



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES
Mestrado em Saúde Pública



HELENA ROCHA CORRÊA DE ARAÚJO

ULTRA-ESTRUTURA DOS HEMÓCITOS DE

Aedes aegypti

(Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae)

RECIFE

2009

HELENA ROCHA CORRÊA DE ARAÚJO

ULTRA-ESTRUTURA DOS HEMÓCITOS DE *Aedes aegypti*

(Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae)

Dissertação apresentada ao Mestrado em Saúde Pública do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Orientadores: Dr. Fábio André Brayner

Dr. Luiz Carlos Alves

Recife

2009

Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

A663u Araújo, Helena Rocha Côrrea de.

Ultra-estrutura dos hemócitos de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae) / Helena Rocha Côrrea de Araújo. — Recife: H. R. C. de Araújo, 2009.

83 p.: il., tabs.

Dissertação (mestrado em saúde pública) — Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 2007.

Orientadores: Fábio André Brayner, Luiz Carlos Alves.

1. *Aedes* - ultraestrutura. 2. Microscopia. 3. Hemócitos. 4.

Citologia. I. Brayner, Fábio André. II. Alves, Luiz Carlos. Título.

CDU 595.771

HELENA ROCHA CORRÊA DE ARAÚJO

ULTRA-ESTRUTURA DOS HEMÓCITOS DE *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae)

Dissertação apresentada ao Mestrado em Saúde Pública do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Aprovado em 28/02/07

BANCA EXAMINADORA

Prof^o. Dr. Fábio André Brayner dos Santos (Orientador)
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM-FIOCRUZ)

Prof^a. Dra. Cláudia Maria Fontes de Oliveira (Titular)
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM-FIOCRUZ)

Prof^o. Dr. Paulo Filemon Paolucci Pimenta (Titular)
Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR-FIOCRUZ)

Prof^a. Dra. Constância Flávia Junqueira Ayres (Suplente)
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM-FIOCRUZ)

Prof^a. Dra. Váleria Wanderley Teixeira (Suplente)
Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE)

Dedico

*Aos meus pais, Romualdo e Edelci, ao meu irmão, Ulisses,
e a Matheus Benevides por estarem sempre ao meu lado em
todos os momentos.*

Ofereço

*Aos meus orientadores e amigos Fábio Brayner e Luiz
Carlos pelos ensinamentos que levarei por toda a vida.*

AGRADECIMENTOS

A Deus que me concedeu sabedoria, proteção, autoconfiança e principalmente muita força para vencer mais esta etapa da minha vida.

Aos meus pais, Romualdo e Edelci, e meu irmão Ulisses que apesar de todas as dificuldades sempre estiveram ao meu lado e se esforçaram para que eu pudesse continuar minha jornada.

Ao meu grande amor Matheus Benevides pelo companheirismo, amizade, atenção, paciência e amor que mesmo estando longe sempre me ajudou e ajuda muito, principalmente nos momentos mais difíceis. A você serei eternamente grata.

Aos meus orientadores e grandes amigos Fábio Brayner e Luiz Carlos, pela orientação, confiança, ensinamentos, companheirismo, paciência, estímulo e por todo o aprendizado durante minha caminhada científica.

À Marília Gabriela pelo companheirismo, amizade e presença constante em todos os momentos da minha vida profissional.

Aos alunos de iniciação científica Fabiana Lira, Gabriela Brito, Sílvia e Fernando Caldeira pela ajuda imprescindível na realização dos experimentos.

À Lânia Ferreira pela oportunidade de poder iniciar a iniciação científica no Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães.

Aos técnicos Sérgio Santos, Raimundo Pimentel e Rodrigo Martins do Deptº. de Biologia Celular e Ultra-estrutura do CPqAM/ FIOCRUZ e Rafael Padilha do Laboratório de Microscopia eletrônica do LIKA pela ajuda no processamento das amostras e obtenção das fotos em Microscopia eletrônica.

Às técnicas do Departamento de Biologia Celular e Ultra-estrutura do CPqAM/FIOCRUZ, Fábria e Diana e do CPqGM/FIOCRUZ Elisângela, pela amizade, compreensão e ajuda em todos os trabalhos que realizei.

Aos amigos e amigas do Departamento de Biologia Celular e Ultra-estrutura do CPqAM/FIOCRUZ Guilherme, Mércia e demais membros pelo apoio e convivência.

Ao Dr. José Luiz de Lima Filho pela infra-estrutura do laboratório de Microscopia Eletrônica do LIKA que possibilitou a realização desta pesquisa.

À Nalva Menezes, Joselice Pinto, Nilda Lima e Ana Paula da secretaria Acadêmica do NESL/CPqAM, pelo suporte essencial para conclusão deste trabalho.

A equipe do insetário Aninha e Alaíde pela obtenção dos mosquitos necessários para realização dos experimentos.

À Dra. Claudia Fontes e Dra. Alice Varjal pelas contribuições que permitiram o aperfeiçoamento deste trabalho.

Ao Marcelo Paiva pela ajuda no desenvolvimento do artigo científico.

Aos amigos da informática e do serviço de xérox do CPqAM/FIOCRUZ por sempre me socorrer nas horas mais importantes.

Aos amigos da biblioteca pela colaboração na obtenção das informações científicas, em especial a Mérgine pela ajuda na correção da versão final deste trabalho.

Aos amigos do Centro de Pesquisa René Rachou CPqRR/FIOCRUZ Dr. Paulo Pimenta, Rafael, Carol, Eliane, Cristina, Gustavo, Tatiana, Fernanda e Vanessa pela grande amizade e parceria profissional que está se fortalecendo a cada dia;

A Elizabeth, Antônio, Thiago, Camila e Serginho que sempre me apoiaram nos momentos mais difíceis e por fazerem parte da minha família;

Aos amigos da Universidade de Pernambuco (UPE) Marina, Merilane, Marcela e Pedro pela eterna amizade, companheirismo e momentos de descontração;

As minhas avós, Helena e Deográcia pelo carinho;

A tia Lurdinha e tio Ferreira pelo apoio e ajuda constante na minha vida;

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo financiamento deste trabalho;

Por fim a todos os Doutores, Mestrados, Técnicos, Estagiários, colaboradores e amigos do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães-CPqAM/FIOCRUZ e do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami/LIKA que de alguma forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho.

*“O mundo está nas mãos daqueles que têm
coragem de sonhar e de correr o risco de viver
seus sonhos”*

Paulo Coelho

RESUMO

O sucesso dos insetos em explorar diversos ambientes é devido, em grande parte, à habilidade em se defender contra patógenos e parasitas. Nos insetos, os principais mecanismos de defesa são desempenhados pelos hemócitos. A classificação dos tipos de hemócitos presentes na hemolinfa ainda é bastante controversa. A biodiversidade desses organismos tem proporcionado modelos importantes para o estudo de suas estratégias antimicrobianas, as quais podem fornecer informações relevantes para o combate a diversas doenças, bem como para o estudo da imunologia geral. O objetivo do presente estudo foi caracterizar a resposta imune celular de *Aedes aegypti* sob o ponto de vista morfológico, funcional e ultra-estrutural através da microscopia óptica e eletrônica de transmissão. Em nossos estudos identificamos seis tipos morfológicos de hemócitos circulantes na hemolinfa de *Ae. aegypti* através da microscopia de luz, eletrônica de transmissão e contraste de interferência diferencial, são eles: prohemócitos, adipohemócitos, granulócitos, plasmatócitos, oenocitóides e trombocitóides. Os prohemócitos foram as menores células encontradas na hemolinfa. Sua principal característica é a presença de um citoplasma ocupando uma pequena área em torno do núcleo. Os adipohemócitos foram os mais abundantes tipos celulares presentes e exibiam grandes inclusões lipídicas preenchendo praticamente todo o citoplasma. Os granulócitos possuem um citoplasma contendo diversos grânulos elétron-densos. Os plasmatócitos exibiram morfologia bastante polimórfica e diversos filopódios e pseudópodes. Os oenocitóides possuem citoplasma homogêneo com poucas organelas. Os trombocitóides são raros e possuem características similares aos oenocitóides com organelas pouco desenvolvidas. Os hemócitos responsáveis pela resposta imune contra partículas de látex conjugadas a FITC foram identificados através da microscopia laser confocal, assim como as lectinas que marcam os hemócitos. Os granulócitos foram as únicas células envolvidas na fagocitose de alvos abióticos *in vitro* e *in vivo*. As lectinas BSI, ConA, HPA, LCA, PNA, UEA e WGA marcaram os hemócitos com variações na intensidade. A WFA e LPL não marcaram hemócitos de *Ae. aegypti*.

Palavras chaves: *Aedes*, microscopia, hemócitos e citologia.

ARAÚJO, Helena Rocha Corrêa. **Hemocytes ultrastructure of *Aedes aegypti***. 2007. Dissertacion (Master of Public Health) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2009.

ABSTRACT

The success of insects in colonizing various environments is mainly due to the ability in defending itself from pathogens and parasites. In insects, the main defense mechanisms are performed by hemocytes. Hemocytes classification present in hemolymph is quite controversial. The biodiversity of such organisms have given important models to antimicrobial strategy studies, which are able to provide relevant information to combat many diseases, as well as to immunology studies. The objective of the present study was to characterize the cellular immune response of *Aedes aegypti* under morphological, functional and ultrastructural point of view, by optic and transmission electron microscopy. In our study we have identified six hemocytes morphologic types circulating in *Ae. aegypti* hemolymph, through techniques such as light microscopy, electron transmission and contrast of differential interference, and they are: prohemocytes, adipohemocytes, granulocytes, plasmatocytes, oenocytoids and trombocytoids. The prohemocytes were the smallest hemocytes found in the hemolymph. Its cytoplasm occupies only a narrow area around the nucleus. The adipohemocytes were the most abundant cell type present and exhibited large lipid vesicles filling almost the entire cytoplasm. The granulocytes possess a cytoplasm containing diverse electron-dense granules. The plasmatocytes were polymorphic and exhibited plasma membrane with irregular processes, filopodia and pseudopodia. The oenocytoids displayed homogenous cytoplasm with a few organelles. Thrombocytoids were very fragile and few in number. Similar characteristics were found in oenocytoids, possessing a homogeneous cytoplasm with poorly developed organelles, few mitochondria and granules. The hemocytes responsible for the immune response against latex particles conjugated to FITC, were identified by confocal microscopy, as the lectins which mark hemocytes. The granulocytes were the only cells responsible for phagocytic activity against abiotic targets *in vitro* and *in vivo*. The lectins BSI, ConA, HPA, LCA, PNA, UEA and WGA marked hemocytes with intensity variations. The WFA and LPL did not mark *Ae. aegypti* hemocytes.

Keywords: *Aedes*, microscopy, hemocytes and cytology.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 – <i>Aedes aegypti</i> | 14 |
| Figura 2 – Distribuição mundial da Dengue em 2005 | 18 |
| Figura 3 – Sistema circulatório dos insetos | 19 |
| Figura 4 – Hemócitos de <i>Ae. aegypti</i> observdos através da microscopia de luz | 46 |
| Figura 5 – Fotomicrografia eletrônica de transmissão dos hemócitos de <i>Ae. aegypti</i> | 47 |
| Figure 6 – Fotomicrografia de um granulócito | 48 |
| Figura 7 – Hemócitos de <i>Ae. aegypti</i> observados através da microscopia óptica de contraste de interferência diferencial (DIC) | 49 |
| Figura 8 – Fagocitose <i>in vivo</i> de partículas de látex pelo granulócito de <i>Ae. aegypti</i> | 51 |
| Figura 9 – Fagocitose <i>in vitro</i> de partículas de látex pelo granulócito de <i>Ae. aegypti</i> | 52 |

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 13 |
| 1.1 Culicídeos | 13 |
| 1.1.2 O <i>Ae. aegypti</i> | 14 |
| 1.1.2.1 <i>Biologia, ecologia e distribuição do Ae. aegypti</i> | 15 |
| 1.1.2.2 <i>Importância epidemiológica do Ae. aegypti</i> | 16 |
| 1.2 Sistema circulatório dos insetos | 18 |
| 1.3 Mecanismo de defesa dos insetos | 19 |
| 1.3.1 Hemolinfa | 21 |
| 1.3.2 Hemócitos | 22 |
| 1.3.2.1 <i>Origem dos hemócitos</i> | 22 |
| 1.3.2.2 <i>Classificação dos hemócitos</i> | 23 |
| 1.4 Resposta imune humoral | 24 |
| 1.4.1 Importância das lectinas | 25 |
| 1.5 Resposta imune celular | 26 |
| 1.5.1 Fagocitose | 27 |
| 1.5.2 Nodulação | 27 |
| 1.5.3 Encapsulação | 28 |
| 2 JUSTIFICATIVA | 30 |
| 3 PERGUNTA CONDUTORA | 32 |
| 4 HIPÓTESE | 34 |
| 5 OBJETIVOS | 36 |
| 5.1 Geral | 36 |
| 5.2 Específicos | 36 |
| 6 MATERIAIS E MÉTODOS | 38 |

| | |
|--|-----------|
| 6.1 Obtenção dos insetos | 38 |
| 6.2 Coleta da hemolinfa | 38 |
| 6.3 Microscopia de Luz | 38 |
| 6.4 Microscopia de contraste de interferência diferencial | 39 |
| 6.5 Microscopia eletrônica de transmissão | 39 |
| 6.6 Contagem diferencial | 40 |
| 6.7 Lectinas | 40 |
| 6.8 Desafio imune | 41 |
| 7 RESULTADOS | 43 |
| 7.1 Caracterização morfológica dos hemócitos de <i>Ae. aegypti</i> | 43 |
| 7.2 Desafio imune com partículas de látex | 50 |
| 7.3 Utilização do painel de lectinas | 53 |
| 8 DISCUSSÃO | 55 |
| 9 CONCLUSÕES | 62 |
| REFERÊNCIAS | 64 |
| APÊNDICE A | 76 |
| ANEXO A | 83 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 Culicídeos

Os mosquitos dos gêneros *Anopheles*, *Culex* e *Aedes* (Diptera, Culicidae) são importantes vetores de doenças como malária, oncoconcerose, filariose linfática, dengue, febre amarela, febre do Nilo ocidental, entre outras que causam grande morbidade e mortalidade no mundo. Mais de 90% das doenças veiculadas ao homem por insetos ocorrem nas regiões tropicais. Onde encontramos parte das Américas do Sul e Central, regiões do Caribe, grande parte do continente Africano, regiões da Ásia Meridional, Austrália do Norte e Oceania.

A malária, transmitida pelo *Anopheles gambiae* é endêmica em mais de 100 países e contribui para a morte de aproximadamente 1 milhão de pessoas ao ano, sendo a maioria das vítimas crianças da África. Outras 60 espécies de anofelinos contribuem na transmissão da malária, embora possuam menor competência veotrial. A filariose afeta cerca de 120 milhões de pessoas em mais de 80 países localizados nos trópicos e subtropicais (ROBERTS, 2002; Organização Mundial de saúde, 2000).

As fêmeas de alguns mosquitos alimentam-se de sangue (hematofagia) de grande número de animais, enquanto outros parecem ter essa capacidade limitada a poucas ou mesmo a uma única espécie, este último aspecto leva o culicídeo a adquirir hábitos de estreita associação com o hospedeiro, passando a freqüentar o mesmo ambiente. Dessa maneira, o mosquito torna-se doméstico e antropófilo, quando prefere se alimentar do sangue humano para nutrir seus ovos, e por esse motivo, vive constantemente no meio habitado por ele. Alguns mosquitos realizam a hematofagia à noite; outros no alvorecer ou durante todo o dia (FORATTINI, 1962; ROBERTS, 2002).

1.1.2 O *Aedes aegypti*

O *Ae. aegypti* é um mosquito rajado, de coloração escura, com manchas brancas pelo corpo. Sua identificação é facilitada pelo desenho em forma de lira presente no dorso, que pode ser observado a olho nu. Manchas brancas, alternando-se com manchas escuras, são encontradas na região posterior da cabeça, nos segmentos abdominais, onde as manchas brancas formam cintos junto à base de cada uma das pernas, que apresentam anéis brancos contrastando com sua cor escura (REY, 2001) (Figura 1).



Figura 1: *Aedes aegypti*.
Foto: Genilton Viera IOC/FIOCRUZ

O *Ae. aegypti* pertence à ordem Diptera, subordem Nematocera, família Culicidae, subfamília Culicinae, tribo Aedini e Gênero *Aedes* (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994). É caracterizado pelo alto grau de adaptação ao ambiente urbano, o que vem dificultando bastante o controle da densidade populacional desse mosquito (SILVA, 1994). Os ovos são muito resistentes à dessecação, podendo permanecer viáveis por mais de um ano. Essa resistência tem-se apresentado como um dos principais obstáculos para o controle do *Ae. aegypti*, pois é ela que possibilita a dispersão passiva da espécie (NEVES, 2005). Já a dispersão ativa dos adultos é reduzida, sendo a autonomia de voo de aproximadamente 100 metros (GADELHA; TODA, 1985).

1.1.2.1 *Biologia, ecologia e distribuição do Ae. aegypti*

As fêmeas de *Ae. aegypti* são preferencialmente antropofílicas, apresentam hábito alimentar diurno intra e peridomiciliar, com picos pré-crepusculares. Após a ingestão do repasto sanguíneo (hematofagia), as fêmeas buscam sítios para oviposição onde seus ovos são postos isoladamente nas paredes internas do recipiente, próximo a lâmina d'água, que servirão de criadouro para o desenvolvimento de suas formas imaturas (quatro estádios larvais e pupa). Em geral os criadouros colonizados pelo *Ae. aegypti*, por ser uma espécie bastante domiciliada, são artificiais preenchidos por águas pluviais como pneus, latas, garrafas, calhas, pratos de planta domésticos e de cemitérios ou aqueles utilizados para o armazenamento de água para uso doméstico, todos situados nas proximidades às habitações humanas. Seu habitat, portanto, está diretamente relacionado às condições oferecidas pelo homem em seu ambiente domiciliar (GADELHA; TODA, 1985).

Esse mosquito é vetor eficiente do vírus dengue especialmente por causa do seu comportamento hematófago intermitente, podendo assim se alimentar em mais de um hospedeiro durante um único ciclo gonotrófico (MACKENZIE et al., 2004).

1.1.2.2 Importância epidemiológica do *Ae. aegypti*

Dengue é uma doença febril aguda, cujos agentes etiológicos são vírus pertencentes à família *Flaviviridae*. São conhecidos quatro sorotipos antigenicamente distintos: DENV – 1, DENV – 2, DENV – 3 e DENV – 4. As manifestações clínicas são variáveis apresentando-se desde síndrome viral inespecífica benigna, até quadro grave e fatal de doença hemorrágica com choque. São destacados alguns fatores de risco para a ocorrência de casos graves: a cepa do sorotipo de vírus infectante, o estado imunitário e genético do paciente, a concomitância com outras doenças e a infecção prévia por outro sorotipo da doença (TAUIL, 2001). Originalmente, o vírus dengue circulava e era mantido em ciclos de transmissão silvestres, envolvendo primatas inferiores e mosquitos *Aedes*, na Ásia e África (GUBLER, 1998). No entanto, a doença se estabeleceu em centros urbanos das regiões tropicais, em um ciclo que envolve o homem – *Ae. aegypti* – homem. Durante o século XX a transmissão urbana do vírus dengue tornou-se grave problema de saúde pública (GUBLER, 2002). Hoje é mundialmente considerada, a arbovirose mais importante, constituindo uma importante carga de morbidade e mortalidade para a população humana. Aproximadamente 2,5 bilhões de pessoas encontram-se sob o risco de infecção, principalmente em países tropicais onde as condições climáticas (temperatura e umidade) são favoráveis a proliferação do mosquito vetor (TAUIL, 2002). Considerando a ampla dispersão geográfica desta espécie e a circulação dos sorotipos virais na maioria das áreas onde ocorre a doença, estima-se que 80 milhões de pessoas sejam infectadas anualmente (ROBERTS, 2002). A dengue é uma infecção reemergente e vem preocupando as autoridades sanitárias de todo o mundo em virtude de sua circulação nos cinco continentes e grande potencial para causar formas graves e letais (HALSTEAD, 1997)(Figura 2).

O *Ae. aegypti* foi eliminado pela maioria dos países americanos, incluindo o Brasil, através dos esforços para erradicar a febre amarela pela Associação Panamericana de Saúde na década de 60. Entretanto, a erradicação não teve sucesso no Suriname, Guianas, Venezuela, Ilhas do Caribe e Estados Unidos devido à falta de recursos para manter a campanha. E em 1995 sua distribuição alcançou os mesmos níveis encontrados antes da campanha (SCHATZMAYR, 2000).

Nos três últimos séculos, tem-se registrado a ocorrência de dengue em várias partes do mundo, com pandemias e epidemias isoladas, atingindo todos os continentes (TEIXEIRA et

al., 1999). Nas Américas parece ter havido diminuição ou mesmo interrupção da transmissão do vírus dengue após as primeiras décadas do século XX. Porém a partir dos meados da década de 60 diferentes epidemias de dengue clássico foram registradas em vários países. Na década de 90, o quadro epidemiológico da dengue nas Américas e no Caribe agravou-se e epidemias têm sido, freqüentemente, observadas em vários centros urbanos, muitas delas associadas à ocorrência de casos hemorrágicos (TEIXEIRA et al., 1999).

No Brasil, desde 1982 vem ocorrendo epidemias de dengue clássico que circulam em milhares de municípios. A febre hemorrágica da dengue vem sendo diagnosticada desde 1990, sendo que deste ano até 2003 foram notificados 5.075 casos e 264 óbitos. Em 2001, 2002 e 2003 foram notificados 428.117, 794.219 e 341.776 casos respectivamente. Os casos relatados no Brasil representam cerca de 80% do total do número das Américas, enfatizando a magnitude deste problema. Epidemias de dengue têm sido descritas em 24 dos 26 estados brasileiros, inclusive no Distrito Federal/ Brasília (TEIXEIRA et al., 1999; BRASIL, 2006).

A febre amarela, também transmitida pelo *Ae. aegypti*, é uma doença infecciosa não contagiosa que se mantém endêmica ou enzoótica nas florestas tropicais da América e África causando epidemias de maior ou menor impacto em Saúde Pública. Constitui a febre hemorrágica viral original, a primeira descrita no mundo. Cerca de 90% dos casos da doença apresentam-se com formas clínicas benignas que evoluem para cura, enquanto 10% desenvolvem quadros dramáticos com mortalidade em torno de 50% (VASCONCELOS, 2003). É temida a cerca de 400 anos e está em ascensão outra vez, sendo responsável por 200.000 casos e 30.000 mortes por ano no mundo, com maior ocorrência em áreas rurais (ROBERTS, 2002).

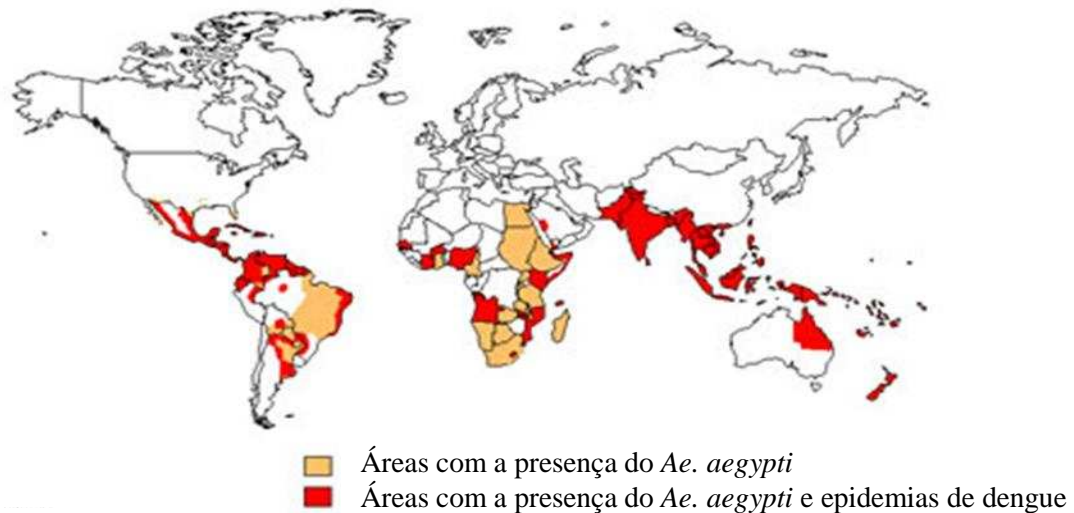


Figura 2: Distribuição mundial da dengue em 2005.
Fonte: Centers for Disease Control and Prevention (2007)

1.2 Sistema circulatório dos insetos

Os insetos têm o sistema circulatório aberto com a hemolinfa, líquido circulante, ocupando a cavidade geral, conhecida como hemocele e os apêndices. A hemolinfa circula através da atividade de contração do único vaso presente no inseto, que é um tubo localizado dorsalmente ao trato alimentar que percorre o corpo do inseto longitudinalmente, chamado vaso dorsal. É regularmente pulsátil e constituído por um tubo simples, diferenciado em duas regiões anatomicamente distintas: região anterior, que se inicia no tórax e termina na cabeça, denominada “aorta”. E a região posterior que se situa no abdômen e é denominada “coração” (GALLO et al., 1978; CHAPMAN, 1983).

Nos Dípteros adultos, e em alguns outros insetos, a hemolinfa percorre todo o tórax e o abdômen, percorrendo os espaços não ocupados pelos órgãos internos, isto ocorre porque a hemocele é separada em duas partes por uma membrana móvel de tecido gorduroso (diafragmas dorsal e ventral). As contrações dos músculos alares fazem com que o coração se expanda e a hemolinfa seja empurrada para frente. A hemolinfa normalmente flui da parte posterior para a anterior no vaso dorsal e da parte anterior para a posterior dentro das cavidades perivisceral e perineural. O fluxo pode ser aumentado por estruturas pulsatórias acessórias localizadas na cabeça, tórax, pernas ou asas e por contrações do diafragma dorsal. O fluxo da hemolinfa está coordenado com os movimentos abdominais ventilatórios (WASSERTHAL, 1982; RUPPERT, BARNES, 1996) (Figura 3).

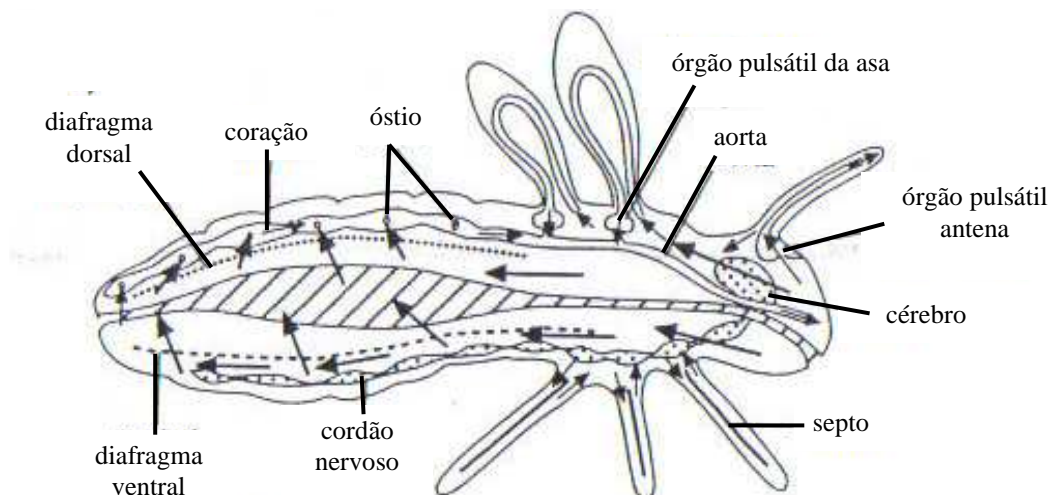


Figura 3: Sistema circulatório dos insetos. As setas indicam o sentido da circulação da hemolinfa. Adaptado (CHAPMAN, 1998).

1.3 Mecanismos de defesa dos insetos

O sistema de defesa dos invertebrados em geral se distingue fundamentalmente daquele dos vertebrados pela falta de imunoglobulinas, moléculas que apresentam alta especificidade contra os invasores. A resposta de defesa dos invertebrados é pouco específica e se apóia sobre um sistema de defesa complexo que envolve reações celulares e humorais coordenadas (KARP, 1990).

O sucesso dos insetos para se desenvolverem em ambientes repletos de competidores potencialmente patogênicos é atribuído à grande eficiência das suas barreiras mecânicas e/ou fisiológicas. Nas barreiras mecânicas podemos destacar o tegumento (GULLAN; CRANSTON, 1994) e a membrana peritrófica (matriz peritrófica) (BILLINGSLEY; RUDIN, 1992). Em algumas espécies de mosquitos a armadura cibarial ou cibário pode constituir uma importante barreira mecânica (McGREEVY et al., 1978). As barreiras fisiológicas utilizadas para defesa constituem as respostas humorais (HULTMARK et al., 1980; COCIANCICH et al., 1994) e celulares, sendo esta última representada pelos hemócitos (NAPPI; CHRISTENSEN, 1986). Há uma interação estreita dos sistemas imunológicos celular e humoral pois fatores humorais podem atuar como moléculas de reconhecimento facilitando a fagocitose pelas células ou ainda, células podem sintetizar e secretar moléculas humorais como aglutininas e peptídeos antimicrobianos, portanto a divisão da imunidade é apenas para efeitos didáticos.

O tegumento é formado por uma camada epitelial de células (epiderme), e duas camadas não celulares (lâmina basal e cutícula). Sua importância para o inseto é evitar a perda excessiva de água e impedir a entrada de muitos patógenos (GULLAN; CRANSTON, 1994). A estrutura e composição química da cutícula representam as principais barreiras de defesa. Ela apresenta componentes antimicrobianos como proteínas, lipídios, hidrocarbonetos, diofenóis, carboidratos, quitina e melanina que impedem a penetração na hemocele de bactérias, vírus e protozoários, constituindo assim, a primeira linha de defesa contra patógenos e parasitas. Contudo, se essa barreira for danificada, esses patógenos, que vivem na superfície da cutícula, podem penetrar na hemocele (DUNN, 1986; MARMARAS et al., 1993; BULET et al., 1999).

A matriz peritrófica, em insetos hematófagos, está envolvida na proteção contra danos mecânicos, mas um dos principais papéis atribuídos a ela é a proteção contra agentes patogênicos e toxinas, por promover uma barreira à transmissão e subsequente desenvolvimento desses agentes que penetram por via oral (PETERS, 1992; MILLER, LEHANE, 1993; SHAHABUDDIN et al., 1993; PIMENTA et al., 1997). Sua localização entre o alimento e o epitélio do intestino médio, faz com que a matriz peritrófica desempenhe um importante papel na biologia intestinal do inseto (LEHANE, 1997). De acordo com Richards e Richards (1977) a ingestão de alimentação sanguínea assim como a distensão do estômago por alimentos livres de proteínas e aumento do lúmen do estômago estimula a síntese da matriz peritrófica.

É a partir da formação da matriz peritrófica que o intestino médio dos mosquitos passa a ser protegido de danos mecânicos, ações de patógenos e toxinas.

A armadura cibarial ou cibário é um obstáculo físico dos insetos que funciona como um filtro, podendo impedir a entrada de microrganismos e parasitas pela via digestiva. Alguns mosquitos apresentam esta estrutura quitinizada em seu intestino anterior (McGREEVY et al., 1978).

Todavia, uma vez que o patógeno vence estas barreiras e atinge a hemocele do inseto, desencadeia a defesa hemocitária, que segundo BULET et al. (1999) seria a resposta imunológica propriamente dita.

1.3.1 Hemolinfa

A hemolinfa é o único tecido fluido extra-celular no corpo dos insetos. É composto pelo componente líquido, o plasma linfático; e por células incolores suspensas, os hemócitos. Percorre quase todo o corpo do inseto banhando os tecidos diretamente. A hemolinfa corresponde de 15 a 75% do volume total do corpo do inseto. Sua quantidade e composição variam conforme a espécie, momento fisiológico e a idade. Esse líquido é claro, às vezes incolor, podendo, apresentar coloração verde, amarela ou raramente vermelha, devido à presença de pigmentos solúveis provenientes da alimentação. Apresenta grande tendência a se tornar escura, quando em contato com o ar, sob a influência de uma enzima, a tirosinase (BARTH, 1972; BARRACCO, 1982).

O papel da hemolinfa no transporte dos gases respiratórios é pouco relevante, a troca gasosa tecidual é realizada diretamente pelo sistema traqueal (RUPPERT; BARNES, 1996). Mesmo não tendo um papel destacado na oxigenação, a hemolinfa tem uma grande importância fisiológica. É atuando através dela que são efetuadas as trocas químicas entre os diversos órgãos, funcionando no transporte de hormônios e enzimas; dos resíduos oriundos do metabolismo aos órgãos de excreção; e ainda no transporte das substâncias nutritivas do aparelho digestivo para os tecidos, asas e demais apêndices, os quais são banhados livremente por ela (GALLO et al., 1978). A hemolinfa destaca-se ainda pela sua atuação na distribuição da pressão de uma região para outra do corpo, como na ventilação do sistema traqueal, na eclosão, na ecdise e na expansão das asas durante a muda (VANETTI, 1978).

Romoser (1973) e Borrer; Triplehorn; Johnson (1989) mencionaram ainda outras funções da hemolinfa como: lubrificante, armazenamento, proteção (fagocitose, encapsulação, coagulação, cicatrização e liberação de fatores protetores não celulares) e formação de outros tecidos. A hemolinfa apresenta também, na parte líquida, aminoácidos livres os quais são os principais responsáveis pela regulação osmótica do fluido, altas concentrações de ácido úrico dissolvido, amônia, fosfatos orgânicos, trealose (um açúcar não redutor), proteínas e hemócitos (RUPPERT, BARNES, 1996; CHAPMAN, 1998).

1.3.2 Hemócitos

As células livres circulantes na hemolinfa dos insetos são denominadas de hemócitos e apresentam formas e funções diversificadas (BARTH, 1972). São todos elementos nucleados e de acordo com Nappi e Stoloffolano (1972), percorrem quase todas as regiões do corpo dos insetos, devido a seus movimentos amebóides, podendo inclusive mover-se em sentido contrário ao fluxo da hemolinfa. Podem também estar aderidos ao corpo gorduroso, traquéia e sistema digestivo.

Em diferentes espécies de insetos, o número e os tipos de hemócitos podem apresentar-se muito variáveis. Dentro da mesma espécie o número pode variar ao longo do desenvolvimento do inseto na fase larval, nas ecdises e nos adultos (ARNOLD; HINKS, 1976)

Os principais mecanismos de defesa são desenvolvidos pelos hemócitos, que fornecem uma resposta ágil e eficiente contra patógenos que atingem a hemocele (RATICLIFFE et al., 1985). São comparados, devido as suas funções, aos leucócitos dos vertebrados, visto que estão relacionados direta ou indiretamente com sua capacidade de reagir contra a presença de patógenos (BOMBONATO; GREGÓRIO, 1995).

1.3.2.1 *Origem dos hemócitos*

A hipótese de que os hemócitos são derivados do mesoderma embrionário é a mais aceita pela comunidade científica. Passada a fase embrionária, a manutenção do estoque de hemócitos na circulação deve-se à existência de tecidos com função hematopoiética e por divisão celular. Nem todos os tipos de hemócitos se dividem e a média de divisão é variável até entre os mesmos tipos celulares (HOFFMAN et al., 1979).

1.3.2.2 *Classificação dos hemócitos*

Diferentes tipos de hemócitos têm sido descritos na literatura, porém tem sido difícil uma classificação exata porque células individuais podem ter diferentes aparências sob determinadas condições, desta forma uma variedade de técnicas têm sido usadas nestes estudos principalmente, a microscopia eletrônica e a microscopia de luz. Esta última, por sua vez, pode ser realizada empregando-se esfregaços fixados e corados, ou ainda através de observações a fresco em contraste de fase. Para o estudo da microscopia de luz a maioria dos autores prefere o contraste de fase devido a sua rapidez e eficiência, além da vantagem de permitir a observação de células vivas (JONES, 1979; SHAPIRO, 1979).

Observações da hemolinfa através da microscopia de luz resultaram em numerosas e conflitantes publicações quanto à classificação dos hemócitos, bem como na dificuldade em relacioná-los aos diferentes mecanismos de defesa, que envolvem a ação de vários tipos celulares (WILLOT et al., 1994). As razões para esta controvérsia decorrem também da grande variabilidade morfológica dos hemócitos em função dos estágios de desenvolvimento e das condições ambientais, além da grande diversidade de insetos. Outra dificuldade encontrada é a fragilidade destas células, dependendo dos métodos utilizados para seu estudo, além dos parâmetros utilizados em sua classificação (GUPTA, 1985).

Para a classificação morfológica dos hemócitos são considerados vários aspectos como: a) o tamanho, a forma, o número e afinidade tintorial de suas inclusões e coloração do citoplasma. b) diferenças comportamentais, na sua habilidade de divisão, rapidez de degranulação ou vacuolização de suas inclusões, na sua fragilidade, no desenvolvimento de projeções citoplasmáticas e sua adesão a superfícies (JONES, 1979).

Na literatura, encontram-se poucos trabalhos com abordagem sobre hemócitos de insetos quando se considera o elevado número de espécies existentes ou mesmo quando se considera apenas as espécies economicamente importantes na agricultura ou na saúde. Os trabalhos, a esse respeito enfocam ordens mais estudadas que são: Lepidoptera, Himenoptera, Coleoptera e Diptera (CHAPMAN, 1998).

Gupta (1985) em ampla revisão da literatura, uniformizou a nomenclatura dessas células e classificou os principais tipos de hemócitos presentes em várias ordens de insetos: prohemócito (PR), plasmatócito (PL), granulócito (GR) e oenocitóide (OE). Tipos adicionais

também foram descritos: coagulócito (CO), adipohemócito (AD), esferulócito (ES), podócito (PO) e vermiforme (VE).

1.4 Resposta imune humoral

A defesa humoral é representada principalmente pela ação de proteínas e peptídeos antimicrobianos, ativação de uma complexa cascata proteolítica que leva a coagulação, melanização e formação de produtos de reações mediadas pelo oxigênio e nitrogênio (BOGDAN et al., 2000; VASS, NAPPI, 2001; LAVINE, STRAND, 2002).

Na hemolinfa dos insetos existem proteínas solúveis presentes em pequenas quantidades, que aparecem somente no curso de uma infecção, e que normalmente leva algumas horas ou dias para sua completa expressão (COCIANCICH et al., 1994). Essas substâncias estão envolvidas no reconhecimento, na mediação da resposta imune-celular ou na ação direta antimicrobiana. Entre estas substâncias, as mais estudadas são as lectinas e os peptídeos e as proteínas antimicrobianas (WILSON et al., 1999).

Os peptídeos antimicrobianos são moléculas anfipáticas positivamente carregadas na sua maioria, compostas de 12 a 45 aminoácidos. O principal modo de ação destas moléculas é através do aumento da permeabilidade da membrana plasmática (ANDREU; RIVAS, 1998). Peptídeos antimicrobianos estão amplamente distribuídos nos diversos organismos. A ampla ocorrência dessas substâncias sugere que elas desempenham um papel importante na imunidade inata (BOMAN, 1998).

O espectro de ação dos peptídeos é diverso, alguns peptídeos tais como as cecropinas são ativas quando em contato com bactérias gram-negativas e gram-positivas, já as defensinas são ativas principalmente contra bactérias gram-positivas. Peptídeos antifúngicos específicos foram identificados em *Drosófila* e provavelmente existem também em outros insetos (LOWENBERGER, 2001).

Outros peptídeos antibacterianos que fazem parte da imunidade humoral dos insetos são as atacinas que têm sido isoladas da hemolinfa dos lepidópteros e os dipterocinas isolados da hemolinfa de várias espécies de dípteros. As atacinas são peptídeos consideravelmente maiores que as cecropinas (180 aminoácidos), mas sua ação antibactericida é menor. Estudos realizados demonstraram que cada tipo de peptídeo liga-se a um receptor diferente na parede celular das bactérias. Essa característica impede que as bactérias escapem através de mutações

(COCIANCICH et al., 1994). Alguns insetos, como grilos, baratas e gafanhotos, não sintetizam esses peptídeos antibacterianos. Na hemolinfa desses insetos a atividade antimicrobiana é realizada principalmente pelas lisozimas. As lisozimas estão presentes na hemolinfa de todas as espécies de insetos (KANOST, 1999).

No *Ae. aegypti* a invasão da hemocele por bactérias inicia a produção das defensinas e das cecropinas, peptídeos ativos contra às bactérias gram-negativas, e diversos outros peptídeos que ainda estão sendo caracterizados (LOWENBERGER, 2001). Os peptídeos são produzidos, geralmente, no corpo gorduroso ou nos hemócitos, podem também ser ativados por precursores e liberados na hemolinfa por outros tecidos (BOMAN, 1998).

1.4.1 Importância das lectinas

As lectinas são proteínas com alta afinidade por carboidratos e estão relacionadas a vários fenômenos de reconhecimento celular, incluindo adesão a hemócitos e microrganismos. Desempenham, portanto um papel importante na imunidade dos artrópodes, funcionando como opsoninas, ao se aderirem aos microrganismos invasores ou como receptores na membrana dos hemócitos.

Nos insetos, as lectinas têm sido detectadas na hemolinfa, sendo produzidas durante os processos infecciosos, injúrias no tegumento e na degradação dos tecidos durante os estágios de desenvolvimento. São uma classe de glicoproteínas que participam de muitos processos biológicos. Especificamente, se ligam a glicolipídios, glicoproteínas ou polissacarídios na superfície das células, causando a sua aglutinação e/ou precipitação. Alguns pesquisadores consideram a interação lectina-carboidrato e a ativação da cascata da profenoloxidase um dos mediadores no processo de reconhecimento de patógenos e parasitóides (DRIF; BREHÉLIN, 1994; BOUCIAS; PENDLAND, 1993; KAWASAKI et al., 1996; WILSON et al., 1999). Em larvas da mosca *Sarcophaga peregrina*, moléculas de lectinas são liberadas na hemolinfa todas as vezes que a cutícula do inseto é danificada. Essa proteína auxilia os hemócitos no reconhecimento e na fagocitose dos tecidos injuriados ou de microrganismos que invadem a hemocele. Em ninfas da barata *Blaberus discoidalis*, injeções de *Escherichia coli* induzem o aparecimento de lectinas na hemolinfa, que aumenta a fagocitose das bactérias. As ninfas não desafiadas, as lectinas não são detectadas (BOUCIAS; PENDLAND, 1993). Moléculas de lectinas na membrana dos hemócitos têm sido reportadas por vários pesquisadores

(BRADLEY et al., 1989; WHEELER et al., 1993). Nos gafanhotos, *Melanoplus differentialis* e *M. sanguinipes* 20% a 30% dessas moléculas estão na membrana dos granulócitos (BRADLEY et al., 1989). Várias moléculas de lectinas já foram purificadas e caracterizadas em lepidópteros e ortópteros (DRIF; BREHÉLIN, 1994; CHEN et al., 1998).

A coagulação da hemolinfa é um fenômeno freqüentemente observado após um ferimento no exoesqueleto do inseto, relacionada à prevenção da perda de hemolinfa e à reparação de seu revestimento externo. Funciona também como barreira mecânica, bloqueando a penetração de patógenos oportunistas. Na formação dos coágulos, proteínas solúveis na hemolinfa interagem com células especializadas do sistema imunológico, que constitui a barreira final do sistema de defesa dos insetos. A coagulação da hemolinfa desempenha um papel complexo nas reações de defesa dos insetos, tendo sido observada sua participação no processo de encapsulação (ROWLEY; RATCLIFFE, 1981).

Fenoloxidase é uma enzima que cataliza a oxidação de compostos fenólicos presentes na hemolinfa e na cutícula dos insetos. O produto final dessa oxidação é a melanina, que participa de três importantes processos fisiológicos: esclerotização da cutícula, cicatrização de feridas e defesas imunológicas. A fenoloxidase encontra-se como uma proenzima, chamada pro-fenoloxidase, é ativada proteoliticamente por uma ou duas serina-proteases em resposta a infecções. Fenoloxidase é uma enzima bastante ativa e os produtos intermediários de sua ativação são tóxicos tanto para os microorganismos invasores como para o próprio inseto, por isso sua ativação é limitada ao local de infecção, caso contrário poderia levar a uma melanização generalizada e letal para o inseto (SILVA et al., 2000).

1.5 Resposta imune celular

Os hemócitos participam ativamente dos mecanismos de defesa tais como: reconhecimento, fagocitose, encapsulação, coagulação, formação de nódulos e citotoxicidade. Elas ocorrem em combinação com as defesas humorais (DUNN, 1986; RATCLIFFE et al., 1985).

Eles circulam livremente na hemolinfa, mas após o contato com partículas estranhas e a resposta a sinais extracelulares, rapidamente migram para o local onde destroem os invasores (SILVA, 2002). Esta capacidade de reconhecer, responder e eventualmente destruir estes

patógenos é em grande parte devida ao esforço cooperativo dos hemócitos (ANGGRAENI; RATCLIFFE, 1991; MEYER-FERNANDES et al., 2000).

Os hemócitos reconhecem uma variedade de objetos estranhos, pela interação direta de receptores de superfície celular com moléculas do organismo invasor, ou indiretamente pelo reconhecimento de receptores da resposta humoral que opsonizam a superfície do invasor (LAVINE; STRAND, 2002). Os granulócitos e os plasmatócitos são os hemócitos que participam das defesas celulares na maioria dos insetos estudados.

Um fato de grande relevância a ser considerado em um quadro infeccioso é a variação no número e na proporção dos diversos tipos de hemócitos presentes na hemolinfa. Em resposta à presença dos patógenos, tais variações decorrem da produção elevada de alguns tipos celulares e da imobilização de hemócitos em nódulos e cápsulas, ao redor dos organismos invasores (CHAPMAN, 1998).

As reações de defesa celular são influenciadas por parâmetros genéticos e fisiológicos do hospedeiro e do patógeno (RUSSO et al., 2001).

1.5.1 Fagocitose

A fagocitose é considerada a resposta celular primária de defesa em muitos insetos que ocorre contra vírus, bactérias, protozoários, fungos ou material inerte particulado tanto *in vivo* como *in vitro*, sendo similar ao que ocorre com as células fagocitárias de mamíferos (LAVINE; STRAND, 2002). Os plasmatócitos são as principais células fagocíticas, que ao receberem sinais da presença de bactérias ou outro microrganismo essas células estendem protusões finas e rígidas, chamadas filopódios, as quais exercem um papel importante na fagocitose. Os granulócitos também podem agir em conjunto ou separadamente com os plasmatócitos durante a fagocitose (SILVA et al., 2000; RUSSO et al., 2001). Um microrganismo quando fagocitado pode ser destruído ou se multiplicar no hemócito e provocar sua lise (SILVA, 2002).

1.5.2 Nodulação

Se a concentração de patógenos é muito grande, os hemócitos se agregam e formam nódulos a fim de imobilizá-los e de removê-los da circulação.

Para haver a formação do nódulo alguns hemócitos se autodestroem ou são destruídos por outros, seu rompimento descarrega na hemolinfa substâncias sinalizadoras que atraem mais hemócitos para a região. Desta maneira, o agente infectante é circundado e imobilizado por uma estrutura amorfa formada por estas células que acabam formando uma série de camadas ao seu redor. O nódulo assim formado compreende, além do agente infectante, vários hemócitos mortos ao seu redor, circundados por camadas de hemócitos vivos (MENEZES; MOSIG, 1999). A velocidade e intensidade da formação desses nódulos variam entre os insetos e alguns podem ser eventualmente encapsulados.

Os hemócitos envolvidos na formação de nódulos são os plasmatócitos e granulócitos (DEAN et al., 2004).

1.5.3 Encapsulação

Quando o corpo estranho é muito grande para ser fagocitado por elementos isolados da hemolinfa, como larvas e ovos de endoparasitóides que são depositados na hemocele e não podem ser isolados em nódulos, ocorre o fenômeno da encapsulação, isto é, a aglomeração de um conjunto de células culminando com a formação de cápsulas ao redor do agente invasor (STRAND; PECH, 1995; MEYER-FERNANDES et al., 2000).

Geralmente, os granulócitos são os primeiros hemócitos que chegam ao local da infecção. Após constatar a presença do endoparasitóide, essas células se agregam e rapidamente liberam uma substância granular na hemolinfa, que atraem os plasmatócitos. Em seguida, os plasmatócitos chegam para formar uma camada de células, que endurece por um período de várias horas. Normalmente, a formação de cápsulas é acompanhada pela produção de melanina. Durante a síntese de melanina, moléculas citotóxicas intermediárias (quinonas) são produzidas e inativam ou matam grande parte dos microrganismos (SILVA et al., 2000).

A formação de nódulos e de cápsulas parece idêntico quando se observa ao nível ultra-estrutural, isto sugere que seja o mesmo processo contra alvos diferentes (LAVINE; STRAND, 2002).

2 JUSTIFICATIVA

Nos últimos anos, tem havido um enorme progresso no conhecimento das defesas imunológicas dos insetos. A biodiversidade desses organismos tem proporcionado modelos importantes para o estudo de suas estratégias antimicrobianas, as quais podem fornecer informações relevantes para o combate a doenças como a malária, a dengue, febre amarela, a tripanosomíase e a leishmaniose, bem como para o estudo da imunologia geral.

A dengue é hoje um dos principais problemas de saúde pública no mundo. No Brasil, o Ministério da Saúde trabalha exaustivamente no combate à dengue, no entanto, observa-se que o número de pessoas picadas pelo mosquito transmissor volta a crescer a cada ano.

O conhecimento sobre o sistema imunológico do *Ae. aegypti* é de grande relevância para o desenvolvimento de metodologias de controle de endemias transmitidas por este inseto. Desta forma, o presente estudo visa esclarecer alguns aspectos da imunidade celular do *Ae. aegypti* sob o ponto de vista morfológico, funcional e ultra-estrutural.

3 PERGUNTA CONDUTORA

Quais as características da resposta imune celular presentes na hemolinfa do *Ae. aegypti* sob o ponto de vista morfológico, funcional e ultra-estrutural?

4 HIPÓTESE

A hemolinfa de *Ae. aegypti* possui alguns tipos celulares morfologicamente distintos que possuem diferentes funções na resposta imune celular .

5 OBJETIVOS

5.1 Geral

- a) Caracterizar a resposta imune celular de *Ae. aegypti* sob o ponto de vista morfológico, funcional e ultra-estrutural.

5.2 Específicos

- a) Descrever a morfologia dos hemócitos de *Ae. aegypti* através da microscopia óptica e microscopia eletrônica;
 - b) Identificar os hemócitos de *Ae. aegypti* responsáveis pela resposta imune fagocítica frente a partículas abióticas;
 - c) Observar a presença de resíduos de carboidratos na superfície dos hemócitos de *Ae. aegypti*.
-

6 MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 Obtenção dos Insetos

Foram utilizados mosquitos *Ae. aegypti* da linhagem REC de laboratório fornecidos pelo Departamento de Entomologia do CPqAM/FIOCRUZ. Os mosquitos adultos fêmeas (4 dias) foram mantidos em gaiolas (30X30X30cm) sob temperatura ambiente (26 ± 1 °C) com $60 \pm 80\%$ de umidade relativa, fotoperíodo 12:12h C/E até a fase adulta e alimentados com solução de sacarose a 10% oferecida permanentemente e diariamente renovada.

6.2. Coleta da Hemolinfa

Para a realização da coleta da hemolinfa, os mosquitos foram lavados em PBS e colocados no gelo (1-2 minutos) para imobilização. A hemolinfa foi retirada dos mosquitos por perfusão no tórax com o auxílio de um microcapilar de vidro, através da inoculação de 5µl de solução salina isotônica (NaCl, KCl, CaCl, NaHCO₃, H₂O), para microscopia de luz e laser confocal. Para microscopia eletrônica de transmissão foi utilizado o fixador (2,5% de glutaraldeído em tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7.2).

6.3. Microscopia de Luz (ML)

Após a realização da perfusão como descrito no item 5.2, as amostras de hemolinfa colhidas de 10 mosquitos foram colocadas, individualmente em lâmina, para secar a temperatura ambiente por 20-30 minutos. As células foram fixadas em metanol por 10 minutos e coradas com Giemsa, diluído a 1:9 em água destilada tamponada, por 10 a 15 minutos. Depois foram, rapidamente, lavadas com água destilada e montadas sob uma lamínula em Entellan. As células foram caracterizadas utilizando, como parâmetro, a morfologia. Para isso, foram visualizados de todos os campos no microscópio óptico de campo claro. Foram formados três grupos de 10 mosquitos para o estudo com esta metodologia.

6.4 Microscopia de contraste de interferência diferencial (DIC):

Para melhor caracterizar os diferentes tipos morfológicos de hemócitos em *Ae. aegypti*, através da Microscopia Óptica, a hemolinfa foi coletada através da perfusão de 40 mosquitos com meio Grace, em seguida foi e colocada em placas de cultivo MatTek 35mm (MatTek Corporation, Ashland, MA USA) que também continham meio Grace, onde os hemócitos foram observados vivos ao microscópio confocal Leica AOBS SPII. As imagens foram adquiridas em tempo real utilizando contraste diferencial.

6.5. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

A hemolinfa de 300 insetos, aproximadamente, foi coletada através de perfusão com fixador, como descrito no item 5.2, e colocadas diretamente em microtubos de plástico de 1,5ml contendo o mesmo fixador. Todo esse procedimento foi realizado a baixa temperatura (4°C). O pool de hemolinfa obtido foi centrifugado a 1.500 rpm por 10 minutos, em seguida o pellet foi resuspenso no mesmo fixador, onde foi deixado por 24 horas. As amostras foram lavadas 3X com tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7.2 e pós-fixadas com 1% tetróxido de ósmio e tampão fosfato 0,1M por 1 hora no escuro. Em seguida foram lavadas 3X no mesmo tampão, contrastadas em bloco com acetato de uranila 5% por 2 horas, lavadas novamente 3X em água destilada e desidratadas em séries crescentes de acetona para posterior infiltração e emblocamento em resina Epon 812 (Electron Microscopy Sciences). Cortes ultrafinos foram obtidos, através da ultramicrotomia, contrastados com acetato de uranila por 60 minutos e citrato de chumbo por 05 minutos, sendo analisados no microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM 109B.

6.6 Contagem diferencial:

Para contagem diferencial de hemócitos a hemolinfa foi coletada como descrito no item 5.2 e processada como descrito no item 5.3. A contagem diferencial foi realizada através do microscópio de luz, utilizando como parâmetros a morfologia das células. Foram analisados campos escolhidos aleatoriamente. Todos os experimentos foram feitos em triplicata.

6.7 Lectinas

Para reconhecer possíveis marcadores na superfície dos hemócitos, a hemolinfa de 50 mosquitos *Ae. Aegypti* foi retirada através da técnica de perfusão utilizando salina isotônica, como descrito no item 5.2, e colocada em microtubos de plástico de 1,5ml contendo o fixador (Paraformaldeído 2% em salina isotônica). O pool de hemolinfa obtido foi lavado 3X em PBS por 10 minutos, sendo centrifugado a 2.500 rpm. Após a retirada do sobrenadante, uma gota da solução com as células foi colocada em lamínula tratada com Poly-L-lisina, dentro do espaço delimitado com Imunopen, onde foi deixado 24h em câmara úmida a temperatura ambiente. A lamínula foi lavada 1X em PBS/ BSA 1% por 15 a 20 minutos e incubada com as 9 lectinas: BSI (*Bandeiraea simplicifolia*), ConA (*Canavalia ensiformis*), HPA (*Helix pomatia*), LCA (*Lens culinaris*), PNA (*Arachis hypogea*), UEA (*Ulex europeus*), WFA (*Wisteria Floribunda*), WGA (*Triticum vulgare*) e LPL (*Limulus polyphemus*) na concentração de 1:100 PBS/ TRITON X 100 0,2% por 1h no escuro. Em seguida a amostra foi lavada 3X em PBS e incubada com DAPI (corante nuclear) diluído 1:250 em PBS/ TRITON X 100 0,2% por 30 min, e para finalizar, foi lavada 3X em PBS. A lâmina foi montada em Mowiol (meio de montagem que não perde a fluorescência) e guardada em geladeira protegida da luz. Experimentos com lamínula controle possuindo material só fixado para cada lectina testada e o controle do açúcar da referida lectina na célula ou tecido foram feitos em paralelo. As amostras foram observadas ao microscópio confocal Zeiss SLM 510. As imagens foram adquiridas utilizando o laser 488 filtro para leitura BP 505 - 530 para FITC e leitura feita pela HBO para DAPI nas objetivas de 40X e 20X. As células que exibiram fluorescência após o tratamento foram consideradas marcadas.

6.8 Desafio imune: Partículas abióticas

Para a observação de fagocitose *in vivo*, partículas de látex acopladas a FITC (SIGMA) diluídas em salina isotônica na proporção de 1:20 foram inoculadas (5µl), com o auxílio de um microcapilar de vidro, no tórax de 50 fêmeas de *Ae. aegypti* (com idade de 4 dias após a emergência). Após 30 min da inoculação os hemócitos foram coletados com 5µl do fixador (Paraformaldeído 2% em salina isotônica) e colocados por 30 minutos em microtubos de 1,5ml contendo o mesmo fixador. O pool de hemolinfa obtido foi centrifugado em 2.500 rpm durante 10 minutos, em seguida lavado em salina isotônica 3X por 10 minutos. O pellet foi resuspenso em 100 µl de solução salina e posteriormente distribuído em lâmina com Poly-L-lisina, 10 µl em 10 poços marcados com imunopen. A lâmina foi deixada em câmara úmida durante 24hs para aderência das células, que foi confirmada após a observação no microscópio de luz, para dar início ao processamento de microscopia laser confocal.

A lâmina foi lavada 3X com salina isotônica por 5 minutos, incubada por 2h com 8µl de faloidina (que liga especificamente em actina) conjugada a Rodamina 1:15 em PBS/TRITON X 100 0,2%, lavada em PBS/BSA 1% /TRITON X 100 0,2% 3X por 5 minutos e incubada posteriormente com 8µl de corante nuclear DAPI diluído 1:250 em PBS/ TRITON X 100 0,2% por 30 min, para finalizar foi lavada rapidamente em PBS. A lâmina foi montada em Mowiol e guardada em geladeira, protegida da luz. As amostras foram observadas ao microscópio confocal Zeiss SLM 510, e as imagens foram adquiridas utilizando o laser 488 filtro para leitura BP 505 - 530 para FITC, a leitura foi feita pela HBO para DAPI, laser 633 e filtro LP 560 para rodamina.

Para a observação de fagocitose *in vitro*, a hemolinfa de 50 fêmeas de *Ae. aegypti* (com idade de 4 dias) foi retirada através da técnica de perfusão, como descrito no item 5.2, com meio de inseto Grace e adicionada 20µl de partículas de látex acopladas a FITC (SIGMA) diluídas 1:20 em meio Grace. Todo o material foi processado e visualizado como de rotina para microscopia laser confocal.

7 RESULTADOS

7.1 Caracterização morfológica dos hemócitos de *Aedes aegypti*

Em nossos estudos utilizando microscopia óptica e eletrônica de transmissão, foram identificados seis tipos morfológicos de hemócitos circulantes na hemolinfa de *Ae. aegypti*. São eles: prohemócitos, adipohemócitos, granulócitos, plasmatócitos, oenocitóides e trombocitóides.

Prohemócitos:

Os prohemócitos correspondem a 20% do total de hemócitos presentes na hemolinfa de *Ae. aegypti*, foram as menores células encontradas. Estas apresentam-se com perfil esférico medindo de 5-10µm de diâmetro, seu núcleo grande localizado no centro da célula ocupa quase todo espaço celular, restando ao citoplasma apenas uma pequena área ao seu redor (Figuras 4A e 7A). A cromatina encontra-se dispersa no núcleo e em algumas células o nucléolo é evidente. Poucas organelas podem ser vistas como o retículo endoplasmático rugoso (RER), os ribossomos livres e as mitocôndrias (Figura 5A).

Adipohemócitos:

Os adipohemócitos são células redondas ou ovais que medem aproximadamente 30-40µm de diâmetro. Eles são os mais abundantes tipos celulares presentes na hemolinfa e compreendem 29% do total dos hemócitos do *Ae. aegypti*. Os adipohemócitos observados neste estudo apresentam núcleo redondo (Figuras 4B e 7B) e citoplasma bastante característico com grandes vesículas lipídicas, mitocôndrias e poucos grânulos elétron-densos. Várias rosetas de glicogênio podem ser vistas distribuídas no citoplasma (Figura 5B).

Granulócitos:

Os granulócitos apresentam formato que varia de circular a oval com 8-15 μ m de diâmetro, os quais representam 16% do total de hemócitos presentes na hemolinfa de *Ae. aegypti*. A membrana plasmática é irregular, exibindo filopódios e pseudópodes na sua superfície (Figura 4C).

Fotomicrografias eletrônicas mostram que o núcleo destas células é lobado com ilhas de heterocromatina presente. Nenhum nucléolo proeminente foi observado. O citoplasma contém RER dilatado e mitocôndrias alongadas. Um processo endocítico pode ser claramente visualizado com a presença de numerosas vesículas. Também pode ser identificada a formação de polissomos e abundantes ribossomos. Grânulos elétron-densos, típicos deste tipo celular, são os mais proeminentes grânulos encontrados (Figura 6).

Através da observação por contraste diferencial (DIC), este tipo celular apresenta grânulos bastante densos de tamanhos variados (Figura 7C).

Plasmatócitos:

Os plasmatócitos representam 27% do total de células. Estas células são bastante polimórficas variando de arredondadas a alongadas com 6-25 μ m de diâmetro. A membrana plasmática possui superfície irregular, filopódios e pseudópodes (Figura 4D).

Ilhas de heterocromatina encontram-se distribuídas principalmente na periferia do núcleo. No citoplasma muitas mitocôndrias alongadas foram observadas (Figura 5C), além de RER bem desenvolvido, complexo de Golgi e vacúolos (Figura 5D). Retículo endoplasmático liso (REL) também pode ser observado nos pólos da célula.

Estas células, através da observação por DIC, apresentam superfície irregular formando processos citoplasmáticos (Figura 7 D).

Oenocitóides:

Oenocitóides medem aproximadamente 7-12 μ m de diâmetro possuem formato redondo com núcleo pequeno e excêntrico (Figura 4E), além de ilhas de heterocromatina condensada. A ultra-estrutura revela citoplasma homogêneo com muitas mitocôndrias e

ribossomos, abundante RER e pouco REL nos pólos da célula. Pequenos vacúolos citoplasmáticos estão presentes parcialmente ou completamente preenchidos com material elétron-denso (Figura 5G). Representam 7% do total de hemócitos.

Através da observação por DIC, podemos visualizar estas células possuindo superfície bastante homogênea com presença de grânulos (Figura 7E).

Trombocitóides:

São as mais raras células encontradas, geralmente apresentam forma piriforme, medem aproximadamente 30-35 μ m de diâmetro e representam 0,9% do total de hemócitos (Figuras 4F e 7F). Ultra-estruturalmente possuem área perinuclear evidente e citoplasma homogêneo com organelas pouco desenvolvidas. Poucas mitocôndrias, pequenos vacúolos e grânulos elétron-densos podem ser visualizados (Figura 5F). Algumas células possuem invaginações citoplasmáticas.

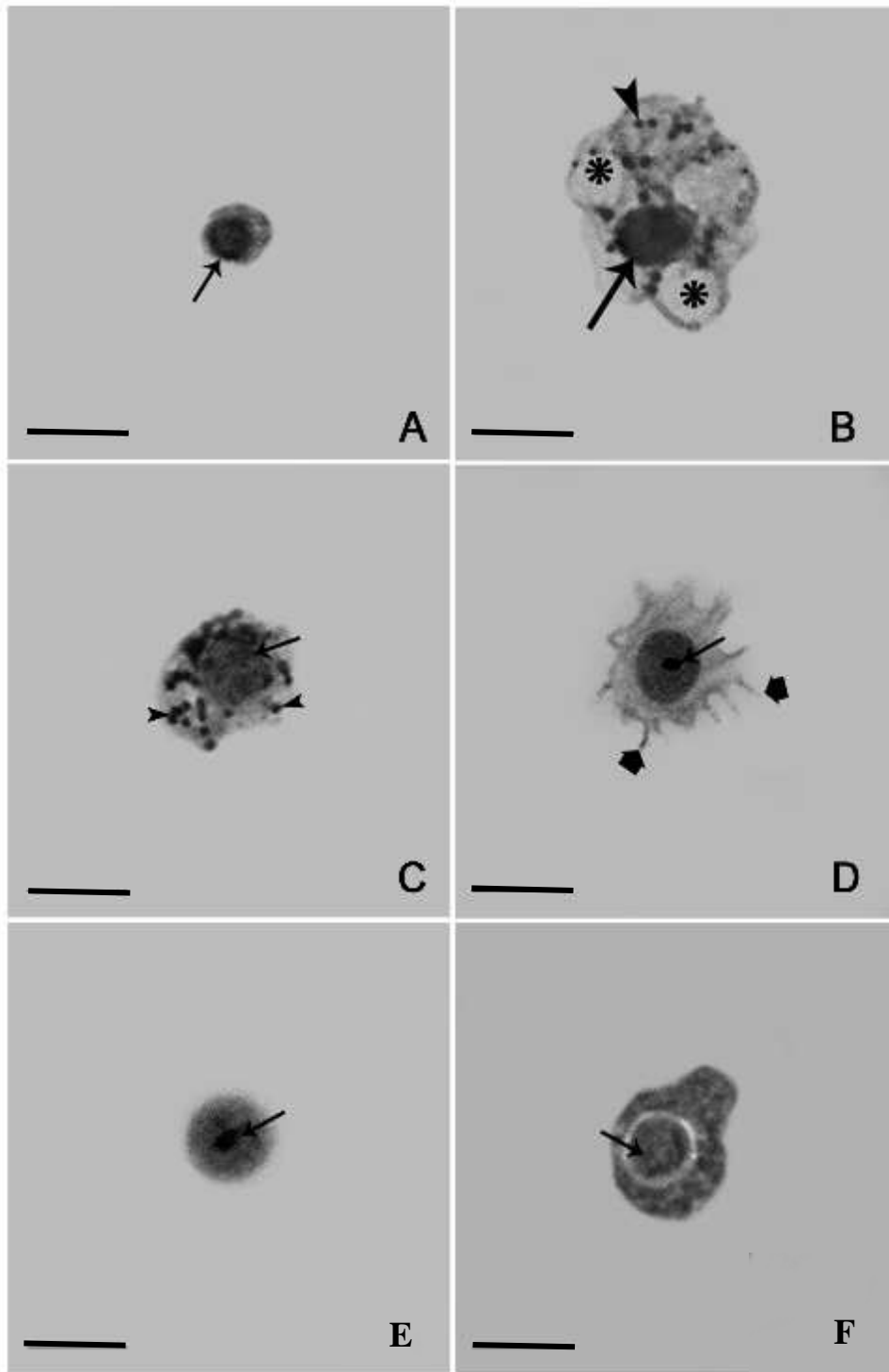


Figura 4 – Hemócitos de *Ae. aegypti* observados através da microscopia de luz dos.
Nota: **A.** Um prohemócito com núcleo volumoso (seta fina) e citoplasma escasso. **B.** Um adipohemócito exibindo um perfil irregular com núcleo excêntrico (seta fina) e muitas inclusões lipídicas no citoplasma (estrelas). Podemos visualizar grânulos no citoplasma (cabeça de seta). **C.** Um granulócito com citoplasma preenchido por grânulos elétron-densos (cabeça de seta) e núcleo volumoso (seta fina). **D.** Um plasmatócito exibindo núcleo localizado centralmente com nucléolo evidente (seta fina). Diversas projeções da membrana plasmática (seta grossa) podem ser visualizadas. **E.** Um oenocitóide com núcleo excêntrico (seta fina). **F.** Trombocitóide exibindo núcleo com área perinuclear presente (seta fina). Barras A, C, D, E = 10 μm ; B, F = 20 μm .

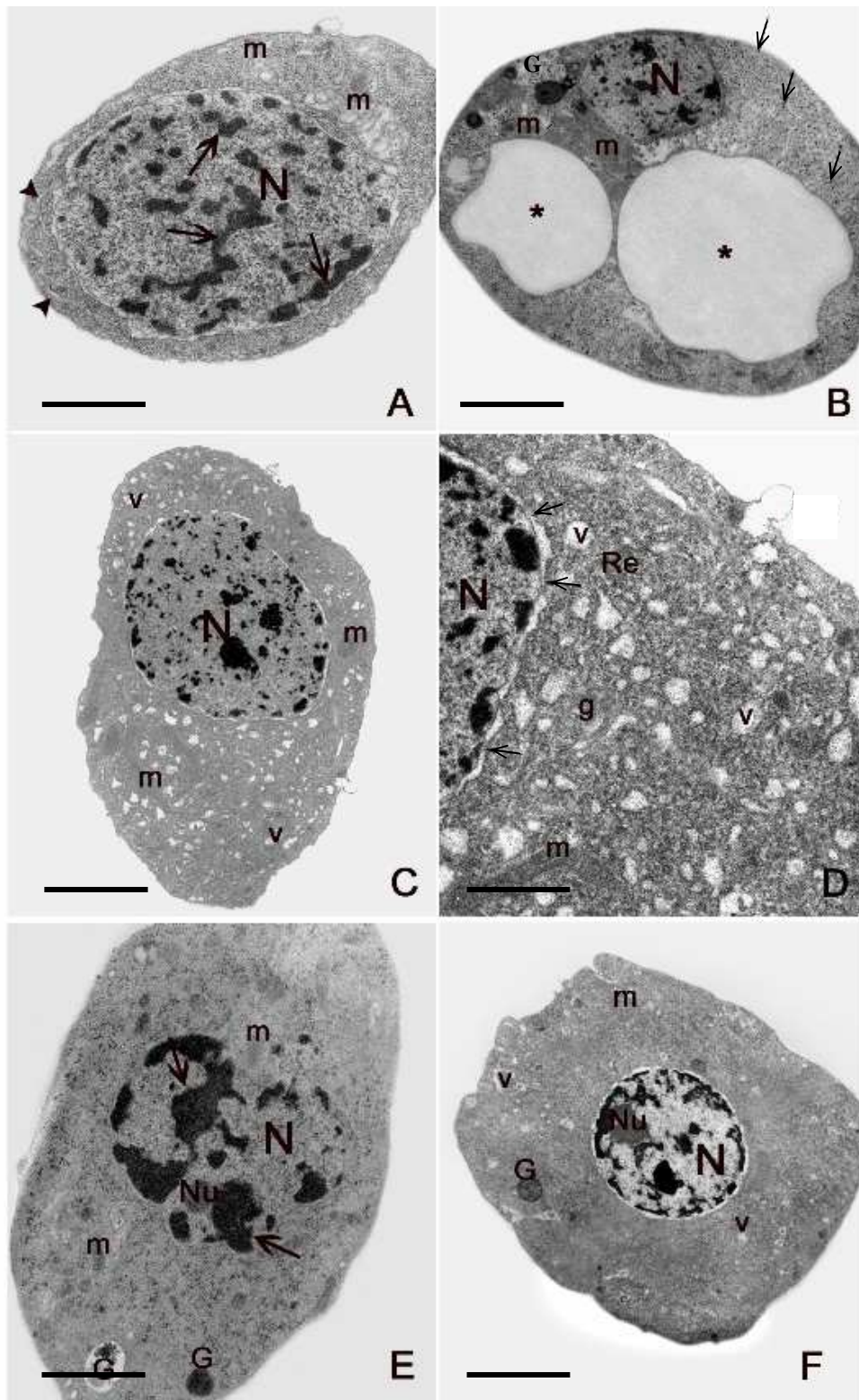


Figura 5 – Fotomicrografia eletrônica de transmissão dos hemócitos de *Ae. aegypti*.

Nota: **A. Prohemócito** exibindo perfil esférico com núcleo volumoso (N) e heterocromatina (setas). Fino citoplasma com poucas organelas. Note a presença de mitocôndrias (m) e REL (cabeça de seta). **B. Adipohemócito** com perfil oval exibindo núcleo largo (N). Observe o citoplasma com grandes vesículas lipídicas (estrelas), mitocôndrias (m), grânulos (G) e rosetas de glicogênio (seta fina). **C. Plasmatócito** exibindo núcleo (N), citoplasma com alongadas mitocôndrias (m) e vesículas (v). **D.** Aumento de um plasmatócito com citoplasma reticulado contendo núcleo (N), mitocôndrias (m), vesículas (v), RER (Re) e grânulos (g). Note que o poro nuclear (seta fina) está presente. **E.** Um **oenocitóide** exibindo núcleo (N) com heterocromatina (seta curta) e nucléolo (Nu). Mitocôndrias (m) e grânulos (G) estão presentes. **F. Trombocitóide** caracterizado por possuir um núcleo volumoso (N) com nucléolo evidente (Nu) e um citoplasma homogêneo com poucas organelas. O citoplasma contém mitocôndrias (m), vesículas (v) e grânulos (G). Barras A, D, E = 1µm; B, C = 1,5µm; F = 2µm.

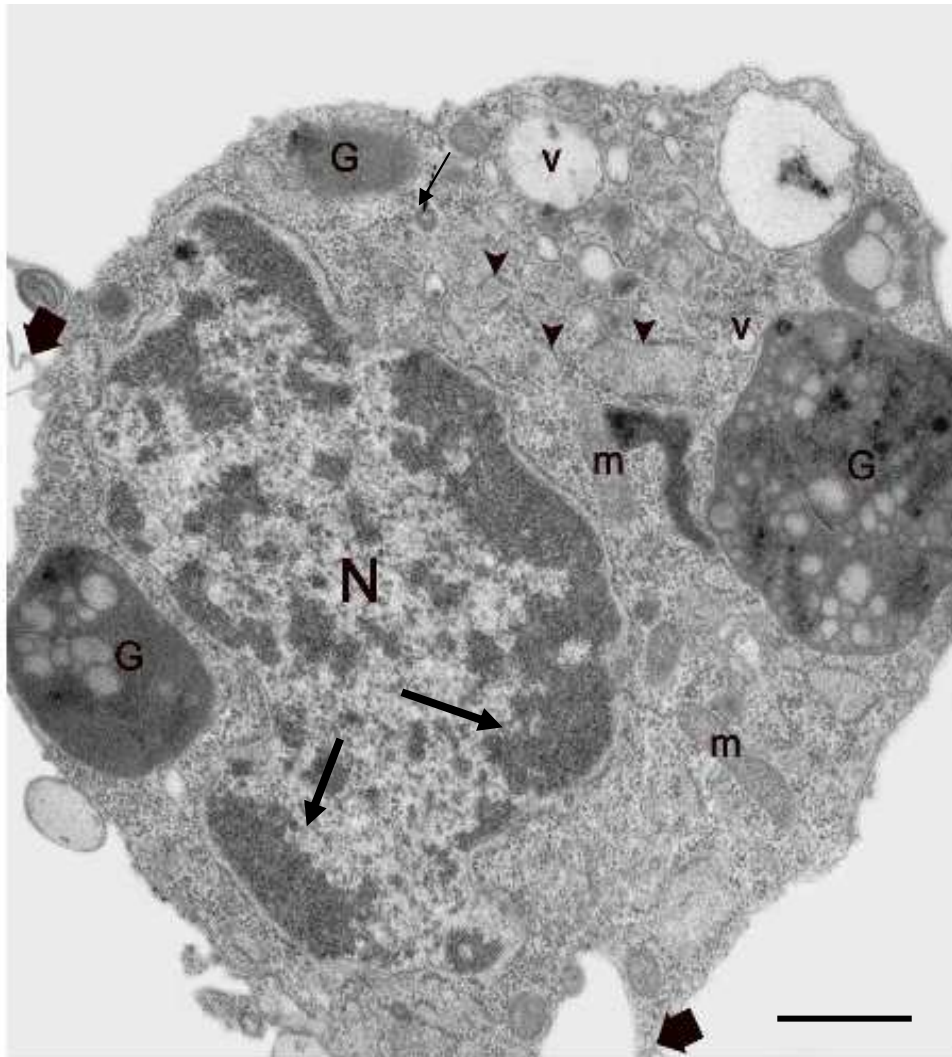


Figura 6 – Fotomicrografia de um granulócito.

Nota: Célula exibindo núcleo (N) com uma grande massa de heterocromatina (seta larga). O citoplasma contém numerosas mitocôndrias (m), RER e abundantes ribossomos (cabeça de seta) com formação de polissomos (seta fina). Condensação do grânulo com formação de grandes (G) e pequenas vesículas (v). Filopódios e pseudópodes também estão presentes (seta larga). Barra = 1 μ m

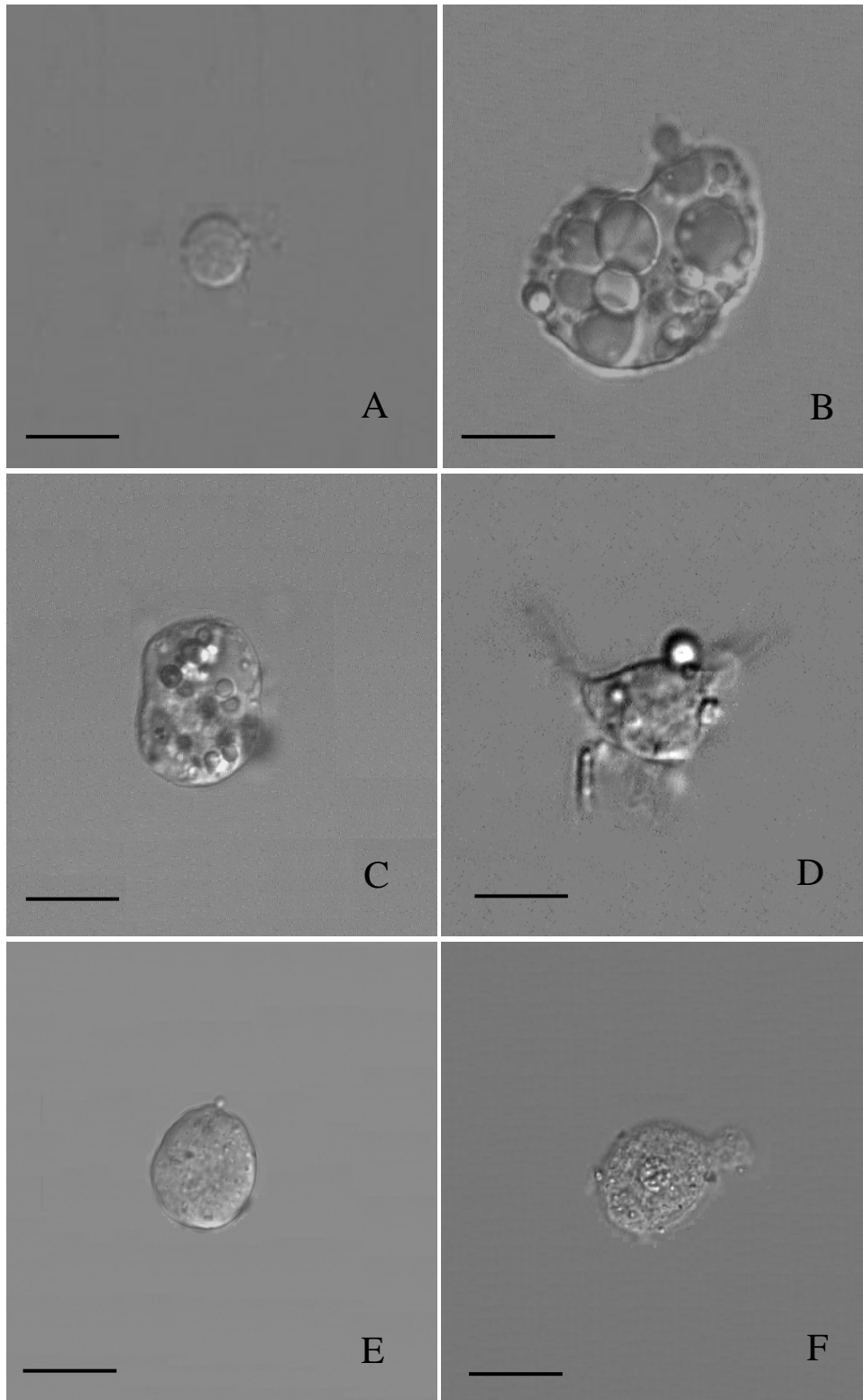


Figura 7 – Hemócitos de *Ae. aegypti* observados através da microscopia óptica de contraste de interferência diferencial (DIC).

Nota: **A.** Prohemócito. **B.** Adipohemócito. **C.** Granulócito. **D.** Plasmatócito. **E.** Oenocitóide. **F.** Trombocitóide. Barras A, C, D, E = 10 μ m; B, F = 20 μ m.

7.2 Desafio imune com partículas de látex

Para a identificação dos hemócitos responsáveis pela resposta imune contra partículas abióticas realizamos o desafio imune dos hemócitos de *Ae. aegypti* com partículas de látex *in vivo* e *in vitro*.

O granulócito foi o único tipo celular que realizou atividade fagocítica contra partículas de látex tanto *in vivo* quanto *in vitro*.

A resposta imune celular desencadeada 30 minutos após a inoculação *in vivo* das partículas de látex conjugadas a FITC em *Ae. aegypti* foi a fagocitose. Neste tempo já podemos observar através da microscopia laser confocal a fagocitose destas partículas por inúmeros granulócitos na hemolinfa (Figura 8). Com relação aos outros hemócitos não observamos nenhuma alteração morfológica significativa (dados não exibidos).

Estas células marcadas, com faloidina conjugada a rodamina, exibiram a delimitação do citoplasma, que estava completamente marcado (vermelho), o que define a distribuição dos filamentos de actina (Figura 8C). Durante o processo de fagocitose foi observado, através desta marcação, alteração morfológica destas células (Figura 8E). A marcação com faloidina e DAPI, corante nuclear (azul), claramente visualiza a posição do núcleo próximo às partículas de látex indicando que as mesmas foram fagocitadas como mostram as Figuras 8 (F e J).

Os resultados do experimento *in vitro* utilizando partículas abióticas reforçam os resultados obtidos *in vivo*, onde os mesmos tipos celulares (granulócitos) se mostraram envolvidos no processo de fagocitose (Figura 9).

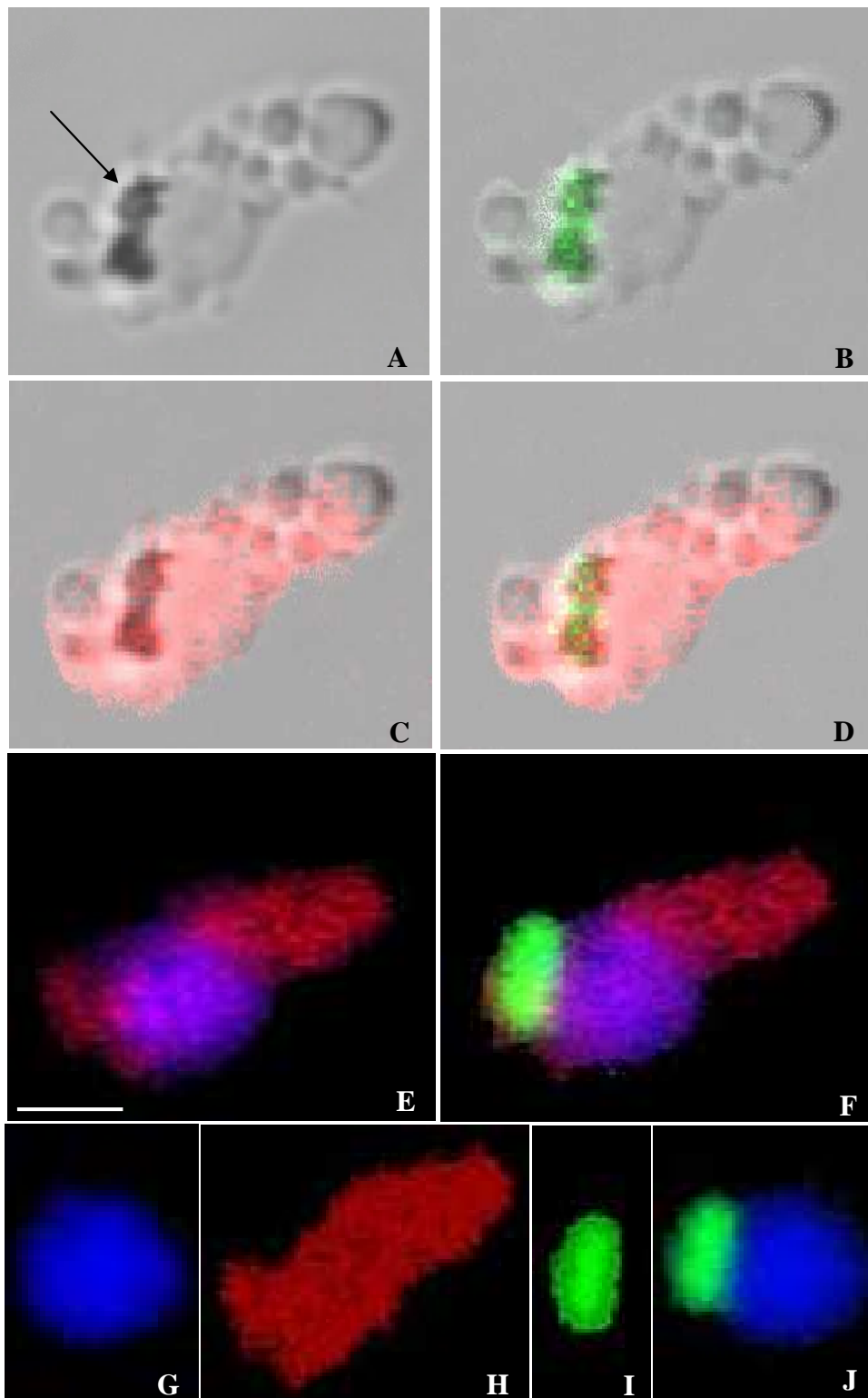


Figura 8 – Fagocitose *in vivo* de partículas de látex pelo granulócito de *Ae. aegypti*.
Nota: **A.** Imagem de DIC mostra a presença de várias partículas no interior do granulócito (seta). **B.** Microscópio óptico de fluorescência exibindo partículas de látex conjugadas a FITC. **C e D.** Imagem sobreposta do granulócito marcado com faloidina, marcador de actina (vermelho) e partículas de látex (verde). **E e F.** Imagem do confocal exibindo marcação com faloidina (vermelho), corante nuclear DAPI (azul) e partículas de látex (verde). Imagens do confocal das marcações: DAPI (**G**), Faloidina (**H**) e partículas de látex (**I e J**). Barra= 5 μ m

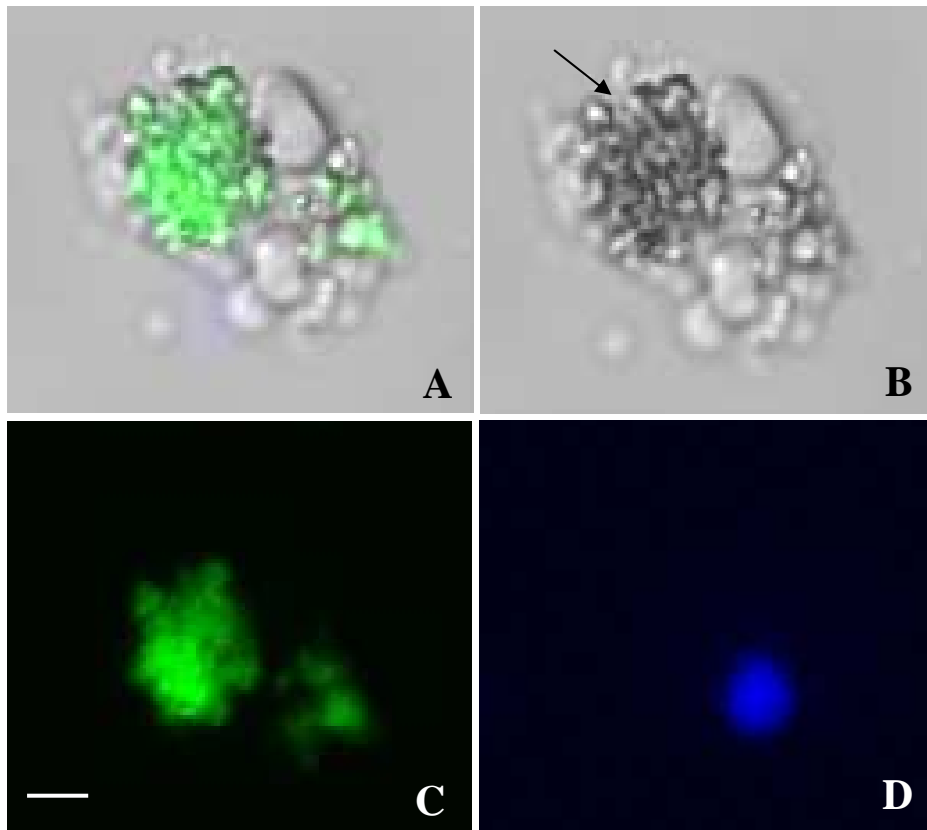


Figura 9 – Fagocitose *in vitro* de partículas de látex pelo granulócito de *Ae. aegypti*.

Nota: **A.** Imagem do granulócito exibindo partículas de látex no seu interior. **B.** Imagem de DIC mostrando a presença de várias partículas fagocitadas pelo granulócito (seta). **C.** Microscópio óptico de fluorescência mostrando as partículas de látex conjugadas a FITC. **D.** Imagem do confocal exibindo marcação do corante nuclear DAPI (azul). Barra= 5 μ m

7.3 Utilização do painel de lectinas

Na tabela 1 estão listadas todas as lectinas conjugadas a FITC que foram usadas para marcar hemócitos de *Ae. aegypti*. As lectinas BS1, ConA, HPA, LCA, PNA, UEA e WGA marcaram todos os hemócitos com variações na intensidade. A BS1, PNA e WGA foram as lectinas que exibiram padrões de marcação mais fortes seguidas da UEA, que exibiu um padrão moderado e ConA, HPA, LCA que marcaram fracamente as células. A WFA e LPL não marcaram nenhum hemócito de *Ae. aegypti*. Os prohemócitos, granulócitos e oenocitóides apresentaram o melhor padrão de marcação dentre os tipos celulares.

Tabela 1 - Sumário da marcação de Lectinas em *Ae. aegypti*.

| | Lectinas | Intensidade de marcação |
|------|---------------------------------|--------------------------------|
| BS1 | <i>Bandeiraea simplicifolia</i> | +++ |
| ConA | <i>Canavalia ensiformis</i> | + |
| HPA | <i>Helix pomatia</i> | + |
| LCA | <i>Lens culinaris</i> | + |
| PNA | <i>Arachis hypogaea</i> | +++ |
| UEA | <i>Ulex europaeus</i> | ++ |
| WFA | <i>Wisteria floribunda</i> | - |
| WGA | <i>Triticum vulgare</i> | +++ |
| LPL | <i>Limulus polyphemus</i> | - |

Intensidade de marcação: +++ forte, ++ moderada, + pouca, – nenhuma

8 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste estudo mostraram que na hemolinfa de fêmeas de *Ae. aegypti* existem seis tipos de hemócitos, que variam na morfologia e tamanho, são eles: prohemócitos, adipohemócitos, granulócitos, plasmatócitos, oenocitóides e trombocitóides. Estudando a hemolinfa de Dípteros de importância médica, através da microscopia óptica, inclusive de *Ae. aegypti*, Kaaya e Ratcliffe (1982) encontraram cinco tipos de hemócitos que foram descritos como prohemócitos, plasmatócitos, granulócitos, oenocitóides e adipohemócitos. Já Hillyer e Christensen (2002) e Hillyer et al. (2003a) observaram, através da microscopia óptica e microscopia eletrônica de transmissão, em *Ae. aegypti* e *Armigeres subalbatus*, respectivamente, apenas quatro tipos de hemócitos: granulócitos, oenocitóides, adipohemócitos e trombocitóides. Provavelmente, esta diferença no tipo morfológico encontrado por estes autores pode estar relacionada ao método de coleta de hemolinfa empregada pelos mesmos.

Brayner et al. (2005), utilizando o mesmo método de coleta de hemolinfa descrito em nossos estudos, encontraram na hemolinfa do *Culex quinquefasciatus* seis tipos diferentes de hemócitos, que foram classificados através da microscopia óptica e eletrônica em: prohemócitos, adipohemócitos, granulócitos, plasmatócitos, oenocitóides e esferulócitos. Em nossos resultados não encontramos a célula denominada como esferulócito, porém identificamos o trombocitóide evidenciando que existe uma variação celular entre os gêneros.

Em recente trabalho, Castillo et al., 2006 conduziram um estudo comparativo com hemócitos de *Anopheles gambiae* e *Ae. aegypti*, onde classificaram as células presentes na hemolinfa destas espécies como: granulócitos, oenocitóides e prohemócitos através da combinação de observações morfológicas no DIC e utilização de marcadores funcionais. É importante salientar que estes autores utilizaram um método diferente do empregado por Hillyer e Christensen (2002) e Hillyer et al. (2003a), por isso seus resultados não foram idênticos. Por outro lado, encontraram três dos seis tipos celulares identificados em nossos experimentos.

Nossos resultados demonstraram que os prohemócitos são células com características muito distintas de outros tipos celulares como seu pequeno tamanho, citoplasma pobre em organelas e a alta relação núcleo-citoplasma. Estas células foram descritas também por muitos autores em outras ordens de insetos (DA SILVA, et al., 2000; SILVA, et al., 2002; FALLEIROS et al., 2003; GIULIANINI et al., 2003; BRAYNER et al., 2005; CASTILLO et al., 2006). Alguns autores mencionam estas células como sendo totipotentes, podendo se diferenciar em qualquer tipo celular (LAVINE; STRAND, 2002).

O prohemócito identificado por Brayner et al., 2005 através da análise da hemolinfa do *C. quinquefasciatus* possui as mesmas características da célula descrita em nosso estudo. Entretanto, Hillyer e Christensen (2002) não relatam a presença dos prohemócitos em *Ae. aegypti*. Estes autores descrevem este tipo celular como pequenas estruturas biológicas esféricas como núcleos ou grandes mitocôndrias de adipohemócitos lisados. Neste estudo, nos observamos através da microscopia óptica e eletrônica que os prohemócitos são facilmente diferenciados das outras células.

No presente estudo, numerosos adipohemócitos foram observados, tendo como características principais seu tamanho e a presença de numerosas vesículas de lipídios, as quais facilitaram sua identificação. Segundo Hillyer e Christensen (2002) e Hillyer et al. (2003a) estas células têm como função o estoque de energia na forma de lipídio e glicogênio. Os adipohemócitos também foram identificados em insetos de várias ordens (HILLYER; CHRISTENSEN, 2002; HILLYER et al., 2003a; BRAYNER et al., 2005). Porém, Da Silva et al., 2000 através de ML dos hemócitos de *C. quinquefasciatus* não identificaram o adipohemócito, provavelmente devido ao processo de fixação e preparação da lâmina.

Alguns autores classificam os adipohemócitos como esferulócitos (OCHIAI et al., 1992). Os esferulócitos contêm grandes esférulos delimitados por membrana, formados por lamelas que se organizam de forma paralela, podendo ou não deformar a superfície celular (FALLEIROS et al., 2003; GIULIANINI et al., 2003). Esta descrição está de acordo com o trabalho de Brayner et al., 2006, que descrevem este mesmo tipo celular como presente em *C. quinquefasciatus*. A partir desta descrição e de nossas observações, podemos afirmar que os adipohemócitos de *Ae. aegypti* não possuem nenhuma similaridade com os esferulócitos presentes em outros mosquitos. Outros autores indicam que estas células são similares ao granulócito e às células do corpo gorduroso (KAAYA; RATCLIFFE, 1982; KAAYA et al., 1986). Porém, nós também não observamos nenhuma similaridade entre estes dois tipos celulares.

Giulianini et al. (2003), através de análises por MET de larvas de *Cetonischema aeruginosa* (Coleoptera, Scarabaeidae) encontraram oenocitóides com um grande número de grânulos densos localizados na periferia da célula, entretanto, em nossas análises feitas por MET, os oenocitóides exibem pequenos vacúolos no citoplasma preenchidos com material elétron-denso e outros completamente vazios. Esta mesma descrição foi relatada por Brayner et al. (2005) ao analisar hemócitos de *C. quinquefasciatus* e por Ribeiro e Brehélin (2006) através de observações em hemolinfa de Lepidópteros.

O presente trabalho mostrou que o citoplasma dos granulócitos possui diversos grânulos elétron-densos de diferentes tamanhos, além de retículo endoplasmático rugoso dilatado, abundantes ribossomos dispersos ou formando polissomos no citoplasma. Hillyer e Christensen. (2002) descreveram similarmente esse mesmo tipo celular em *Ae. aegypti*. Para Silva et al. (2002) e Giulianini et al. (2003), este tipo celular é facilmente identificado através do tamanho e características do citoplasma. Entretanto, para autores como Hypša e Grubhoffer (1997) o termo granulócito não é aceitável porque estas células estariam muito próximas dos plasmatócitos.

Em relação aos plasmatócitos, estas células apresentam morfologia variada. Elas podem ser fusiformes, ovais ou completamente irregulares devido à presença de expansões citoplasmáticas. Muitos autores descrevem dois tipos de plasmatócitos, granular e agranular (HYPŠA; GRUBHOFFER, 1997), outros descrevem estas células como granulócitos (HILLYER, CHRISTENSEN, 2002; HILLYER et al., 2003a). Entretanto, nossos estudos mostram que os granulócitos descritos acima são diferentes dos plasmatócitos em muitos aspectos.

Os plasmatócitos possuem um citoplasma bastante reticular com poucos ou sem a presença de grânulos, RER bem desenvolvido, complexo de golgi e alguns vacúolos, estas descrições estão de acordo com as observações feitas por Da Silva et al., 2000 e Brayner et al., 2005. Desta forma, nossos resultados não são concordantes com os achados de Hypša e Grubhoffer (1997). Segundo Ling et al., 2005, estas células são originárias de uma mesma linhagem celular, que ao longo do seu desenvolvimento vem se especializando em tipos morfológicos distintos.

Raros trombocitóides foram encontrados na hemolinfa de *Ae. aegypti*. Eles possuem citoplasma homogêneo e são pobres em organelas como os oenocitóides. Estes resultados são similares aos de Hillyer e Christensen (2002) e Hillyer et al., 2003a. Enquanto que, Kaaya e Ratcliffe (1982) observaram trombocitóides em diversos dípteros com exceção do *Ae. aegypti* e *C. quinquefasciatus*. Esses autores descreveram que os trombocitóides apresentavam diversos processos citoplasmáticos e aderiam à superfície da lâmina como típicos plasmatócitos.

Quando se trata de estudar as células circulantes na hemolinfa de insetos, não existe uma técnica específica utilizada para determinar com exatidão os diferentes tipos celulares. Portanto, existem controvérsias na classificação dos tipos de hemócitos presentes nos insetos, sendo assim diferentes técnicas devem ser empregadas em conjunto para minimizar esta polêmica.

A maioria dos estudos com hemócitos de mosquitos tem trabalhado exclusivamente com microscopia de luz e eletrônica de transmissão (ANDREADIS, HALL, 1976; FOLEY, 1978; KAAAYA, RATCLIFFE, 1982; DRIF, BREHELIN, 1983). Desta forma, nosso trabalho, além de identificar os hemócitos de *Ae. aegypti* através da ML e MET, também descreve os mesmos seis tipos celulares através do DIC e identifica algumas moléculas expressas na superfície dos hemócitos através da marcação com lectinas conjugadas a FITC. Os resultados obtidos neste estudo ampliam os achados de Hillyer e Christensen (2002) que utilizando ML e MET para análise de hemócitos de *Ae. aegypti* classificaram quatro tipos celulares, enquanto que Castillo et al. (2006) classificaram apenas três tipos, como discutido anteriormente. Acreditamos que a relevância dos nossos resultados está correlacionada com o método empregado.

A fagocitose é uma resposta imune inata mediada por receptor em vertebrados e invertebrados (KUTZ, 2002; HART et al., 2004). É um importante mecanismo de defesa contra infecções causadas por microrganismos patogênicos e efetiva para eliminação de células apoptóticas geradas durante o desenvolvimento (HART et al., 2004; ZHOU et al., 2004). Plasmatócitos e granulócitos de insetos são as células mais envolvidas no processo de fagocitose (GIULIANINI et al., 2003; LING et al., 2003). Outros hemócitos como oenocitóides também podem fagocitar células bacterianas (GIULIANINI et al., 2003).

Hillyer et al. (2003a) estudando a fagocitose e melanização mediada por hemócitos em *Armigeres subalbatus* mostraram que os granulócitos e oenocitóides foram os principais fagócitos envolvidos nesta resposta. Resultados similares foram obtidos em *Ae. aegypti* infectado com bactérias e esporozoítos de *Plasmodium* (HILLYER et al., 2003b). Entretanto, Da Silva et al. (2000) examinando a hemolinfa de *C. quinquefasciatus* infectado com *Cândida albicans* descreveram a fagocitose deste fungo por plasmatócitos.

Em nossos experimentos *in vivo* e *in vitro*, onde colocamos partículas de látex acopladas a um marcador fluorescente, em contato com hemócitos de *Ae. aegypti*, observamos o processo de fagocitose realizado apenas pelos granulócitos.

Em insetos, como Lepidópteros, os granulócitos são os fagócitos profissionais, os plasmatócitos estão envolvidos na formação da cápsula, os oenocitóides são fonte de fenoloxidase, os prohemócitos são as células tronco e os esferulócitos originam os componentes cuticulares (LANOT et al., 2001). Giulianini et al., (2003) demonstraram que os granulócitos e oenocitóides foram os únicos hemócitos envolvidos na fagocitose de partículas de látex por *Cetonischema aeruginosa*. Esta função de fagocitose pelos granulócitos é relatada

ainda por diversos autores em diferentes ordens de insetos (*Galleria mellonella* TOJO et al., 2000; *Manduca sexta* NARDI et al., 2001; *Spodoptera littoralis* COSTA et al., 2005).

O papel dos plasmatócitos na fagocitose é muito controverso enquanto que para alguns autores eles são fagócitos profissionais (TOJO et al., 2000; LING, YU, 2006), para outros como por exemplo Costa et al. (2005) os plasmatócitos não têm esta capacidade. De acordo com Ling e Yu (2006) os plasmatócitos estão envolvidos na fagocitose de partículas de látex em *Manduca sexta* e os granulócitos foram os únicos que fagocitaram células mortas. Em nossos experimentos não encontramos nenhuma atividade fagocítica dos plasmatócitos contra as partículas abióticas.

A citoquímica de enzimas e o uso de lectinas têm sido utilizados por muitos autores na identificação dos hemócitos (HILLYER, CHRISTENSEN, 2002; HILLYER et al., 2003a; CASTILLO et al., 2006). A produção de anticorpos específicos, além da utilização de marcadores para os hemócitos podem tornar possível a separação dos diferentes tipos celulares (WILLOTT et al., 1995; GARDINER, STRAND, 1999). Apesar do uso de anticorpos monoclonais para identificar os hemócitos de insetos ser bastante promissor, não existe ainda um anticorpo específico para identificar cada tipo celular (LING et al., 2003).

Dentre as lectinas utilizadas em nossos experimentos, algumas foram previamente utilizadas para classificar hemócitos em várias espécies de insetos (HILLYER, CHRISTENSEN, 2002; HILLYER, et al., 2003a; CASTILLO et al., 2006). Nossos resultados confirmam que os hemócitos circulantes de *Ae. aegypti* expressam resíduos de carboidratos que se ligam as lectinas de uma maneira heterogênea. É interessante notar que os resultados demonstram uma variedade de padrões de marcação para cada lectina testada.

Das nove lectinas utilizadas em nossos experimentos, apenas ConA, HPA, PNA e WGA tinham sido utilizadas anteriormente por outros autores em hemócitos de mosquitos. Hillyer e Christensen (2002) realizaram uma caracterização dos hemócitos de *Ae. aegypti* através da morfologia, marcação com lectinas, atividade enzimática e imunocitoquímica. Estes autores utilizaram as lectinas ConA (*Conavalina ensiformis*), HPA (*Helix pomatia*), PNA (*Arachis hypogaea*), WGA (*Triticum vulgare*), GNL (*Galanthus nivalis*), SBA (*Soybean agglutinin*) e PWM (*Pokeweed*) e as únicas que marcaram os granulócitos, oenocitóides, adipohemócitos e trombocitóides foram a HPA, WGA e GNL com diferenças nos padrões de marcação. Por outro lado, Hillyer et al. (2003a) utilizaram aquelas mesmas sete lectinas para caracterizar os hemócitos de *Armigeres subalbatus*, onde obtiveram os mesmos resultados marcando apenas HPA, GNL e WGA. Enquanto que Castillo et al. (2006) utilizaram apenas

três lectinas (PNA, WGA e SBA) para caracterizar os hemócitos de *Ae. aegypti* e *Anopheles gambiae* e obtiveram resultado positivo em todas as marcações.

Em nossos estudos obtivemos sucesso na marcação dos hemócitos de *Ae. aegypti* com as seguintes lectinas BSI, ConA, HPA, LCA, PNA, UEA e WGA, apenas WFA e LPL não marcaram.

9 CONCLUSÕES

1 - A hemolinfa de fêmeas de *Ae. aegypti*, obtida através de perfusão no tórax e analisada tanto por microscopia ótica quanto eletrônica de transmissão apresenta prohemócitos, adipohemócitos, granulócitos, plasmatócitos, oenocitóides e trombocitóides;

2 - Em *Ae. aegypti*, apenas o granulócito apresentou atividade fagocítica contra partículas de látex tanto *in vivo* quanto *in vitro*;

3 - As lectinas BS1 (*Bandeiraea simplicifolia*), ConA (*Canavalia ensiformis*), HPA (*Helix pomatia*), LCA (*Lens culinaris*), PNA (*Arachis hypogea*), UEA (*Ulex europeus*) e WGA (*Triticum vulgare*), analisadas por microscopia laser confocal, marcaram a superfície dos hemócitos de *Ae. aegypti* com variação no padrão de marcação;

4 - As lectinas que foram utilizadas no reconhecimento de resíduos de carboidratos não servem como parâmetro para classificação dos hemócitos de *Ae. aegypti*.

10 REFERÊNCIAS

ANDREADIS, T. G.; HALL, D. W. *Neoplectana carpocapsae*: encapsulation in *Aedes aegypti* and changes in host hemocytes and hemolymph proteins. **Exp. parasitol.**, New York, v. 39, p. 252–261, 1976.

ANGGRAENI, T.; RATCLIFFE, N. A. Studies on cell-cell cooperation during phagocytosis by purified haemocytes populations of the wax moth, *Galleria melonella*. **J. insect hysiol.**, Oxford, v. 37, p. 453-460, 1991.

ANDREU, D.; RIVAS, L. Animal antimicrobial peptides: an overview. **Biopolymers**, New York, v. 47, n. 6, p. 415 – 433, 1998.

ARNOLD, J. W.; HINKS, C. F. Haemopoiesis in Lepidoptera I: the multiplication of circulating haemocytes. **Can. j. zool.**, Ottawa, v. 54, p.1003-1012, 1976.

BARRACCO, M. A. **Estudo dos hemócitos e hemolinfa de *Trichosia pubescens* (Diptera: Sciaridae)**. 1982. Tese (Doutorado em Biologia) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 1982.

BARTH, R. **Entomologia Geral**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 1972.

BILLINGSLEY, P. F.; RUDIN, W. The role of the mosquito peritrophic membrane in bloodmeal digestion and infectivity of *Plasmodium* species. **J. parasitol.**, Lawrence, v. 78, p. 430-440, 1992.

BOGDAN, C.; ROLLINGHOFF, M.; DIEFENBACH, A. Reative oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. **Curr. opin. immunol.**, Philadelphia, v. 12, p. 64-76, 2000.

BOMAN, H. G. Gene-Encided Peptide Antibiotics and the Concept of Innate immunity: An Update Review. **Scand. j. immunol.**, Oslo, v. 48, p. 15-25, 1998.

BOMBONATO, M. T.; GREGÓRIO, E. A. Estudo morfológico e quantitativo dos hemócitos em larvas de *Diatraea sacharalis* (Fabricius) (Lepidoptera, Pyralidae). **Rev. bras. zool.**, São Paulo, v.12, n. 4, p. 867-879, 1995.

BORROR, D. J.; TRIPLEHORN, C. A.; JOHNSON, N. F. **An introduction to the study of insects**. 6 ed. New York: Harcodrt Brace Jobanovich Colleg Publishers, 1989.

BOUCIAS, D. G.; PENDLAND, J. C. The galactose binding lectin from the beet armyworm, *Spodoptera exigua*: distribution and site of synthesis. **Insect biochem. mol. biol.**, Oxford, v. 23, n. 2, p. 233-242, 1993.

BRADLEY, R. S. et al. Grasshopper haemagglutinin: Immunochemical localization in haemocytes and investigation of opsonic properties. **J. insect physiol.**, Oxford, v. 35, n. 5, p. 353-361, 1989.

BRASIL. Secretaria de Vigilância a Saúde. **Dengue – Distribuição de casos confirmados, por Unidade Federada. 1980 – 2003**. Disponível em: <http://dtr2001.saude.gov.br/svs/epi/situacao_doenças/dengue.pdf>. Acesso em: 10 out. 2006.

BRAYNER, F. A. et al. Ultrastructural characterization of the hemocytes of *Culex quinquefasciatus* (DIPTERA: Culicidae). **Micron.**, Oxford, v. 36, p. 359-367, 2005.

BRAYNER, F. A. et al. A. Hemocyte population and ultrastructural changes during the immune response of *Culex quinquefasciatus* (DIPTERA: Culicidae) to microfilariae of *Wuchereria bancrofti*. **Med. vet. entomol.**, Oxford, v. 21, n. 1, p. 112-20, 2007.

BULET, P. et al. Antimicrobial peptides in insects; structure and function. **Dev. comp. immunol.**, Elmsford, v. 23, p. 329-344, 1999.

CASTILHO, J. C.; ROBERTSON, A. E.; STRAND, M. R. Characterization of hemocytes from the mosquitoes *Anopheles gambiae* and *Aedes aegypti*. **Insect biochem. mol. biol.**, Oxford, v. 36, p. 891-903, 2006.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **World distribution of dengue viruses and their mosquito vector, *Aedes aegypti*, in 2005**. Atlanta, 2007. Disponível em: <http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/dengue/map-distribution-2005.htm>

CHAPMAN, R. F. Circulatory system blood and immune systems. In: _____. **The insects: structure and function**. 4. ed. Cambridge: Cambridge University, 1998. cap. 5, p. 94-131.

CHAPMAN, R. F. The circulatory system. In: _____. **The insects: structure and function**. London: Hodber and stonghton, 1983. cap. 32, p. 781-795.

CHEN, C.; ROWLEY, A. F.; RATCLIFFE, N. A. Detection, purification by immunoaffinity chromatography and properties of β -1,3-glucan-specific lectins from the sera of several insect species. **Insect biochem. mol. biol.**, Oxford, v. 28, p. 721-731, 1998.

COCIANCICH, S. et al. The inducible antibacterial peptides of insect. **Parasitol. today.**, Cambridge, v. 10, p. 132-139, 1994.

CONSOLI, R. A. G. B.; OLIVEIRA, R. L. **Principais Mosquitos de Importância Sanitária no Brasil**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 1994.

COSTA, S. C. P. et al. Modes of phagocytosis of Gram-positive and Gram-negative bacteria by *Spodoptera littoralis* granular haemocytes. **J. insect physiol.**, Oxford, v. 51, p. 39-46, 2005.

DA SILVA, J. B. et al. Immune defense mechanisms of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) against *Candida albicans* infection. **J. invertbr. pathol.**, New York, v. 76, p. 257-262, 2000.

DEAN, P. et al. Hyperphagocytic haemocytes in *Manduca sexta*. **J. insect physiol.**, Oxford, v. 50, p.1027-1036, 2004.

DRIF, L.; BREHÉLIN, M. Purification and characterization of an agglutinin from hemolymph of *Locusta migratoria* (Orthoptera). **Insect biochem. mol. biol.**, Oxford, v. 24, n. 3, p. 283-289, 1994.

DUNN, P. E. Biochemical aspects of insect immunity. **Ann. rev. entomol.**, Palo Alto, v. 31, p. 321-339, 1986.

FALLEIROS, A. M. F., BOMBONATO, M. T. S., GREGÓRIO, E. A. Ultrastructural and quantitative studies of hemocytes in the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae). **Braz. arch. biol. technol.**, Curitiba, v. 46, p. 287-294, 2003.

FORATTINI, O. P. **Entomologia Médica**. São Paulo: Faculdade de Higiene e Saúde Pública, 1962. v. 1.

FOLEY, D. A. Innate cellular defense by mosquito hemocytes. **Curr. top. comp. pathobiol.**, New York, v. 4, p. 114-143, 1978.

GADELHA, D. P.; TODA, A. T. Biology and behavior of *Aedes aegypti*. **Rev. bras. malariol. doenças trop.**, Brasília, v. 37, p. 29-36, 1985.

GALLO, D. et al. Aparelho Circulatório. In: _____. **Manual de Entomologia Agrícola**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1978. p. 94-96.

GARDINER, E. M. M.; STRAND, M.R. Monoclonal antibodies bind distinct classes of hemocytes in the moth *Pseudoplusia includens*. **J. insect physiol.**, Oxford, v. 45, p. 113-126, 1999.

GIULIANINI, P. G. et al. Ultrastructure of the hemocytes of *Cetonischema aeruginosa* larvae (Coleoptera, Scarabeidae): involvement of both granulocytes and oenocytoids in vivo phagocytosis. **Tissue cell.**, Edinburgh, v. 35, p. 243-251, 2003.

GUBLER, D. J. Dengue and dengue hemorrhagic fever. **Clin. microbiol. rev.**, Washington, v. 11, p. 480-496, 1998.

GUBLER, D. J. Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. **Trends microbiol.**, Cambridge, v. 10, n. 2, p. 100-103, 2002.

GULLAN, P. J.; CRANSTON, P. S. External anatomy, In: _____. **The insects an outline of Entomology**. 2. ed. Oxford: Blackwell Publishing, 1994. p. 21-50.

GUPTA, A. P. Cellular elements in hemolymph. In: KERKUT, G. A.; GILBERT, L. I. (Ed.). **Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology**. Oxford: Pergamon, 1985. v. 3, p. 401-451.

HALSTEAD, S. B. Epidemiology of dengue and dengue hemorrhagic fever In: GUBLER D. J.; KUNO G. (Ed.). **Dengue and dengue hemorrhagic fever**. New York: CAB International, 1997. p. 23-44.

HART, S. P.; SMITH, J. R.; DRANSFIELD, I. Phagocytosis of opsonized apoptotic cells: roles for 'old-fashioned' receptors for antibody and complement. **Clin. exp. immunol.**, London, v. 1. 35, p. 181-185, 2004.

HILLYER, J. F.; CHRISTENSEN, B. M. Characterization of hemocytes from the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. **Histochem cell biol.**, Berlin, v. 117, p. 431-440, 2002.

HILLYER, J. F.; SCHMIDT, S. L.; CHRISTENSEN, B. M. Hemocyte-mediated phagocytosis and melanization in the mosquito *Armigeres subalbatus* following immune challenge by bacteria. **Cell tissue res.**, Berlin, v. 313, p. 117-127, 2003a.

HILLYER, J. F.; SCHMIDT, S. L.; CHRISTENSEN, B. M. Rapid Phagocytosis and melanization of bacteria and *Plasmodium* sporozoites by hemocytes of the mosquitoes *Aedes aegypti*. **J. parasitol.**, Lawrence, v. 89, p. 62-69, 2003b.

HYPŠA, V.; GRUBHOFFER, L. Two hemocyte populations in *Triatoma infestans*: ultrastructural and lectin-binding characterization. **Folia parasitol.**, Praha, v. 44, p. 62-70, 1997.

HOFFMAN, J. A. Appareil circulatoire et circulation. In: GRASSE, P. P. **Traité de Zoologiê**. Paris: Mansson et Cie, 1976. v. 8, p. 1-19.

HOFFMAN, J. A. et al. Postembryonic development and differentiation: hemopoietic tissues and their functions in some insects. In: GUPTA, A. P. **Insect Hemocytes**. Cambridge: Cambridge University Press, 1979. p. 29-66

HULTMARK, D. et al. Insect immunity: Purification and properties of three inducible bactericidal proteins from haemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia*. **Eur. j. biochem.**, Berlin, v. 106, p. 16, 1980.

JONES, J. C. Pathways and pitfalls in the classification and study of insect hemocytes. In: GUPTA, A. P. **Insect Hemocytes**. Cambridge: Cambridge University, 1979. p. 279-300.

KAAYA, G. P.; RATCLIFFE, N. A.; ALEMU, P. Cellular and humoral defenses of *Glossina*: reactions against bacteria, trypanosomes and experimental implants. **J. med. entomol.**, Honolulu, v. 23, p. 30-43, 1986.

KAAYA, G. P.; RATCLIFFE, N. A. Comparative study of hemocytes and associated cells of some medically important dipterans. **J. morphol.**, Philadelphia, v. 173, p. 351-365, 1982.

KANOST, M. R. Serine proteinase inhibitors in arthropod immunity. **Dev. comp. imunol.**, Elmsford, v. 23, p. 291-301, 1999.

- KARP, R. D. Inducible humoral immunity in insects: does an antibody-like response exist in invertebrates? **Res. immunol.**, Paris, v. 141, p. 923-926, 1990.
- KAWASAKI, K.; KUBO, T.; NATORI, S. Presence of the Periplaneta lectin-related protein family in the American cockroach *Periplaneta americana*. **Insect biochem. mol. biol.**, Oxford, v. 26, n. 4, p. 355-364, 1996.
- KURTZ, J. Phagocytosis by invertebrate hemocytes: causes of individual variation in *Panorpa vulgaris* Scorpionflies. **Microsc. res. tech.**, New York, v. 57, p. 456-468, 2002.
- LANOT, R. et al. Postembryonic hematopoiesis in *Drosophila*. **Dev. biol.**, Orlando, v. 230, p. 243-257, 2001.
- LAVINE, M. D.; STRAND, M. R. Insect hemocytes and their role in immunity. **Insect biochem. mol. biol.**, Orford, v. 32, p. 1295-1309, 2002.
- LEHANE, M. J. Peritrophic matrix structure and function. **Ann. rev. entomol.**, Palo Alto, v. 42, p. 525-550, 1997.
- LING, E. et al. Classification of larval circulating hemocytes of the silkworm, *Bombyx mori*, by acridine orange and propidium iodide staining. **Histochem cell biol.**, Berlin, v. 120, p. 505-511, 2003.
- LING, E. et al. Hemocytes differentiation in the hematopoietic organs of the silkworm, *Bombyx mori*: prohemocytes have the function of phagocytosis. **Cell tissue res.**, Berlin, v. 320, n. 3, p. 535-534, 2005.
- LING, E.; YU, X. Q. Hemocytes from the tobacco hornworm *Manduca sexta* have distinct functions in phagocytosis of foreign particles and self dead cells. **Dev. comp. immunol.**, Elmsford, v. 30, p. 301-309, 2006.
- LOWENBERGER, C. Innate immune response of *Aedes aegypti*. **Insect biochem. mol. biol.**, Orford, v. 31, p. 219-229, 2001.
- MACKENZIE, J. S.; GUBLER, D. J.; PETERSEN, L. R.; Emerging flavivirus: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue viruses. **Nat. med.**, New York, v. 10, p. 98 - 109, 2004.
-

MARMARAS, V. J. et al. Defense mechanisms in insects: certain integumental proteins and tyrosinase are responsible for nonselfrecognition and immobilization of *Escherichia coli* in the cuticle of developing *Ceratitidis capitata*. **Arch insect biochem physiol**, New York, v. 23, p. 169-180, 1993.

McGREEVY, P. B. et al. The lethal effects of cibarial and pharyngeal armatures of mosquitoes on microfilariae. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, London, v. 4, p. 316-368, 1978.

MENEZES, H.; MOSIG, J. M. A. O sistema imune dos insetos e o controle de algumas doenças parasitárias humanas. **Interciência**, Rio de Janeiro, v. 24, n. 3, 1999.

MEYER-FERNANDES J.R.; LANZ-MENDOZA, H.; GONDIM, K.C. Ectonucleotide diphosphohydrolase activities in hemocytes of larval *Manduca sexta*. **Arch. biochem. biophys.**, New York, v. 328, n. 1, p. 152-159, 2000.

MILLER, N.; LEHANE, M. J. Peritrophic membranes, cell surface molecules and parasite tropisms within arthropod vectors, **Parasitol. today.**, Cambridge, v. 9 p. 1-30, 1993.

NAPPI, A. J., CHRISTENSEN, B. M. Hemocyte cell surface changes in *Aedes aegypti* in response to microfilariae of *Dirofilaria immitis*. **J. parasitol.**, Lawrence, v. 74, p. 875-879, 1986.

NAPPI, A. J.; STOLOFFOLANO JR, J. G. Distribution of haemocytes in larvae of *Musca autumnalis* and possible chemotaxis during parasitization. **J. insect physiol.**, Oxford, v. 18, p. 169-179, 1972.

NARDI, J. B.; GAO, C.; KANOST, M. R. The extracellular matrix protein lacunin is expressed by a subset of hemocytes involved in basal lamina morphogenesis. **J. insect physiol.**, Oxford, v. 47, p. 997-1006, 2001.

NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. 11 ed. São Paulo: Atheneu, 2005.

OCHIAI, M.; NIKI, T.; ASHIDA, M; Immunocytochemical localization of beta-1,3-glucan recognition protein in the silkworm, *Bombyx mori*. **Cell tissue res.**, Berlin, v. 268, n. 3, p. 731-7, 1992.

PETERS, W. **Peritrophic membranes: Zoophysiology**, Berlin: Springer-Verlag, 1992. v. 30.

PIMENTA, P. F. P. et al. A novel role for the peritrophic matrix in protecting *Leishmania* from the hydrolytic activities of the sand fly midgut. **Parasitology**, London, v. 115, 359-369, 1997.

RATCLIFFE, N.A. et al. Invertebrate immunity: basic concepts and recent advances. **Int. rev. cytol.**, New York, v. 97, p. 183-279, 1985.

REY, L. **Parasitologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

RIBEIRO, C., BREHELIN, M. Insect haemocytes: what type of cell is what? **J. insect physiol.**, Oxford, v. 52, p. 417-429, 2006.

RICHARDS A. G., RICHARDS P. A. The peritrophic membrane of insects. **Annu. rev. entomol.**, Palo Alto, v. 22, p. 219-40, 1977.

ROBERTS, L. Mosquitoes and Disease. **Science**, Washington, v. 298, n. 5591, p. 82-83, 2002.

ROMOSER, W. S. **The science of entomology**. New York: Macmillan Publishing, 1973. p.72-85.

ROWLEY, A. F.; RATCLIFFE, N. A. Insects. In: _____. **Invertebrate blood cells**. New York: Academic, 1981. v. 2, p. 421-490.

RUPPERT, E. E.; BARNES, R. D. **Zoologia de Invertebrados**. 6. ed. São Paulo: Roca, 1996.

RUSSO, J.; BREHÉLIN, M.; CARTON, Y. Haemocyte changes in resistant and susceptible strains of *D. melanogaster* caused by virulent and avirulent strains of the parasitic wasp *Leptopilina boulardi*. **J. insect physiol.**, Oxford, v. 47, p.167- 172, 2001.

SHAPIRO, M. Techniques for total and differential hemocyte counts and blood volume, and mitotic index determinations. In: GUPTA, A. P. (Ed.). **Insect emocytes**. Cambridge: Cambridge University Press, 1979. p. 539-548.

SCHATZMAYR, H. Dengue Situation in Brazil by Year 2000. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, Rio de Janeiro, v. 95, suppl. 1, p. 179-181, 2000.

SHAHABUDDIN, M. et al. Transmission blocking activity of a chitinase inhibitor and activation of malarial parasite chitinase by mosquito protease. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, Washington, v. 90 p. 4266-4270, 1993.

SILVA, I. G. Metodologia de criação de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae), em condições laboratoriais. **Rev. goiana med.**, Goiânia, n. 39, p. 23-26, 1994.

SILVA, C.; GARY, B. D.; RAU, M. E. Interaction of hemocytes and prophenoloxidase system of fifth instar nymphs of *Acheta domesticus* with bacteria. **Dev. comp. immunol.**, Elmsford, v. 24, p. 367-379, 2000.

SILVA, C. C. Aspectos do sistema imunológico dos insetos. **Biotecnologia cienc. Desenvolv.**, Brasília, v. 24, p. 68-72, 2002.

SILVA, J. E. B.; BOLELI, I.; SIMÕES, Z. L. P. Hemocytes types and total and differential counts in unparasitized and parasitized *Anastrepha obliqua* (Diptera, Tephritidae) larvae. **Braz. j. biol.**, São Carlos, v. 62, n. 4A, p. 689-699, 2002.

STRAND, M. R.; PECH, L. L. Immunological basis for compatibility in parasitoid-host relationships. **Annu. rev. entomol.**, Palo Alto, v. 40, p.31-56, 1995.

TAUIL, P. L. Aspectos críticos do controle do dengue no Brasil. **Cad. saúde pública**, Rio de Janeiro, n. 18, p. 867-71, 2002.

TAUIL, P. L. Urbanização e ecologia do dengue. **Cad. saúde pública**, Rio de Janeiro, n. 17 (Supl), p. 99-102, 2001.

TEIXEIRA, M. G.; BARRETO M. L.; GUERRA, Z. Epidemiologia e medidas de prevenção do dengue. **Inf. Epidemiol. Sus**, Brasília, n. 8, p. 5-33, 1999.

TOJO, S. et al. Involvement of both granular cells and plasmatocytes in phagocytic reactions in the greater wax moth, *Galleria mellonella*. **J. insect physiol.**, Oxford, v. 46, p. 1129–1135, 2000.

VANETTI, F. Sistema Circulatório. In: _____. **Entomologia Geral**. Viçosa: Coopasul, 1978. cap. 6, p.212-225.

VASCONCELOS, P. F. C. Febre Amarela. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v. 36, n. 2, p. 275-293, 2003.

VASS, E., NAPPI, A. J. Fruit fly immunity. **BioEssays**, Cambridge, v. 51, p. 529-535, 2001.

ZHOU Z, MANGAHAS PM, YU X. The genetics of hiding the corpse: engulfment and degradation of apoptotic cells in *C. elegans* and *D. melanogaster*. **Curr. top. dev. biol**, New York, v. 63:, p. 91-143, 2004.

WASSERTHAL, L. T. Antagonism between haemolymph transport and tracheal ventilation in an insect wing (*Attacus atlas* L.) **J. comp. physiol**, Berlin, v. 147, p. 27-40, 1982.

WHEELER, M. B., STUART, G., HAPNER, K. D. Agglutinin mediated opsonization of fungal blastospores in *Melanoplus differentialis* (Insecta). **J. insect physiol.**, Oxford, v. 39, n. 6, p. 477-483, 1993.

WILLOTT, E. et al. Immunochemical identification of insect populations monoclonal antibodies distinguish four major hemocyte types in *Manduca sexta*. **Eur. j. cell biol.**, Stuttgart, v. 65, p. 417-423, 1994.

WILLOTT, E. et al. Monoclonal antibodies against *Manduca sexta* hemocytes bind *Aedes aegypti* hemocytes: characterization of six monoclonal antibodies that bind hemocytes from both species. **Dev. comp. immunol.**, Elmsford, v. 19, n. 6, p. 451-461, 1995.

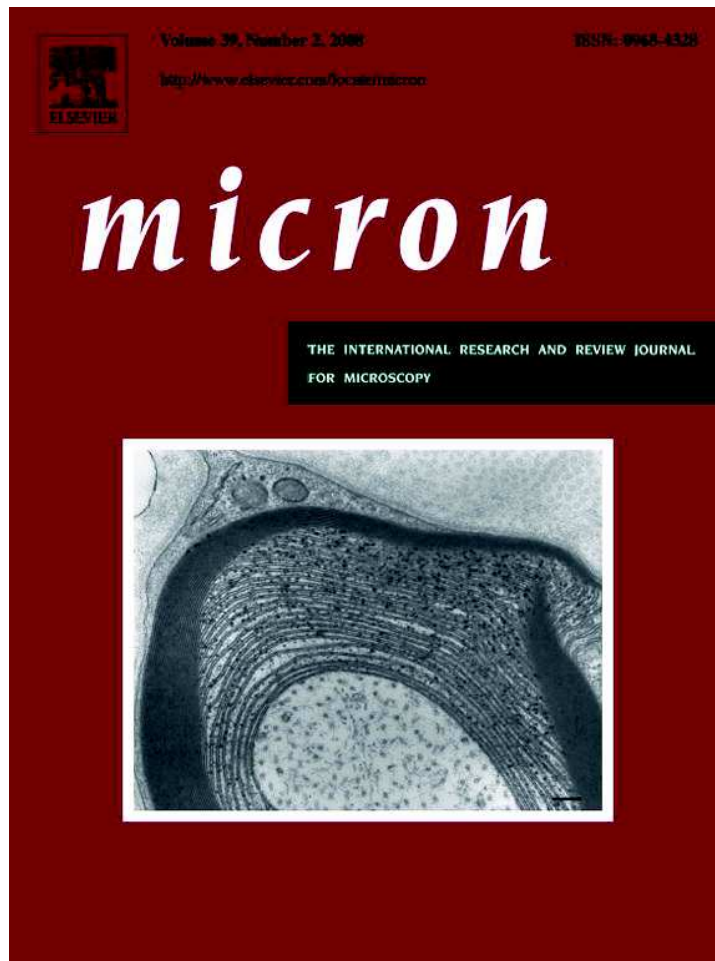
WILSON, R.; CHEN, C.; RATCLIFFE, N. A. Innate immunity in insects . the role of multiple endogenous serum lectin in the recognition of foreign invaders in the cockroach *Blaberus discoidalis*. **J. immunol.**, Baltimore, v. 162, p.1590-1596, 1999.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control**. 2nd ed. Geneva, 1997.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Preparing and Implementing a National Plan to Eliminate Lymphatic Filariasis: A guideline for Programme Managers**. Geneva, 2000. (Technical reports series WHO/CDS/CPE/CEE/2000.15).

APÊNDICE A

Provided for non-commercial research and education use.
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article was published in an Elsevier journal. The attached copy is furnished to the author for non-commercial research and education use, including for instruction at the author's institution, sharing with colleagues and providing to institution administration.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



ELSEVIER

Available online at www.sciencedirect.com

Micron 39 (2008) 184–189

www.elsevier.com/locate/micron

Hemocytes ultrastructure of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)

H.C.R. Araújo*, M.G.S. Cavalcanti, S.S. Santos, L.C. Alves, F.A. Brayner

Departamento de Biologia Celular e Ultra-estrutura, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (FIOCRUZ) and Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco, Brazil

Received 26 October 2006; received in revised form 5 January 2007; accepted 5 January 2007

Abstract

Mosquitoes have an efficient defence system against infection. Insect blood cells (hemocytes) play an essential role in defense against parasites and other pathogenic organisms that infect insects. We have identified by light and transmission electron microscopy six hemocytes cell types from the hemolymph of *Aedes aegypti*. They were: prohemocytes (20%), adipohemocytes (29%), granulocytes (16%), plasmacytes (27%), oenocytoids (7%) and thrombocytoids (0.9%). The prohemocytes were the smallest hemocytes found in the hemolymph. Its cytoplasm occupies only a narrow area around the nucleus. The adipohemocytes were the most abundant cell type presented. These hemocytes exhibited a large lipid like vesicle and mitochondria. In electron micrographs, the granulocytes showed cytoplasm containing dilated rough endoplasmic reticulum (RER) and a round or elongated mitochondria. Electron-dense granules with a proteinaceous material were also present. The plasmacytes were polymorphic and exhibited plasma membrane with irregular processes, filopodia and pseudopodia. Ultrastructural investigation revealed that the reticular cytoplasm showed a well-developed RER, a Golgi and vacuoles. Oenocytoids showed homogeneous cytoplasm with many mitochondria and ribosomes are scattered throughout the cytoplasm, abundant RER and a small smooth endoplasmic reticulum (SER) present at the cell poles. Thrombocytoids were very fragile and few in number. Similar characteristics were found in oenocytoids, possessing a homogeneous cytoplasm with poorly developed organelles, few mitochondria and granules.

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: *Aedes aegypti*; Electron microscopy; Hemocytes; Light microscopy; Morphology

1. Introduction

Mosquitoes are the most medically important arthropod vectors of disease (Beerntsen et al., 2000). Mosquitoes vector are able to transmit several pathogens, such as viral, protozoan and metazoan parasites on which cause great morbidity and mortality all over the world (Roberts, 2002).

Taking into consideration the diversity of environments in which insects live, pathogens they are exposed to and success colonizing essentially every niche on Earth, part of their overall success must be attributed to their ability to withstand invasion by microorganisms (Lowenberger, 2001; Silva et al., 2002; Dunn, 1986).

In contrast to vertebrates, the insect immune system lacks specific immunoglobulins and immunological long-term

memory (Niere et al., 1999). They possess efficient innate immune systems comprising both cellular and humoral elements (Vass and Nappi, 2001).

Humoral defenses include inducible antimicrobial peptides (Lowenberger, 2001; Vizioli et al., 2001; Meister et al., 2000), reactive oxygen or nitrogen intermediates (Kumar et al., 2003; Vass and Nappi, 2001), and complex enzymatic cascades that regulate coagulation or melanization of hemolymph (Lavine and Strand, 2002; Muta and Iwanaga, 1996). Cellular defenses include phagocytosis, nodulation and encapsulation of potential pathogens by hemocytes (Schmidt et al., 2001; Niere et al., 1999).

Dividing the insect immune system into cellular and humoral responses is somewhat arbitrary, mainly because many humoral factors affect hemocyte function and they constitute an important source of humoral molecules (Lavine and Strand, 2002).

The circulation of hemocytes population represents an important tool to understand host–parasite interactions (Nappi and Christensen, 1989; Christensen et al., 1989; Da Silva et al., 2000). The number and type of the host hemocytes are two of

* Corresponding author at: Departamento de Biologia Celular e Ultra-estrutura, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (FIOCRUZ), Av. Moraes Rego s/n, Campus da UFPE, CEP 50670-420 Recife, Pernambuco, Brazil. Tel.: +55 81 21012643; fax: +55 81 34532449.

E-mail address: helena@cpqam.fiocruz.br (H.C.R. Araújo).

the key factors required for a successful immune reaction (Russo et al., 2001). Insects produce several types of hemocytes that are traditionally identified using morphological, histochemical and functional characteristics (Gupta, 1985).

The most common types of hemocytes reported in the literature are prohemocytes, granulocytes, plasmatocytes, adipohemocytes and oenocytoids. These five hemocytes types have also been described Diptera species (Hernández et al., 1999; Da Silva et al., 2000; Hillyer and Christensen, 2002; Hillyer et al., 2003; Brayner et al., 2005).

Aedes aegypti is the natural vector of yellow fever and dengue fever, two of the most important mosquito-transmitted viral diseases (WHO, 1999; Roberts, 2002). Light microscopic studies have attempted to characterize the hemocyte populations in *A. aegypti* without reaching a consensus (Hillyer and Christensen, 2002). Understanding the mechanisms underlying vector competence will probably allow the development of new technologies in reducing or eliminating transmission of diseases (Beatty, 2000).

In the present study, we describe distinct morphological types of hemocytes of *A. aegypti* using electron microscopy. We have also quantified, through differential counts, the types of hemocytes found in the hemolymph.

2. Materials and methods

2.1. Insects

Laboratory strain of *A. aegypti* (Recife strain) was used throughout this study. Adults were maintained in cages (30 cm × 30 cm × 30 cm) at room temperature (27 ± 3 °C) with $85 \pm 10\%$ relative humidity and fed with 10% (w/v) sucrose solution.

2.2. Hemocytes characterization

For light microscopy (LM), adult insects were washed in PBS and placed on ice (1–2 min) for immobilization. The hemolymph of 10 insects (4-day old) was obtained by perfusing the thorax with anticoagulant II solution (Mead et al., 1986), bled directly on to a glass slide and allowed to dry in natural air conditions for 20–30 min. Cells were fixed in methanol for 10 min. After natural room temperature of the fixative, hemocytes were stained with Giemsa (diluted 1:9 in buffered distilled water) for 10–15 min and slides were rapidly washed with buffered distilled water (Brayner et al., 2005). After room temperature the slides were dehydrated in ethanol and mounted in Entellan.

For transmission electron microscopy (TEM), hemolymph of at least 300 insects (4-day old) was collected from a punctured thorax perfused directly with a fixer solution at 4 °C, in 4% glutaraldehyde in 0.2 M cacodylate buffer, pH 7.2, overnight (Hypša and Grubhoffer, 1997). The hemolymph obtained was pooled and centrifuged at 500 g for 5 min. The pellet was re-suspended and re-fixed in the same fixer solution, overnight. The samples were washed in 5% sucrose solution in 0.2 M cacodylate buffer, pH 7.2 and post-fixed with osmium

tetroxide in cacodylate buffer for 1 h. After dehydration in graded acetone series samples were embedded in EMBED 812/ Araldite (Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, PA).

3. Results

Six morphological types of the circulating cells were recognized in the hemolymph of adult *A. aegypti*. They were: prohemocytes, adipohemocytes, granulocytes, plasmatocytes, oenocytoids and thrombocytoids.

3.1. Prohemocytes

Prohemocytes were the smallest cells found in the hemolymph, displaying a spherical profile of 5–10 μm in diameter, representing 20% of the total hemocyte population.

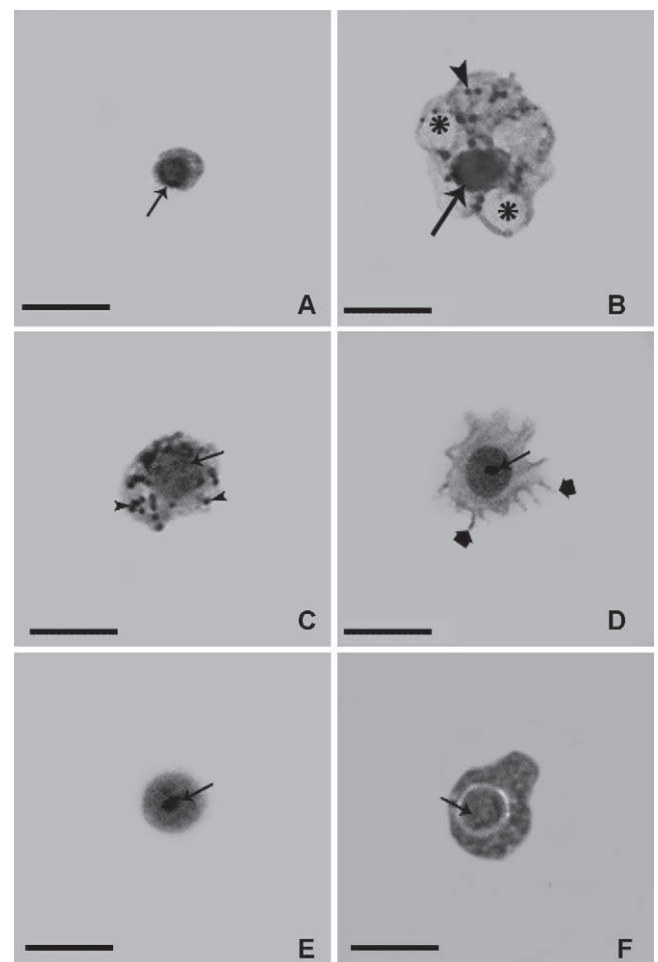


Fig. 1. (A–F) Light microscopy of *Aedes aegypti* hemocytes. (A) A prohemocyte with a large nucleus (thin arrow) and a thin cytoplasmic. (B) An adipohemocyte showing an irregular cell profile and several large lipid droplets in the cytoplasm (stars). Electron-dense granules (arrowhead) and nucleus (thin arrows) are present. (C) A granulocyte filled with the typical granules in the cytoplasm (arrowheads) and large nucleus (thin arrow). (D) A plasmatocyte exhibiting a central nucleus with nucleolus (thin arrow). Phylopodium process (short arrow) is shown. (E) An oenocytoid with a round eccentric nucleus (thin arrow). (F) Thrombocytoids showing nucleus with the perinuclear area (thin arrow). Bars A, C, D, E = 10 μm; B, F = 20 μm.

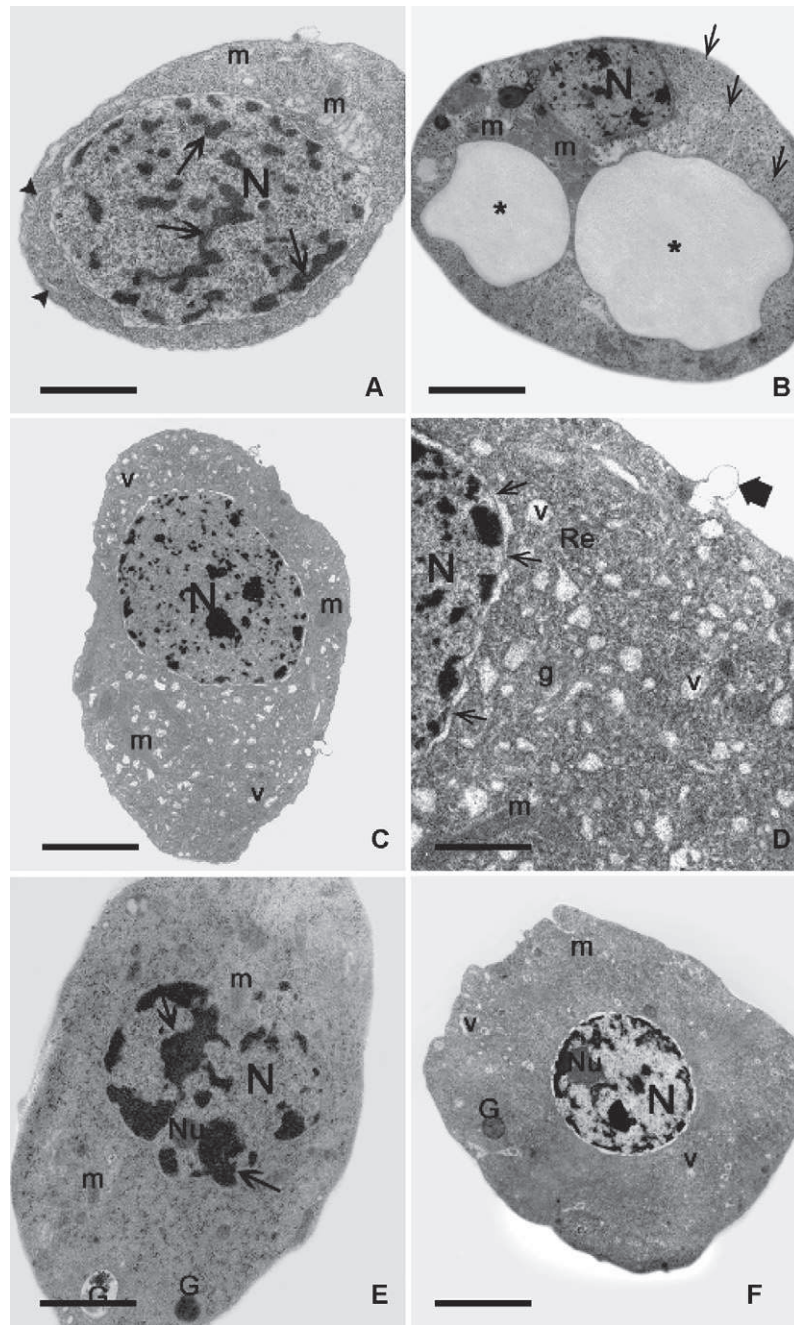


Fig. 2. (A–F) Electron micrographs of *A. aegypti* hemocytes. (A) Prohemocytes displaying spherical profiles with a large central nucleus (N), lumps of heterochromatin (arrows) is shown. Thin cytoplasm with few organelles. Note mitochondria (m) and SER isles (arrowheads) are also indicated. (B) Adipohemocytes with oval profile showing large nucleus (N). Observe cytoplasm with several large lipid droplets (stars), mitochondria (m) and many glycogen particles (thin arrow). (C) Plasmatocyte showing a nucleus (N), within the cytoplasm several elongated and round mitochondria (m) and vesicles (v) are present. (D) Higher magnification of plasmatocyte within reticular cytoplasm containing nucleus (N), mitochondria (m), vesicles (v), RER (Re), granules (g) and coated vesicles (large short arrows) in the cytoplasm. Note that nucleus pores (thin arrow) are present. (E) An oenocytoid showing a nucleus (N) with clumps of heterochromatin (short arrows) and nucleolus (Nu). Mitochondria (m) and granules (G) are also present. (F) Thrombocytoids characterized by having a large nucleus with nucleolus (Nu), a homogeneous cytoplasm with few organelles. The cytoplasm can contain mitochondria (m), vesicles (v) and granules (G). Bars A, D, E = 1 μm ; B, C = 1.5 μm ; F = 2 μm .

The large and centrally located nucleus almost fills the entire cell, so that the cytoplasm occupies only a narrow area around the nucleus (Fig. 1A). The chromatin is scattered, and in some cells the presence of nucleoli is evident. Only a few organelles could be seen with a conspicuous rough endoplasmic reticulum (RER), free ribosomes and mitochondria (Fig. 2A).

3.2. Adipohemocytes

Adipohemocytes were round or oval cells measuring 30–40 μm in diameter. These cells were the most abundant cell type, comprising 29% of hemocyte population. The adipohemocytes observed in this study, presented a round nucleus

(Fig. 1B). Inside the cytoplasm, several large lipid vesicles and mitochondria were observed. Few and scattered electron-dense granules were sometimes present. The remaining cytoplasm was covered with glycogen particles (Fig. 2B).

3.3. Granulocytes

Granulocytes presented a circular to fusiform profile 8–15 μm in diameter, representing 16% of the total hemocyte population. The plasma membrane was irregular displaying pseudopodia and filopodia in its surface (Fig. 1C). In electron micrographs, these hemocytes showed the lobated nucleus with heterochromatin present. No prominent nucleolus was found. The cytoplasm contained dilated RER, round or elongated mitochondria. A clear endocytic process with the presence of numerous (coated vesicles and coated pits or pinocytotic vesicle) was present. It could also be identified the formation of polysomes and abundant ribosomes. The electron-dense granules were the most prominent granules found. They represented the typical granules of this cell type (Fig. 3).

3.4. Plasmatocytes

The plasmatocytes represented 27% of the total hemocyte population. These cells varied from spindle-shaped to round cells, 6–25 μm in diameter. The plasma membrane exhibited irregular processes, filopodia and pseudopodia (Fig. 1D). The chromatin was finely distributed but some heterochromatin clumps were present. Within the cytoplasm several elongated and round mitochondria were observed (Fig. 2C). The reticular cytoplasm showed well-developed RER, Golgi and vacuoles.

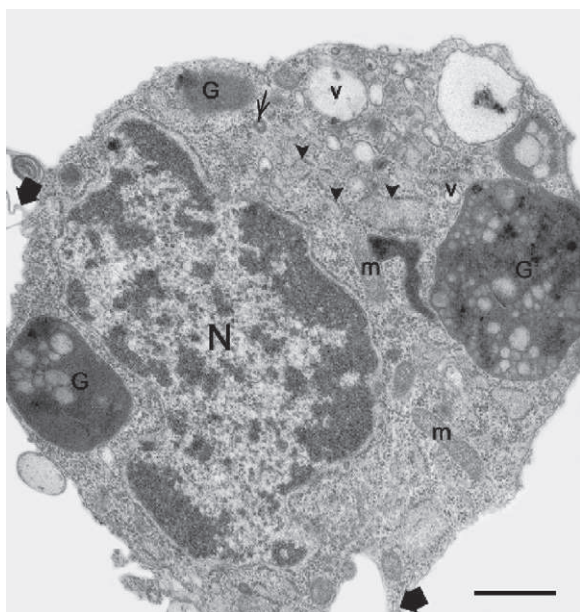


Fig. 3. A granulocyte showing a nucleus (N) with large mass of heterochromatin. The cytoplasm contains numerous mitochondria (m), sparse RER and abundant ribosomes (arrowheads) with formation of polysomes (thin arrow). Condensation of the granule with production vesicles (v) and granules (G) are indicated. Filopodia are present (large short arrows). Bar = 1 μm .

Patches of smooth endoplasmic reticulum SER were also present at the cell poles (Fig. 2D).

3.5. Oenocytoids

Oenocytoids ranged 7–12 μm diameter and presented a round shape, with small and eccentric nucleus (Figs. 1E) with chromatin showing lumps of condensation. The ultrastructure revealed a homogeneous cytoplasm with many mitochondria and ribosomes scattered throughout the cytoplasm, abundant RER and few SER presented at the cell poles. Some cytoplasmic short vacuoles were present, filled with a heterogeneous electron-dense material and others completely empty (Fig. 2E). They represented 7% of the total hemocytes population.

3.6. Thrombocytoids

Thrombocytoids were rare among the others cells, presenting large irregular shaped cells measuring approximately 30–35 μm in diameter, representing 0,9% of the total hemocyte population (Fig. 1F). These cells were similar to oenocytoids in possessing a homogeneous cytoplasm with poorly developed organelles, few mitochondria and granules. Some short vacuoles were present and few possess cytoplasmic invaginations (Fig. 2F).

4. Discussion

A. aegypti adult mosquitoes possess six different types of hemocytes in hemolymph, which vary considerably in their morphology and size, and are named: prohemocytes, adipohemocytes, granulocytes, plasmatocytes, oenocytoids, and thrombocytoids.

Using a LM analysis, Kaaya and Ratcliffe (1982) used different morphological types of hemocytes from several medical important dipterans, including the *A. aegypti*, but did not identify the hemocyte recognized here as the thrombocytoids. On the other hand, Hillyer and Christensen (2002) and Hillyer et al. (2003) described only four morphological cell types in *A. aegypti* and *Armigeres subalbatus*, natural vectors of virus dengue and filarial nematodes, respectively: granulocytes, oenocytoids, adipohemocytes and thrombocytoids by DIC, LM and TEM. Recently, Brayner et al. (2005) in light and electron microscopic studies suggested the presence of six distinct hemocytes types in *Culex quinquefasciatus* classified into prohemocytes, adipohemocytes, granulocytes, plasmatocytes, oenocytoids, and spherulocytes.

Prohemocytes displayed unique characteristics such as small size and large nuclear–cytoplasmic ratio. Consequently, these cells correspond to the same prohemocytes described by several authors in other insects (Hernández et al., 1999; Da Silva et al., 2000; Silva et al., 2002; Brayner et al., 2005). However, Hillyer and Christensen (2002) do not agree prohemocytes are present in *A. aegypti* species. These authors described with small spherical biological structures like nuclei or large mitochondria from lysed adipohemocytes. In this study, we observed that prohemocytes

by LM and TEM are commonly seen. The characteristics and diameters of cells are according to with the literature.

Numerous *adipohemocytes* were observed in the present study. These hemocytes exhibited a large lipid like vesicle, sometimes large enough to deform the cell. We consider that the apparent function of these cells is energy storage in lipids and glycogen form. Their characteristics and size are similar to those observed by Hillyer and Christensen (2002) and Hillyer et al. (2003). Kaaya and Ratcliffe (1982) indicated that these cells are most similar to the fat body cells. However, we did not observe any similarity between these two cellular types.

By LM analysis, we identified that the oenocytoids presented an acidophilic cytoplasm after Giemsa staining. Giulianini et al. (2003), using EM analysis of *Cetonischema aeruginosa* larvae (Coleoptera, Scarabaeidae) oenocytoids, found a greater number of dense granules located at the cell periphery, however, in this study the oenocytoids showed some cytoplasmic short vacuoles, filled with a heterogeneous electron-dense material and others completely empty. This description was also reported in oenocytoids of *C. quinquefasciatus* by Brayner et al. (2005).

The present work indicates that numerous granules formed in cytoplasm of granulocytes are filled with a proteinaceous material. This cell contains dilated RER, formation of polysomes and abundant ribosomes scattered in the cytoplasm. As stated by Giulianini et al. (2003) and Silva et al. (2002) the granulocytes are easily identified by their size and cytoplasm characteristically filled with basophilic granules in Giemsa stained smears.

Plasmatocytes are the most variable cell in shape observed in the hemolymph of *A. aegypti*. They can be fusiform, rounded or completely irregular in shape due to cytoplasm expansions. Same authors described different types of plasmatocytes, granular and agranular (Hypša and Grubhoffer, 1997), others described this cell as granulocytes (Hillyer and Christensen, 2002; Hillyer et al., 2003). However, our study showed that cells termed granulocytes were quite different from plasmatocytes in some aspects, because we managed to find plasmatocytes without the presence of granules, reticular cytoplasm showed well-developed RER, Golgi system and some vacuoles, these descriptions are in accordance to the observations in *C. quinquefasciatus* (Brayner et al., 2005).

Thrombocytoids have a homogeneous cytoplasm similar to oenocytoids, with poorly developed organelles. In the present study we showed that these cells are rarely seen in the hemolymph of *A. aegypti*. Our results are in agreement with Hillyer and Christensen (2002), on which it is possible that these cells are not circulating and likely are attached to fixed tissues.

The present study has classified hemocytes of *A. aegypti* using the morphological criteria set up by others study. Although Hillyer and Christensen (2002) have identified only four hemocytes types, by using a different methodology we have managed to find other two different hemocytes.

Acknowledgements

The authors are grateful to Marcelo Paiva, Rafael Padilha, Raimundo Pimentel and Sérgio Santos for the precious technical

support. This work has been supported by Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) and Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA/UFPE).

References

- Beaty, B.J., 2000. Genetic manipulation of vectors: a potential novel approach for control of vector borne diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 10295–10297.
- Beerntsen, B.T., James, A.A., Christensen, B.M., 2000. Genetics of mosquito vector competence. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64 (1), 115–137.
- Brayner, F.A., Araújo, H.R.C., Cavalcanti, M.G., Alves, L.C., Peixoto, C.A., 2005. Ultrastructural characterization of the hemocytes of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Micron* 36, 359–367.
- Christensen, B.M., Huff, B.M., Miranpuri, G.S., Harris, K.L., Christensen, L.A., 1989. Hemocyte population changes during the immune response of *Aedes aegypti* to inoculated microfilariae of *Dirofilaria immitis*. *J. Parasitol.* 75, 119–123.
- Da Silva, J.B., Albuquerque, C.M.R., Araújo, E.C., Peixoto, C.A., Hurd, H., 2000. Immune defense mechanisms of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) against *Candida albicans* infection. *J. Inver. Pathol.* 76, 257–262.
- Dunn, P.E., 1986. Biochemical aspects of insect immunity. *Annu. Rev. Entomol.* 31, 321–339.
- Giulianini, P.G., Bertolo, F., Battistella, S., Amirante, G.A., 2003. Ultrastructure of the hemocytes of *Cetonischema aeruginosa* larvae (Coleoptera, Scarabaeidae): involvement of both granulocytes and oenocytoids in vivo phagocytosis. *Tissue Cell* 35, 243–251.
- Gupta, A.P., 1985. Cellular elements in the hemolymph. In: Kerkut, G.A., Gilbert, L.I. (Eds.), *Comprehensive Insect Physiology Biochemistry and Pharmacology*, vol. 3. Pergamon Press, Oxford.
- Hernández, S., Lanz, H., Rodríguez, M.H., Torres, J.A., Martínez-Palomo, A., Tsutsumi, V., 1999. Morphological and cytochemical characterization of female *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae) hemocytes. *J. Med. Entomol.* 36, 426–434.
- Hillyer, J.F., Christensen, B.M., 2002. Characterization of hemocytes from the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Histochem. Cell Biol.* 313, 117–127.
- Hillyer, J.F., Schmidt, S.L., Christensen, B.M., 2003. Hemocyte-mediated phagocytosis and melanization in the mosquito *Armigeres subalbatus* following immune challenge by bacteria. *Cell Tissue Res.* 313, 117–127.
- Hypša, V., Grubhoffer, L., 1997. Two hemocyte populations in *Triatoma infestans*: ultrastructural and lectin-binding characterization. *Folia Parasitol.* 44, 62–70.
- Kaaya, G.P., Ratcliffe, N.A., 1982. Comparative study of hemocytes and associated cells of some medically important Dipterans. *J. Morphol.* 173, 351–365.
- Kumar, S., Christophides, G.K., Cantera, R., Charles, B., Han, Y.S., Meister, S., Dimopoulos, G., Kafatos, F.C., Barillas-Mury, C., 2003. The role of reactive oxygen species on Plasmodium melanotic encapsulation in *Anopheles gambiae*. *PNAS* 100 (24), 14139–14144.
- Lavine, M.D., Strand, M.R., 2002. Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32, 1295–1309.
- Lowenberger, C., 2001. Innate immune response of *Aedes aegypti*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 31, 219–229.
- Mead, G.P., Ratcliffe, N.A., Renwrandt, L.R., 1986. The separation of insect haemocyte types on percoll gradients: methodology and problems. *J. Insect Physiol.* 32, 167–177.
- Meister, M., Hetru, C., Hoffmann, J.A., 2000. The antimicrobial host defense of *Drosophila*. In: Du Pasquier, L., Litman, G.W. (Eds.), *Current Topics in Microbiology and Immunology. Origin and Evolution of the Vertebrate Immune System*, vol. 248. Springer-Verlag, Berlin, pp. 17–36.
- Muta, T., Iwanaga, S., 1996. The role of hemolymph coagulation in innate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 8, 41–47.
- Nappi, A.J., Christensen, B.M., 1989. Hemocyte cell surface changes in *Aedes aegypti* in response to microfilariae of *Dirofilaria immitis*. *J. Parasitol.* 72, 875–879.

- Niere, M., Meisslitzer, C., Dettloff, M., Weise, C., Ziegler, M., Wiesner, A., 1999. Insect immune activation by recombinant *Galleria mellonella* apolipophorin III. *Biochim. Biophys. Acta* 1433, 16–26.
- Roberts, L., 2002. Mosquitoes and disease. *Science* 298 (5591), 82–83.
- Russo, J., Brehélin, M., Carton, Y., 2001. Haemocyte changes in resistant and susceptible strains of *D. melanogaster* caused by virulent and avirulent strains of the parasitic wasp *Leptopilina boulardi*. *J. Insect Physiol.* 47, 167–172.
- Schmidt, O., Theopold, U., Strand, M., 2001. Innate immunity and its evasion and suppression by hymenopteran endoparasitoids. *BioEssays* 23 (4), 344–351.
- Silva, J.E.B., Boleli, I.C., Simões, Z.L.P., 2002. Hemocytes types and total differential counts in unparasitized and parasitized *Anastrepha obliqua* (Diptera, Tephritidae) larvae. *Braz. J. Biol.* 62, 689–699.
- Vass, E., Nappi, A.J., 2001. Fruit fly immunity. *BioEssays* 51, 529–535.
- Vizioli, J., Bulet, P., Hoffmann, J.A., Kafatos, F.C., Muller, H.M., Dimopoulos, G., 2001. Gambicin: a novel immune responsive antimicrobial peptide from the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 12630–12635.
- World Health Organization, 1999. Disease Statistics. The World Health Report. World Health Organization, Geneva, Switzerland.

ANEXO A

Anexo A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



Título do Projeto: “Estudo ultra-estrutural dos hemócitos de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae)”.

Pesquisador responsável: Helena Rocha Corrêa de Araújo

Instituição onde se realizará o projeto: Depto de Biologia Celular e Ultraestrutural (CPqAM/FIOCRUZ); Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA/UFPE).

Data de apresentação ao CEP: 01/06/06

Registro no CEP/CPqAM/FIOCRUZ: 41/06

Registro no CAEE: 0037.0.095.000-06

PARECER

O Comitê avaliou as modificações introduzidas e considera que os procedimentos metodológicos do Projeto em questão estão condizentes com a conduta ética que deve nortear pesquisas envolvendo seres humanos, de acordo com o Código de Ética, resolução CNS 196/96, e complementares.

O projeto está aprovado para ser realizado em sua última formatação apresentada ao CEP e este parecer tem validade até 11 de agosto de 2009. Em caso de necessidade de renovação do Parecer, encaminhar relatório e atualização do projeto.

Recife, 11 de agosto de 2006.

Ana Maria A. Santos

Dr^a Ana Maria Aguiar dos Santos
Médica
Coordenação
CEP/CPqAM/FIOCRUZ

Observação:

Anexos:

- Orientações ao pesquisador para projetos aprovados;
- Modelo de relatório anual com 1º prazo de entrega para 11/08/2007.

Campus da UFPE - Av. Moraes Rego, s/n
CEP 50.670-420 Fone: (81) 2101.2639
Fax: (81) 3453.1911 | 2101.2639
Recife - PE - Brasil
comitedeetica@cpqam.fiocruz.br

