocorre a digestão e está associado à infecção de diferentes patógenos, tornando-se alvo de importantes estudos. No presente trabalho, analisamos os efeitos da cafeína e da borra de café comum (com cafeína) e da borra de café descafeinada (sem cafeína), sobre as larvas de 3º instar de *A. aegypti*. Avaliamos a sobrevivência, o comportamento e a morfologia do intestino médio, utilizando quatro diferentes concentrações das borras de café (50 mg/mL, 100 mg/mL, 150 mg/mL e 200 mg/mL) e quatro concentrações de cafeína pura (0,2 mg/mL, 0,5 mg/mL, 1,0 mg/mL e 2,0 mg/mL). O tratamento com os diferentes compostos interferiu na sobrevivência, no desenvolvimento e na atividade locomotora das larvas, além de causar danos às células do intestino médio, induzindo o estresse oxidativo e ativando a apoptose das células digestivas, além de reduzir o número de células em proliferação e das células enteroendócrinas FMRF-positivas. Assim, tanto as borras de café como a cafeína, possuem efeitos larvicidas sobre *A. aegypti*, podendo ser promissores para o controle alternativo do mosquito.

1. Introdução

O mosquito *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) tem ampla distribuição geográfica (Consoli & Oliveira, 1994; Powell & Tabachnick, 2013) e tem importância médica por ser vetor da dengue, febre amarela, febre chikungunya e zika (Morrison et al., 2008; Alphey et al., 2013; Powell & Tabachnick, 2013). O combate a essas arboviroses humanas inclui o controle do inseto vetor, que pode ser feito pela eliminação de

criadouros ou uso de compostos químicos como larvicidas (Morrison et al., 2008; Allan, 2011; Alphey et al., 2013).

O uso de inseticidas sintéticos, principalmente os organofosforados e piretroides é o principal meio de controle desses vetores, porém, eles podem ser tóxicos para organismos não-alvo (Brandt et al., 2016) além de aumentar os níveis de resistência nas populações de mosquitos (Braga & Valle, 2007; Lima et al., 2011). Alternativas para o controle de mosquitos com baixa toxicidade e impactos ambientais, como os extratos de plantas vem sendo avaliados quanto aos efeitos larvicidas (Laranja et al., 2003; Silva et al., 2004; Barreto et al., 2006; Procópio et al., 2015).

Diferentes extratos de plantas e substâncias de uso doméstico têm sido utilizados em estudos toxicológicos em vários organismos, incluindo o mosquito *A. aegypti*. Diversos tipos de extratos têm demonstrado atividade larvicida, interferindo no desenvolvimento, alterando a organização estrutural do intestino, causando danos nas células do epitélio do intestino médio, comprometendo a digestão ou até mesmo interferindo no processo de replicação viral (Barreto et al., 2006; Valotto et al., 2010; Procópio et al., 2015). Por exemplo, extratos de café comum e descafeinada utilizados em larvas do mosquito *Aedes albopictus*, tem demonstrado atividade larvicida e interferindo na infecção viral (Eastep et al., 2012).

Compostos como a cafeína têm apresentado efeitos tóxicos nas larvas de *A. aegypti*, interferindo no desenvolvimento e impedindo que alcancem a fase adulta (Laranja et al., 2003; Guirado & Bicudo, 2016), além de reduzirem significativamente a fecundidade de adultos e diminuírem a taxa de oviposição (Laranja et al., 2006). Assim como a cafeína, a borra de café (resíduo que fica após o café ser filtrado), tem evidenciado efeitos deletérios sobre o mosquito *A. aegypti*, afetando a eclosão de ovos, aumentando a mortalidade na fase larval, limitando a produção de adultos e diminuindo sua longevidade, atrasando o desenvolvimento (Laranja et al., 2003; Guirado & Bicudo, 2007; 2016).

O intestino médio do mosquito *A. aegypti*, tem papel central em diferentes aspectos da sua biologia, é o principal local de digestão e absorção de nutrientes, sendo o maior órgão endócrino do mosquito, além de estar associado à infecção de diferentes patógenos (Billingsley, 1990; Wang et al., 2001; Moffett & Moffett, 2005). Esse órgão é formado por um epitélio simples colunar, constituído por células digestivas, regenerativas e enteroendócrinas, sendo circundado por duas camadas musculares, uma circular e outra longitudinal (Hecker, 1977; Billingsley, 1990; Fernandes et al., 2014).

Bioinseticidas como o spinosad, têm mostrado ser um eficiente larvicida contra o *A. aegypti*, causando mortalidade larval, reduzindo sua capacidade reprodutiva e vetorial em adultos, diminuindo a capacidade de aquisição de sangue, afetando assim, a longevidade e a reprodução, causando uma redução na oviposição (Fernandes et al., 2019). Outro inseticida em destaque é o imidacloprid, que têm evidenciado efeitos subletais no desenvolvimento pós-embrionário do mosquito *A. aegypti*, afetando a remodelação do intestino médio, ocasionando a malformação do epitélio, causando o estresse oxidativo, induzindo a apoptose e inibindo a proliferação e diferenciação das células regenerativas (Fernandes et al., 2015).

No presente trabalho, investigamos os efeitos da cafeína e das borras de café comum e descafeinada sobre a sobrevivência desde a fase larval até adultos e a atividade locomotora das larvas de *A. aegypti*. Também analisamos os efeitos negativos desses compostos na morfologia do intestino médio larval, que tem papel central em diversos aspectos da biologia do mosquito *A. aegypti*, responsável por processos relacionados a digestão e absorção, como também associado a multiplicação e transmissão de diferentes patógenos.

2. Materiais e métodos

2.1. Mosquitos

Larvas de 3º instar (L3) de *A. aegypti* (PP-Campos, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil) foram obtidas da colônia mantida no insetário do Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal de Viçosa (UFV). As larvas foram criadas em recipientes com água decolorada e alimentadas com ração de tartaruga (Reptolife). Adultos recém-emergidos de ambos os sexos foram alimentados com solução 10% de sacarose, mantidos a 25 ± 5 °C com fotoperíodo de 12 horas.

2.2. Borra de café e cafeína

As borras de café comum e a descafeinada, foram obtidas a partir do pó de café de uso comercial, marca Melitta. As borras foram adquiridas através do processo caseiro e convencional, coando apenas uma vez o pó de café, com água de torneira fervida sem adição de açúcar. Após o café ser filtrado, a borra foi recolhida e retirado o excesso de líquido, e devidamente seca, foi misturada manualmente e homogeneizada, mantida posteriormente em refrigeração em -20°C, por três meses. Amostras das borras de café da comum e da descafeinada foram enviadas ao Instituto de Tecnologia de Alimentos de São

Paulo (ITAL) para determinação da concentração de cafeína, que foi obtido pelo método de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (Alves & Bragagnolo, 2002). As amostras apresentaram a concentração de 0,35g de cafeína para borra de café comum e 0,01 g de cafeína para a borra de café descafeínada a cada 100 g de borra. A cafeína pura utilizada foi Cafeína anidra (1H-PURINA-2,6-DIONA,3,7-DIHDRO-1,3,7-TRIMETIL), fabricada por CSP INNOVATION PHARN (China) e comercializada pela Saint Charbel Farmácia & Manipulação LTDA.

2.3. Sobrevivência

Para a obtenção das diluições (Laranja et al., 2003) as borras de café e a cafeína foram pesadas e divididas em quatro concentrações. A borra de café comum (BCC) e a borra de café descafeínada (BCD) foram usadas nas seguintes concentrações de 50, 100, 150 e 200 mg/mL, e a cafeína pura (CAF) foi utilizada nas concentrações de 0,2; 0,5; 1,0 e 2,0 mg/mL. As amostras foram diluídas em 200 mL de água destilada e transferidas para recipientes contendo 25 larvas de *A. aegypti* no 3º instar com 5 mg de alimento, sendo este repostado quando necessário.

A sobrevivência dos insetos foi monitorada a cada 24 horas, durante todo o ciclo de desenvolvimento, desde larvas até adultos, finalizando quando todos os indivíduos estavam mortos. Durante a avaliação da sobrevivência, os insetos incapazes de se locomover mediante estímulos com um pincel foram considerados mortos e descartados (Tomé et al., 2014). Cada tratamento BCC, BCD, CAF e o controle foram repetidos quatro vezes, totalizando 100 larvas por tratamento.

2.4. Análise comportamental

Para a análise comportamental foi selecionada a maior concentração de ambas as borras de café (200 mg/mL) e de cafeína pura (2,0 mg/mL), na qual apresenta maior efeito em menor tempo, em um período de 24 h. Vinte e cinco larvas de 3º instar foram mantidas com 5 mg de alimento/pote, sendo quatro o total de repetições. Posteriormente, as larvas tratadas e o controle, foram transferidos em grupos de 10 indivíduos, para uma arena (placa de Petri com diâmetro de 9,0 centímetros e 2 cm de altura), com água destilada (a uma altura de 1 cm), com quatro repetições em cada intervalo de tempo analisado (Tomé et al., 2014). As larvas foram mantidas nas soluções com borras e cafeína até o momento das análises, quando foram transferidas para arena com água destilada

devido as soluções com borra deixarem a água turva. Após os registros das imagens, as larvas foram descartadas.

A motilidade larval foi analisada através de um sistema de rastreamento de vídeo equipado com uma câmera digital acoplado a um dispositivo de carga (câmera CCD), para captura de imagens com software de rastreamento de comportamento (ViewPoint LifeSciences, Montreal, QC, Canadá), colocada a 30 cm da arena, onde a atividade foi registrada durante 15 minutos nos intervalos de 1-2 h, 3-4 h, 5-6 h e em 23-24 h após as exposições, juntamente com o controle, sendo registrado como pixels. As mudanças de pixels quantificados, representam todos os movimentos dentro da arena, que foram capturados pelo sistema a cada 10^{-2} segundos. As análises foram realizadas em $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e luz fluorescente artificial (Tomé et al., 2014).

2.5. Morfologia do intestino médio

Larvas de 3º instar (L3), foram expostas as concentrações de ambas as borras de café (200 mg/mL) e de cafeína pura (2,0 mg/mL) por 24 h, juntamente com o controle. Para análises histológicas foram utilizados seis intestinos médios de cada tratamento e do controle, onde foram dissecados em solução fisiológica para insetos (0.1 M NaCl, 20 mM KH_2PO_4 e 20 mM Na_2HPO_4) e transferidos para solução fixadora de Zamboni (paraformaldeído a 2% contendo 15% de ácido pícrico em tampão fosfato de sódio à 0,1 M) por 2 h em temperatura ambiente. A seguir, os intestinos foram desidratados em uma série crescente de etanol (70, 80, 90, 100%) e embebidos em historesina (Leica), seccionados com 5 μm e corados com hematoxilina e eosina (HE). As amostras foram montadas em meio Eukitt (Fluka), analisadas e fotografadas no microscópio Olympus BX-60 acoplado com câmera digital Q-Color3 (Olympus Corp. Tokyo, Japan).

2.6. Imunomarcção

Para cada teste de imunomarcção utilizamos vinte intestinos médios de cada tratamento e do controle, dissecadas em solução fisiológica para insetos (0.1M NaCl, 20 mM KH_2PO_4 , 20 mM Na_2HPO_4) e fixados em solução fixadora Zamboni por 2 h. Após a fixação os intestinos médios foram submetidos a três lavagens de uma h cada, em tampão fosfato contendo 1% de Triton X-100 (PBST), seguindo-se pela incubação por 24 h a 4°C em solução de anticorpo primário: anti-fosfo-histona H3 (PH3) (Cell Signaling Technology, Inc., Beverly, MA, EUA) (diluição 1:100), primário anti-FMRFamida (Peninsula Laboratories, Inc., San Carlos, CA, E.U.A) (diluição 1:500), anti-caspase-3

clivada (diluição 1:500) e anti-peroxidase (diluição 1:500) (Cell Signaling Technology, Inc., Beverly, MA, USA). As amostras foram lavadas três vezes (10 min cada) com PBS e incubadas no anticorpo secundário conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Sigma-Aldrich Brasil Ltda) (1:500), seguido de três lavagens de 5 min cada com PBS. Os núcleos foram corados com TO-PRO-3 (Invitrogen, Eugene, OR, USA) (1:1000) por 30 min e as lâminas foram montadas em solução de mowiol (Sigma-Aldrich Brasil Ltda), analisadas e fotografadas no microscópio confocal Zeiss LSM 510 do Núcleo de Microscopia e Microanálises (NMM) da UFV.

Para o controle negativo, foram utilizados cinco intestinos médios larval, sendo tratados como descrito anteriormente, exceto pela incubação com anticorpos primários sendo substituído por PBS. As células enteroendócrinas e as células em divisão (positivas para o neuropeptídeo FMRFamida e a proteína fosfo-histona H3, respectivamente) foram contadas em todos os intestinos médios. As contagens de células foram feitas com o programa Image-Pro Plus 4.5 (Media Cybernetics) (Fernandes et al., 2014).

2.7. Análises estatísticas

O efeito de diferentes tratamentos na sobrevivência imatura e adulta foi testado por análise de sobrevivência. As curvas de sobrevivência e o tempo médio de sobrevivência (LT_{50}) foram obtidos pelos estimadores de Kaplan-Meier, produzidos a partir da proporção de indivíduos que sobreviveram diariamente. A similaridade geral entre as curvas foi testada por teste Log-Rank e as comparações pareadas foram realizadas pelo método de Bonferroni ($p < 0,05$). Para os dados de desenvolvimento, foi ajustado um modelo linear generalizado (GLM) com distribuição de Weibull; a distribuição foi baseada no menor valor de deviência residual. Comparações entre tratamentos, nos quais os indivíduos sobreviveram à exposição enquanto imaturos, foram realizadas por simplificação gradual do modelo, agrupando curvas que não eram significativamente diferentes (Crawley, 2012). Os dados da atividade de grupo foram transformados para $\log_{10}(x)$ para satisfazer a normalidade e homocedasticidade e submetidos à análise de covariância (ANCOVA), considerando o tempo e o tratamento como variáveis explicativas. Os resultados referentes às medidas e contagem de células foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey. Os resíduos foram verificados em todos os modelos para averiguar a adequação das distribuições. Todas as análises foram realizadas com o software R (R Core Team, versão 3.4.4, 2018). As análises

morfométricas foram feitas com o auxílio do programa Image-Pro Plus 4.0 (Windows Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EUA).

3. Resultados e discussão

3.1. CAF, BCC e BCD reduzem a sobrevivência larval e o tempo de vida dos adultos de *A. aegypti*.

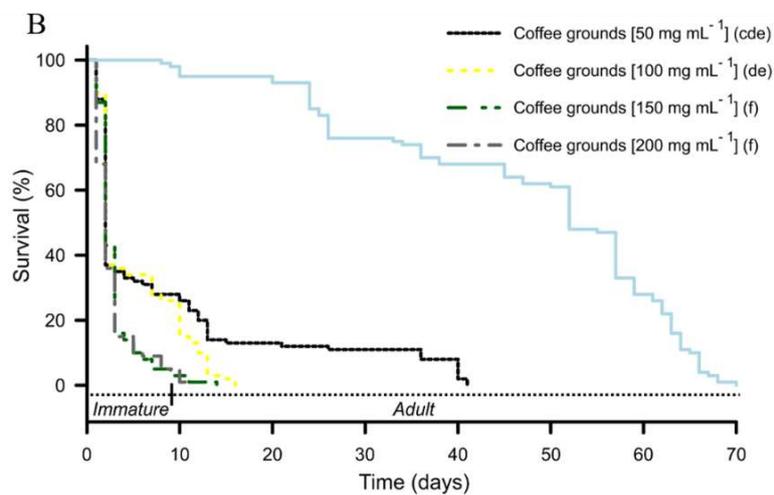
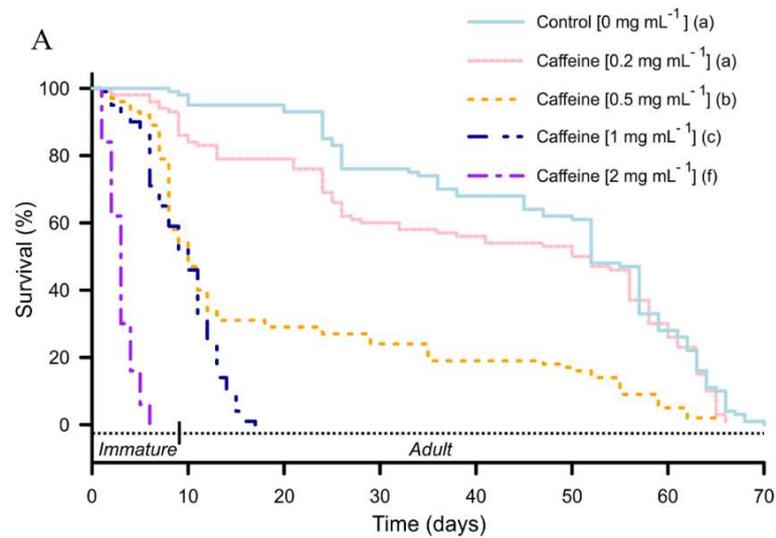
Os compostos utilizados afetaram significativamente a sobrevivência e o tempo de vida de *A. aegypti* (Log-Rank $\chi^2 = 1191,11$; $df = 12$; $p < 0,001$; Fig. 1). As larvas tratadas com CAF 2 mg/mL tiveram 100% de morte na fase larval, ocorrendo nos seis primeiros dias de exposição (TL₅₀ de 3 dias), sendo a mais letal entre as concentrações de cafeína. Já nos tratamentos CAF 0,5 e 1 mg/mL, os tempos letais médio foram semelhantes (TL₅₀ de ± 10 dias), porém, o tempo de vida dos indivíduos tratados com CAF 1 mg/mL foi menor (± 16 dias após a exposição) em relação ao CAF 0,5 (± 65 dias após a exposição). A sobrevivência das larvas tratadas com CAF 0,2 mg/mL foi semelhante ao controle (LT₅₀ de ± 52 dias) (Fig. 1A).

Nos tratamentos com BCC e BCD, todas as concentrações reduziram a sobrevivência larval e o tempo de vida dos adultos em relação a CAF e ao controle. Os tratamentos BCD 150 mg/mL e 200 mg/mL foram os mais letais entre todos os tratamentos (TL₅₀ de 2 dias), com 100% de mortes na fase imatura (quatro a cinco dias após a exposição) (Fig. 1BC). Em larvas tratadas com BCD 100 mg/mL, apenas 4% chegaram a fase adulta, porém, esses sobreviveram aproximadamente 55 dias, estatisticamente semelhante ao que ocorreu nas BCC 50 mg/mL, BCC 100 mg/mL, BCC 150 mg/mL e BCC 200 mg/mL (TL₅₀ de 3 dias) (Fig. 1BC).

Houve diferença estatística no tempo de desenvolvimento entre os indivíduos do controle e tratados, sendo que todas as larvas tratadas tiveram o desenvolvimento desacelerado ($\chi^2 = 385,2$; $df = 6$; $p < 0,001$; Fig. 2). Os tratamentos CAF 1 mg/mL e BCC 100 mg/mL, tiveram maior atraso na emergência de adultos (a partir do 10º dia), em relação ao controle, cujos indivíduos emergem a partir do 4º dia.

No presente trabalho, além de confirmarmos a alta atividade larvicida da cafeína e da BCC (Laranja et al., 2003; Guirado & Bicudo, 2007), constatamos o atraso no desenvolvimento e a redução no tempo de vida dos mosquitos adultos, resultados semelhantes ao encontrado em tratamentos com bioinseticida spinosad (Fernandes et al., 2019). Além disso, a BCD ocasionou maior mortalidade larval, demonstrando que o efeito larvicida das borras não possui relação com a cafeína, pois essa borra apresenta

concentração de cafeína quase nula, sendo desconhecido o mecanismo de ação. Embora não tenha trabalhos utilizando BCD, foi visto que extrato de café descafeinado possui maior atividade larvicida e antiviral em comparação com a cafeína e o extrato de café (Eastepp et al., 2012).



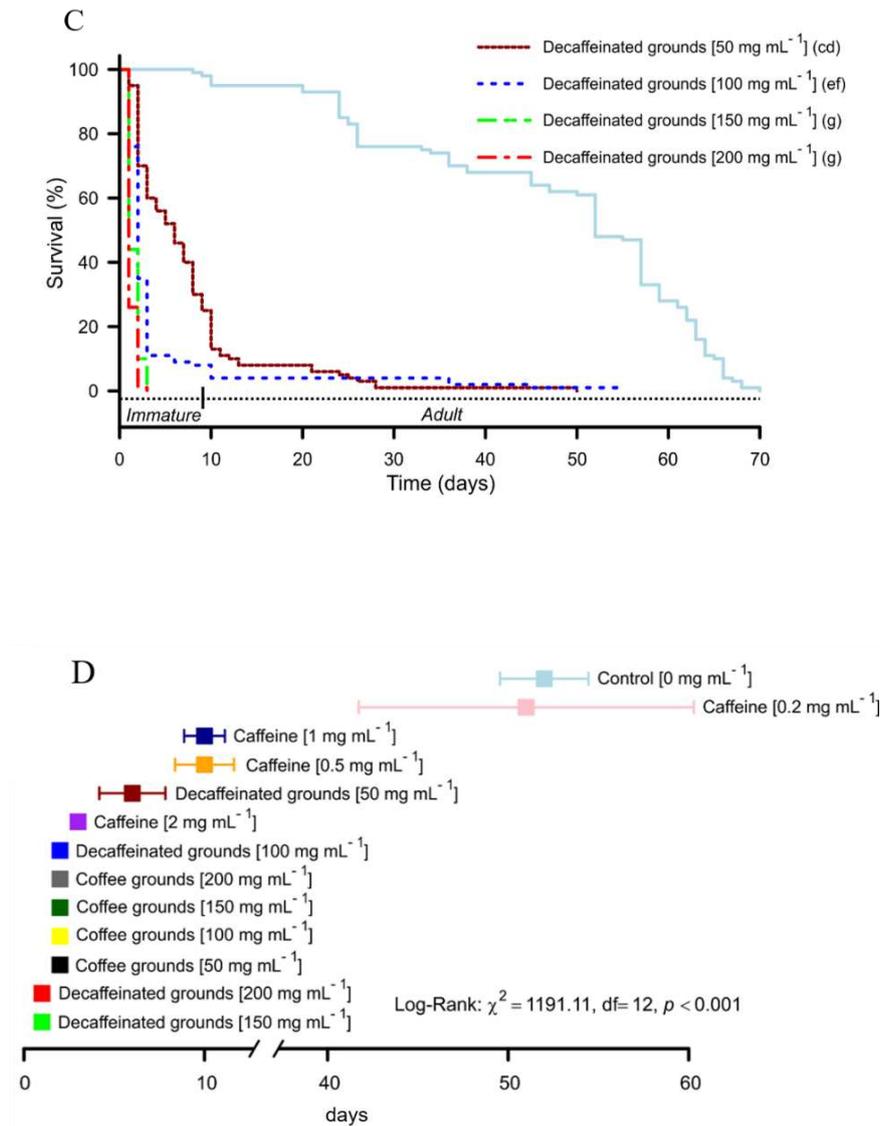


Fig. 1: Curvas de sobrevivência e tempos letais (mediana \pm CLs) dos imaturos (larvas e pupas) e adultos de *A. aegypti* que foram expostos a diferentes concentrações de CAF, BCC e BCD. Os tratamentos codificados com a mesma letra não foram significativamente diferentes pelo método de Bonferroni ($p > 0,05$); as comparações são entre todos os tratamentos. **A:** Curva de sobrevivência para o tratamento com CAF; **B:** Curva de sobrevivência para o tratamento com BCC; **C:** Curva de sobrevivência para o tratamento com BCD; **D:** Tempo letal médio (LT₅₀).

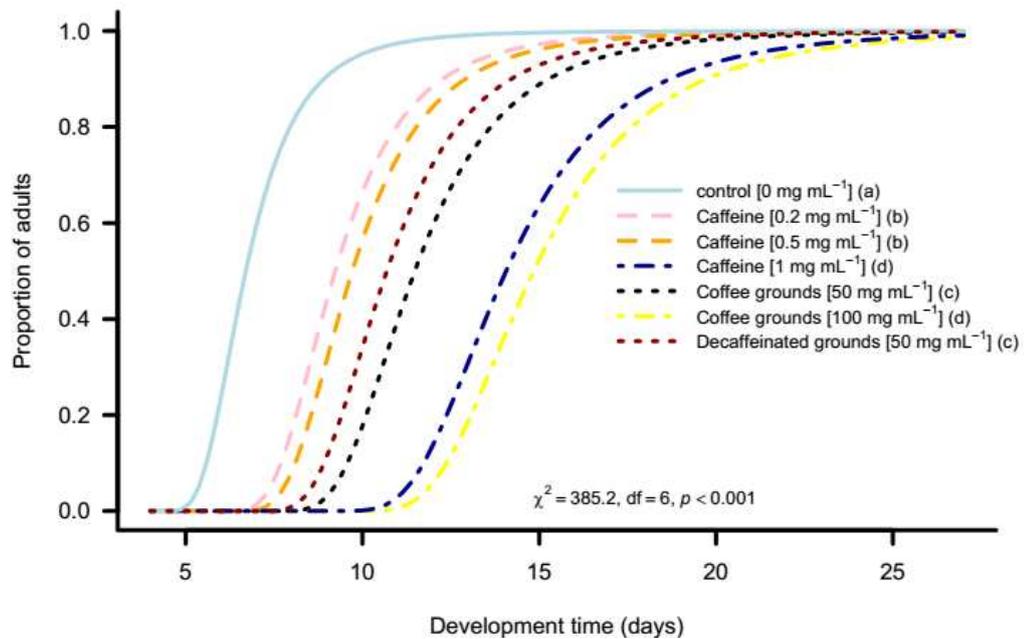


Fig. 2: Desenvolvimento de *A. aegypti* submetido a diferentes tratamentos. Curvas codificadas com a mesma letra não foram significativamente diferentes com base em comparações realizadas por simplificação gradual no GLM ($p > 0,05$).

3.2. CAF, BCC e BCD afetam a atividade locomotora de larvas de *A. aegypti*.

A atividade larval dos grupos tratados foi significativamente reduzida (modelo global: $F_{7,56} = 38,4$; $p < 0,001$; Fig. 3). Além disso, a interação entre as variáveis explicativas (ou seja, tempo x tratamentos) foi significativa ($F_{3,56} = 11,45$; $p < 0,001$). Os indivíduos tratados com CAF exibiram maior atividade no período de uma-duas h, reduzindo gradativamente até as 23-24h de exposição, enquanto que os tratados com BCD tiveram menor atividade entre todos tratamentos a partir de cinco-seis h. Nos indivíduos controles, a atividade permaneceu constante durante todo período.

A alta atividade nos indivíduos tratados com CAF durante as primeiras horas de exposição se assemelha com os resultados obtidos com Spinosad, o qual interage com receptores nicotínicos, levando inicialmente à excitação e posteriormente a redução na atividade (Tomé et al., 2014). Em contrapartida, as larvas submetidas aos tratamentos com BCC e BCD, diminuem a mobilidade do início ao fim da exposição, assim como visto em extratos da planta *Sapindus saponaria* (Barreto et al., 2006).

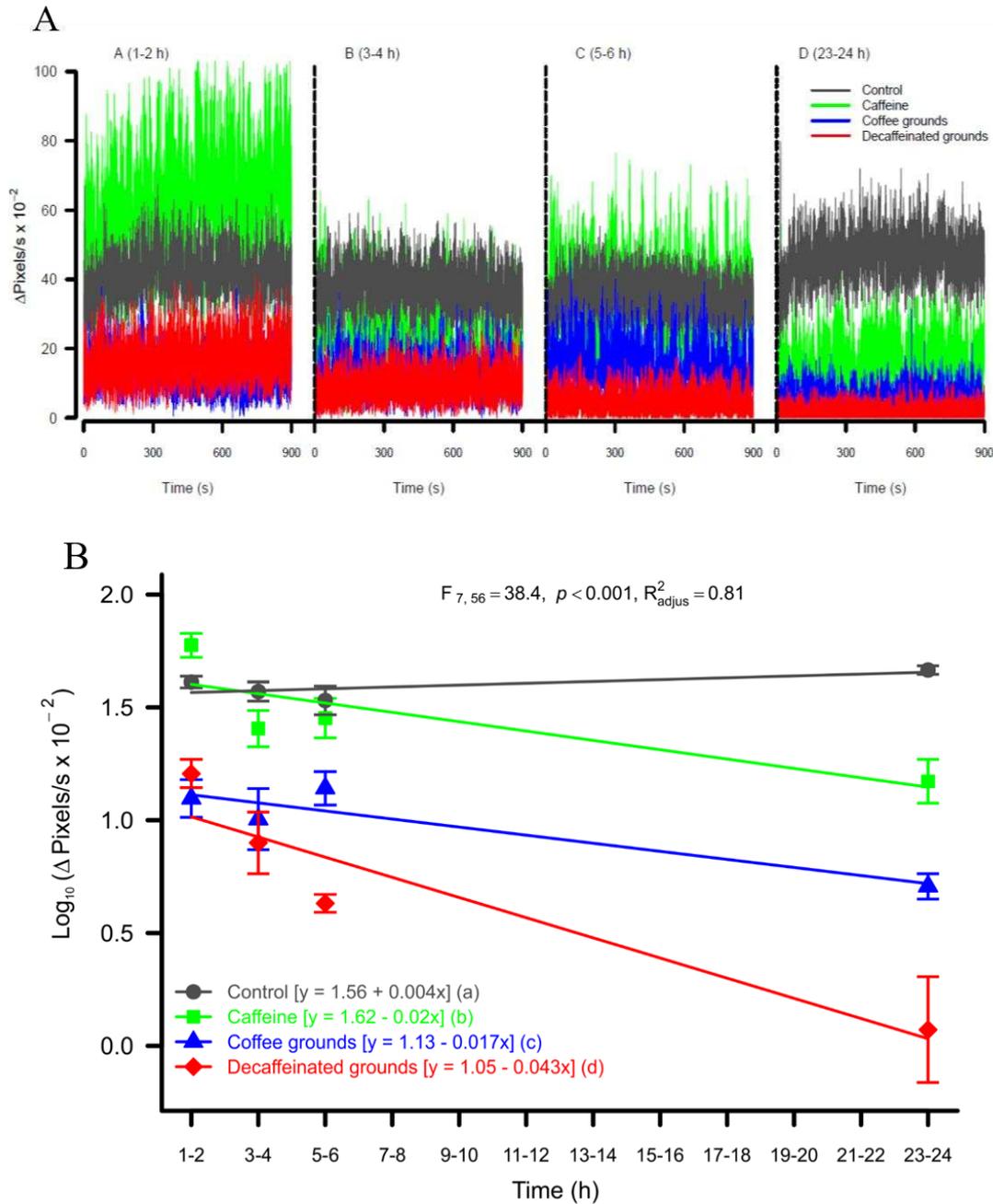


Fig. 3: **A:** Perfil de atividade ao longo do tempo exibido pelo *A. aegypti* submetido a diferentes tratamentos. (A) Entre uma-duas h após o início da exposição, (B) entre três-quatro h após o início da exposição, (C) entre cinco-seis h após o início da exposição, (D) entre 23 e 24 h após o início da exposição. **B:** Média da atividade global registrada em pixels por segundo ($\times 10^{-2}$). Os símbolos representam as médias e as barras verticais erros padrão (SE) de cada tratamento. As letras (a, b, c e d) na legenda indicam diferença entre as curvas baseadas em comparações realizadas por simplificação gradual no modelo ANCOVA ($p < 0,05$). O eixo Y está em escala \log_{10} .

3.3. O tratamento com CAF, BCC e BCD alteram a morfologia do intestino médio das larvas de *A. aegypti*.

O intestino médio larval dos controles apresenta epitélio simples colunar, borda estriada desenvolvida e secreções apócrinas na região apical. Nos tratados com borra de café é notável que as larvas se alimenta dos sedimentos, como mostrado pela observação de material escuro dentro do trato digestivo, potencializando os efeitos dos diferentes compostos presentes nas borras (Guirado & Bicudo, 2007). O intestino médio exhibe notável desorganização do epitélio, extensa vacuolização e ausência de borda estriada, sendo mais evidente no tratamento com BCD (Fig. 4). Essas alterações morfológicas no intestino médio larval de *A. aegypti* têm sido demonstradas em vários estudos com inseticidas (imidacloprid e spinosad), extrato de *Schinus terebinthifolius* e Squamocin, corroborando os resultados de CAF, BCC e BCD (Fernandes et al., 2015, 2019; Procópio et al., 2015; Costa et al., 2016).

Modificações no intestino médio, como a intensa vacuolização observada nos indivíduos tratados sugere um elevado estresse nas células digestivas, podendo estar ativando vias de morte celular (Fernandes et al., 2015; Procópio et al., 2015; Fernandes et al., 2019). Assim, enzimas peroxidases são sintetizadas em resposta ao aumento do estresse oxidativo, envolvidas na oxidação de espécies reativas de oxigênio (Khan et al., 2014). Essas células peroxidase-positivas só foram detectadas no intestino médio das larvas tratadas (Fig. 6 e 7). O número de células peroxidase-positivas no intestino médio de larvas tratadas com CAF e BCC foram semelhantes ($32,00 \pm 6,59$ e $30,80 \pm 6,65$ células, respectivamente), sendo maior em relação aos BCD ($19,00 \pm 1,58$ células) ($p < 0,05$; Fig. 5). O aumento do número de células peroxidase-positivas nos intestinos médios dos indivíduos tratados sugere que os compostos induzem estresse oxidativo nas células do intestino médio de *A. aegypti*, o que corrobora com os dados de larvas tratadas com o bioinseticida spinosad (Fernandes et al., 2019).

Corroborando com os resultados de peroxidase, as células caspase-3 positivas também só foram detectadas no intestino médio das larvas tratadas (Fig. 6). O tratamento com BCC apresenta maior número de células, sendo significativamente diferente da CAF e BCD ($46,20 \pm 9,94$, $22,00 \pm 2,45$ e $14,00 \pm 2,92$ células, respectivamente) ($p < 0,05$; Fig. 6).

Elevado estresse oxidativo pode causar danos celular, levando a ativação da morte celular através das vias das caspases (Kim et al., 2005; Yang et al., 2017). As marcações de caspase-3 encontradas nas células do intestino médio larval tratadas

indicam que o estresse celular ativou a via de morte celular por apoptose, o que pode comprometer o desenvolvimento, levando a má-formação nos mosquitos adultos, prejudicando o processo de digestão (Fernandes et al., 2015, 2019). Isso explicaria a redução no número e viabilidade dos ovos nas fêmeas do mosquito *A. aegypti*, em que as larvas foram tratadas com CAF e BCC (Laranja et al., 2006, Guirado & Bicudo, 2007). Além disso, uso de CAF e extratos de café (comum e descafeinada) em larvas de *A. albopictus*, reduziram a infectividade do vírus La Crosse (LCV) durante o repasto sanguíneo, indicando um possível problema no processo digestivo e consequente entrada do vírus através do intestino médio (Eastep et al., 2012).

O número de células FMRF-positivas do intestino médio reduziu nas larvas tratadas, em relação ao controle ($25,00 \pm 5,61$ células) ($p < 0,05$; Fig. 7). Entre os tratados, as borras (BCC e BCD) tiveram o menor número de células FMRF-positivas, quando comparado com a CAF ($5,20 \pm 1,92$, $1,60 \pm 1,52$ e $13,20 \pm 3,70$ células, respectivamente) ($p < 0,05$; Fig. 7). Enquanto o número de células PH3-positivas diminuiu drasticamente no intestino médio das larvas tratadas, passando de $21,60 \pm 3,85$ nos controles para uma célula em média, havendo diferenças significativas entre o controle e os tratados, mas não entre os diferentes tratamentos ($p < 0,05$; Fig.8).

As células FMRF-positivas possuem diversas funções no intestino médio, entre elas a motilidade intestinal e controle na secreção de enzimas digestivas, onde sua inibição pode levar a alterações na homeostase, interferindo na remodelação do intestino médio durante a metamorfose, como descrito em estudos utilizando inseticidas (Brown et al., 1986; Moffett & Moffett, 2005; Fernandes et al., 2015, 2019). Além disso, em *Drosophila melanogaster* as células enteroendócrinas estão envolvidas na regulação da proliferação das células-tronco do intestino médio de adultos, o que poderia explicar a redução do número de células-tronco positivas para PH3 no presente trabalho (Amcheslavsky et al., 2014; Ameku et al., 2018).

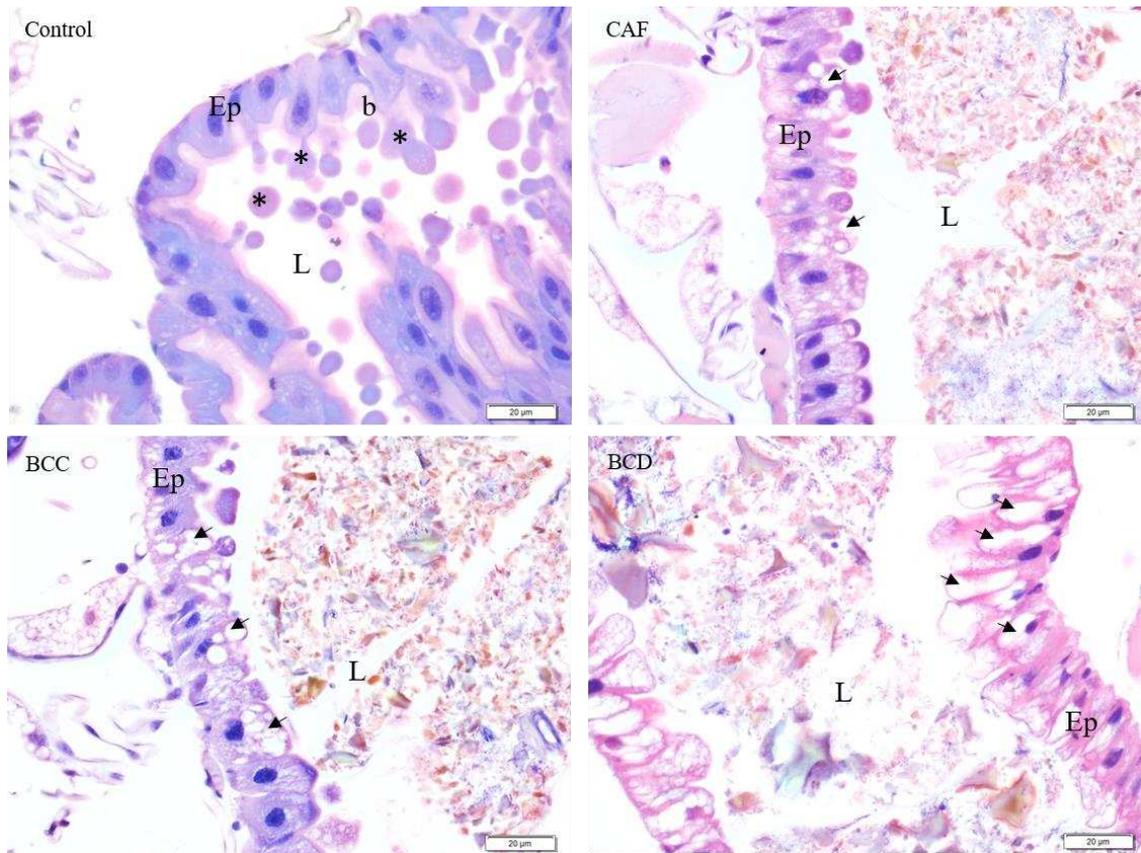


Fig. 4: Histologia do intestino médio de larvas de *A. aegypti* expostas a CAF (2,0 mg/m) e borras (BCC e BCD 200 mg/mL) por 24 h. **Ep:** epitélio; **L:** lúmen; **b:** borda estriada; *****: secreções apócrinas; **Seta:** vacúolos. Coloração por hematoxilina e eosina (HE). Barras = 20 µm.

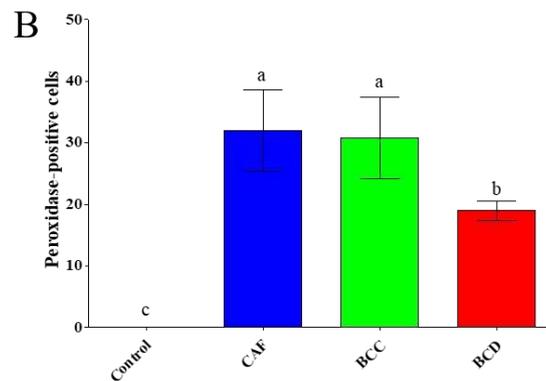
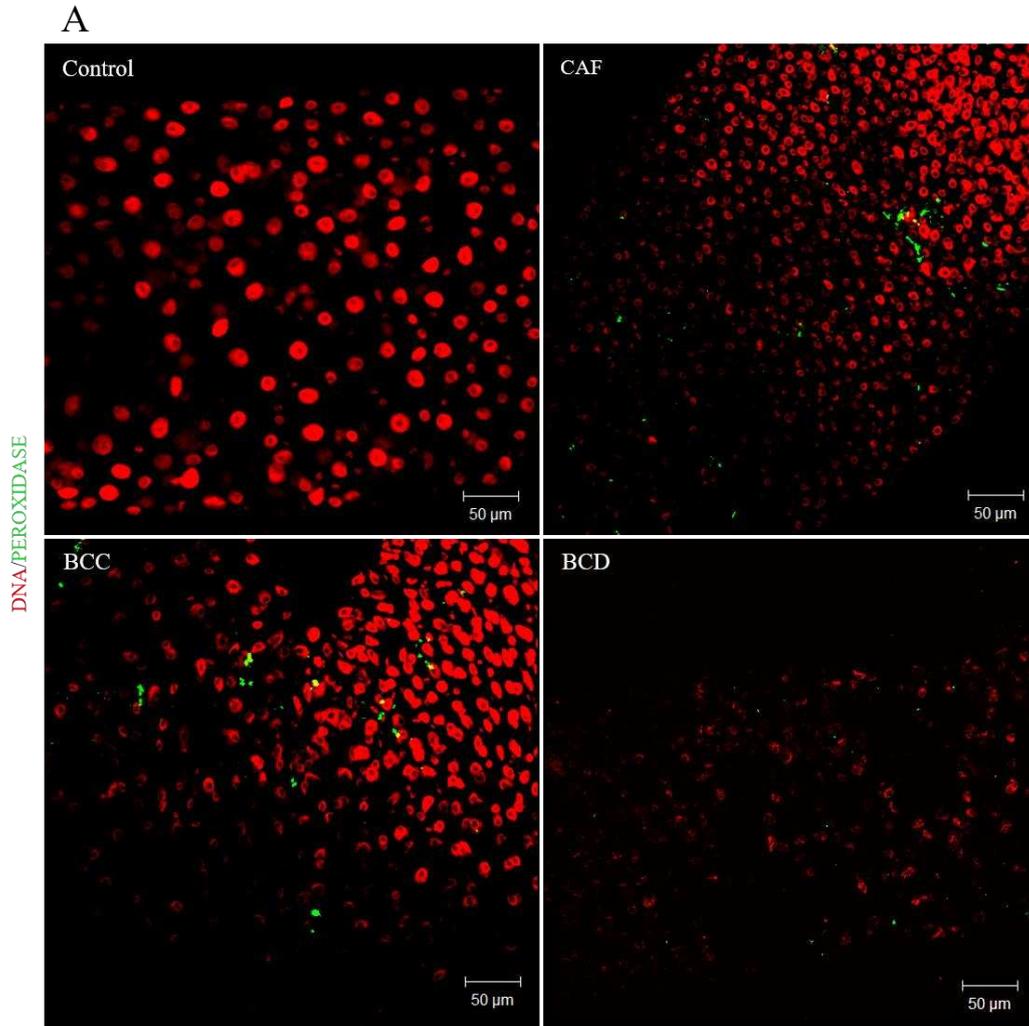


Fig. 5: **A:** Imunomarcção para peroxidase no intestino médio de L3 de *A. aegypti* expostas à cafeína (2,0 mg/mL) e borras (BCC e BCD 200 mg/mL) por 24 h. Verde: células peroxidase-positivas, Vermelho: núcleos corados com TO-PRO-3. **B:** Número de células positivas para peroxidase no intestino médio de L3 de *A. aegypti* expostas à cafeína (2,0 mg/mL) e borras (BCC e BCD 200 mg/mL) por 24 h. Barras verticais representam o desvio padrão (\pm SD). Letras diferentes indicam diferenças significativas com base no teste de Tukey's ($p < 0,05$).

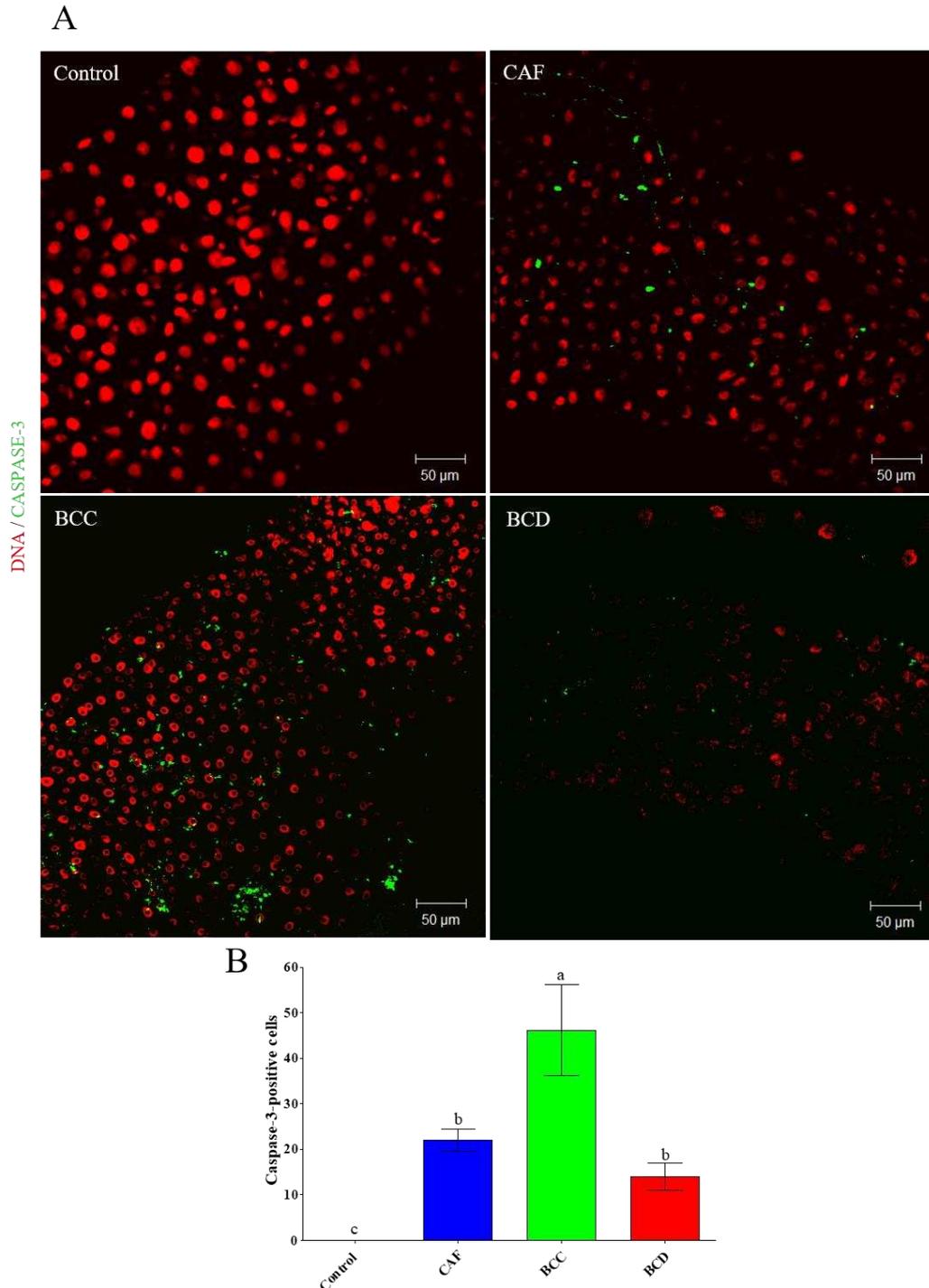


Fig. 6: **A:** Imunomarcção de caspase-3 no intestino médio larval de *A. aegypti* expostas à cafeína (2,0 mg/mL) e borras (BCC e BCD 200 mg/mL) por 24 h. Verde: células positivas para caspase-3, Vermelho: núcleos corados com TO-PRO-3. **B:** Número de células positivas para caspase-3 no intestino médio de L3 de *A. aegypti* expostas à cafeína (2,0 mg/mL) e borras (BCC e BCD 200 mg/mL) por 24 h. Barras verticais representam a média e o desvio padrão (\pm SD). Letras diferentes indicam diferenças significativas com base no teste de Tukey's ($p < 0,05$).

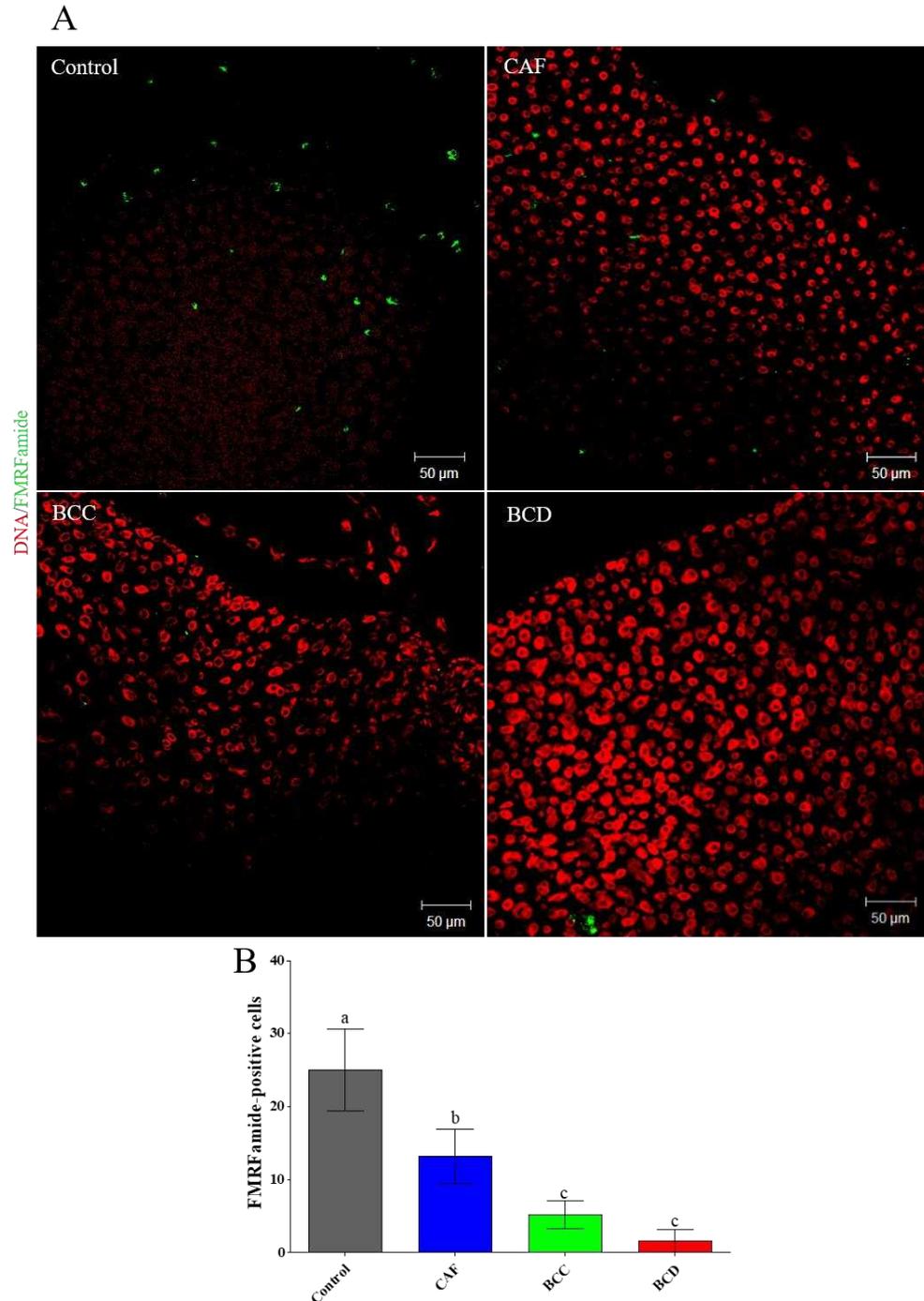


Fig. 7:A: Imunomarcção para células enteroendócrinas FMRF-amida-positivas no intestino médio de L3 de *A. aegypti* expostas à cafeína (2,0 mg/mL) e borras (BCC e BCD 200 mg/mL) por 24 h. Verde: células peroxidase-positivas, Vermelho: núcleos corados com TO-PRO-3. **B:** Número de células enteroendócrinas FMRF-positivas no intestino médio de L3 de *A. aegypti* expostas à cafeína (2,0 mg/mL) e borras (BCC e BCD 200 mg/mL) por 24 h. Barras verticais representam a média e o desvio padrão (\pm SD). Letras diferentes indicam diferenças significativas com base no teste de Tukey's ($p < 0,05$).

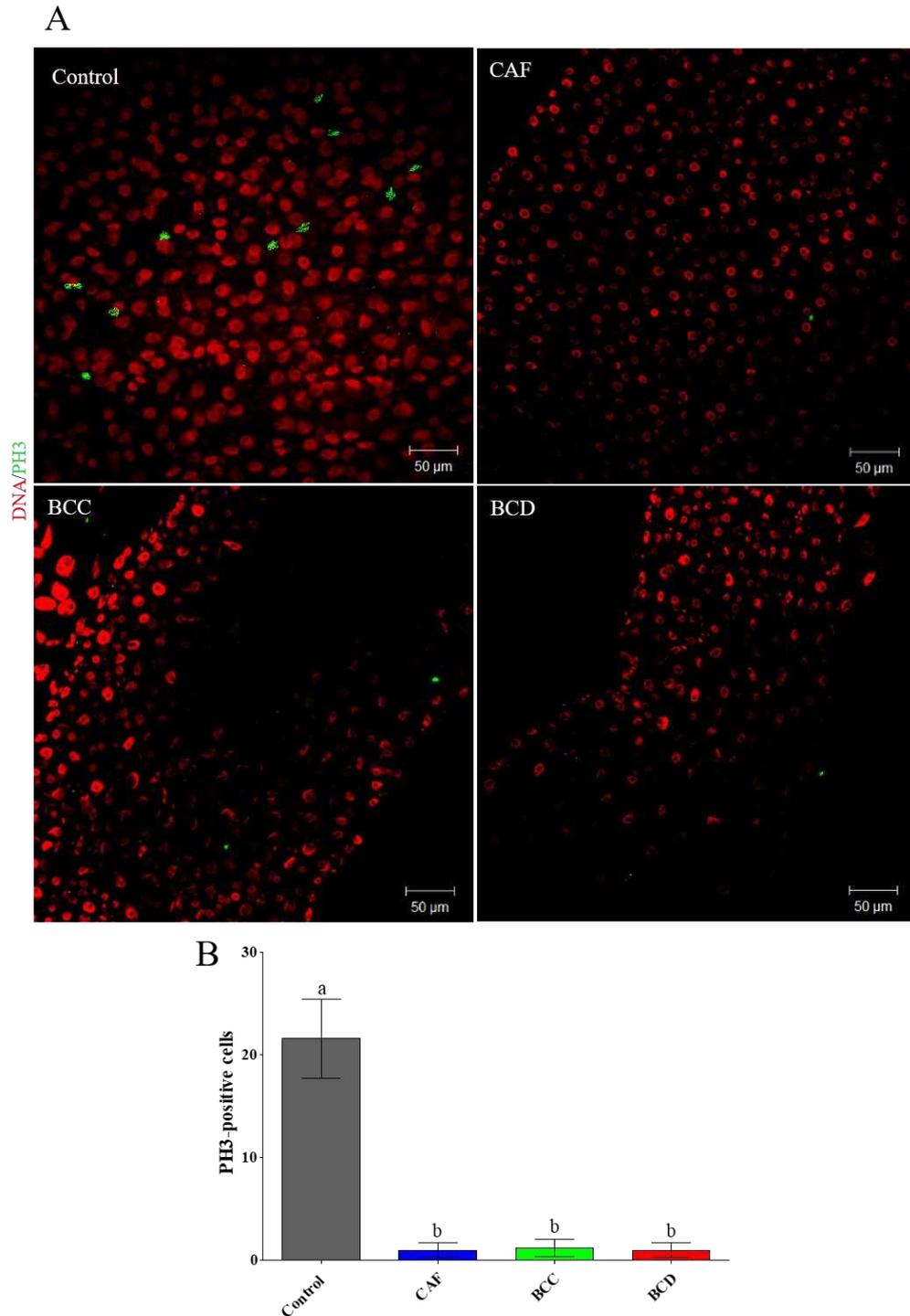


Fig. 8: **A:** Imunomarcção de células positivas para fosfohistona H3 (PH3) no intestino médio de L3 de *A. aegypti* expostas à cafeína (2,0 mg/mL) e borras (BCC e BCD 200 mg/mL) por 24 h. Verde: células PH3-positivas, Vermelho: núcleos corados com TO-PRO-3. **B:** Número de células PH3-positivas no intestino médio de L3 de *A. aegypti* expostas à cafeína (2,0 mg/mL) e borras (BCC e BCD 200 mg/mL) por 24 h. Barras verticais representam a média e o desvio padrão (\pm SD). Letras diferentes indicam diferenças significativas com base no teste de Tukey's ($p < 0,05$).

4. Conclusão

Nosso trabalho mostrou que a cafeína e a borra de café (comum ou descafeinada) têm potencial para serem utilizadas como larvicida natural, uma vez que os efeitos delas foram semelhantes a de inseticidas conhecidos. Os tratamentos também afetaram o intestino médio das larvas de *A. aegypti*, causando estresse oxidativo, ativando a apoptose, inibindo a proliferação de células-tronco e reduzindo o número de células enteroendócrinas FMRFamida. Além do mais, a borra de café usada apresenta menor toxicidade ao meio ambiente e a organismos não-alvos, em relação aos inseticidas químicos, e é um produto livre de custos, por ser de uso cotidiano e de descarte, transformado em ferramenta de controle alternativo de vetores.

5. Referências bibliográficas

Allan, S. A. Susceptibility of adult mosquitoes to insecticides in aqueous sucrose baits. *Journal of Vector Ecology*, v. 36, n. 1, p. 59–67, 2011.

Alphey, L., McKemey, A., Nimmo, D., Neira Oviedo, M., Lacroix, R., Matzen, K., & Beech, C. Genetic control of *Aedes* mosquitoes. *Pathogens and Global Health*, v. 107, n. 4, p. 170–179, 2013.

Alves, A. B., & Bragagnolo, N. Determinação simultânea de teobromina, teofilina e cafeína em chás por cromatografia líquida de alta eficiência. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 38, n. 2, p. 237–243, 2002.

Amcheslavsky, A., Song, W., Li, Q., Nie, Y., Bragatto, I., Ferrandon, D., Perrimon, N., & Ip, Y. T. Enteroendocrine cells support intestinal stem-cell-mediated homeostasis in *Drosophila*. *Cell Reports*, v. 9, n. 1, p. 32–39, 2014.

Ameiku, T., Yoshinari, Y., Texada, M. J., Kondo, S., Amezawa, K., Yoshizaki, G., Y., & Niwa, R. Midgut-derived neuropeptide F controls germline stem cell proliferation in a mating-dependent manner. *PLoS Biology*, v. 16, n. 9, p. 1–27, 2018.

Barreto, C. F., Carvasin, G. M., Silva, H. H. G. D., & Silva, I. G. D. Estudo das alterações morfo-histológicas em larvas de *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) submetidas ao extrato bruto etanólico de *Sapindus saponaria* Lin (Sapindaceae). *Revista De Patologia Tropical*, v. 35, n. 1, p. 37–57, 2006.

Bernick, E. P., Moffett, S. B., & Moffett, D. F. Ultrastructure and morphology of midgut visceral muscle in early pupal *Aedes aegypti* mosquitoes. *Tissue and Cell*, v. 40, n. 2, p. 127–141, 2008.

Billingsley, P. F. The midgut ultrastructure of hematophagous insects. *Annual Review of Entomology*, v. 35, n. 1, p. 219–248, 1990.

Braga, I. A., & Valle, D. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, v. 16, n. 4, p. 279–293, 2007.

Brandt, A., Gorenflo, A., Siede, R., Meixner, M., & Büchler, R. The neonicotinoids thiacloprid, imidacloprid, and clothianidin affect the immunocompetence of honeybees (*Apis mellifera* L.). *Journal of Insect Physiology*, v. 86, p. 40–47, 2016.

Brown, M. R., Crim, J. W., & Lea, A. O. FMRamide- and pancreatic polypeptidelike immunoreactivity of endocrine cells in the midgut of a mosquito. *Tissue and Cell*, v. 18, n. 3, p. 419–428, 1986.

Brown, M. R., Raikhel, A. S., & Lea, A. O. Ultrastructure of midgut endocrine cells in the adult mosquito, *Aedes aegypti*. *Tissue and Cell*, v. 17, n. 5, p. 709–721, 1985.

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

Bryant, B., Blair, C. D., Olson, K. E., & Clem, R. J. Annotation and expression profiling of apoptosis-related genes in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect biochemistry and molecular biology*, v. 38, n. 3, p. 331–45, 2008.

Buszczak, M., & Segraves, W. A. Insect metamorphosis: out with the old, in with the new. *Current Biology*, v. 10, n. 22, p. 830–833, 2000.

Camargo, M. C. R., & Toledo, M. C. F. Teor de cafeína em cafés brasileiros. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 18, n. 421–424, 1998.

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

Coelho, J. S., Santos, N. D., Napoleão, T. H., Gomes, F. S., Ferreira, R. S., Zingali, R. B. & Paiva, P. M. Effect of *Moringa oleifera* lectin on development and mortality of *Aedes aegypti* larvae. *Chemosphere*, v. 77, n. 7, p. 934–938, 2009.

Consoli, R. A., & de Oliveira, R. L. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. In: SciELO. [s.l: s.n.]. v. 11p. 228p. 1994

Cooper, D. M., Granville, D. J., & Lowenberger, C. The insect caspases. *Apoptosis*, v. 14, n. 3, p. 247–256, 2009.

Costa, M. S., de Paula, S. O., Martins, G. F., Zanuncio, J. C., Santana, A. E. G., & Serrão, J. E. Multiple modes of action of the Squamocin in the midgut cells of *Aedes aegypti* larvae. *PLoS ONE*, v. 11, n. 8, p. 1–13, 2016.

Crawley, M. J. *The R Book*, Ed., Secon ed. [s.l: s.n.]. Wiley, Chichester, 2012.

Cruz-Landim, C., & Costa-Leonardo, A. M. Ultrastructure of cell renewal in the midgut of termites. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 91, n. 1, p. 129–130, 1996.

Denton, D., Shrivage, B., Simin, R., Mills, K., Berry, D. L., Baehrecke, E. H., & Kumar, S. Autophagy, not apoptosis, is essential for midgut cell death in *Drosophila*. *Current Biology*, v. 19, n. 20, p. 1741–1746, 2009.

Eastep, N. E., Albert, R. E., & Anderson, J. R. Modulation of La Crosse virus infection in *Aedes albopictus* mosquitoes following larval exposure to coffee extracts. *Frontiers in Physiology*, v. 3, n. March, p. 1–6, 2012.

Fernandes, K. M., Gonzaga, W. G., Pascini, T. V., Miranda, F. R., Tomé, H. V. V., Serrão, J. E., & Martins, G. F. Imidacloprid impairs the post-embryonic development of the midgut in the yellow fever mosquito *S. tegomyia aegypti* (= *Aedes aegypti*). *Medical and Veterinary Entomology*, v. 29, n. 3, p. 245–254, 2015.

Fernandes, K. M., Neves, C. A., Serrão, J. E., & Martins, G. F. *Aedes aegypti* midgut remodeling during metamorphosis. *Parasitology International*, v. 63, n. 3, p. 506–512, 2014.

Fernandes, K. M., Tomé, H. V. V., Miranda, F. R., Gonçalves, W. G., Pascini, T. V., Serrão, J. E., & Martins, G. F. *Aedes aegypti* larvae treated with spinosad produce adults with damaged midgut and reduced fecundity. *Chemosphere*, v. 221, p. 464–470, 2019.

Franzetti, E., Huang, Z. J., Shi, Y. X., Xie, K., Deng, X. J., Li, J. P., Li, Q. R., Yang, W. Y., Zeng, W. N., Casartelli, M., Deng, H. M., Cappellozza, S., Grimaldi, A., Xia, Q., Feng, Q., Cao, Y., & Tettamanti, G. Autophagy precedes apoptosis during the remodeling of silkworm larval midgut. *Apoptosis*, v. 17, n. 3, p. 305–324, 2012.

Gooding, R. H. The digestive processes of haematophagous insects: IV. Secretion of trypsin by *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *The Canadian Entomologist*, v. 105, n. 4, p. 599–603, 1973.

Guirado, M. M., & Bicudo, H. E. M. de C. Attractiveness of bioinsecticides caffeine and used coffee grounds in the choice of oviposition site by *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *International Journal of Mosquito Research IJMR*, v. 47, n. 3, p. 47–51, 2016.

Guirado, M. M., & Bicudo, H. E. M. de C. Effect of used coffee grounds on larval mortality of *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae): suspension concentration and age versus efficacy. *BioAssay*, v. 2, n. 0, p. 1–7, 2007.

Hakim, R. S., Baldwin, K., & Smagghe, G. Regulation of midgut growth, development, and metamorphosis. *Annual Review of Entomology*, v. 55, n. 1, p. 593–

608, 2010.

Hecker, H. Structure and function of midgut epithelial cells in Culicidae mosquitoes (Insecta, Diptera). *Cell and Tissue Research*, v. 184, n. 3, p. 321–341, 1977.

Hecker, H., & Rudin, W. Morphometric parameters of the midgut cells of *Aedes aegypti* L. (Insecta, Diptera) under various conditions. *Cell and Tissue Research*, v. 219, n. 3, p. 619–627, 1981.

Khan, A. A., Rahmani, A. H., Aldebasi, Y. H., & Aly, S. M. Biochemical and pathological studies on peroxidases—An updated review. *Global Journal of Health Science*, v. 6, n. 5, p. 87–98, 2014.

Kim, R., Emi, M., & Tanabe, K. Caspase-dependent and-independent cell death pathways after DNA damage (Review). *Oncology Reports*, v. 14, n. 3, p. 595–599, 2005.

Laranja, A. T., Manzato, A. J., & Bicudo, H. E. M. D. C. Caffeine effect on mortality and oviposition in successive generations of *Aedes aegypti*. *Revista de Saude Publica*, v. 40, n. 6, p. 1112–1117, 2006.

Laranja, A. T., Manzatto, A. J., & Campos Bicudo, H. E. M. D. Effects of caffeine and used coffee grounds on biological features of *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) and their possible use in alternative control. *Genetics and molecular biology*, v. 26, n. 4, p. 419–429, 2003.

Lima, E. P., Paiva, M. H. S., Araújo, A. P., Silva, É. V. G., Silva, U. M., Oliveira, L. N., Santana, A. E. G., Barbosa, C. N., Neto, C. C. P., Goulart, M. O., Wilding, C. S., Ayres, C. F. J., & Santos, M. A. V. de M. Insecticide resistance in *Aedes aegypti* populations from Ceará, Brazil. *Parasites and Vectors*, v. 4, n. 1, p. 1–12, 2011.

Lopes, M. P., Fernandes, K. M., Tomé, H. V. V., Gonçalves, W. G., Miranda, F. R., Serrão, J. E., & Martins, G. F. Spinosad-mediated effects on the walking ability, midgut, and Malpighian tubules of Africanized honey bee workers. *Pest management science*, v. 74, n. 6, p. 1311–1318, 2018.

Moffett, S. B., & Moffett, D. F. 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*. *Journal of Insect Science*, v. 5, n. 1, 2005.

Morrison, A. C., Zielinski-Gutierrez, E., Scott, T. W., & Rosenberg, R. Defining challenges and proposing solutions for control of the virus vector *Aedes aegypti*. *PLoS Medicine*, v. 5, n. 3, p. e68, 2008.

Neto, J. A. R., Teixeira, J. L., Júnior, P. J. G., & Alves, S. N. Susceptibilidade das formas imaturas de *Culex quinquefasciatus* expostas a diferentes concentrações de

caféina e pó de guaraná (*Paullinea cupana*). Veredas Favip-Revista Eletrônica de Ciências, v. 5, n. 1, 2012.

Neves, C. A., Gitirana, L. D. B., & Serrão, J. E. FMRamide-like immunoreactive midgut endocrine cells in different castes of the bee *Melipona quadrifasciata* anthidioides (Apidae; Meliponini). Brazilian Journal of Morphological Sciences, v. 20, n. 3, p. 157–164, 2003.

Nishiura J. T., Ho P., Ray K. Methoprene interferes with mosquito midgut remodeling during metamorphosis. Journal of Medical Entomology, v. 40, n. 4, p. 498–507, 2003.

Pólo, A. M. Efeito da caféina no desenvolvimento de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): o significado biológico das alterações do padrão de síntese de esterases. [s.l.] Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, 2014.

Powell, J. R., & Tabachnick, W. J. History of domestication and spread of *Aedes aegypti*-A Review. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 108, n. October, p. 11–17, 2013.

Procópio, T. F., Fernandes, K. M., Pontual, E. V., Ximenes, R. M., de Oliveira, A. R. C., Souza, C. de. S., Melo, A. M., Navarro, D. M., Paiva, P. M., Martins, G. F., & Napoleão, T. H. *Schinus terebinthifolius* leaf extract causes midgut damage, interfering with survival and development of *Aedes aegypti* larvae. PLoS ONE, v. 10, n. 5, p. 1–19, 2015.

R Core Team. R: a Language and Environment for Statistical Computing, Version 3.4.4. R Foundation for Statistical Computing, 2018. Vienna.<http://www.R-project.org/>.

Ray, K., Mercedes, M., Chan, D., Choi, C. Y., & Nishiura, J. T. Growth and differentiation of the larval mosquito midgut. Journal of Insect Science, v. 9, n. 55, p. 1–13, 2009.

Rudin, W., & Hecker, H. Functional morphology of the midgut of *Aedes aegypti* L. (Insecta, Diptera) during blood digestion. Cell and Tissue Research, v. 200, n. 2, p. 193–203, 1979.

Rudin, W., & Hecker, H. Morphometric comparison of the midgut epithelial cells in male and female *Aedes aegypti* L. (Insecta, Diptera). Tissue and Cell, v. 8, n. 3, p. 459–470, 1976.

Satho, T., Dieng, H., Ahmad, M. H. I., Ellias, S. B., Hassan, A. A., Abang, F., Ghani, I. A., Miake, F., Ahamd, H., Fukumitsu, Y., Zuharah, W. F., Majib, A. H. A., Lassim, N. F. A., Hashim, N. A., Ajibola, O. O., Al-Khayyat, F. A., & Nolasco-Hipolito,

C. Coffee and its waste repel gravid *Aedes albopictus* females and inhibit the development of their embryos. *Parasites and Vectors*, v. 8, n. 1, p. 1–15, 2015.

Silva, H. H. G. D., Silva, I. G. D., Santos, R. M. G. D., Rodrigues Filho, E., & Elias, C. N. Larvicidal activity of tannins isolated of *Magonia pubescens* St. Hil. (Sapindaceae) against *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 37, n. 5, p. 396–399, 2004.

Terzi, D. M. Avaliação do teor de cafeína em produtos descafeínados. [s.l.] Fundação Educacional do Município de Assis - FEMA - Assis, 2010.

Tomé, H. V. V., Barbosa, W. F., Corrêa, A. S., Gontijo, L. M., Martins, G. F., & Guedes, R. N. C. Reduced-risk insecticides in Neotropical stingless bee species: impact on survival and activity. *Annals of Applied Biology*, v. 167, n. 2, p. 186–196, 2015a.

Tomé, H. V. V., Barbosa, W. F., Martins, G. F., & Guedes, R. N. C. Spinosad in the native stingless bee *Melipona quadrifasciata*: regrettable non-target toxicity of a bioinsecticide. *Chemosphere*, v. 124, n. 1, p. 103–109, 2015b.

Tomé, H. V., Pascini, T. V., Dângelo, R. A., Guedes, R. N., & Martins, G. F. Survival and swimming behavior of insecticide-exposed larvae and pupae of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. *Parasites and Vectors*, v. 7, n. 1, p. 1–9, 2014.

Valotto, C. F. B., Carvasin, G., Silva, H. H. G., Geris, R., & Silva, I. G. D. Alterações morfo-histológicas em larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae) causadas pelo tanino catéquico isolado da planta do cerrado *Magonia pubescens* (Sapindaceae). *Revista de Patologia Tropical*, v. 39, n. 4, p. 309–321, 2010.

Wang, P., Conrad, J. T., & Mohammed, S. Localization of midgut-specific protein antigens from *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) using monoclonal antibodies. *Journal of Medical Entomology*, v. 38, n. 2, p. 223–230, 2001.

Wu, Y., Parthasarathy, R., Bai, H., & Palli, S. R. Mechanisms of midgut remodeling: juvenile hormone analog methoprene blocks midgut metamorphosis by modulating ecdysone action. *Mechanisms of Development*, v. 123, n. 7, p. 530–547, 2006.

Yang, M., Wang, B., Gao, J., Zhang, Y., Xu, W., Tao, L. Spinosad induces programmed cell death involves mitochondrial dysfunction and cytochrome C release in *Spodoptera frugiperda* Sf9 cells. *Chemosphere*, v. 169, p. 155–161, 2017.

Apêndice 1. Resumo da análise de sobrevivência. Comparações de pares usando o teste de Log-Rank. Método de ajuste do valor P: Bonferroni.

	BCC [50 mg mL ⁻¹]	BCC [100 mg mL ⁻¹]	BCC [150 mg mL ⁻¹]	BCC [200 mg mL ⁻¹]	CAF [0.2 mg mL ⁻¹]	CAF [0.5 mg mL ⁻¹]	CAF [1 mg mL ⁻¹]	CAF [2 mg mL ⁻¹]
BCC [100 mg mL ⁻¹]	1	-	-	-	-	-	-	-
BCC [150 mg mL ⁻¹]	0.019	0.041	-	-	-	-	-	-
BCC [200 mg mL ⁻¹]	< 0.001	< 0.001	1	-	-	-	-	-
CAF [0.2 mg mL ⁻¹]	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	-	-	-	-
CAF [0.5 mg mL ⁻¹]	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	-	-	-
CAF [1 mg mL ⁻¹]	1	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	0.004	-	-
CAF [2 mg mL ⁻¹]	0.097	0.025	1	1	< 0.001	< 0.001	< 0.001	-
Control [0 mg mL ⁻¹]	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	1	< 0.001	< 0.001	< 0.001
BCD [50 mg mL ⁻¹]	1	1	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	0.138	< 0.001
BCD [100 mg mL ⁻¹]	0.364	1	1	1	< 0.001	< 0.001	< 0.001	1
BCD [150 mg mL ⁻¹]	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
BCD [200 mg mL ⁻¹]	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001

Apêndice 1. Continuação...

	Control [0 mg mL ⁻¹]	BCD [50 mg mL ⁻¹]	BCD [100 mg mL ⁻¹]	BCD [150 mg mL ⁻¹]
BCD [50 mg mL ⁻¹]	< 0.001	-	-	-
BCD [100 mg mL ⁻¹]	< 0.001	< 0.001	-	-
BCD [150 mg mL ⁻¹]	< 0.001	< 0.001	< 0.001	-
BCD [200 mg mL ⁻¹]	< 0.001	< 0.001	< 0.001	0.083

Apêndice 2. Resumo da análise dos dados da atividade locomotora. Contrastes por simplificação gradual no modelo ANCOVA.

Control vs Caffeine	$F_{2,56} = 6.2, p = 0.004$
Caffeine vs Coffee grounds	$F_{2,56} = 20.7, p < 0.001$
Coffee grounds vs Decaffeinated grounds	$F_{2,56} = 12.8, p < 0.001$

Conclusões gerais

Nos estádios larvais iniciais (L3 e L4-48h), o intestino médio apresenta protuberâncias apicais (“bolhas”) das células digestivas no lúmen. Há presença de alguns vacúolos no citoplasma, porém nenhuma célula caspase-3 positiva foi detectada, e os processos de apoptose e autofagia são evidentes nos músculos viscerais do intestino médio. No final da fase larval (L4-72h), há aumento da vacuolização do epitélio, sugerindo o início do processo apoptótico, além de detectar células positivas para caspase-3 clivada (Denton et al., 2010). O remodelamento do intestino médio de *A. aegypti* começa no final de L4 antes do estágio pupal com células digestivas mostrando características de morte celular (apoptose dependente de caspases).

No início da pupação há poucas células regenerativas e as células diferenciadas do epitélio do intestino médio começam a se deteriorar, apresentando alta vacuolização, perda da borda estriada e diminuição do número de células digestivas, que se desprende da membrana basal como resultado de apoptose e autofagia. As células regenerativas larvais sofrem diferenciação e originam o epitélio do intestino médio da pupa (O'Brien, 1966; Fernandes et al., 2014).

A metamorfose do intestino médio de *A. aegypti* é um processo de remodelação no qual células larvais sofrem morte celular autofágica e apoptótica, enquanto células regenerativas proliferam e se diferenciam para construir o epitélio do intestino médio adulto. Além disso, a proliferação celular ocorre nas células regenerativas, resultando em uma nova célula que permanecerá indiferenciada e outra que segue a cascata de diferenciação encontrada em outros insetos (O'Brien, 1966; Ray et al., 2009; revisado por Hakim et al., 2010).

Compostos como a cafeína e borra de café podem ser usados como alternativa para o controle desse vetor. A cafeína e borra de café comum e descafeinada, afetam significativamente a sobrevivência e o tempo de vida do mosquito *A. aegypti*. A cafeína e a BCC tem uma alta atividade larvicida e induz um atraso no desenvolvimento e a redução no tempo de vida dos mosquitos adultos (Laranja et al., 2003; Guirado & Bicudo, 2007). Além disso, a BCD causou maior mortalidade larval, demonstrando que o efeito larvicida das borras não possui relação com a cafeína, pois essa borra apresenta concentração de cafeína quase nula, sendo desconhecido o mecanismo de ação.

Esses compostos alteram a morfologia do intestino médio das larvas de *A. aegypti*, exibindo notável desorganização do epitélio, extensa vacuolização e ausência de borda estriada, sendo mais evidente no tratamento com BCD. Os tratamentos também

afetaram o intestino médio das larvas de *A. aegypti*, causando estresse oxidativo, ativando a apoptose, inibindo a proliferação de células-tronco e reduzindo o número de células enteroendócrinas FMRFamida.

A cafeína e a borra de café têm potencial para serem utilizadas como larvicida natural, uma vez que seus efeitos foram semelhantes a de inseticidas conhecidos, além de apresentar menor toxicidade ao meio ambiente e a organismos não-alvos, em relação aos inseticidas químicos, e é um produto livre de custos, por ser de uso cotidiano e de descarte, transformado em ferramenta de controle alternativo de vetores.