

WIVIANE ALVES DE ASSIS

**O CORPO GORDUROSO DE *Lutzomyia longipalpis* E *Phlebotomus papatasi*
(Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): ESTUDO MORFOLÓGICO EM
DIFERENTES CONDIÇÕES ALIMENTARES**

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
2013**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

A848c
2013
Assis, Wiviane Alves de, 1979-
O corpo gorduroso de *Lutzomyia longipalpis* e *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) : estudo morfológico em diferentes condições alimentares / Wiviane Alves de Assis. – Viçosa, MG, 2013.
vii, 39f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Gustavo Ferreira Martins.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f.32-39.

1. *Lutzomyia longipalpis* - Morfologia. 2. *Phlebotomus papatasi* - Morfologia . I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia Animal. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural. II. Título.

CDD 22. ed. 595.77

WIVIANE ALVES DE ASSIS

**O CORPO GORDUROSO DE *Lutzomyia longipalpis* E *Phlebotomus papatasi*
(Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): ESTUDO MORFOLÓGICO EM
DIFERENTES CONDIÇÕES ALIMENTARES**

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: 23 de agosto de 2013

Luciane Cristina de Oliveira Lisboa

Dihego de Oliveira Azevedo

Gustavo Ferreira Martins
(Orientador)

Agradecimentos

Inicialmente, gostaria de agradecer a cidade de Viçosa, que me acolheu durante esses dois anos. Da mesma forma agradeço à Universidade Federal de Viçosa, que me ofereceu todo o suporte para que eu pudesse realizar meu mestrado.

Ao meu orientador Gustavo, que foi um exemplo de que um orientador pode ser ao mesmo tempo, exigente, competente e amigo. Com certeza seguirei seus ensinamentos ao longo da minha vida.

Aos meus amigos do laboratório, principalmente Tales e Renata, pelo suporte e pelos momentos de descontração. Um agradecimento especial à Juliana, que se tornou uma amiga confidente e me auxiliou muito com suas palavras de conforto e sabedoria.

Aos amigos que fiz em Viçosa e no programa de Biologia Celular e Estrutural. A Talitta e Riudo, pela convivência e apoio profissional e pessoal durante todo o meu mestrado. A Stéphanie, Débora e Priscila pelas confidências, palavras de conforto e força e momentos muito felizes!

A Thaís por estar presente em todos os momentos importantes da minha vida e pelas sinceras demonstrações de amizade.

A CAPES/REUNI pela bolsa durante todo o meu mestrado.

E por último, porém não menos importante, a Deus e minha família, pois sem eles eu jamais conseguiria passar por essa etapa da minha vida.

A todos vocês, muito obrigada!

Resumo

ASSIS, Wiviane Alves de, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2013. **O corpo gorduroso de *Lutzomyia longipalpis* e *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): estudo morfológico em diferentes condições alimentares.** Orientador: Gustavo Ferreira Martins.

Os flebotomíneos dos gêneros *Lutzomyia* e *Phlebotomus* são encontrados no Novo e Velho Mundo, respectivamente. Suas fêmeas são hematófagas e importantes vetores de vírus, bactérias e várias espécies de *Leishmania*. Apesar de sua importância, alguns aspectos da morfofisiologia desses insetos permanecem pouco estudados, incluindo a organização do seu corpo gorduroso (CG). O CG é um órgão multifuncional, cujas funções incluem o armazenamento de nutrientes (proteínas, carboidratos e lipídeos). O objetivo deste trabalho foi descrever o CG de fêmeas adultas de *Lutzomyia longipalpis* e *Phlebotomus papatasi*, estudar as alterações subcelulares que ocorrem quando submetidas a diferentes dietas e estudar o efeito da administração de anticorpos antiqitina e antiperitrofina na dieta sanguínea no acúmulo de lipídeos nos trofócitos. Dois grupos de fêmeas foram usados para as duas espécies: 45h após o repasto sanguíneo e alimentadas com solução de sacarose (20-30%), estudados através das microscopias óptica e eletrônicas de varredura e transmissão e pelas análises de morfometria, onde foram medidas as áreas das gotículas lipídicas dos trofócitos. A abordagem morfométrica também foi empregada em fêmeas submetidas às dietas sanguíneas contendo dois anticorpos contra a matriz peritrófica: antiqitina e antiperitrofina. O CG é bastante semelhante entre as duas espécies em termos de localização, organização e composição celular, sendo subdivididos em parietal (logo abaixo do tegumento) e perivisceral. As células que compõem o CG são os trofócitos e os enócitos, sendo os primeiros muito mais abundantes, ricos em mitocôndrias e RER nos insetos alimentados com sangue. Os enócitos são células ricas em REL, reforçando a hipótese delas estarem envolvidas na síntese de lipídeos. Apesar de serem espécimes anautógenas e autógenas (*L. longipalpis* e *P. papatasi*, respectivamente), elas compartilham alterações subcelulares observadas mediante a dieta sanguínea, mesmo que no primeiro caso ela não seja essencial para o desenvolvimento dos ovócitos. Não houve diferenças significativas no tamanho da área das gotículas de lipídeos entre fêmeas tratadas com os dois anticorpos e as do grupo controle. Por outro lado, 48h após

o repasto a área das gotículas de lipídeo do controle é quase duas vezes maior do que os espécimes tratados com antiperitrofina e antiqutinase, porém, entre as fêmeas tratadas com os anticorpos não houve diferença. Em 72h após o repasto, a área das gotículas de fêmeas tratadas com antiperitrofina foi quase duas vezes maior do que do controle e dos tratados com antiqutinase. Em *P. papatasi*, a área das gotículas 24h após o repasto tratadas com antiqutinase é quase o triplo em relação ao controle e em torno de duas vezes maior que às tratadas com antiperitrofina. Em 48h e 72h após o repasto houve diferença significativa apenas entre as fêmeas tratadas com antiqutinase e antiperitrofina. Nossos resultados sugerem que os anticorpos foram capazes de interferir indiretamente no armazenamento de lipídeos em *L. longipalpis* e *P. papatasi* a partir das 48h seguidas do repasto sanguíneo. Esse trabalho constitui um estudo inédito do CG de flebotomíneos e fornece importantes informações para uma maior compreensão da fisiologia dos mesmos.

Abstract

ASSIS, Wiviane Alves de, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2013. **The fat body of *Lutzomyia longipalpis* and *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): morphological study in different feeding conditions.** Adviser: Gustavo Ferreira Martins.

The *Phlebotomus* and *Lutzomyia* sandflies are found in the Old and New World, respectively. Their adult females are haematophagous and important vectors of viruses, bacteria and various species of *Leishmania*. Despite their importance, some aspects of their physiology are poorly studied yet, including the organization of your fat body (FB). The FB is a multifunctional organ and its functions include storage of nutrients (such as proteins, carbohydrates and lipids). The aim of this study was to investigate the FB of adult females of *Lutzomyia longipalpis* and *Phlebotomus papatasi*, including the subcellular changes that occur in the FB trophocytes after blood feeding, and also study the effect of polyclonal antisera against the midgut peritrophic matrix proteins (i.e. chitinase and peritrophin) in the lipid accumulation in the trophocytes. Two groups of females were used of each species: 45h after blood feeding and the control, fed with sucrose solution (20-30%). Samples were processed for light and electron microscopy, and for morphometric analysis, trophocyte lipid droplets were considered. For the females that receive the blood diet with antibodies, the lipid droplet areas were measured 24, 48 and 72h after feeding. The FB is quite similar between the two species in terms of location, organization and cellular composition. The FBs are distributed throughout the whole insect body and are organized as parietal and perivisceral lobes. The FBs include the trophocytes and oenocytes. The trophocytes are the most abundant cells, rich in mitochondria and RER mainly in blood fed females. The oenocytes are rich in smooth endoplasmic reticulum, suggesting their role in lipid processing. Although *L. longipalpis* and *P. papatasi* are autogenous and anautogenous, respectively, they share subcellular changes observed after blood feeding, even in the former species the blood acquisition is not mandatory for the egg development. In addition, in non-blood fed and in blood fed individuals, there is no significant differences in the lipid droplet area in the trophocytes of *L. longipalpis* and *P. papatasi*. The treatment with antibodies has been shown to influence the supply of nutrients by FB. In *L. longipalpis* 24h after feeding showed no significant difference. Conversely, 48h after blood feeding significant differences in the

lipid droplet control is almost two times higher than the antiperitrophin and antichitinase fed females. However, among the females treated with these two antibodies there is no difference in terms of lipid droplet area. Seventy two h after feeding, the droplets area in antisera fed females was almost two times higher than the control. In *P. papatasi*, the lipid droplets area 24h after the treatment with antiserum against chitinase is almost three-fold greater compared to the control, while 48h and 72h after feeding the area was not significantly different among females treated with antisera against the chitinase and peritrophin. Our results suggest that the antibodies were able to negatively interfere with the digestion process in *L. longipalpis* and *P. papatasi* from 48h followed the blood meal, even if they were developed from *P. papatasi*. This work constitutes and provides important information for the better understanding of the sandflies FB biology.

Sumário

1 - Introdução.....	1
1.1– Os flebotomíneos.....	1
1.2 – O corpo gorduroso (CG) dos insetos.....	3
1.3 – Modificações celulares do CG ao longo da vida dos insetos.....	6
1.4 – Matriz peritrófica de insetos hematófagos.....	8
2 – Objetivos.....	10
3 – Materiais e Métodos.....	10
3.1 – Flebotomíneos.....	10
3.2 – Histologia.....	11
3.3 – Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	11
3.4 – Microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	12
3.5 – Morfometria e análises estatísticas.....	12
4 – Resultados.....	12
4.1 – Caracterização dos corpos gordurosos de <i>L. longipalpis</i> e <i>P. papatasi</i>	22
4.2 – Modificações ultraestruturais dos CGs de <i>L. longipalpis</i> e <i>P. papatasi</i>	18
4.3 – Ultraestrutura dos enócitos.....	18
4.4 – Morfometria.....	22
5 – Discussão.....	26
6 – Considerações finais.....	31
7 – Referências Bibliográficas.....	32

1 – Introdução e Revisão Bibliográfica

1.1 – Os flebotomíneos

Os flebotomíneos pertencem à Ordem Diptera, Família Psychodidae, Subfamília Phlebotominae. São reconhecidos seis gêneros de flebotomíneos, sendo de interesse para a entomologia médica, os gêneros *Lutzomyia* (Novo Mundo) e *Phlebotomus* (Velho Mundo) (Killick-Kendrick 1999). Essa classificação vem sendo discutida, em especial por ser baseada principalmente em características morfológicas. Porém, em análises de biologia molecular mostram algumas discrepâncias dessa classificação, sugerindo uma revisão mais cautelosa da taxonomia desses insetos (Ready 2013). Esses insetos são encontrados em regiões temperadas e tropicais, cujas fêmeas se alimentam de sangue e apresentam diferenças significativas em adaptações ecológicas, endemismo e riqueza de espécies (Dujardin *et al.* 1999, Sharma e Sing 2008, Costa 2009, Carvalho *et al.* 2010, Kato *et al.* 2010, OMS 2010).

Os flebotomíneos são pequenos, com um comprimento máximo de corpo de 3mm, sua cor varia do cinza ao preto e suas asas em repouso se dobram em forma de “V”. Eles possuem hábitos noturnos e descansam durante o dia em domicílios, cavernas, adegas e rochas. Seu voo é silencioso e não conseguem atingir grandes distâncias. Uma das características marcantes dos flebotomíneos é que eles saltam sobre seus hospedeiros (Killick-Kendrick 1999). A reprodução ocorre em ambiente terrestre úmido e podem ser autógenos ou anautógenos. No primeiro caso, as fêmeas completam seu primeiro ciclo gonotrófico sem o repasto sanguíneo, mas necessitam de uma ou mais alimentações sanguíneas para completar os ciclos subsequentes. No segundo caso, as fêmeas requerem um ou mais repastos sanguíneos para completar cada ciclo. Dos ovos eclodem larvas que se alimentam de fungos e matéria orgânica em decomposição, com um período de desenvolvimento de 30 a 60 dias e com quatro instares larvais. O período de pupação é de sete a oito dias e o tempo de vida do adulto é de duas a seis semanas (revisado em Killick-Kendrick 1999, Rutledge e Gupta 2002).

São conhecidas cerca de 900 espécies de flebotomíneos, porém apenas 70 delas são importantes com relação à saúde pública (Ready 2013). Esses insetos são importantes vetores de alguns patógenos, como, por exemplo, protozoários cinetoplastídeos do gênero *Leishmania*, causadores de leishmanioses, que estão

presentes em 22 países no Novo Mundo e 66 países do Velho Mundo (Sharma e Sing 2008). No continente americano, essa doença pode ser encontrada desde os Estados Unidos até o norte da Argentina, com exceção do Chile e Canadá, enquanto que o Brasil contribui com 90% dos casos, existindo registro de leishmanioses em todos os estados brasileiros (Soares e Turco 2003).

A transmissão de *Leishmania* ocorre através da picada de uma fêmea de um flebotomíneo infectado pelo parasito em um hospedeiro vertebrado. As fêmeas, ao realizarem o repasto em mamíferos infectados, ingerem macrófagos parasitados por formas amastigotas da *Leishmania*. Nesse estágio, os parasitos possuem moléculas presentes na sua superfície, entre elas os lipofosfoglicanos, que reconhecem e interagem com componentes do intestino médio dos flebotomíneos e se diferenciam rapidamente em formas flageladas denominadas promastigotas. O ciclo do parasito no inseto se completa em torno de 72h. Ao realizar um novo repasto em um hospedeiro vertebrado, as fêmeas infectantes liberam as formas promastigotas juntamente com a saliva, que são fagocitadas por células do sistema mononuclear fagocitário, entre elas, os macrófagos, associado à derme do hospedeiro. Nessas células, as formas promastigotas se diferenciam em formas amastigotas, iniciando um novo ciclo (Sacks e Kamhawi 2001, Handman e Bullen 2002, Bates 2007).

Nem todos os flebotomíneos são considerados vetores de *Leishmania spp.* A relação inseto-parasita parece ser espécie-específica, de maneira que em cada flebotomíneo vetor se desenvolve determinadas espécies ou cepas de *Leishmania*. Por motivos ainda não totalmente esclarecidos, alguns parasitos não conseguem se desenvolver no inseto. Apenas 30 espécies de flebotomíneos têm sido incriminadas como vetores de *Leishmania* (Kato *et al.* 2010, OMS 2010). Vários estudos relatam que há uma interação entre proteínas presentes do intestino médio dos flebotomíneos com moléculas de superfície do parasita, em especial lipofosfoglicanos, sugerindo que esta interação é determinante para a capacidade vetorial do inseto (Killick-Kendrick 1999).

Atualmente têm sido discutido quais as espécies de flebotomíneos são vetores naturais e quais são permissivos das cepas de *Leishmania*. O alvo de estudo para essa discussão é o mecanismo de adesão do parasita no intestino médio dos vetores, que é dependente da interação das cepas com lipofosfoglicanos (LPG) secretados pelos parasitos e interage com receptores presentes no epitélio intestinal dos insetos. *P. papatasi* é um vetor natural de *L. major* e expressa LPGs com uma alta variação das suas cadeias laterais e demonstram especificidade para seus respectivos parasitos.

Porém, outras espécies de *Phlebotomus* permitem o desenvolvimento de diversas espécies de *Leishmania* que expressa LPGs com poucas ou sem adições de cadeias laterais, além daquelas que essas espécies transmitem naturalmente. Esse é o caso de vetores permissivos. *Lutzomyia longipalpis* também pode ser considerado vetor permissivo por suportar experimentalmente o desenvolvimento de algumas cepas de *Leishmania* que não ocorrem naturalmente, como *Leishmania (L.) infantum chagasi* ou *Leishmania (L.) mexicana*. (revisado em Sacks *et al.* 2008, Ramalho-Ortigão *et al.* 2010, Pimenta *et al.* 2012).

A leishmaniose possui tratamento através de quimioterapia, mas seu controle é complicado por ser uma doença negligenciada e devido à diversidade de vetores, parasitos e hospedeiros intermediários que podem estar envolvido com a doença (Soares e Turco 2003). Pesquisas estão sendo desenvolvidas para um controle efetivo dessa doença, entre elas tentativas de se encontrar vacinas. Apesar da leishmaniose ser uma das mais conhecidas doenças relacionadas a flebotomíneos, eles também são agentes vetores de arbovírus, bactérias e fungos. Portanto, o controle dos flebotomíneos é a medida mais importante para evitar os parasitos transmitidos por esses insetos, sendo essencial entender sua a biologia para elaborar estratégias de prevenção eficazes (Marcondes 2001, OMS 2010).

1.2 – O corpo gorduroso (CG) dos insetos

O corpo gorduroso (CG) dos insetos possui origem mesodérmica, preenchendo boa parte do corpo dos insetos e outros artrópodes. Ele é constituído por um conjunto de células formando lâminas ou lóbulos suspensos na hemocele por uma lâmina basal, músculos e traquéias, que estão em contato direto com a hemolinfa, facilitando, dessa forma, a troca de substâncias com os outros órgãos e tecidos (revisado em Chapman 2012). O CG se encontra distribuído ao longo de todo o corpo, mas é mais abundante no abdômen, (Roma *et al.* 2010) e a sua organização geral varia muito entre os insetos. Em várias espécies de insetos holometábolos o CG se divide em dois subtipos, o perivisceral, em contato com os sistemas reprodutor e digestivo e o parietal, logo abaixo do tegumento (Hauerland e Shirk 1995, Arrese e Soulages 2010, Roma *et al.* 2010, Chapman 2012).

Por ser considerado um órgão multifuncional, uma variedade de funções metabólicas é atribuída ao CG, entre elas o fornecimento e estocagem de nutrientes que compõem a hemolinfa, como proteínas, carboidratos e lipídeos, a eliminação de substâncias tóxicas ao organismo e a participação na imunidade (Arrese e Soulages 2010, Chapman 2012). O armazenamento de lipídeos é essencial para o desenvolvimento dos insetos holometábolos, garantido sua sobrevivência durante a falta de alimento e durante o processo de metamorfose, além de ser crucial para a ovogênese, pelo fato do mesmo sintetizar os componentes do vitelo (Arrese e Soulages 2010). Além disso, as reservas de nutrientes são mobilizadas em resposta à demanda energética de outros tecidos, seja pelo voo, ou pela reprodução durante a vida adulta. Devido a sua variedade de funções, o CG é considerado análogo ao tecido adiposo e ao fígado de vertebrados (Canavoso *et al.* 2001, Arrese e Soulages 2010).

Os lipídeos são oriundos da dieta, absorvidos pelo intestino e estocados no CG, principalmente na forma de triacilgliceróis e, ao longo do desenvolvimento, são enviados a vários órgãos sempre que houver necessidade, como para os músculos do voo e ovócitos. Seu transporte é realizado através de uma proteína da hemolinfa, a lipoforina, a principal proteína carreadora de lipídeos nos insetos (Canavoso *et al.* 2001, Cheon *et al.* 2006, Klowden 2007). Outro tipo de nutriente que também é estocado no CG e enviado aos ovócitos são proteínas, como a vitelogenina que faz parte da composição do vitelo (Ziegler e Ibrahim 2001). Os carboidratos também são estocados no CG sob a forma de glicogênio e enviados a outros órgãos como fonte de energia sob a forma de trealose (Canavoso *et al.* 2001, Ziegler e Ibrahim 2001, Cheon *et al.* 2006).

A principal célula do CG são os trofócitos, também chamados de adipócitos ou células do CG propriamente ditas. Sua morfologia varia de acordo com o estágio de desenvolvimento do inseto e condição nutricional. Trata-se de células globulares de origem mesodérmica que apresentam geralmente um núcleo arredondado e um citoplasma rico em mitocôndrias, retículo endoplasmático rugoso (RER) e complexo de Golgi. Os trofócitos constituem o principal reservatório de nutrientes do CG, devido ao fato de o citoplasma dessas células possuem abundância de componentes lipídicos, proteicos e glicogênio em forma de grânulos. Além deles, outros tipos celulares também compõem o CG como, por exemplo, os enócitos, os urócitos, os micetócitos e células da hemoglobina (revisado em Chapman 2012). Nos dípteros, os tipos celulares presentes são os trofócitos e os enócitos, sendo que esses últimos estão em menor número,

espalhados entre os trofócitos (revisado em Dean *et al.* 1985, Johnson e Batterworth 1985, Raikhel *et al.* 1997, Martins *et al.* 2008b e 2011a).

Em fêmeas de *Culex quinquefasciatus* os trofócitos são células grandes com núcleo esférico e com gotículas de lipídeo ocupando quase todo o citoplasma. Essas células são altamente plásticas no sentido de serem capazes de alterar sua morfologia e capacidade de biossíntese de acordo com as demandas energéticas do inseto. Por exemplo, antes do repasto sanguíneo, elas possuem escassez de algumas estruturas celulares como RER e complexo de Golgi, ocorrendo um aumento em número das mesmas após o repasto sanguíneo. Também nesse estágio é possível observar a presença de vitelogenina no citoplasma dos trofócitos. Logo após a digestão sanguínea, os trofócitos voltam a apresentar morfologia semelhante a que apresentava antes do repasto, ou seja, com uma redução nítida da capacidade de síntese proteica (Cardoso *et al.* 2010).

Os enócitos, ao contrário das outras células do CG, são de origem ectodérmica, derivadas de células epidérmicas (revisado em Dean *et al.* 1985, Gould *et al.* 2001). Apesar de terem origem diferente, essas células são consideradas pertencentes ao CG em alguns trabalhos, simplesmente por estarem espalhadas por entre os trofócitos, participando da constituição do órgão. Dependendo da espécie ou de estágio de desenvolvimento, essas células podem ser encontradas associadas às células da epiderme, a outras do CG ou em ambos os casos (Wigglesworth 1988, Rollo e Camargo-Mathias 2006, revisado em Martins e Ortigão 2012). Sua função está relacionada ao processamento de lipídeos, síntese de hidrocarbonetos e ao processo de detoxificação (Gutierrez *et al.* 2007, Martins *et al.* 2011c). Em pupas de *Aedes aegypti*, essas células se encontram agrupadas com um núcleo central e com o citoplasma repleto de retículo endoplasmático liso. Os enócitos de *A. aegypti* também expressam genes para a transcrição da superfamília de proteínas do citocromo P450 e outras proteínas relacionadas ao processo de desintoxicação (Martins *et al.* 2008b e 2011c).

Os urócitos são células especializadas em armazenar uratos (Roma *et al.* 2010). Elas armazenam e excretam ácido úrico em forma de cristais. Nas abelhas essas células são de fácil identificação por apresentarem cor branca devido aos depósitos de uratos no citoplasma. Os urócitos possuem um núcleo de formato irregular e picnótico e uma aparente escassez de mitocôndrias, ribossomos ou RER (Chapman 1998, Cruz-Landim 2009, Roma 2010). Os micetócitos ou bacteriócitos são células encontradas em algumas ordens dos insetos, como Isoptera, Blattaria, Hemiptera, Homoptera e Anoplura e

contém microrganismos simbiotes, como demonstrado em *Periplaneta americana* a presença de *Blattabacterium cuenoti*, que produzem vitamina B e aminoácidos essenciais. Já as células da hemoglobina são encontradas apenas em larvas dos gêneros *Gaestrophilus* (Diptera), *Anisops* (Lepidoptera) e *Buenoa* (Hemiptera) e são especializadas na produção de hemoglobina (Costa 2009, revisado em Chapman 2012, Park *et al.* 2013).

O CG dos insetos também é um órgão imunocompetente. Os insetos possuem um sistema imune inato bem desenvolvido, subdividido: humoral, no qual há a produção de substâncias, como peptídeos antimicrobianos; e celular, que conta com os hemócitos ou células que realizam fagocitose, agregação e encapsulação de patógenos. Na resposta humoral de dípteros, a produção de peptídeos é realizada pelas células do CG, hemócitos e células epiteliais, sendo depois liberadas na hemolinfa (Boulanger *et al.* 2006, Garcia *et al.* 2009). Vários desses peptídeos já foram caracterizados em *Drosophila melanogaster* e eles são liberados por duas vias do sistema imune: a Via Toll e IMD (Agaisse e Perrimon 2004, revisado em Klowden 2007).

1.3 – Modificações celulares do CG ao longo da vida dos insetos

Durante a metamorfose dos insetos holometábolos, as células do CG, bem como o tecido em si podem passar por transformações tanto morfológicas quanto em termos da expressão gênica. Por exemplo, nos lepidópteros, o CG passa de um órgão disposto em lâminas nas larvas para grupos de lóbulos nos adultos. Nesse exemplo, proteínas específicas de larvas e pupas deixam de ser expressas no CG durante a metamorfose, ao mesmo tempo em que iniciam a expressão das proteínas específicas dos adultos (Hauerland e Shirk 1995), porém, essa modificação parece não acontecer nos insetos holometábolos em geral.

Durante a metamorfose, dois mecanismos têm sido sugeridos para explicar as alterações ocorridas no CG: o primeiro seria a completa substituição do CG larval pelo do adulto por ação de células tronco indiferenciadas e o segundo seria uma remodelação celular, onde o CG larval é dissociado em células isoladas, que depois se reassociam formando o CG adulto (Larse 1976, Hauerland e Shirk 1995). Esse último mecanismo parece ser o que ocorre em dípteros. Já o CG de ninfas dos insetos hemimetábolos persiste ao longo do desenvolvimento sem muitas mudanças (Chapman, 2012).

Durante a pupação de *D. melanogaster*, as células do CG se dissociam pela ação de proteases que promovem a degradação da membrana basal e da matriz extracelular existentes entre as células, promovendo a dissociação de células individuais na hemolinfa (Butterworth *et al.* 1965, Zhang *et al.* 2013). Foi proposto que os hemócitos seriam as células responsáveis por esse processo. Porém, em *D. melanogaster*, esse processo ocorre coordenado por genes envolvidos no processo de morte celular, induzidos pelo hormônio ecdisona. Estudos realizados em *Helicoverpa armigera*, demonstraram a participação de uma protease catepsina L na dissociação das células do CG, sob ação da ecdisona (Zhang *et al.* 2013). Estudos com *D. melanogaster* também relataram que algumas células do CG larvais perdem a adesão durante a metamorfose e estão presentes nos adultos recém-emergidos, formando um aglomerado de células (Nelliot *et al.* 2006). Esse processo também é observado em *Calpodex ethlius* (Lepidoptera), antes de passar pela metamorfose, onde as células do CG perdem a adesão entre elas e se soltam, formando então um CG de massa de células soltas. Dois dias antes de o adulto emergir, algumas células se reagrupam, formando nódulos em torno das traquéias. Um dia antes da emergência, quase todo o CG já está reorganizado (Larsen 1976). O CG de larvas e adultos têm funções específicas relacionadas com o estágio do desenvolvimento. Por exemplo, em larvas de *Helicoverpa zea* (Lepidoptera), a síntese de proteínas ocorre somente no CG parietal, enquanto que o armazenamento de lipoproteínas importantes para esse inseto ocorre no CG perivisceral. Os pigmentos do olho no adulto de *D. melanogaster* têm síntese e armazenamento em locais diferentes do CG da larva e em Chironomidae, a síntese de hemoglobina na larva parece ocorrer no CG parietal, enquanto que o armazenamento ocorre no perivisceral (Hauerland e Shirk 1995, revisado em Chapman 2012). Além disso, há diferenças estruturais em cada região desse órgão. Em Diptera e Lepidoptera, no período de pré-pupa, aparecem estruturas eletrondensas, como vacúolos autofágicos, grânulos de urato e grânulos proteicos, sendo que esses últimos estão ausentes no início do estágio larval e presentes nas pupas e adultos (revisado em Dean *et al.* 1985, Hauerland e Shirk 1995).

Os trofócitos de fêmeas adultas recém-emergidas de *A. aegypti* possuem grandes quantidades de lipídeos, proteínas, partículas de glicogênio na forma de roseta, muitos ribossomos livres, mitocôndrias e pouco RER. Percorridos quatro dias sem se alimentar, as células sofrem uma redução das reservas de nutrientes e possuem muitos lisossomos. Após o repasto sanguíneo, os trofócitos sofrem várias modificações, entre elas, o aumento em número de organelas, como RER e Complexo de Golgi e inclusões

proteicas. A membrana plasmática das células formam inúmeras invaginações, aumentando a área de superfície. Nas primeiras 24h após o repasto, os trofócitos apresentam uma grande quantidade de vitelogenina que é liberada na hemolinfa e endocitada pelos ovários. Nessa fase, os trofócitos são caracterizados pela abundância de RER, complexo de Golgi e vesículas secretoras. Passados 48h do repasto há um grande aumento da quantidade de glicogênio e significativa redução de RER e da síntese de vitelogenina (Tadkowski e Jones 1979, Raikhel e Lea 1983, Raikhel 1986a, b, Snigirevskaya *et al.* 1997).

Estudos realizados com o CG de *Toxorhynchites theobaldi* (Culicidae) mostraram que ocorre um aumento da massa corporal dos estágios larvais L1 a L4. Acompanhando esse processo, também ocorre um aumento da área das gotículas de lipídeo presentes no citoplasma dos trofócitos. O tamanho dessas gotículas diminui após a metamorfose e em fêmeas adultas de seis dias de idade, ocorre um novo aumento. Com base nesses resultados, pode-se dizer que o estoque de lipídeos do CG aumenta durante o estágio larval e o aumento da área das gotículas de lipídeos no órgão é um dos principais responsáveis pelo aumento da massa corporal do inseto (Pascini *et al.* 2011).

1.4 – Matriz peritrófica de insetos hematófagos

A matriz peritrófica (MP) é uma estrutura sintetizada no intestino médio logo após os insetos hematófagos ingerirem sangue e que, entre outras funções, atua como uma barreira contra patógenos (Ramalho-Ortigão *et al.* 2005, Secundino *et al.* 2005). Ela é composta de proteínas, denominadas peritrofinas, que participam do esqueleto da matriz peritrófica, além de ter uma função análoga à mucina de vertebrados, protegendo as células do epitélio intestinal (Coutinho-Abreu *et al.* 2013). Um outro componente da MP é o polissacarídeo quitina, considerado o principal componente da MP. Sua deposição e degradação são controladas pela enzima quitinase. Além de envolver o alimento ingerido, a MP também tem uma função protetora. É conhecido que os patógenos *Leishmania sp.* podem utilizar a MP para escapar da ação de enzimas digestivas ao interagir com substâncias dessa matriz protetora e se desenvolver dentro o inseto (Pimenta *et al.* 1997, Coutinho-Abreu *et al.* 2010).

Alguns estudos têm sido realizados no intuito de destruir substâncias da MP, com a utilização de anticorpos contidos na dieta para interferir na ação da proteína

peritrofina e da enzima quitinase. Isso supostamente pode interferir na formação da MP e avaliar um possível mecanismo de evitar o desenvolvimento de parasitos nos flebotomíneos, auxiliando, dessa forma, no combate à Leishmaniose. Essa estratégia é conhecida como uso de vacina de bloqueio de transmissão e representa uma potencial interferência da transmissão dos patógenos (Ramalho-Ortigão e Traub-Csekö 2003, Coutinho-Abreu *et al.* 2010, Coutinho-Abreu *et al.* 2013).

Como demonstrado até o momento, muitos estudos têm sido realizados com o objetivo de entender a bioquímica e morfologia do corpo gorduroso de vários dípteros, inclusive de mosquitos hematófagos importantes vetores de patógenos como o *A. aegypti*. No entanto, estudos com o CG de outros insetos que também são de grande interesse para a saúde pública, tais como os flebotomíneos, são escassos. Conforme já foi exposto, o CG é um órgão multifuncional que participa de processos vitais nos insetos, o que não deve ser diferente para os flebotomíneos. Conhecer a morfologia desse órgão é importante para melhor compreender a biologia dessa espécie, e assim, adotar medidas de controle para as doenças relacionadas a esses insetos.

No presente trabalho o CG de adultos de *Lutzomyia longipalpis* (espécie do Novo Mundo) e *Phlebotomus papatasi* (espécie do Velho Mundo) foram estudados de maneira inédita numa abordagem comparativa através de diferentes ferramentas de microscopia possibilitando descrever o órgão em termos de organização e composição celular em insetos submetidos a diferentes tipos de dietas, incluindo a alimentação sanguínea contendo anticorpos (antiquitinase e antiperitrofina) contra proteínas da matriz peritrófica. De maneira geral o CG dos dípteros é bastante conservado quanto aos tipos celulares, porém, devido aos diferentes hábitos alimentares e aos diferentes tempos da digestão sanguínea e de maturação dos ovos, as modificações ocorridas no CG variam. Finalmente esse trabalho representa um importante passo para entender como essas modificações ocorrem nessas duas espécies de flebotomíneos de regiões geográficas distintas.

2 – Objetivos

2.1 – Objetivo geral:

Estudar as alterações no CG de *L. longipalpis* e *P. papatasi* submetidos a diferentes dietas.

2.2 – Objetivos específicos:

- 1) Caracterizar morfológicamente os CGs;
- 2) Comparar entre as espécies a ultraestrutura dos trofócitos de fêmeas submetidas à alimentação sanguínea e à base de açúcar;
- 3) Comparar o efeito das dietas à base de sangue e açúcar no acúmulo de lipídeos nos trofócitos através da morfometria;
- 4) Estudar o efeito da presença de anticorpos anti quitinase e anti peritrofina na dieta sanguínea, no acúmulo de lipídeos nos trofócitos também através da morfometria.

3 – Materiais e Métodos

3.1 – Flebotomíneos

Os espécimes de *L. longipalpis* (Jacobina, BA) e *P. papatasi* (Israel) foram obtidos de colônias mantidas no Departamento de Entomologia da Kansas State University, Kansas, Estados Unidos. As fêmeas foram mantidas em incubadores com temperatura ($\pm 28^{\circ}\text{C}$), umidade (80%) e fotoperíodo (12/12h de claro/escuro).

O CG foi obtido dos seguintes grupos: (1) fêmeas com seis dias de idade, 45h após o repasto sanguíneo em cobaias (porcos da Índia, anestesiados com 100 mg/kg de cetamina e 3 mg/kg xilazina e fêmeas alimentadas com solução de açúcar (sacarose 10%) (controle); e (2) fêmeas com três a cinco dias de idade, 24, 48 e 72h após a alimentação em alimentador artificial com solução de hemácias misturadas com anticorpos policlonais (485 $\mu\text{g/ml}$ de sangue a 37°C) anti-quitinase e anti-peritrofina. Os anticorpos foram obtidos camundongos BALB/c anestesiados e caracterizados: anti quitinase (PpChit1, quitinase 1 de *P. papatasi*) e anti peritrofina (PpPer1, peritrofina 1 de *P. papatasi*), conforme descrito por Ramalho-Ortigão *et al.* (2005) e Coutinho-

Abreu *et al.* (2010). O grupo controle era composto por fêmeas alimentadas em alimentador artificial com solução de hemácias sem anticorpos.

3.2 – Histologia

As fêmeas dos dois grupos de flebotomíneos foram lavadas em solução com detergente e em seguida em água corrente. Com o auxílio de pinças e estiletos, o abdome foi perfurado para permitir a entrada do fixador. O fixador utilizado foi o gluteraldeído 2,5%, em tampão cacodilato de sódio 0,1M pH 7,2. As amostras foram mantidas no mesmo fixador até as etapas subsequentes. As amostras foram lavadas duas vezes em tampão fosfato-PBS 0.1M, desidratadas em solução alcóolica crescente (70-100%), infiltradas em solução etanol/historesina Leica (1:1) por 40min e em historesina sem endurecedor por, no mínimo, uma hora. Após a infiltração, as amostras foram embebidas em historesina com endurecedor em moldes de plástico à temperatura ambiente por, no mínimo, 40min, de acordo com o protocolo do fabricante.

Blocos de resina polimerizada contendo as amostras foram seccionados (3-4 μ m). As lâminas foram coradas com Hematoxilina e Eosina, montadas em meio de montagem Eukitt[®] (Fluka) observadas e fotografadas em microscópio óptico da marca Zeiss Primo Star com câmera acoplada AxioCam ERC5s.

3.3 – Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Após fixação e lavagem, amostras das duas espécies do grupo 1 foram colocados em uma lâmina de vidro sob o microscópio estereoscópio e o abdômen foi aberto longitudinalmente para retirada das vísceras e para expor o CG. Subsequentemente, as amostras foram submetidas à pós-fixação em solução de tetróxido de ósmio 1% e ferricianeto de potássio 0,8% (Martins e Pimenta 2008) por uma hora à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. As amostras foram lavadas em PBS, desidratadas em concentrações crescentes de acetona (30-100%), submetidas à secagem rápida através do aparelho de ponto crítico, montadas em suportes apropriados e metalizadas com ouro, a fim de serem observadas e as imagens registradas no MEV LEO 1430VP do Núcleo de Microscopia e Microanálise (NMM) da UFV.

3.4 – Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Fragmentos do abdômen contendo CGs do grupo 1 foram pós-fixados e desidratados como no item anterior. Em seguida, os mesmos foram mantidos em solução de acetona/Spurr (1:1) durante o período da noite e posteriormente em Spurr (EMS) por 24h, seguido da polimerização por 48h a $58\pm 2^{\circ}\text{C}$. Após a polimerização, o material foi seccionado (70-90nm) no ultramicrotomo com o auxílio de navalha de diamante. As secções ultrafinas foram coletadas em grades de cobre (300 *mesh*), contrastadas por 20min em acetato de uranila aquosa, lavadas com água destilada, contrastadas por 20min em citrato de chumbo e novamente lavadas. O material foi observado e fotografado com o auxílio do MET da marca Zeiss EM 109 do NMM.

3.5 – Morfometria e análises estatísticas

As áreas das gotículas de lipídeo dos trofócitos dos grupos 1 e 2 foram medidas a partir das imagens dos cortes histológicos obtidas ao microscópio óptico do item 3.2.1. As áreas foram medidas com o auxílio do software Image ProPlus™. Foram medidas 30 gotículas de lipídeo em três exemplares de *L. longipalpis* e *P. papatasi* para cada tratamento do item 3.1. Os dados quantitativos foram analisados utilizando Teste *t-Student* para comparações entre pares ou análise múltipla de variância (ANOVA), seguido do teste de Tukey para comparação it-hoc entre grupos. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p\leq 0,05$. As análises foram realizadas utilizando o programa R (R Development Core Team 2006).

4 – Resultados

4.1 – Caracterização dos corpos gordurosos de *L. longipalpis* e *P. papatasi*

O CG de *L. longipalpis* e *P. papatasi* está distribuído ao longo de todo corpo, presente inclusive na cabeça e no tórax, porém, o CG é mais desenvolvido na região abdominal. Ambas as espécies, incluindo os diferentes tratamentos ou dietas, apresentam semelhanças em termos de localização, organização e composição celular do CG (Fig. 1A-D). Os CGs apresentam uma porção parietal, logo abaixo do tegumento, e uma porção perivisceral, em contato com os órgãos viscerais. A porção

perivisceral é mais desenvolvida do que a parietal e está associada aos órgãos viscerais (Fig. 1 A-B).

O CG é basicamente composto por trofócitos. Essas células apresentam citoplasma repleto de gotículas de lipídeo, facilmente visíveis (Fig. 1C). Os enócitos também foram observados nos CGs de *L. longipalpis* e *P. papatasi*. Eles são células grandes, bem maiores que os trofócitos, distribuídas entre eles, na periferia do órgão. Elas foram vistas somente na porção posterior do abdômen, especificamente próximas dos ovários. Elas possuem um citoplasma homogeneamente corado e um núcleo volumoso e arredondado com nucléolo evidente (Fig. 1E).

Ao MEV somente foi possível observar a porção parietal dos CGs pelo fato dos lóbulos periviscerais terem sido perdidos durante a dissecação e processamento das amostras. O CG parietal está organizado sob a forma de pequenos lóbulos abaixo do tegumento, especificamente entre as pleuras e nas laterais do abdome (Figs. 2A-B). O CG parietal não é contínuo, formando lóbulos amorfos e intervalados que se projetam para a hemocele (Figs. 2A-B). Os lóbulos dos CGs são delimitados por uma membrana basal com a superfície enrugada (Fig. 2C).

Figura 1 – Secções histológicas coradas por HE mostrando alguns aspectos gerais e outros detalhados do corpo gorduroso (CG) de fêmeas de flebotomíneos.

A- Secção longitudinal do tórax (t) e abdome (a) de *L. longipalpis* alimentada com açúcar mostrando a distribuição do CG principalmente logo abaixo do tegumento (TG). Im - intestino médio; H - hemocele; Ov - ovário; TM - túbulos de Malpighi; M - músculo.

B- Secção longitudinal do abdome de *L. longipalpis* 24h após o repasto sanguíneo mostrando os lóbulos parietais (PA) e periviscerais (PV) do CG.

C- Porção parietal do CG de *P. papatasi* alimentada com açúcar. Notar o citoplasma dos trofócitos com gotículas lipídicas evidentes. N - núcleos dos trofócitos.

D- Secção longitudinal da cabeça (c) e tórax (t) de *P. papatasi* 45h após o repasto sanguíneo mostrando a presença do CG entre os músculos (M), logo abaixo do tegumento (TG) e nas pernas (p).

E- Enócitos (En) de *L. longipalpis* alimentados com açúcar com núcleo (N) volumoso e nucléolo (n) desenvolvido. Notar que o tamanho dessa célula é bem maior que dos trofócitos no CG. Ov - Ovário.

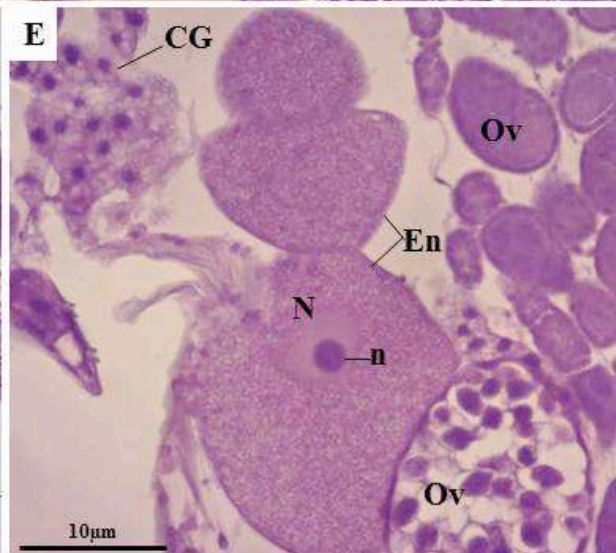
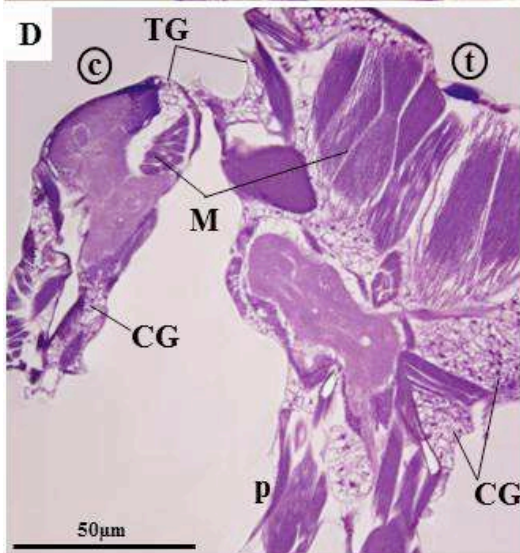
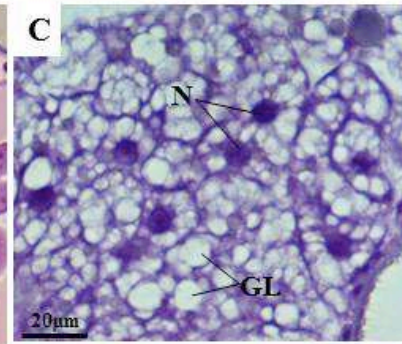
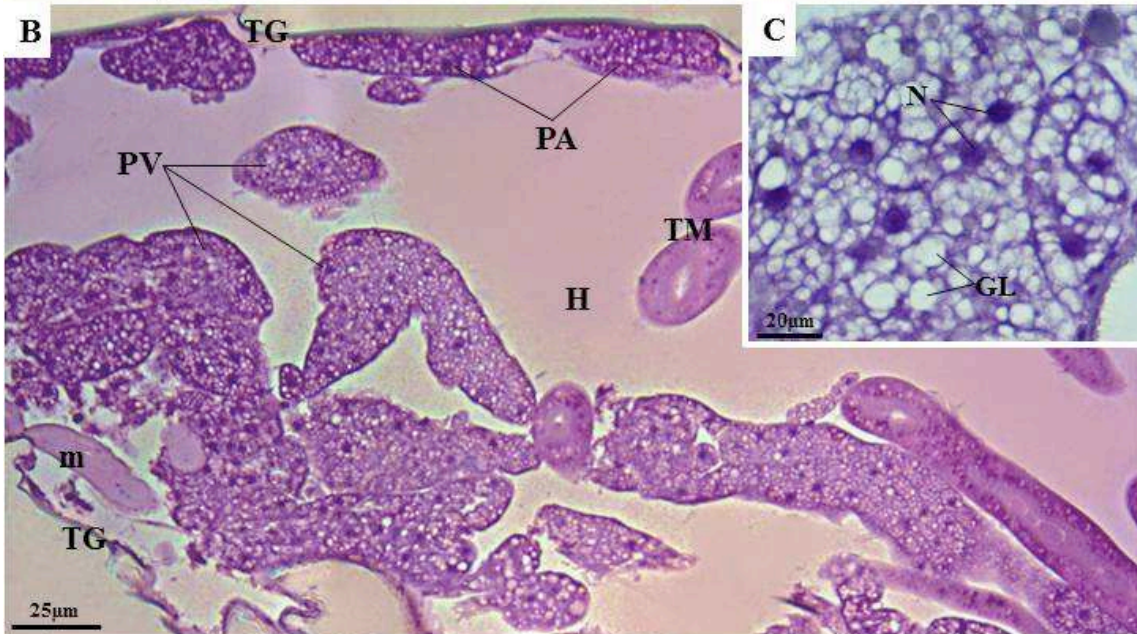
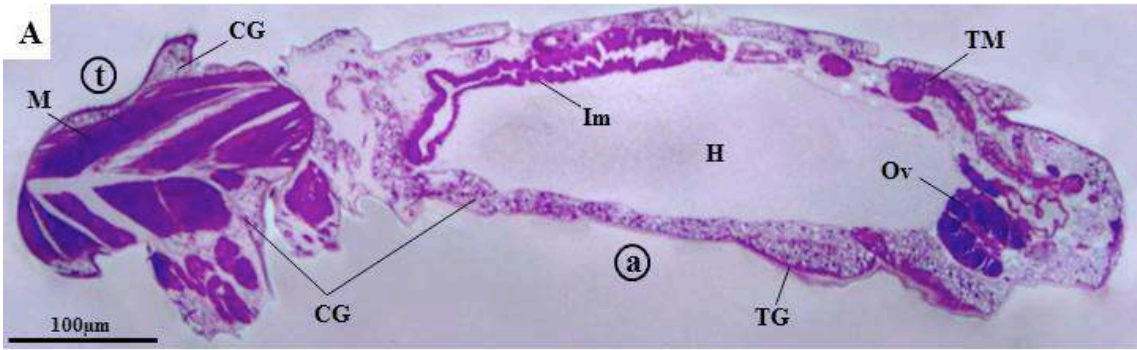
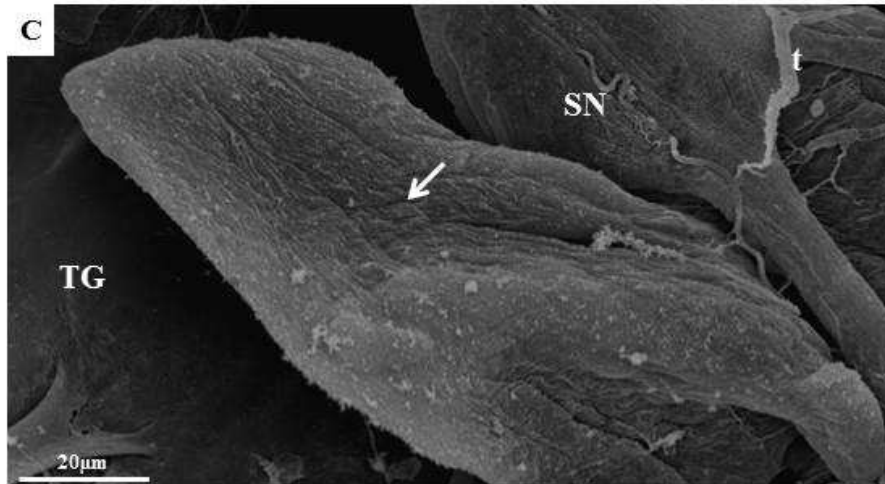
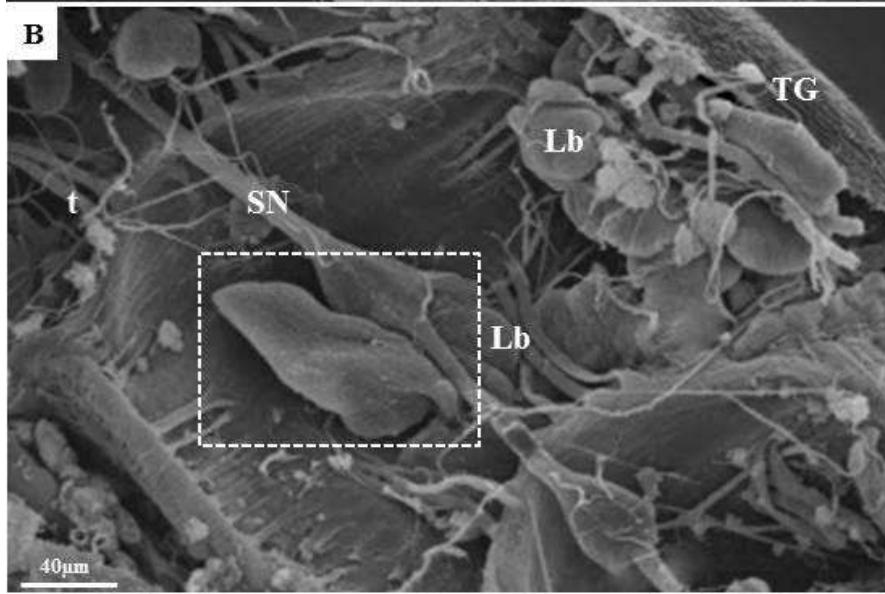
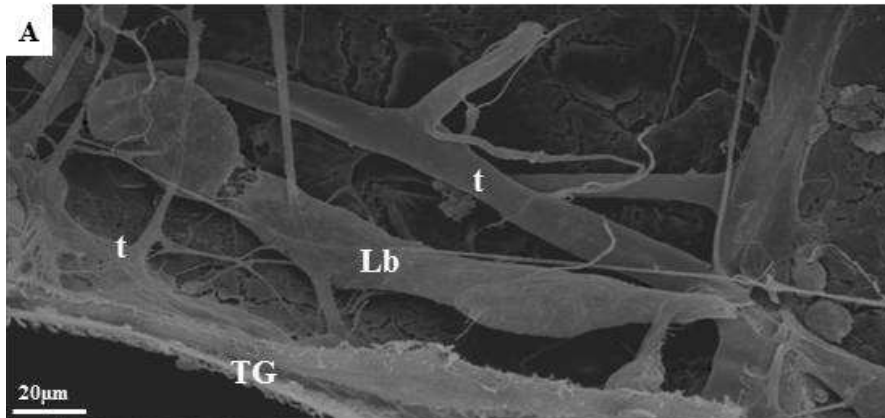


Figura 2 – Micrografia eletrônica de varredura do CG abdominal de fêmeas de *L. longipalpis*.

A- Lóbulo (Lb) lateral do CG de fêmeas alimentadas com açúcar. TG - tegumento; t - traqueia.

B- Superfície interna do tegumento de fêmeas 45h após o repasto mostrando os lóbulos (Lb) amorfos do corpo gorduroso. Notar que a distribuição desses lóbulos não é contínua ao longo do corpo. SN - sistema nervoso.

C- Detalhe mostrando do lóbulo demarcado pelo pontilhado branco da Fig. 2B. Notar que o lóbulo é revestido por uma membrana basal irregular/enrugada (seta).



4.2 – Modificações ultraestruturais dos CGs de *L. longipalpis* e *P. papatasi*

Os CGs de *L. longipalpis* e *P. papatasi* são delimitados por uma membrana basal que isola os trofócitos da hemolinfa, sendo que essas células apresentam uma membrana citoplasmática com muitas invaginações (Figs. 3A e 4A).

Nas fêmeas alimentadas com açúcar, o citoplasma dos trofócitos é quase todo preenchido por mitocôndrias, poucas e pequenas gotículas de lipídeo e algumas áreas preenchidas por glicogênio. O núcleo é volumoso com cromatina na sua maioria descondensada e grumos de cromatina condensada (Figs. 3 A-B e 4 A).

Quarenta e cinco horas após o repasto sanguíneo, os trofócitos possuem um citoplasma rico em glicogênio e gotículas de lipídeo, sendo que esses dois componentes citoplasmáticos estão mais desenvolvidos que nas fêmeas alimentadas com sacarose. Grânulos de proteína são evidentes e em *L. longipalpis* esses grânulos são visualmente menores em comparação com *P. papatasi*. Após o repasto, o citoplasma continua rico em mitocôndrias e também em RER, sendo que alguns desses aparecem circundando as gotículas de lipídeo. Em *P. papatasi* várias estruturas semelhantes a vacúolos autofágicos estão presentes perto do envelope nuclear. O núcleo de *L. longipalpis* e *P. papatasi* alimentados com sangue tem formato semelhante, apresentando-se oval e ocupando a região central da célula (Figs. 3 D, 4 B-D).

4.3 – Ultraestrutura dos enócitos

Os enócitos de *L. longipalpis* e *P. papatasi* são células grandes associadas aos trofócitos, encontradas de forma restrita na periferia do CG parietal e próximas aos ovários. Os enócitos possuem um núcleo central, bastante volumoso e arredondado, cromatina descondensada com poucos grumos de cromatina condensada e pequeno nucléolo. O citoplasma é rico em retículo endoplasmático liso, além de mitocôndrias de perfis variados e gotículas de lipídeo. Alguns elementos do complexo de Golgi às vezes também podem ser vistos no citoplasma dos enócitos (Figs. 3 C e 4 E-G).

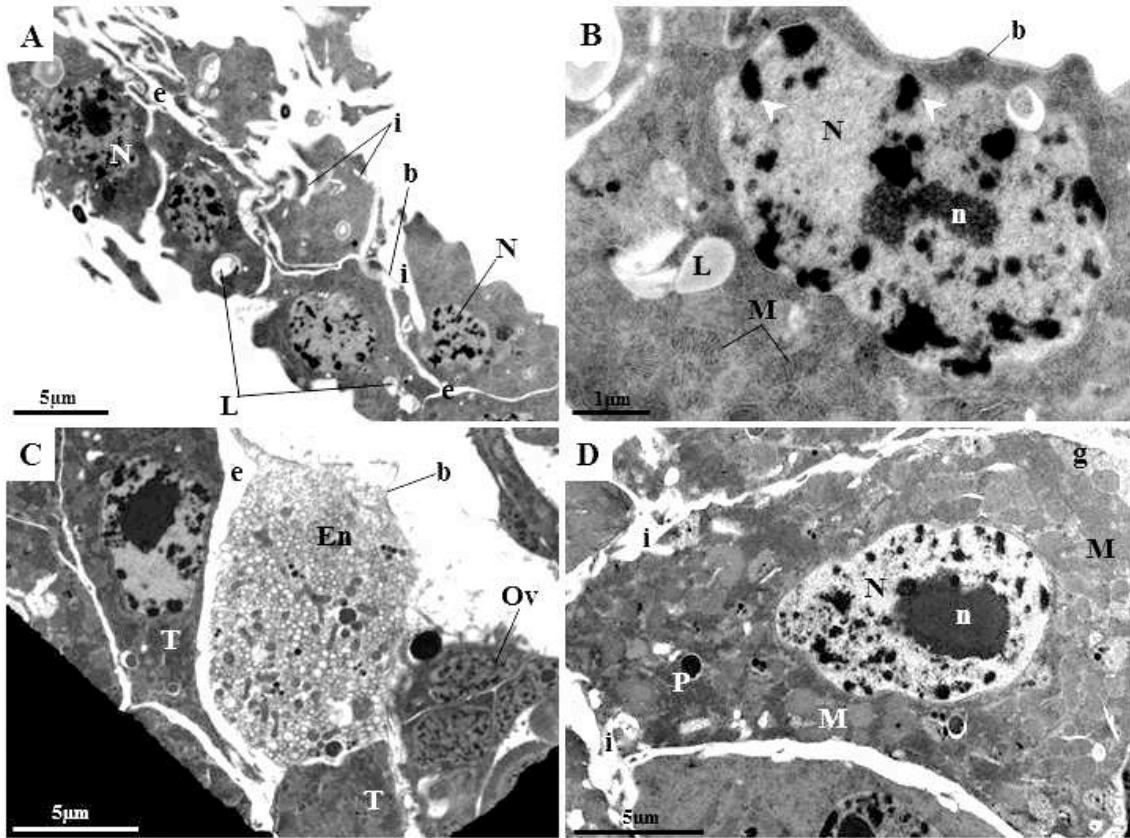


Figura 3 – Micrografia eletrônica de transmissão corpo gorduroso de *L. longipalpis*.

A- Micrografia eletrônica de transmissão de um lóbulo do CG perivisceral de *L. longipalpis* alimentada com sacarose. O lóbulo é revestido pela membrana basal (b). Os trofócitos apresentam invaginações da membrana plasmática (i) e núcleos (N) relativamente grandes em relação ao citoplasma, que por sua vez contém gotículas de lipídeos (L) evidentes. e - espaço intercelular.

B- Detalhe do citoplasma de um trofócito de fêmea alimentada com sacarose. Notar a abundância de mitocôndrias (M) no citoplasma. No núcleo, são mostrados o nucléolo (n) e grumos de cromatina condensada (cabeças de seta).

C- Porção de um lóbulo do CG perivisceral de fêmea 45h após o repasto sanguíneo. Notar a presença de um enócito associado aos trofócitos (T) na periferia do órgão e próximo ao ovário (Ov).

D- Detalhe do citoplasma de um trofócito de uma fêmea 45h após o repasto sanguíneo com áreas do citoplasma preenchidas por mitocôndrias (M) e glicogênio (g). O núcleo (N) está nitidamente mais desenvolvido em comparação ao observado em fêmeas que não receberam a alimentação sanguínea (B). P - grânulo de proteína.

Figura 4 – Micrografia eletrônica de transmissão do CG de *P. papatasi*.

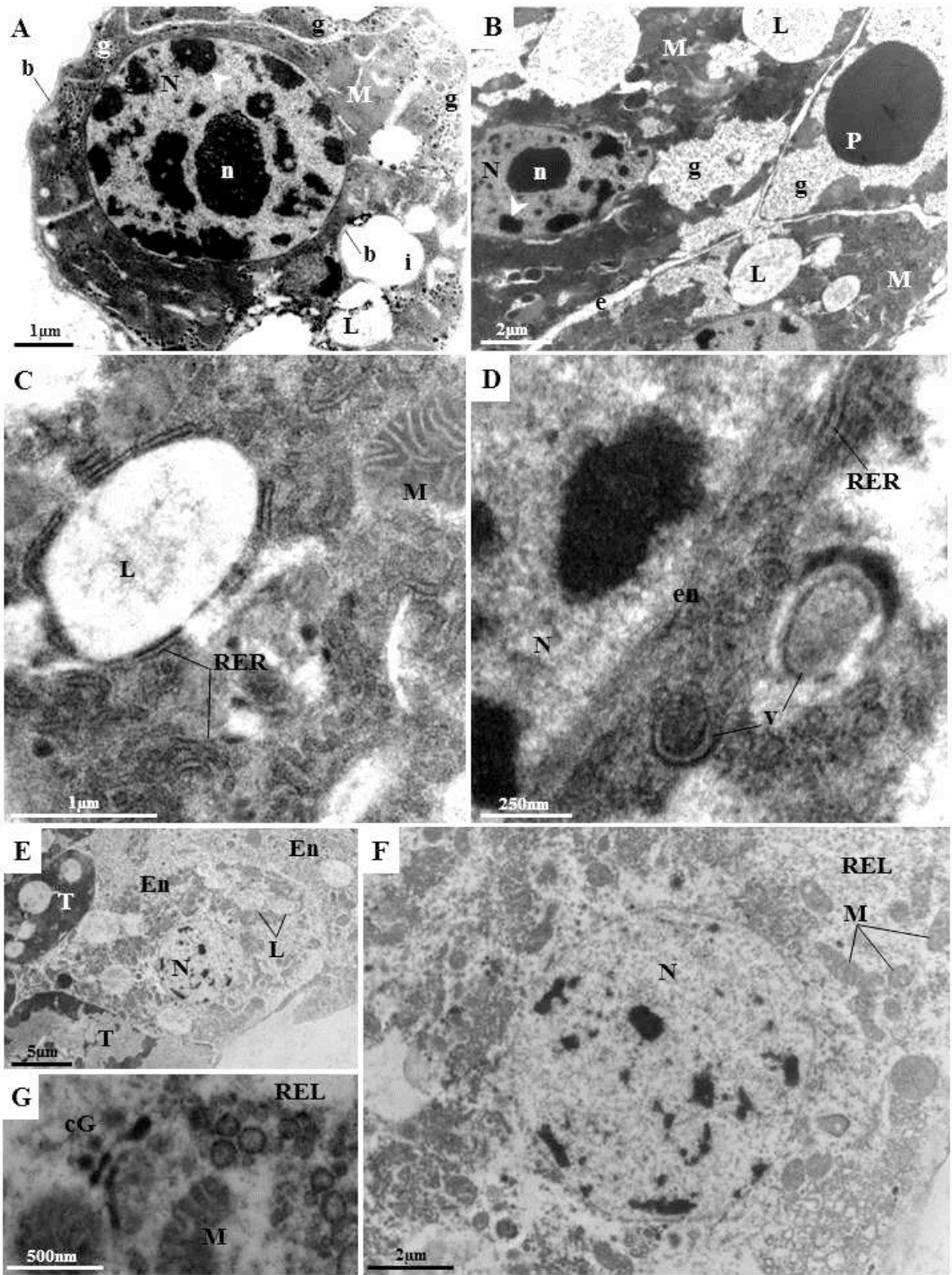
A- Trofócito de fêmea alimentada com açúcar. Nessa imagem é possível notar a presença da lâmina basal (b) revestindo externamente a célula e invaginações da membrana plasmática (i). No citoplasma é possível reconhecer mitocôndrias (M) e glicogênio (g) em abundância em regiões específicas do citosol. Cabeça de seta-cromatina condensada; N - núcleo; n - nucléolo.

B- Trofócitos de fêmea 45h após o repasto sanguíneo. É notável o aumento das áreas preenchidas por componentes da reserva energética como glicogênio (g), gotículas de lipídeo (L) e grânulo de proteína (P). e - espaço intercelular.

C- Detalhe do citoplasma do trofócitos de fêmea 45h após o repasto sanguíneo. Notar a abundância de retículo endoplasmático rugoso (RER), ocorrendo inclusive em volta de gotículas de lipídeo (L). M - mitocôndria.

D- Interface núcleo-citoplasma do trofócito de fêmea 45h após o repasto sanguíneo. Notar a presença de estruturas semelhantes a vacúolos autofágicos (v) próximos ao envelope nuclear (en).

E, F e G- Enócitos (En) associados aos trofócitos (T) na periferia do CB parietal de uma fêmea 45h após o repasto sanguíneo. No citoplasma dos enócitos são vistos gotículas de lipídeo (L), retículo endoplasmático liso (REL) e mitocôndrias (M). O complexo de Golgi (cG) também pode ser visto em maiores aumentos, como mostrado em “G”.



4.4 – Morfometria

A área das gotículas de lipídeo dos trofócitos de *L. longipalpis* não foi significativamente diferente entre as fêmeas 45h após a alimentação sanguínea e as do controle (fêmeas alimentadas com açúcar) ($p < 0,303$). O mesmo ocorreu em *P. papatasi* e ($p < 0,329$). Já nos espécimes tratados com anticorpos, foram encontradas diferenças significativas.

Tabela 1: Área das gotículas de lipídeo de *L. longipalpis* e *P. papatasi* submetidos a diferentes dietas.

Dieta	Espécie	
	<i>L. longipalpis</i>	<i>P. papatasi</i>
Sangue	15,710±10,807	22,652±12,260
Açúcar	18,066±19,831	28,772±33,407

Para *L. longipalpis* a área das gotículas de lipídeo não foi significativamente diferente entre fêmeas do grupo controle (alimentadas com sangue, porém, sem os anticorpos) e sangue (contendo antiqitina e antiperitrofina) 24h após o repasto ($p < 0,227$) (Fig. 5A). Por outro lado houve diferenças significativas 48 e 72h após o repasto. Conforme apresentado na Tabela 1, 48h após o repasto, a área das gotículas de lipídeo do controle é quase duas vezes maior do que os espécimes tratados com antiperitrofina ($p < 0,022$) e antiqitina ($p < 0,027$), porém, entre as fêmeas tratadas com os dois anticorpos não houve diferença ($p < 0,997$) (Fig. 5B). Setenta e duas horas após o repasto, a área das gotículas de fêmeas tratadas com antiperitrofina foi quase duas vezes maior (Tabela 1) do que do controle ($p < 0,001$) e dos espécimes tratados com antiqitina ($p < 0,001$), enquanto que não houve diferenças entre esses últimos ($p < 0,082$) (Fig. 5 C).

Para *P. papatasi* a área das gotículas de lipídeo das fêmeas 24h após o repasto tratadas com antiqitina é quase o triplo em relação ao controle ($p < 0,001$) e em torno de duas vezes maior que as tratadas com antiperitrofina ($p < 0,01$) (Tabela 1 e Fig. 6A). Não há diferença entre o controle e as fêmeas tratadas com antiperitrofina ($p < 0,856$)

(Fig. 6 A). Quarenta e oito horas após o repasto houve diferença significativa apenas entre as fêmeas tratadas com antiqitina e antiperitrofina ($p < 0,002$) (Fig. 6 B). A mesma situação ocorre nas fêmeas 72h após o repasto ($p < 0,001$) (Tabela 1 e Fig. C).

Tabela 2: Área das góticulas de lipídeo de *L. longipalpis* e *P. papatasi* submetidos ao repasto sanguíneo com e sem anticorpos ($n=30$); (Média \pm desvio padrão).

Espécie/tempo decorrido após o repasto sanguíneo						
Tratamento	<i>L. longipalpis</i>			<i>P. papatasi</i>		
	24h	48h	72h	24h	48h	72h
Controle	15,69 \pm 7,70	22,62 \pm 12,80	7,78 \pm 3,60	30,97 \pm 21,80	34,11 \pm 26,30	29,80 \pm 26,50
Antiqitina	18,26 \pm 12,60	17,33 \pm 16,25	9,91 \pm 5,02	76,37 \pm 41,01	49,09 \pm 48,74	34,72 \pm 16,20
Antiperitrofina	17,93 \pm 11,60	17,48 \pm 10,50	14,41 \pm 9,12	33,26 \pm 18,70	22,64 \pm 19,20	23,73 \pm 13,90

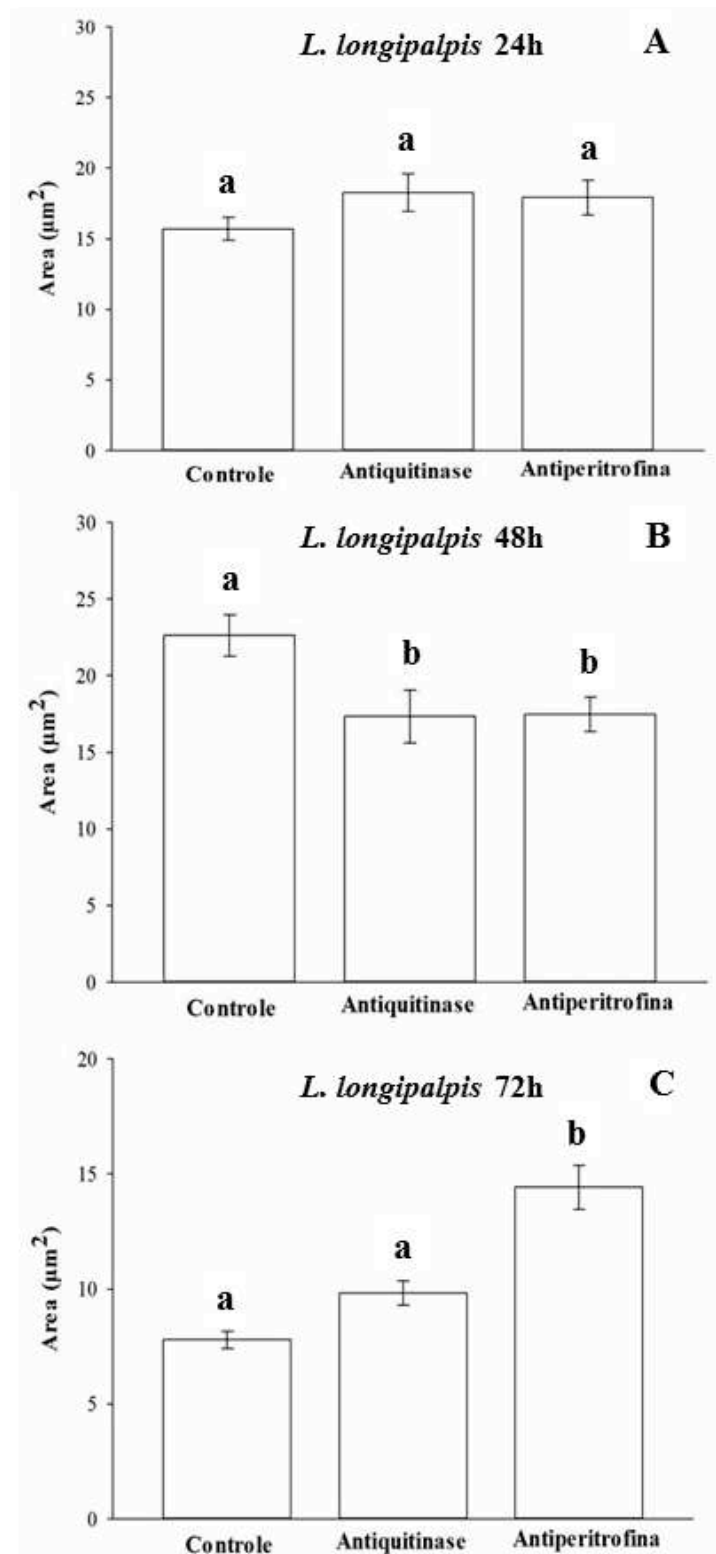


Figura 5 – Áreas das gotículas de lipídeo dos trofócitos do CG de *L. longipalpis* submetidos ao repasto sanguíneo com e sem antiquitinase e antiperitrofina 24h (Fig. 5A; $p < 0,227$), 48h (Fig. 5B; $p < 0,011$) e 72h (Fig. 5C; $p < 0,001$) após o repasto. Barras verticais indicam erro padrão. Letras (a-b) diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos.

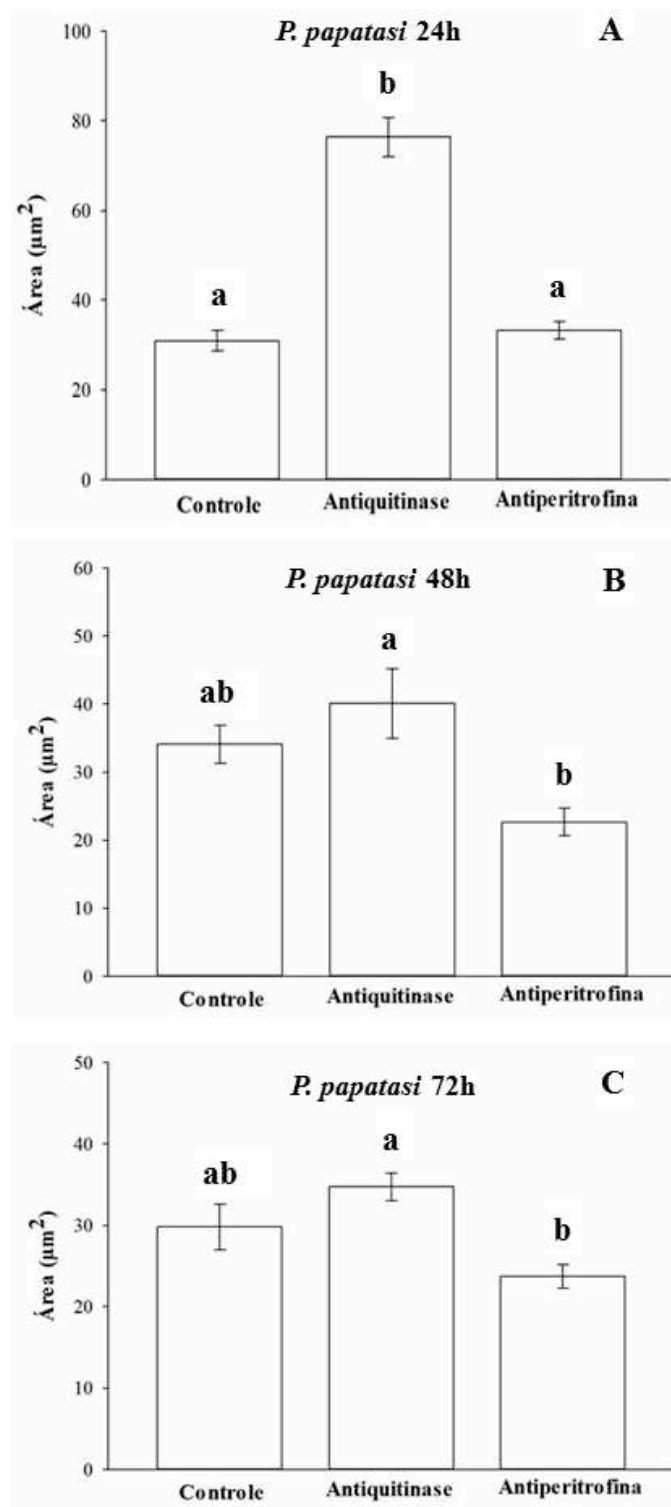


Figura 6 – Áreas das gotículas de lipídeo dos trofócitos do CG de *P. papatasi* submetidos ao repasto sanguíneo com e sem antiquitinase e antiperitrofina 24h (Fig. 6A; $p < 0,001$), 48h (Fig. 6B; $p < 0,002$) e 72h (Fig. 6C; $p < 0,001$) após o repasto. Barras verticais indicam erro padrão. Letras (a-b) diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos.

5 – Discussão

O CG dos flebotomíneos estudados apresenta semelhanças em termos de localização, organização e composição celular. As análises de microscopia óptica e MEV mostraram que em *L. longipalpis* e *P. papatasi* o órgão é amorfo, distribuído ao longo de todo o corpo, presente inclusive na região do tórax e da cabeça. O CG forma lóbulos divididos em uma porção parietal, logo abaixo do tegumento e porção perivisceral, em contato com os órgãos viscerais. Os lóbulos não estão em contato direto com a hemolinfa, sendo recobertos por uma lâmina basal, assim como descrito em *A. aegypti* (Martins e Pimenta 2008). Essa forma de distribuição do CG em contato com a hemolinfa nos flebotomíneos pode ser importante em termos de metabolismo, já que esse órgão armazena nutrientes que são liberados na hemolinfa e utilizados, por exemplo, pelos músculos do voo e principalmente para a produção do vitelo dos ovos (Canavoso *et al.* 2001).

Ao contrário do que foi demonstrado em adultos de *A. aegypti* (Martins e Pimenta, 2008), nas duas espécies de flebotomíneos, o CG parietal não forma uma camada contínua de células abaixo do tegumento, estando restrito às regiões entre as camadas pleurais dorsais e ventrais. Adicionalmente, o CG perivisceral de *L. longipalpis* e *P. papatasi* é encontrado em fêmeas adultas, diferente de *A. aegypti*, onde se restringe apenas ao estágio larval (Wiglesworth 1942, Martins e Pimenta 2008).

Os trofócitos e os enócitos estão presentes no CG de *L. longipalpis* e *P. papatasi*, sendo os primeiros mais abundantes, assim como descrito em outros dípteros. Os trofócitos são células que apresentam citoplasma repleto de gotículas de lipídeo, facilmente visíveis ao microscópio óptico (Sohal 1973, Tobe *et al.* 1973, Stoppie *et al.* 1981, Johnson e Butterworth 1985, Cardoso *et al.* 2010, Martins *et al.* 2011b). Ao MET o citoplasma dos trofócitos de *L. longipalpis* e *P. papatasi* alimentadas com açúcar, é quase todo preenchido por mitocôndrias, poucas e pequenas gotículas de lipídeo e algumas áreas preenchidas por glicogênio. O núcleo é volumoso com cromatina na sua maioria descondensada e grumos de cromatina condensada. Já nas fêmeas alimentadas com sangue, o citoplasma continua abundantes em mitocôndrias e RER como observado em fêmeas de mosquitos dos gêneros *Aedes*, *Culex* e *Anopheles* (Martins *et al.* 2001a e b). Alguns elementos de RER aparecem circundando as gotículas de lipídeo, cuja função é desconhecida.

Uma característica visível nos trofócitos das fêmeas 45h após o repasto sanguíneo é que áreas ocupadas por partículas de glicogênio e gotículas de lipídio são mais conspícuas que nas fêmeas do controle (alimentadas com sacarose). Grânulos de proteína são evidentes os trofócitos e em *L. longipalpis* eles são visualmente menores em comparação com *P. papatasi*. Em espécimes anautógenas, como *P. papatasi* (Killick-Kendrick 1999, Benkova e Volf 2007), essas reservas provavelmente são estocadas nos trofócitos e enviadas aos ovários para atender a demanda energética dos ovos mesmo antes do repasto (Tobe *et al.* 1973, Thomsen e Thomsen 1974, Stoppie *et al.* 1981), ou seja, *L. longipalpis* não necessita obrigatoriamente do repasto sanguíneo para o desenvolvimento de seus ovos (revisado em Soares e Turco 2003) e as reservas proteicas necessárias para o desenvolvimento dos ovos provavelmente são acumuladas ao longo do desenvolvimento larval, como é o caso de *T. theobaldi* (Diptera, Culicidae) que também é autógeno (Pascini *et al.* 2011).

No citoplasma dos trofócitos de *P. papatasi* também foram observadas estruturas semelhantes a vacúolos autofágicos 45h após o repasto sanguíneo. Os trofócitos de *A. aegypti*, também apresentam essas estruturas e associado aos estudos de biologia molecular, concluiu-se que a autofagia ocorre nos trofócitos de fêmeas pós vitelogênicas (Raikhel 1986, Bryant e Raikhel 2011). Considerando que essas estruturas foram observadas somente em fêmeas de *P. papatasi* que também são anautógenas como o *A. aegypti*, é possível que a autofagia também possa estar envolvida com o término da vitelogênese nesse flebotomíneo. A degradação da maquinaria de síntese de proteínas e remodelamento dos trofócitos permite que essas células saiam de uma fase secretória e sejam novamente preparadas para reiniciar a atividade de estocagem de lipídeos e glicogênio, se preparando para o próximo ciclo gonotrófico (Raikhel 1986).

Os enócitos dos flebotomíneos são células grandes, maiores que os trofócitos e claramente estão em menor número em relação aos primeiros. Elas possuem um citoplasma homogeneamente corado e um núcleo volumoso e arredondado com nucléolo evidente, como observado por outros autores (Clark e Dahm 1973, Sohal 1973, Tadmowski *et al.* 1997, Martins *et al.* 2011c). Diferentemente dos dípteros em que os enócitos são encontrados tanto na periferia do CG quanto dentro do órgão (Stoppie *et al.* 1981, Dean *et al.* 1985, Johnson e Batterworth 1985), nos flebotomíneos adultos eles são observados somente na porção posterior do abdômen, especificamente próximos dos ovários. Alguns estudos relatam a função dos enócitos em produzir lipídeos para a impermeabilização da cutícula (Lockey 1988). Para exercer tal função, essas células

deveriam ser encontradas associadas às células epidérmicas, como ocorre em muitos insetos (Klowden 2007). Isso provavelmente não ocorre em adultos de *L. longipalpis* e *P. papatasi* e a localização dessas células próxima aos ovários também sugere que essas células, atuem no fornecimento de lipídeos aos ovos assim como proposto por Thomsen (1956) e Tobe e Davey (1974) para *Glossina austeni* (Diptera, Glossinidae). Ao contrário dos trofócitos, os enócitos aparentemente não apresentam mudanças quanto à morfologia geral entre os diferentes grupos aqui estudados. Apesar da discussão do presente trabalho se limitar aos aspectos gerais dessas células em *L. longipalpis* e *P. papatasi*, um estudo sobre como elas respondem a diferentes dietas merece ser considerado em trabalhos futuros.

Ao MET, foi possível observar abundantes mitocôndrias espalhadas pelo citoplasma dos enócitos e REL desenvolvido, sendo que o REL provavelmente esteja associado ao metabolismo e secreção de lipídeos e ao processo de desintoxicação, função geralmente atribuída a essas células (Locke 1969, Tobe e Davey 1974, Jackson e Locke 1989, Martins e Ramalho-Ortigão 2012). Gotículas de lipídeo também estão presentes no citoplasma dos enócitos das fêmeas adultas dos flebotomíneos. Essas estruturas são abundantes nos enócitos de larvas de *D. melanogaster* (Gutierrez *et al.* 2007). Em adultos, essas estruturas também foram encontradas em enócitos de machos de *Musca domestica* (Sohal 1973). A presença de gotículas lipídicas no citoplasma dos enócitos de fêmeas adultas é uma outra evidência de que essas células podem fornecer lipídeos aos ovos (Thomsen 1956, Tobe e Davey 1974). Porém, outros estudos são necessários para avaliar a participação dos enócitos de flebotomíneos nesse processo.

Os valores médios das áreas das gotículas de lipídeos dos flebotomíneos alimentados com açúcar e sangue (45h após o repasto) não foram significativamente diferentes. Em *A. aegypti* ocorre intensa lipogênese no CG tanto após o repasto sanguíneo quanto longo do envelhecimento de fêmeas submetidas à dieta a base de açúcar (Raikhel & Lea 1983, Ziegler e Ibrahim 2001). Também em *A. aegypti*, fêmeas com 18 dias de idade que envelheceram comendo somente açúcar apresentaram gotículas de lipídeo mais desenvolvidas que fêmeas quatro dias após o repasto, no final do ciclo gonotrófico (Martins *et al.* 2011b). No caso de *L. longipalpis* e *P. papatasi* isso não foi observado. Primeiramente as fêmeas foram analisadas 45h após o repasto, período no qual os ovos estão se desenvolvendo, de maneira que apesar da grande disponibilidade de nutrientes advindos da digestão sanguínea (Romoser 1996, Kollien e Billingsley 2002), os trofócitos acumulam, mas também exportam seu conteúdo

(nutrientes) para anteder a demanda ovariana por componentes do vitelo. Além disso, o tempo que as fêmeas foram submetidas à alimentação a base de açúcar (seis dias), não tiveram tempo suficiente para acumular reservas em grandes quantidades, como foi o caso de *A. aegypti* (Martins *et al.* 2011). As análises de morfometria também foram realizadas avaliando a área das gotículas lipídicas de *L. longipalpis* e *P. papatasi* submetidas ao tratamento com dois anticorpos. Esses bloqueiam a ação de duas proteínas importantes, para a formação da matriz peritrófica: a proteína peritrofina e a enzima quitinase. Eles provavelmente são capazes de interferir na formação da matriz peritrófica e por evitar o desenvolvimento do parasita nos flebotomíneos, auxiliando, dessa forma, no combate à Leishmaniose (Pimenta *et al.* 1997, Coutinho-Abreu *et al.* 2010, Coutinho-Abreu *et al.* 2013). Essa estratégia é conhecida como uso de vacina de bloqueio de transmissão e representa uma potencial interferência da transmissão dos patógenos (Ramalho-Ortigão e Traub-Csekö, 2003, Coutinho-Abreu *et al.* 2010, Coutinho-Abreu *et al.* 2013). No presente estudo, um dos objetivos foi avaliar como esses anticorpos, contra as duas proteínas da matriz, podem interferir indiretamente no estoque de nutrientes, em especial lipídeos, no CG dos flebotomíneos adultos.

As fêmeas de *L. longipalpis* não apresentaram diferença significativa da área das gotículas de lipídeo entre os indivíduos do controle e dos tratados com anticorpos 24h após o repasto. Seria esperado que o tratamento com antiquitinase apresentasse uma área menor em comparação ao controle e ao tratamento com o outro anticorpo, pois, ao bloquear a ação da quitinase, a matriz peritrófica fica mais espessa e assim, uma digestão ocorreria de forma mais lenta (Shao *et al.* 2001, Villalon *et al.* 2003, Ramalho-Ortigão *et al.* 2005, Coutinho-Abreu *et al.* 2013). Já para o tratamento com antiperitrofina, o esperado seria que a área das gotículas fosse maior em relação ao controle e ao tratamento com antiquitinase, pois, o bloqueio da peritrofina interferiria diretamente na formação da matriz peritrófica, deixando-a mais frouxa e promovendo uma digestão mais rápida (Shao *et al.* 2001, Villalon *et al.* 2003). Isso foi demonstrado em *A. aegypti* e *Anopheles stephensi* alimentados com sangue contendo quitinase e anticorpos contra peritrofinas, onde a digestão ocorreu de forma mais rápida do que em espécies com a matriz peritrófica íntegra (Villalon *et al.* 2003). Como em 24h após o repasto a área das gotículas não apresentou diferença significativa em *L. longipalpis*, pode-se inferir que os anticorpos não foram capazes de interferir com a dinâmica do acúmulo de lipídeos nas primeiras 24h que se sucederam após o repasto, mesmo porque a digestão sanguínea nesse tempo está no início (Secundino *et al.* 2005).

Quarenta e oito horas após o repasto, a área das gotículas das fêmeas do controle é bem maior do que dos espécimes de *L. longipalpis* tratados com anticorpos e não há diferença significativa entre esses dois tratamentos. Nossos resultados demonstraram que 48h após o repasto, os anticorpos indiretamente promovem um atraso no armazenamento de lipídeos, que poderia ocorrer em decorrência das alterações na matriz peritrófica, deixando-a mais espessa e dessa forma, promovendo um atraso na digestão diminuindo tanto o contato com as enzimas ou mesmo a absorção de nutrientes do bolo alimentar (Ramalho-Ortigão *et al.* 2005, Coutinho-Abreu *et al.* 2013).

Em 72h, os trofócitos de *L. longipalpis* tratados com antiperitrofina possuem a área das gotículas de lipídeos maior do que o controle e os espécimes tratados com antiqitinaase. Isso reforça a hipótese de que existe um atraso no armazenamento de nutrientes mediante ao tratamento com pelo menos o antiperitrofina, que alcançam maiores valores depois dos indivíduos dos grupos controle e tratados com antiqitinaase. Estudos anteriores demonstram que 72h após o repasto, a matriz peritrófica já está totalmente degradada (Walters *et al.* 1995, Secundino *et al.* 2005, Sadlova e Volf 2009) e os estudos do nosso grupo de pesquisa (Malta *et al.*, dados não publicados) mostraram que nos indivíduos tratados com anticorpos a dinâmica de formação e degradação da matriz é alterada, sendo que ela permanece espessa 72h após o repasto. Pode-se concluir que há uma interferência indireta do tratamento com os anticorpos, atrasando o processo de armazenamento de lipídios pelos trofócitos. Provavelmente esse atraso é uma consequência também do atraso do processo de digestão e absorção de nutrientes que ainda carece de ser esclarecido.

Em *P. papatasi* 24h após o repasto com antiqitinaase, a área das gotículas de lipídeo é bem maior em relação ao controle e aos indivíduos tratados com antiperitrofina. Adicionalmente, não há diferença significativa entre esses dois últimos. Assim como em *L. longipalpis*, seria esperado que os espécimes tratados com antiperitrofina apresentassem a área das gotículas maior do que as do controle e dos tratados com antiqitinaase. Como isso não ocorreu no tempo de 24h em *P. papatasi*, pode-se inferir que apenas o anticorpo contra quitinase foi capaz de interferir com a dinâmica do acúmulo de lipídeos nas primeiras 24h após o repasto. O motivo pelo qual a área das gotículas foi diferente do esperado pelo efeito desse anticorpo ainda carece de mais investigações. Nos outros dois tempos de repasto, há diferença significativa apenas entre os tratamentos com anticorpos, sendo que no tratamento com antiqitinaase, a área das gotículas é maior do que as espécies tratadas com antiperitrofina. Esses resultados

sugerem que os anticorpos também interferem indiretamente no armazenamento de lipídeos pelos trofócitos de *P. papatasi* 48 e 72h após o repasto sanguíneo.

6 – Considerações finais

O corpo gorduroso de *L. longipalpis* e *P. papatasi* foi estudado de forma inédita, avaliando os aspectos de histologia e ultraestrutura, possibilitando descrever o órgão em termos de organização e composição celular em insetos submetidos a diferentes tipos de dieta. Além disso, foram avaliados aspectos fisiológicos do órgão submetidos a tratamentos com anticorpos. O presente trabalho representa uma contribuição importante para o entendimento da morfologia e fisiologia dos flebotomíneos, fornecendo informações inéditas para uma maior compreensão da biologia desses insetos.

De maneira geral os CGs de *L. longipalpis* e *P. papatasi* apresentaram ser bastante conservados quanto aos tipos celulares e também foram capazes de modificarem sua ultraestrutura de acordo com as diferentes dietas, semelhante ao que ocorre nos adultos outros dípteros hematófagos. Acreditamos que nossa abordagem, juntamente com estudos posteriores utilizando inclusive técnicas de biologia molecular, irá auxiliar em uma melhor compreensão das modificações que ocorrem nessas duas espécies de flebotomíneos de diferentes de regiões geográficas.

Nossos resultados sugerem que os anticorpos foram capazes de interferir com o processo de acúmulo de reserva de lipídeos em *L. longipalpis* a partir das 48h seguidas do repasto sanguíneo, mesmo eles tendo sido desenvolvidos a partir *P. papatasi* (Coutinho-Abreu *et al.* 2005 e 2013). Mesmo se tratando de duas espécies filogeneticamente distantes (Ready 2013, Killick-Kendrick 1999), essa abordagem de utilizar proteínas da matriz peritrófica como alvo apresenta potencial promissor para interferir negativamente no processo de digestão/absorção de nutrientes nas duas espécies.

Tanto *L. longipalpis* quanto *P. papatasi* possuem importância epidemiológica por atuarem como vetores de parasitos do gênero *Leishmania*. O tratamento com anticorpos contra substâncias da matriz peritrófica mostrou que ele pode influenciar a absorção e o subsequente estoque de lipídeos no CG e corroboram as propostas de Ramalho-Ortigão *et al.* (2005), Coutinho-Abreu *et al.* (2010 e 2013) e Malta *et al.* (dados não publicados) de que esses anticorpos podem alterar a formação da matriz

peritrófica. Acredita-se que esses anticorpos possam ser utilizados como uma futura vacina de bloqueio de transmissão de *Leishmania*, porém, mais estudos necessitam ser realizados no intuito de confirmar essa possibilidade.

7 – Referências bibliográficas

AGAISSE H, PERRIMON N. The roles of JAK/STAT signaling in *Drosophila* immune responses. *Immunol. Rev.* 198, 72-82 (2004).

ARRESE EL, SOULAGES JL. Insect fat body: energy, metabolism, and regulation. *Annu. Rev. Entomol.* 55, 207 (2010).

BENKOVA I, VOLF P. Effect of temperature on metabolism of *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae). *J. Med. Entomol.* 44, 150-154 (2007).

BRYANT B, RAIKHEL AS. Programmed autophagy in the fat body of *Aedes aegypti* is required to maintain egg maturation cycles. *PloS one.* 6, e25502 (2011).

BUTTERWORTH FM, BODENSTEIN D, KING RC. (1965) Adipose tissue of *Drosophila melanogaster*. I. An experimental study of larval fat body. *J. Exp. Zool.* 158, 141-153 (1965).

CAMARGO-MATHIAS MI, CAETANO FH. (1996) Ultrastructural cytochemistry of oenocytes of *Pachycondyla villosa* ants (Hymenoptera: Ponerinae). *Acta Microsc.* 5A, 6000-6003 (1996).

CARDOSO AF, CRES RL, MOURA AS, DE ALMEIDA F, BIJOVSKY AT. *Culex quinquefasciatus* vitellogenesis: morphological and biochemical aspects. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 105, 254-262 (2010).

CANAVOSO LE, JOUNI ZE, KARNAS KJ, PENNINGTON JE, WELLS MA. Fat metabolism in insects. *Annu. Rev. Nutr.* 21, 23-46 (2011).

CARVALHO MSL, BREDT A, MENEGHIN ERS, OLIVEIRA C. Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em áreas de ocorrência de leishmaniose tegumentar americana no Distrito Federal, Brasil, 2006 a 2008. *Epidemiol. Serv. Saúde.* 19, 227-237 (2010).

CHAPMAN, R.F., SIMPSON, S.J, DOUGLAS, A.E. The Insects: Structure and Function. 5th edition. Cambridge University Press, Cambridge, 954 p, 2012.

CHEON HM, SEO SJ, SUN JX, SAPPINGTON TW, RAIKHEL AS. Regulation of lipid metabolism genes, lipid carrier protein lipophorin, and its receptor during immune challenge in the mosquito *Aedes aegypti*. *J. Biol. Chem.* 281, 8426-8435 (2006).

CLARK MK, DAHM PA. Phenobarbital-induced, membrane-like scrolls in the oenocytes of *Musca domestica* Linnaeus. *J. Cell. Biol.* 56, 870-875, 1973.

COSTA WA. Morfologia de imaturos de *Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) e *Lutzomyia (Nyssomyia) neivai* (Pinto, 1926) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), Vetores de Leishmaniose Tegumentar no Brasil. 2009. 63f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

COUTINHO-ABREU IV, SHARMA NK, ROBLES-MURGUIA M, RAMALHO-ORTIGAO M. Targeting the midgut secreted PpChit1 reduces *Leishmania major* development in its natural vector, the sand fly *Phlebotomus papatasi*. *PLoS Neglect. Trop. Dis.* 4, e901 (2010).

COUTINHO-ABREU, IV, SHARMA NK, ROBLES-MURGUIA M, RAMALHO-ORTIGAO M. Characterization of *Phlebotomus papatasi* peritrophins, and the role of PpPer1 in *Leishmania major* survival in its natural vector. *PLoS Neglect. Trop. Dis.* 7, e2132 (2013).

DEAN RL, LOCKE M, COLLINS JV. Structure of fat body. In: KerkutGA, Gilbert LI, editors. Comprehensive Insect physiology biochemistry and pharmacology. Oxford Pergamon Press. 3, 155-210 (1985).

DUJARDIN JP; LE PONT F, MARTINEZ E. Quantitative phenetics and taxonomy of some phlebotomine taxa. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 94, 735-741 (1999).

GARCIA ES, CASTRO DP, FIGUEIREDO MB, GENTA FA, AZAMBUJA P. *Trypanosoma rangeli*: a new perspective for studying the modulation of immune reactions of *Rhodnius prolixus*. *Parasit. Vectors.* 2, 33 (2009).

- GOULD AP, ELSTOB PR, BRODU V. Insect oenocytes: a model system for studying cell-fate specification by Hox genes. *J. Anat.* 199, 25-33 (2001).
- GUTIERREZ E, WIGGINS D, FIELDING B, GOULD AP. Specialized hepatocyte-like cells regulate *Drosophila* lipid metabolism. *Nature* 445, 275-280 (2007).
- HANDMAN E, BULLEN DVR. Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. *Trends. Parasitol.* 18, 332-334 (2002).
- HAUNERLAND NH, SHIRK PD. Regional and functional differentiation in the insect fat body. *Annu. Rev. Entomol.* 40, 121-45 (1995).
- JACKSON A, LOCKE M. The formation of plasma membrane reticular systems in the oenocytes of an insect. *Tissue Cell* 21: 463-473, 1989.
- JOHNSON MB, BUTTERWORTH FM. Maturation and aging of adult fat body and oenocytes in *Drosophila* as revealed by light microscopic morphometry. *J. Morphol.* 184, 51-59 (1985).
- KATO, H. GOMEZ EA, CACERES AG, UEZATO H, MIMORI T, HASHIGUCHI Y. Molecular epidemiology for vector research on leishmaniasis. *J. Environ. Res. Public Health.* 7, 814-826 (2010).
- KILLICK-KENDRICK, R. The biology and control of phlebotomine sand flies. *Clin. Dermatol.* 17, 279-289 (1999).
- KLOWDEN AJ. Physiological Systems in Insects, *Boston: Academic Press.* 2, 688 (2007).
- KOLLIEN AH, BILLINGSLEY PF. Differential display of mRNAs associated with blood feeding in the midgut of the bloodsucking bug, *Triatoma infestans*. *Parasitol. Res.* 88, 1026-1033 (2002).
- LARSEN WJ. Cell remodeling in the fat body of an insect. *Tissue Cell.* 8, 73-92 (1976).
- LOCKE M. The ultrastructure of the oenocytes in the molt/intermolt cycle of an insect. *Tissue Cell.* 1, 103-154 (1969).

- LOCKEY KH. Lipids of the insect cuticle: origin, composition and function. *Comp. Biochem. Physiol.* 89B: 595-645 (1988).
- MARCONDES CB. Flebotomíneos. Entomologia Médica e Veterinária. Editora Atheneu, São Paulo, Rio de Janeiro, Belo Horizonte. 2, 525 (2001).
- MARTINS GF, PIMENTA PFP. Structural changes in fat body of *Aedes aegypti* caused by aging and blood feeding. *J. Med. Entomol.* 45, 1102-1107 (2008).
- MARTINS GF, SERRÃO JE, RAMALHO-ORTIGÃO M, PIMENTA PFP. A comparative study of fat body morphology in five mosquito species. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 106, 742-747 (2011a).
- MARTINS GF, SERRÃO JE, RAMALHO-ORTIGÃO M, PIMENTA PFP. Histochemical and ultrastructural studies of the mosquito *Aedes aegypti* fat body: effects of aging and diet type. *Microsc. Res. Tech.* 74, 1032-1039 (2011b).
- MARTINS GF, GUEDES BAM, SILVA LM, SERRÃO JE, FORTES-DIAS CL, RAMALHO-ORTIGÃO M, PIMENTA PFP. Isolation, primary culture and morphological characterization of oenocytes from *Aedes aegypti* pupae. *Tissue Cell.* 43, 83-90 (2011c).
- MARTINS GF, RAMALHO-ORTIGÃO JM. Oenocytes in insects. *Inver. Surv. J.* 9, 139-152 (2012).
- NELLIOT A, BOND N, HOSHIZAKI DK. Fat-body remodeling in *Drosophila melanogaster*. **Genesis.** 44, 396-400 (2006).
- WHO EXPERT COMMITTEE ON THE CONTROL OF THE LEISHMANIASES. MEETING. Control of the leishmaniasis: report of a WHO expert committee. World Health Organization (1990).
- PARK MS, PARK P, TAKEDA M. Roles of fat body trophocytes, mycetocytes and urocytes in the American cockroach, *Periplaneta americana* under starvation conditions: an ultrastructural study. *Arth. Struct. Dev.* 42, 287-95 (2013).
- PASCINI TV, ALBENY DS, RAMALHO-ORTIGÃO M, VILELA EF, SERRÃO JE, MARTINS, GF. Changes in the fat body during the post-embryonic development of the

predator *Toxorhynchites theobaldi* (Dyar & Knab) (Diptera: Culicidae). *Neotrop. Entomol.* 40, 456-461 (2011).

PIMENTA PFP, MODI GB, PEREIRA ST, SHAHABUDDIN M, SACKS DL. A novel role for the peritrophic matrix in protecting *Leishmania* from the hydrolytic activities of the sand fly midgut. *Parasitol.* 115, 359-369 (1997).

RAIKHEL AS, LEA AO. Previtellogenic development and synthesis in the fat body of a mosquito: an ultrastructural and immunocytochemical study. *Tissue Cell.* 15, 281-300 (1983).

RAIKHEL AS, DEITSCH KW, SAPPINGTON TW. Culture and analysis of the insect fat body. In: Molecular biology of insect disease vectors: a methods manual. In: Crampton JM, Beard CB, Louis C, editors. *Chapman & Hall.* 507-522 (1997).

RAIKHEL AS. Role of lysosomes in regulating of vitellogenin secretion in the mosquito fat body. *J. Insect. Physiol.* 32, 597-604 (1986a).

RAIKHEL AS. Lysosomes in the cessation of vitellogenin secretion by the mosquito fat body; selective degradation of Golgi complexes and secretory granules. *Tissue Cell.* 18, 125-142 (1986b).

RAMALHO-ORTIGAO JM, TRAUB-CSEKÖ YM. Molecular characterization of Llchit1, a midgut chitinase cDNA from the leishmaniasis vector *Lutzomyia longipalpis*. *Insect Biochem Molec.* 33, 279-287 (2003).

RAMALHO-ORTIGÃO M, KAMHAWI S, JOSHI MB, REYNOSO D, LAWYER PG, DWYER DM, SACKS DL, VALENZUELA JG. Characterization of a blood activated chitinolytic system in the midgut of the sand fly vectors *Lutzomyia longipalpis* and *Phlebotomus papatasi*. *Insect. Mol. Biol.* 14, 703-712 (2005).

RAMALHO-ORTIGAO M, SARAIVA EM, TRAUB-CSEKO YM. Sand fly-*Leishmania* interactions: long relationships are not necessarily easy. *Open. Parasitol. J.* 4, 195-204 (2010).

READY PD. Biology of phlebotomine sand flies as vectors of disease agents. *Annu. Rev. Entomol.* 58, 227-250 (2013).

ROLLO JP, CAMARGO-MATHIAS MI. Morphohistochemical characterization of the perivisceral fat body in royal and worker female castes in different ages of *Atta sexdens rubropilosa* ants (Hymenoptera Formicidae). *Sociobiology*. 47, 519-530 (2006).

ROMA GC, BUENO OC, CAMARGO-MATHIAS MI. Chemical detection of the proteins and lipids in the fat body cells from workers of Attini ants (Hymenoptera: Formicidae). *Cell. Biol. Int.* 32, 406-416 (2008).

ROMA GC, BUENO OC, CAMARGO-MATHIAS MI. Morpho-physiological analysis of the insect fat body: a review. *Micron*. 41, 395-401 (2010).

ROMOSER WS. The vector alimentary system. BJ Beaty, WC Marquardt, The Biology of Disease Vectors. *Colorado: University* 1, 632 (1996).

RUTLEDGE LC, GUPTA RK. Moth flies and sand flies (Psychodidae). *Med. Vet. Entomol.* Academic Press, New York, NY 153-154 (2002).

SACKS DL, LAWYER P, KAMHAWI S. The Biology of *Leishmania*- sand fly interactions, in: Myler P, Fasel N. (Eds.). *Leishmania: After the Genome*. UK: Caister Academic Press Norfolk. 205-238 (2008).

SADLOVA J, VOLF P. Peritrophic matrix of *Phlebotomus duboscqi* and its kinetics during *Leishmania major* development. *Cell. Tissue. Res.* 337, 313-325 (2009).

SECUNDINO NFC, EGER-MANGRICH I, BRAGA EM, SANTORO MM, PIMENTA PFP. *Lutzomyia longipalpis* peritrophic matrix: formation, structure, and chemical composition. *J. Med. Entomol.* 42, 928-938 (2005).

SHARMA U, SINGH S. Insect vectors of *Leishmania*: distribution, physiology and their control. *J. Vector Borne Dis.* 45, 255-272 (2008).

SNIGIREVSKAYA ES, HAYS AR, RAIKHEL AS. Secretory and internalization pathways of mosquito yolk protein precursors. *Cell Tissue Res.* 290, 129-142 (1997).

SOARES RPP, TURCO SJ. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): a review. *An. Acad. Bras. Ciênc.* 75, 301-330 (2003).

SOHAL RS. Fine structural alterations with age in the fat body of the adult male housefly *Musca domestica*. *Z. Zellforsch.* 140, 169-175 (1973).

STOPPIE P, BRIERS T, HUYBRECHTS R, DE LOOF A. Molting hormone juvenile hormone and the ultrastructure of the fat body of adult *Sarcophaga bullata* (Diptera). *Cell Tissue Res.* 221, 233-244 (1981).

TADKOWSKI TM, JONES JC. Changes in the fat body and oocysts during starvation and vitellogenesis in a mosquito *Aedes aegypti* (L.). *J. Morphol.* 159, 185-204 (1979).

THOMSEN E. Observations on the oenocytes of the adult *Calliphora erythrocephala*. Meig. Bertil Hanstrom. *Zool. Papers.* 298-306 (1956).

THOMSEN E, THOMSEN M. Fine structure of the fat body of the female of *Calliphora erythrocephala* during the first egg-maturation cycle. *Cell Tissue Res.* 152, 193-217 (1974).

TOBE SS, DAVEY KG. Autoradiographic study of protein synthesis in abdominal tissues of *Glossina austeni*. *Tissue Cell.* 6, 255-268 (1974).

TOBE SS, DAVEY KG, HUEBNER E. Nutrient transfer during the reproductive cycle in *Glossina austeni* Newst. I. Histology and histochemistry of the milk gland fat body and oenocytes. *Tissue Cell.* 5, 633-650 (1973).

VILLALON JM, GHOSH A, JACOBS-LORENA M. The peritrophic matrix limits the rate of digestion in adult *Anopheles stephensi* and *Aedes aegypti* mosquitoes. *J. Insect. Physiol.* 49, 891-895 (2003).

WALTERS LL, IRONS KP, GUZMAN H, TESH RB. Peritrophic envelopes of *Lutzomyia spinicrassa* (Diptera:Psychodidae). *J. Med. Entomol.* 32, 711-725 (1995).

WIGGLESWORTH VB. The storage of protein fat glycogen and uric acid in the body and other tissues of mosquito larvae. *J. Exp. Biol.* 19, 56-77 (1942).

WIGGLESWORTH VB. The source of lipids and polyphenols for the insect cuticle: the role of fat body, oenocytes and oenocytoids. *Tissue Cell,* 20, 919-932 (1988).

ZHANG Y, YU-XUAN L, LIU J, YANG C, FENG QL, XU WH. A Regulatory pathway, ecdysone-transcription factor relish-cathepsin L, is involved in insect fat body dissociation. *PLoS Genet.* 9, e1003273 (2013).

ZIEGLER R, IBRAHIN MM. Formation of lipid reserves in fat body and eggs of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. *J. Insect. Physiol.* 47, 623-627 (2001).