


**Ministério da Saúde**  
**Fundação Oswaldo Cruz**  
**Centro de Pesquisas René Rachou**  
**Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde**



**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS HEMÓCITOS DO *Aedes aegypti* E  
DO *Aedes albopictus* E A RESPOSTA IMUNE DOS HEMÓCITOS DO *Aedes aegypti*  
APÓS A INFECCÃO PELO *Dengue virus***

por

Helena Rocha Corrêa de Araújo

Belo Horizonte

Fevereiro/2011

**Ministério da Saúde**  
**Fundação Oswaldo Cruz**  
**Centro de Pesquisas René Rachou**  
**Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde**

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS HEMÓCITOS DO *Aedes aegypti* E  
DO *Aedes albopictus* E A RESPOSTA IMUNE DOS HEMÓCITOS DO *Aedes aegypti*  
APÓS A INFECCÃO PELO *Dengue virus***

por

Helena Rocha Corrêa de Araújo

Tese apresentada com vistas à obtenção do título de doutor em Ciências na área de concentração em Biologia Celular e Molecular.

**Orientações:** Dr. Paulo Filemon Paolucci Pimenta

Dra. Nágila F. Costa Secundino

**Co-orientação:** Dr. Fábio André Brayner

Belo Horizonte

Fevereiro/ 2011

Catálogo-na-fonte  
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ  
Biblioteca do CPqRR  
Segemar Oliveira Magalhães CRB/6 1975

A658c      **Araújo, Helena Rocha Corrêa.**  
2011

Caracterização morfológica dos hemócitos do *Aedes aegypti* e do *Aedes albopictus* e a resposta imune dos hemócitos do *Aedes aegypti* após a infecção pelo *Dengue virus* / Helena Rocha Corrêa Araújo. – Belo Horizonte, 2011.

xx, 171 f.: il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f. 170 - 191

Tese (doutorado) – Tese para obtenção do título de Doutor em Ciências pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

1. Dengue/imunologia 2. Vírus da Dengue/parasitologia  
3. Vírus da Dengue/ultraestrutura I. Título. II. Pimenta, Paulo Filemon Paolucci (Orientação). III. Secundino, Nágila F. Costa (Orientação). IV. Brayner, Fábio André (Co-orientação)

CDD – 22. ed. – 616.918 52

**Ministério da Saúde**  
**Fundação Oswaldo Cruz**  
**Centro de Pesquisas René Rachou**  
**Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde**

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS HEMÓCITOS DO *Aedes aegypti* E  
DO *Aedes albopictus* E A RESPOSTA IMUNE DOS HEMÓCITOS DO *Aedes aegypti*  
APÓS A INFECÇÃO PELO *Dengue virus***

por

Helena Rocha Corrêa de Araújo

Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Paulo Filemon Paolucci Pimenta (Presidente)

Prof. Dr. Luciano Andrade Moreira

Prof. Dr. Carlos Eduardo Calzavara Silva

Profa. Dra. Ortrud Monika Barth Schatzmayr

Profa. Dra. Valéria Cristina Soares Pinheiro

Suplente: Prof. Dr. Breno de Mello Silva

Tese defendida e aprovada em: 25/02/2011.

*“O conhecimento do passado  
contribui para melhor entender o  
presente e avaliar com maior  
precisão a evolução para o futuro”*

*Hermann Schatzmayr*

Dedico

Aos meus pais, Romualdo e Edelci e ao meu irmão, Ulisses por sempre acreditarem e torcerem por mim.

Ofereço

A Matheus Benevides por estar sempre ao meu lado em todos os momentos.

## *Agradecimentos*

### *Suporte Financeiro*

- FUNDEP - Processo: 15743
- FUNDEP - Processo: 16717
- FAPEMIG - Processo: APQ-03790-10
- CNPq - Processo: 302249/2008-7 - Produtividade de Pesquisa – PQ – 2008
- CNPq - Processo: 576018/2008-2 - MCT/CNPq/CT-Saúde/MS/SCTIE/DECIT  
n°34/2008

## *Agradecimentos*

Ao meu orientador Paulo Pimenta pela oportunidade de realizar meu doutorado nesta instituição, por me receber com muito carinho em Belo Horizonte e pelos ensinamentos que levarei por toda minha vida profissional. Muito obrigada por acreditar em mim!!!

À Nágila Secundinho pela amizade e momentos de descontração. Deixo aqui minha gratidão a uma pessoa que eu aprendi a gostar e compreender.

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

Aos meus pais, Romualdo e Edelci, e ao 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 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, meu amor, serei eternamente grata!!!

Ao Breno Mello pela ajuda e orientação nos meus estudos com Dengue.

À Caroline Macedo pela ajuda imprescindível nos experimentos de infecção e PCR.

À Bárbara, Luiza e Ana Flávia pela ajuda em todos os experimentos envolvendo infecção com Dengue e manutenção dos mosquitos na colônia.

À Andrezza Chagas pelo companheirismo, amizade e presença constante em todos os momentos da minha vida profissional e pessoal. Levarei sua amizade por toda a minha vida!!!



À turma do **M.A.L.** e grandes amigos Azza, Rafa, Carol, Zile e agora Juju mais uma vez agradeço pelos momentos de alegria e descontração. Minha permanência em Belo Horizonte tão teria sido tão feliz se eu não tivesse a amizade e o companheirismo de vocês meus amigos. Muito obrigada por existirem em minha vida!!!

À *mãezona* Luciana Pinto por ter me recebido em sua casa com muito carinho quando cheguei a Belo Horizonte, pela ajuda constante e por sempre se lembrar de mim.

Aos amigos e amigas do Laboratório de Entomologia Médica Rodriguinho, Vanessa, Ana Anhê, Bruno, Alessandra, Carol Cunha, Junara, Jequeline, Fernanda Gambogi, Marcele, Rafael Assis, Izabela, Paula, Ana Carolina Monteiro, Ana Clara, Bruna, Nadja, Graice e Pollyanna pelo apoio e convivência.

À secretária e amiga Robertinha por me socorrer nos momentos de aperto.

À Cristiane e Andréa da Secretaria Acadêmica da Pós-graduação do René Rachou pelo suporte essencial para conclusão deste trabalho.

À Dra. Valéria Cristina Soares e Dra. Ana Paula Duarte pelas contribuições na qualificação que permitiram o aperfeiçoamento deste trabalho.

À Dra. Carolina Barrilas Mury do Laboratory of Malaria and Vector Research, NIAID do National Institutes of Health, NIH - USA pelo convite para conhecer seu laboratório e pela oportunidade de realizar um treinamento e experimentos que contribuíram para conclusão de uma parte importantíssima deste trabalho.

À Janneth Rodrigues do Laboratory of Malaria and Vector Research, NIAID do National Institutes of Health, NIH - USA pela ajuda com o programa de estatística GraphPad Prisma 5.0 (GraphPad Software, USA).

À Biblioteca do CPqRR em prover acesso gratuito local remoto à informação técnico-científica em saúde custeada com recursos públicos federais, integrante do rol de referências desta tese, também pela catalogação e normalização da mesma.

À Elizabeth, Antônio, Thiago, Camila, Serginho e Pedrinho por serem minha segunda família;

Aos amigos do Aggeu Magalhães Marília Gabriela, Dyanna, Guilherme, Juliana e Rafael Padilha.

Às amigas de *replública* em BH Ana Anhê, Gerusa e Edleusa, que apesar das diferenças, foram as pessoas que moraram comigo durante estes quatro anos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (PRONEX), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Fundação Bill & Melinda Gates e Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) pelo auxílio financeiro deste trabalho;

Por fim a todos os pesquisadores, doutores, mestrados, técnicos, ICs, colaboradores e amigos do Centro de Pesquisas René Rachou que de alguma forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b>	xiv
<b>LISTA DE TABELAS</b>	xvii
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS</b>	xviii
<b>RESUMO</b>	xix
<b>ABSTRACT</b>	xx
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	21
<b>1.1 A doença</b>	21
1.1.1 Aspectos históricos	21
1.1.2 Descrição	22
1.1.3 Epidemiologia	23
1.1.4 Manifestações clínicas	26
1.1.5 Diagnóstico	28
1.1.6 Tratamento	29
1.1.7 Controle e prevenção	29
<b>1.2 <i>Dengue virus</i></b>	30
1.2.1 Ciclo de multiplicação	32
1.2.2 Multiplicação do <i>Dengue virus</i> no vetor	33
<b>1.3 Aspectos gerais da biologia do <i>A. aegypti</i> (Linnaeus, 1762) e do <i>A. albopictus</i> (Skuse, 1894)</b>	35
<b>1.4 Sistema circulatório dos insetos</b>	38
<b>1.5 Mecanismos de defesa dos insetos</b>	39
1.5.1 Hemolinfa	41
1.5.2 Hemócitos	42
1.5.2.1 <i>Origem dos hemócitos</i>	43
1.5.2.2 <i>Classificação dos hemócitos</i>	43
<b>1.6 Resposta imune humoral</b>	44
1.6.1 Importância das lectinas	45
	xi

<b>1.7 Resposta imune celular</b>	47
1.7.1 Fagocitose	48
1.7.2 Nodulação	49
1.7.3 Encapsulação	49
1.7.4 A resposta imune contra a infecção por arbovírus	50
<b>2 JUSTIFICATIVA</b>	53
<b>3 OBJETIVOS</b>	54
3.1 Objetivo Geral	54
3.2 Objetivos Específicos	54
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b>	55
4.1 Mosquitos	55
4.2 Coleta da hemolinfa através da técnica de perfusão intratorácica	55
4.3 Microscopia de Luz	56
4.4 Microscopia de Contraste de Interferência Diferencial	56
4.5 Microscopia Eletrônica de Transmissão	57
4.6 Marcação com lectinas	57
4.7 Ensaios de endocitose	59
4.7.1 Partículas de látex-FITC	59
4.7.2 Albumina-rodamina	59
4.8 Marcação com anticorpo lisosomal	60
4.9 Cultura celular e multiplicação viral	61
4.9.1 Manutenção das células C6/36	61
4.9.2 <i>Dengue virus</i>	61
4.9.3 Infecção das células C6/36	61
4.10 Alimentação oral dos mosquitos com <i>Dengue virus</i>	62
4.11 Titulação viral	64
4.12 Dinâmica hemocitária	65
4.13 Inoculação dos mosquitos <i>A. aegypti</i> com <i>Dengue virus</i>	66
4.14 Imunomarcção dos hemócitos para o <i>Dengue virus</i>	67
4.15 Detecção do <i>Dengue virus</i> na hemolinfa dos mosquitos	68
4.15.1 Extração do RNA	68
4.15.2 RT-PCR	68

4.15.3 PCR	69
4.15.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida 0,8%	71
<b>5 RESULTADOS</b>	<b>72</b>
5.1 Caracterização morfológica dos hemócitos de <i>A. albopictus</i>	72
5.2 Marcação por lectinas	74
5.3 Ensaio de endocitose	76
5.4 Marcação com anticorpo lisossomal	76
5.5 Dinâmica hemocitária	76
5.6 Hemócitos de <i>A. aegypti</i> após o desafio com <i>Dengue virus</i>	84
5.7 Detecção do <i>Dengue virus</i> na hemolinfa	86
<b>6 DISCUSSÃO</b>	<b>121</b>
6.1 Caracterização dos hemócitos de <i>A. albopictus</i>	121
6.2 Ensaio de endocitose	130
6.3 Dinâmica hemocitária	133
6.4 Hemócitos de <i>A. aegypti</i> após o desafio com DENV	137
<b>7 CONCLUSÕES</b>	<b>141</b>
<b>8 PERSPECTIVAS</b>	<b>143</b>
<b>9 ANEXOS</b>	<b>144</b>
9.1 ANEXO 1 – Artigo submetido à publicação	144
9.2 ANEXO 2 – Artigo aceito para publicação	163
<b>10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>170</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura da capa</b> –	Foto do mosquito <i>Aedes aegypti</i> (Linnaeus, 1762)	i
<b>Figura 1</b> –	Mapa da Dengue	24
<b>Figura 2</b> –	Pirâmide que representa as manifestações clínicas do dengue.	28
<b>Figura 3</b> –	Estrutura e expressão do genoma dos <i>Flavivirus</i> .	32
<b>Figura 4</b> –	Ciclo de replicação dos <i>Flavivirus</i> .	33
<b>Figura 5</b> -	Infecção do <i>Dengue virus</i> no mosquito vetor.	34
<b>Figura 6</b> -	Ciclo de vida dos culicídeos	35
<b>Figura 7</b> –	<i>Aedes aegypti</i> e <i>Aedes albopictus</i> .	36
<b>Figura 8</b> –	Sistema circulatório dos insetos.	39
<b>Figura 9</b> –	Perfusão no tórax para coleta de hemolinfa. Figura A - Mosquitos anestesiados no gelo. Figura B - Inoculação da solução fixadora no tórax do mosquito e retirada da hemolinfa. Figura C - Materiais utilizados nesta técnica: pinça, microcapilar de vidro e fixador.	56
<b>Figura 10</b> -	Monocamada das células de mosquito <i>A. albopictus</i> clone C6/36. Figura A – Células C6/36 não infectadas. Figura B - Células C6/36 infectadas com Dengue virus apresentando sincícios. Aumento de 25X.	62
<b>Figura 11</b> -	Material utilizado no experimento de alimentação oral dos mosquitos. A. Alimentador artificial. B. Sangue sendo colocado no alimentador artificial montado com membrana. C. Momento da realização do repasto pelos mosquitos. D. Disposição das gaiolas contendo os mosquitos conectadas por mangueiras onde circula água aquecida. E. Banho-maria utilizado para aquecer a água que passa pelos alimentadores.	63
<b>Figura 12</b> -	Desenho esquemático da placa de titulação.	64
<b>Figura 13</b> -	Obtenção de hemolinfa conforme descrito por Castillo JC <i>et al.</i> , 2006 com modificações.	66

<b>Figura 14 -</b>	Microinjetor Nanoject II (Drummond).	67
<b>Figura 15 -</b>	Contagem total do número de hemócitos presentes na hemolinfa de <i>A. aegypti</i> de acordo com a idade.	77
<b>Figura 16 -</b>	Contagem diferencial dos hemócitos presentes na hemolinfa de <i>A. aegypti</i> . Contagem diferencial dos hemócitos presentes na hemolinfa de <i>A. aegypti</i> (n=6). As barras representam as médias ( $\pm$ erro padrão da média).	78
<b>Figura 17 -</b>	Contagem total do número de hemócitos presentes na hemolinfa de <i>A. albopictus</i> de acordo com a idade.	79
<b>Figura 18 -</b>	Contagem diferencial dos hemócitos presentes na hemolinfa de <i>A. albopictus</i> .	79
<b>Figura 19 -</b>	Contagem total dos hemócitos de <i>A. aegypti</i> no grupo controle e alimentados com sangue contendo <i>Dengue virus</i> , analisados até o 11º dia após a infecção.	80
<b>Figura 20 -</b>	Distribuição dos números de células por mosquito <i>A. aegypti</i> no grupo controle durante os dias 3, 5, 7, 9, 12 e 13 pós-eclosão.	80
<b>Figura 21 -</b>	Distribuição dos números de células por mosquito <i>A. aegypti</i> infectado durante os dias 1, 3, 5, 7, 10 e 11 pós-alimentação.	80
<b>Figura 22 -</b>	Proporção do número de prohemócitos e oenocitóides presentes nos mosquitos <i>A. aegypti</i> controle e infectado. Proporção do número de prohemócitos (A) e oenocitóides (B) presentes nos mosquitos <i>A. aegypti</i> controle e infectado. As barras representam as médias ( $\pm$ erro padrão da média); os asteriscos indicam as diferenças que são estatisticamente significantes (Tukey`s test; n=6).	82
<b>Figura 23 -</b>	Proporção do número de plasmatócitos e granulócitos presentes nos mosquitos <i>A. aegypti</i> controle e infectado. Proporção do número de plasmatócitos (A) e granulócitos (B) presentes nos mosquitos <i>A. aegypti</i> controle e infectado. As barras representam as médias ( $\pm$ erro padrão da média); os asteriscos indicam as diferenças que são estatisticamente significantes (Tukey`s test; n=6).	83
<b>Figura 24 -</b>	Proporção do número de adipohemócitos presentes nos mosquitos <i>A. aegypti</i> controle e infectado. Gráfico ilustrando a proporção do número de adipohemócitos presentes nos mosquitos <i>A. aegypti</i> controle e infectado. As barras representam as médias ( $\pm$ erro padrão da média) ( n=6).	84

<b>Figura 25 –</b>	Morfologia dos hemócitos de <i>A. albopictus</i> fixados e observados através da microscopia de luz.	87
<b>Figura 26 -</b>	Morfologia dos hemócitos de <i>A. albopictus</i> através da microscopia de contraste de interferência diferencial.	89
<b>Figura 27 –</b>	Caracterização ultraestrutural dos hemócitos de <i>A. albopictus</i> .	91
<b>Figura 28 –</b>	Plasmatócito fagocitando uma célula apoptótica.	93
<b>Figura 29 -</b>	Hemócitos de <i>A. aegypti</i> vivos observados em Câmara de Neubauer através da microscopia de luz.	95
<b>Figura 30 -</b>	Hemócitos de <i>A. albopictus</i> vivos observados em Câmara de Neubauer através da microscopia de luz.	97
<b>Figura 31 –</b>	Endocitose (fagocitose) de partículas de látex pelos hemócitos de <i>A. albopictus</i> .	99
<b>Figura 32 –</b>	Endocitose de albumina-rodamina pelos hemócitos de <i>A. aegypti</i> .	101
<b>Figura 33 -</b>	Marcação dos lisossomos presentes nos hemócitos de <i>A. aegypti</i> .	103
<b>Figura 34 -</b>	Ligação das lectinas aos hemócitos de <i>A. aegypti</i> .	105
<b>Figura 35 -</b>	Ligação das lectinas aos hemócitos de <i>A. albopictus</i> .	107
<b>Figura 36 -</b>	Hemócitos de <i>A. aegypti</i> após 48h horas da inoculação com <i>Dengue virus 2</i> observados através da microscopia de luz.	109
<b>Figura 37 –</b>	Imunomarcação dos hemócitos de <i>A. aegypti</i> após 48 horas da inoculação com <i>Dengue virus 2</i> .	111
<b>Figura 38 -</b>	Ultraestrutura dos hemócitos de <i>A. aegypti</i> após 48h do desafio com <i>Dengue virus 2</i> .	113
<b>Figura 39-</b>	Detalhes das estruturas lisas de membrana (SMS) e outras alterações morfológicas presentes nos hemócitos em resposta à infecção pelo <i>Dengue virus 2</i> .	115
<b>Figura 40 -</b>	Ultraestrutura dos hemócitos de <i>A. aegypti</i> não exibindo alterações morfológicas após 2h e 48h do desafio com <i>Dengue virus 2</i> .	117
<b>Figura 41 -</b>	Deteção do <i>Dengue virus 2</i> na hemolinfa de <i>A. aegypti</i> após 48 horas da inoculação através da RT-PCR.	119



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> –	Lista de lectinas.	58
<b>Tabela 2</b> –	Oligonucleotídeos iniciadores.	69
<b>Tabela 3</b> –	Marcação dos hemócitos de <i>A. aegypti</i> com lectinas.	75
<b>Tabela 4</b> –	Marcação dos hemócitos de <i>A. albopictus</i> com lectinas.	75

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

% = porcentagem  
°C = graus Celsius  
BSA = albumina de soro bovino  
cDNA = ácido desoxirribonucléico complementar  
C6/36 = linhagem celular originária de larvas de *Aedes albopictus*  
dNTPs = desoxirribonucleotídeos trifosfatos  
DENV = *Dengue virus*  
DNA = ácido desoxirribonucléico  
DIC = Microscopia de Contraste de Interferência Diferencial  
FD = Febre do Dengue  
FHD = Febre Hemorrágica do Dengue  
FITC = Isotiocianato de fluoresceína  
L15 = Meio de cultura Leibowitz  
ML = Microscopia de luz  
m = mitocôndria  
MET = Microscopia Eletrônica de Transmissão  
M = molar  
µl = microlitros  
mL = mililitros  
mM = milimolar  
mRNA = ácido ribonucléico mensageiro  
NCR = região não codificadora  
nm = nanômetros  
NS = proteínas não-estruturais  
ORF = janela aberta de leitura  
pb = pares de bases  
PBS = Tampão salina fosfato  
PCR = reação em cadeia da polimerase  
PIE = Período de incucação extrínseco  
Primer = oligonucleotídeo iniciador  
prM = proteína precursora da membrana  
Proteína C = proteína do capsídeo  
Proteína E = proteína do envelope  
Proteína M = proteína da membrana  
pmol = picomol  
PIE = período de incubação extrínseco  
RE = retículo endoplasmático  
RER = retículo endoplasmático rugoso  
RNA = ácido ribonucléico  
RT-PCR = transcrição reversa - reação em cadeia da polimerase  
SCD = Síndrome do Choque da Dengue  
SFB = soro fetal bovino  
SMS = estruturas lisas de membrana (“smooth-membrane structure”)  
TCID50 = dose (50) infectante de cultura de tecido  
UI/mL = unidades internacionais por mililitro  
U = unidades

## RESUMO

Os insetos possuem mecanismos imunes que fornecem proteção contra diversos microorganismos. Estas barreiras anatômicas e fisiológicas incluem as respostas de defesa celulares e humorais. A maior parte dos estudos de imunidade de insetos concentra-se na resposta humoral. Entretanto, os hemócitos são também conhecidos por estarem envolvidos nas respostas imunes celulares contra muitos tipos de microorganismos. Inicialmente, nós caracterizamos os hemócitos dos mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* revelando seis diferentes subpopulações celulares: prohemócito, adipohemócito, granulócito, plasmatócito, oenocitóide e trombocitóide. Nós demonstramos que estes mosquitos têm aproximadamente 3.000 hemócitos/ $\mu$ l de hemolinfa e eles exibem diversos padrões no reconhecimento de diferentes lectinas (*Bandeiraea simplicifolia*, *Canavalis ensifonnis*, *Helix pomatia*, *Arachis hypogea*, *Ulex europaeus*, *Triticum vulgare*, *Limulus polyphemus*, *Ricinus communis*). Os ensaios de endocitose demonstraram que, em *A. albopictus*, o granulócito e o plasmatócito apresentaram atividade fagocítica contra as partículas de látex. Além disso, nestas células e no oenocitóide foi observada a presença de diversos lisossomos através da utilização de anticorpos específicos. Em *A. aegypti*, o prohemócito, o granulócito e o oenocitóide foram os tipos celulares que endocitaram a albumina. Entretanto, o plasmatócito e o oenocitóide foram as células marcadas como possuindo lisossomos. Os estudos de interação do *A. aegypti* com *Dengue virus* demonstraram que no 5º e 7º dia após a alimentação oral houve um aumento significativo no número total de hemócitos onde os plasmatócitos, oenocitóides e granulócitos foram os tipos celulares que aumentaram neste período. Os estudos por microscopia exibiram alterações morfológicas características nos plasmatócitos e nos oenocitóides de *A. aegypti* devido à presença do vírus na hemolinfa. Entretanto, os plasmatócitos, oenocitóides e granulócitos estão hábeis para endocitar os vírus, como demonstrado pela imonumeração específica visualizada na microscopia confocal.

## ABSTRACT

Insects have immune mechanisms to provide protection against different microorganisms. These include anatomic and physiologic barriers as well as, cellular and humoral defense responses. Most insect immunity studies are concerned with the humoral response. However, hemocytes are also known to be involved in the cellular immune responses against many types of microorganisms. Firstly, we characterized the hemocytes of the mosquitoes *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* revealing six different cellular subpopulations: Prohemocyte, adipohemocyte, granulocyte, plasmacyte, oenocyte and thrombocytoid. We show that these mosquitoes have approximately 3.000 hemocytes/ $\mu$ l of hemolymph and they exhibit diverse patterns in the recognition of different lectins (*Bandeiraea simplicifolia*, *Canavalis ensifonnis*, *Helix pomatia*, *Arachis hypogea*, *Ulex europaeus*, *Triticum vulgare*, *Limulus polyphemus*, *Ricinus communis*). Endocytosis assays revealed that in *A. albopictus*, granulocytes and plasmacytes have phagocytic activity against the latex particles. Additionally, in these cells and in oenocytes we observed the presence of several lysosomes through visualization specific antibodies. In *A. aegypti*, the prohemocyte, the granulocyte and the oenocyte were the cellular types that endocytosed the albumin. However, the plasmacyte and the oenocyte were the cells that were labeled as having lysosomes. The interaction studies of *A. aegypti* with *Dengue virus* showed that in the 5<sup>o</sup> and 7<sup>o</sup> days after the oral feed there was a significant increase in the total number of hemocytes, with the plasmacytes, oenocytes and granulocytes being the cellular types that increase during this phase. Microscopic studies showed characteristic morphological alterations in the plasmacytes and the oenocytes of *A. aegypti* due to presence of virus in the hemolymph. However, granulocytes, plasmacytes and oenocytes were able to ingest virus as demonstrated by specific immunolabeling see by confocal microscopy.

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 A doença

#### 1.1.1 Aspectos históricos

Os primeiros registros de uma doença semelhante à dengue estão descritos na Enciclopédia Chinesa de sintomas e remédios e datam da Dinastia Chin (265-420 a.C.). A doença era conhecida como “água envenenada” pelos chineses e acreditava-se que estivesse relacionada a insetos voadores associados à água. Os primeiros relatos de uma grande epidemia de uma doença com sintomas semelhante à Dengue Clássica aconteceram nos três continentes (Ásia, África e norte da América) em 1779 e 1780. Essa ocorrência simultânea de casos indica que o *Dengue virus*, assim como seu mosquito vetor, apresentava uma distribuição mundial há mais de 200 anos. A dengue era considerada uma doença benigna, de curso não fatal, proveniente dos visitantes dos trópicos. A II Guerra Mundial foi um evento de grande importância para a dispersão do *Dengue virus* e do seu mosquito transmissor. Antes, as epidemias aconteciam em intervalos de 10 a 40 anos. A dispersão dos sorotipos virais ganhou grande importância com o crescimento da densidade e da área ocupada pelo mosquito *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762). Este fato deve-se ao transporte dos mosquitos para áreas nas quais estes não eram encontrados e ao crescimento exacerbado da população urbana e à sua migração do ambiente rural para os crescentes centros urbanos. Desde então, a pandemia de dengue começou no sudeste da Ásia e tem se espalhado pelo mundo (Halstead, 1992; Gubler, 1998; CDC, 2008). A intensidade da transmissão da infecção está na relação direta, embora não exclusiva, da abundância de mosquitos *A. aegypti* em presença de portadores humanos do vírus (Russell, 1993).

O cientista cubano, Carlos J. Finlay, incriminou o *A. aegypti* como sendo o transmissor da febre amarela em 1881. Esta descoberta abriu caminho para o estudo de outras doenças transmitidas por vetores (Revisão em Tan & Sung, 2008). A transmissão da dengue por mosquitos do gênero *Aedes* foi primeiramente descrita por Bancroft em 1906. Ashburn e Craig encontraram um agente filtrável no sangue humano em 1906 e Simmons e colaboradores transmitiram o vírus para voluntários humanos e definiram o período de incubação em mosquitos, em 1926 e 1931, respectivamente (Simmons, 1931 e Halstead, 1974).

### 1.1.2 Descrição

A dengue é uma arbovirose (virose transmitida por artrópodes) que acomete o homem e cujos agentes etiológicos são os vírus pertencentes à família Flaviviridae, gênero *Flavivirus*. São conhecidos quatro sorotipos antigenicamente distintos: DENV – 1, DENV – 2, DENV – 3 e DENV– 4 (Gubler, 1998).

Atualmente os sorotipos 1, 2 e 3 do *Dengue virus* circulam em todos os estados brasileiros, exceto Santa Catarina e Rio Grande do Sul. No dia 3 de janeiro de 2011, o Instituto Evandro Chagas (IEC/PA) comunicou a confirmação de um caso de dengue causado pelo sorotipo 4 do vírus (DENV4) em Manaus. O paciente não possui história de deslocamento para áreas de reconhecida circulação desse sorotipo, portanto o caso é considerado autóctone (transmissão ocorrida em Manaus). Com as informações disponíveis até o momento este evento não apresenta vínculo com a ocorrência de um surto de dengue pelo mesmo sorotipo ocorrido em Roraima nos meses de julho a setembro de 2010. A Secretaria de Saúde do Município de Manaus iniciou ações visando minimizar o impacto da transmissão pelo DENV4. Em 7 janeiro de 2011 o IEC também confirmou um caso autóctone de dengue causado pelo sorotipo 4 em Belém (Ministério da Saúde, 2011).

Em 2008, uma equipe de cientistas amazonenses já havia identificado o DENV-4, ausente no Brasil desde 1982, em três pacientes que vivem e trabalham em Manaus (Figueiredo *et al.*, 2008). O constante risco da entrada de novos sorotipos no país preocupa as autoridades de saúde. Segundo Halstead (1988), a segunda infecção adquirida pelo *Dengue virus* pertencente à um sorotipo diferente daquele causador da primeira infecção (infecção cruzada) desencadeia uma resposta imunológica e esta condição favoreceria um aumento na permeabilidade vascular. A presença de anticorpos circulantes de uma primeira infecção não neutraliza o segundo vírus infectante de sorotipo diferente e amplificam a infecção, facilitando a penetração em macrófagos do novo tipo infectante. As partículas virais utilizam a porção Fc dos anticorpos ligados ao envelope viral para a ligação com os receptores de membrana Fc $\gamma$ , presentes na membrana dos macrófagos. Trata-se da teoria da intensificação da infecção viral dependente de anticorpos (antibody-dependent enhancement of viral infection– ADE). Desta forma, o contato da população com os quatro sorotipos acarreta um aumento significativo no número destas infecções cruzadas, causando um aumento no número de casos graves da doença (Figueiredo, 1999). São destacados alguns outros fatores de risco

para a ocorrência de casos graves, tais como: a cepa, o sorotipo de vírus infectante, o estado imunológico e genético do paciente e a concomitância com outras doenças (Tauil, 2001).

O *Dengue virus* é transmitido pela picada da fêmea infectada do mosquito *A. aegypti* e após serem inoculados no homem, fazem uma primeira replicação em células musculares estriadas, lisas e fibroblastos, bem como em linfonodos locais. Neste momento, tem início a viremia, disseminando-o por todo o organismo. Os vírus podem circular livres no plasma ou no interior de monócitos/ macrófagos. Sabe-se que o *Dengue virus* tem tropismo por essas células fagocitárias, as quais são os maiores sítios de replicação viral (Figueiredo, 1999). Um mosquito *A. aegypti* susceptível pode tornar-se infectado picando a pessoa doente durante o estágio virêmico febril causado pelo DENV. Após um período de incubação de 8-12 dias, um mosquito infectado é capaz de transmitir o vírus aos indivíduos susceptíveis. As fêmeas infectadas podem também transmitir o vírus à sua prole (através dos ovos) pela transmissão transovariana (Gubler, 1998).

### 1.1.3 Epidemiologia

Originalmente, o *Dengue virus* circulava e era mantido em ciclos de transmissão silvestres, envolvendo primatas inferiores e mosquitos *Aedes*, na Ásia e na África (Gubler, 1998). No entanto, a doença se estabeleceu em centros urbanos das regiões tropicais, em um ciclo que envolve o homem – *A. aegypti* – homem. Hoje, a transmissão urbana do *Dengue virus* tornou-se um grave problema de saúde pública (Gubler, 2002).

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. Nas Américas, a dengue tem sido relatada há mais de 200 anos. Após as primeiras décadas do século XX parece ter havido uma diminuição ou mesmo interrupção da transmissão do *Dengue virus*. Porém, a partir dos meados da década de 60, diferentes epidemias de dengue clássico foram registradas em vários países. A partir de 1963, houve circulação comprovada dos sorotipos 2 e 3 em vários países. Em 1977, o sorotipo 1 foi introduzido nas Américas, inicialmente pela Jamaica. A partir de 80, foram notificadas epidemias em vários países, aumentando consideravelmente a magnitude do problema. A FHD que afetou Cuba, em 1981, é considerada como evento de extrema importância na história da dengue nas Américas. Essa epidemia foi causada pelo sorotipo 2, tendo sido o primeiro relato de FHD ocorrido fora do Sudeste Asiático e do Pacífico Ocidental (Ministério da Saúde, 2009).

Na década de 90, o quadro epidemiológico da dengue nas Américas e no Caribe agravou-se e epidemias têm sido frequentemente, observadas em vários centros urbanos, muitas delas associadas à ocorrência de casos hemorrágicos (Teixeira *et al.*, 1999). Hoje é mundialmente considerada, a arbovirose mais importante, constituindo um grande problema de saúde pública com um significativo impacto econômico, político e social (Gubler & Meltzer, 1999 e Kyle & Harris, 2008).

No mundo, cerca de 3,5 bilhões de pessoas, metade da população mundial, estão sob o risco de infecção pelo *Dengue virus*. Aproximadamente 50-100 milhões de pessoas são infectadas anualmente, incluindo mais de 500.000 casos potencialmente letais de febre hemorrágica da dengue e síndrome do choque da dengue. Isto ocorre principalmente em países tropicais, onde as condições climáticas (temperatura e umidade) são favoráveis à proliferação do mosquito vetor (Tauli, 2002; Halstead, 2007; Kyle & Harris, 2008) (Figura 1). 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 de seu grande potencial para causar as formas graves e letais da doença (Halstead, 1997).



**Figura 1.** Mapa da Dengue.

Este mapa pode ser usado como um guia para a avaliação de risco da dengue em todo o mundo. As regiões azuis representam as áreas de risco contínuo, tal como definido pelo Centers for Disease Control and Prevention (CDC), conforme relato pelos Ministérios da Saúde, organizações de saúde internacionais, revistas e especialistas (última revisão: 2008 do guia do CDC para viajantes). A falta de indicadores vermelhos não relata que não há transmissão, especialmente em áreas onde *Dengue virus* é endêmico.

Fonte: Adaptado de <http://www.healthmap.org/dengue/pt/>



Há referências de surtos da dengue ocorridas no Brasil desde 1845, no Rio de Janeiro (RJ) e, provavelmente ocorreram outros surtos nas regiões Sul, Sudeste e Nordeste durante o século XIX (Figueiredo, 2000). Entre 1958 e 1960, o *A. aegypti* foi eliminado do Brasil e da maioria dos países americanos, através dos esforços para erradicar a febre amarela pela Associação Panamericana de Saúde. 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. Desta forma, a reinfestação no país pelo *A. aegypti* foi inevitável ocorrendo no ano de 1976. Em 1995, sua distribuição alcançou os mesmos níveis encontrados antes da campanha (Figueiredo, 2000; Schatzmayr, 2000; CDC, 2008).

A primeira epidemia, documentada clínica e laboratorialmente, no Brasil ocorreu em 1981-1982, em Boa Vista-RR, causada pelos sorotipos 1 e 4. Em 1986, ocorreram epidemias, atingindo o Rio de Janeiro e algumas capitais da região nordeste. Desde então, a dengue vem ocorrendo no Brasil de forma continuada, intercalando-se com a ocorrência de epidemias, geralmente associadas com a introdução de novos sorotipos em áreas anteriormente indenes ou alteração do sorotipo circulante. Na epidemia de 1986, identificou-se a ocorrência da circulação do sorotipo DENV-1, inicialmente no estado do Rio de Janeiro, disseminando-se, a seguir, para outros seis estados até 1990. Em 1990, foi identificada circulação de um novo sorotipo, o DENV-2, também no estado do Rio de Janeiro. Entre os anos de 1990 e 2000, várias epidemias foram registradas. A circulação do DENV-3 foi identificada, pela primeira vez, em dezembro de 2000, no estado do Rio de Janeiro e, posteriormente, no estado de Roraima, em novembro de 2001. Em 2002, foi observada a maior incidência da doença, refletindo a introdução do sorotipo 3. E em 2004, 23 dos 27 estados do país já apresentaram a circulação simultânea dos sorotipos 1, 2 e 3 do *Dengue virus* (Nogueira *et al.*, 2007; Ministério da Saúde, 2009).

No Brasil, a Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde registrou até a semana epidemiológica 26, que corresponde ao período de 27 de junho a 03 de julho de 2010, cerca de 482.284 casos de dengue. Nesse cenário, a distribuição dos casos de dengue de acordo com as regiões do país é a seguinte: Sudeste com 51,2%, Centro-Oeste com 23,7%, Norte com 8,5%, Nordeste com 11,3% e Sul com 5,3%. Os estados com maior incidência da doença durante o período foram o Acre (3.619,5 casos por 100 mil habitantes), Mato Grosso do Sul (2.521,1 casos por 100 mil habitantes), Goiás (1.353,1 casos por 100 mil habitantes) Rondônia (1.256,4 casos por 100 mil habitantes), Roraima (1.146,9 casos por 100.000 habitantes) e Mato Grosso (1.095,5 casos por 100 mil habitantes). Os Estados de São Paulo e Minas Gerais também se destacam pela incidência de 453 e 912,4 casos por 100 mil

habitantes, respectivamente. Esses oito estados concentram 75% dos casos no Brasil nas 26 primeiras semanas epidemiológicas do ano de 2010. Em Minas Gerais, 42% dos casos se concentram em quatro municípios: Belo Horizonte (46.692; 26,6%), Betim (16.682; 9,1%), Montes Claros (6.770; 3,7%) e Contagem (4.745; 2,6%) (Ministério da Saúde, 2010).

Até a presente data, foram notificados 9.688 casos graves de dengue, sendo 2.271 casos de Febre Hemorrágica do Dengue/Síndrome do Choque do Dengue e 7.417 casos de dengue com complicações. Observa-se um aumento de 30,6% em relação ao mesmo período do ano anterior, quando foram confirmados 7.180 casos graves. Com relação aos óbitos, houve um aumento de 67,6% em relação ao mesmo período de 2009 (Ministério da Saúde, 2010).

#### 1.1.4 Manifestações Clínicas

A infecção pelo *Dengue virus* pode apresentar formas assintomáticas ou dois quadros clínicos diferentes: Febre do Dengue (FD), também conhecida como dengue clássico, e a Febre Hemorrágica do Dengue/Síndrome do Choque por Dengue (FHD/SCD), que é a forma hemorrágica com extravasamento de líquidos (Guzmán & Kouri, 2003).

Os sintomas gerais são: febre, cefaléia e mal-estar geral que surgem após o período de incubação de quatro a sete dias, em média, após a picada pelo mosquito. Durante esse período febril agudo, que pode variar de 2 a 10 dias, o vírus pode circular no sangue periférico. Nessa fase da doença, é muito difícil diferenciar as formas clínicas da dengue, e muitas vezes a dengue de outras infecções, principalmente virais (Gubler, 1998).

A Febre do Dengue, em sua forma clássica, é uma doença de evolução benigna caracterizada por febre alta (39°C a 40°C), de início abrupto, seguida de cefaléia (dor de cabeça), mialgia (dor nos músculos), artralgia (dor nas articulações), náuseas, vômitos, fraqueza e pequenas manifestações hemorrágicas. As mialgias são conseqüentes, em parte, à multiplicação viral no próprio tecido muscular e acometem inclusive os músculos oculomotores, sendo responsáveis pela cefaléia retro-orbitária que muitas pessoas apresentam (Figueiredo, 1999; Halstead, 2007). A febre do dengue geralmente é autolimitante e dura de 3 a 7 dias mas o paciente pode sentir mal-estar por até 10 dias. Com o desaparecimento da febre, há regressão dos sintomas que correspondem com o término do período de viremia (Gubler, 1998).

Alguns aspectos clínicos dependem da idade do paciente. As crianças e os adolescentes apresentam, normalmente, febre inespecífica o que dificilmente a diferencia de

outras doenças. Os casos mais graves ocorrem nos adultos e são caracterizadas por um aumento súbito da temperatura ( $\geq 39^{\circ}\text{C}$ ) que persiste por 5 a 6 dias, retornando, algumas vezes, à temperatura normal no meio do período febril (Mairuhu *et al.*, 2004).

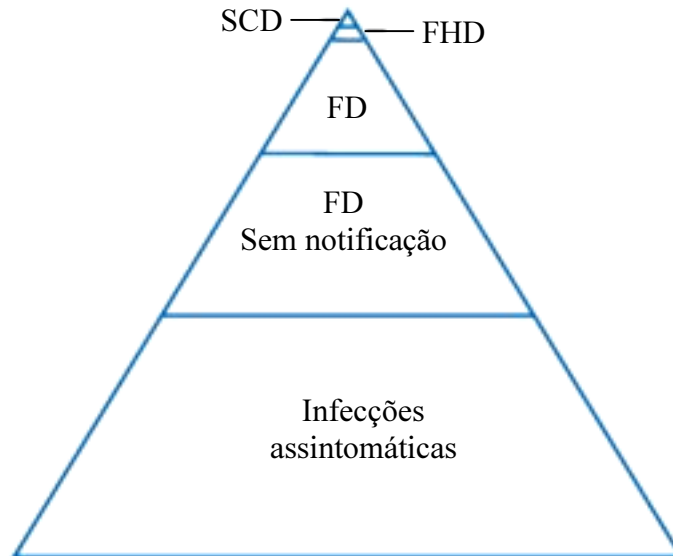
A prova do laço é um procedimento utilizado para diagnóstico da dengue, onde é mantida uma pressão elevada sobre o membro superior na tentativa de verificar a fragilidade dos capilares. Ela é positiva quando aparecem mais de vinte petéquias em uma determinada área da pele e pode ser encontrada em mais de 1/3 dos pacientes com febre clássica (Rigau-Pérez *et al.*, 1998).

A Febre Hemorrágica do Dengue inicia-se como uma febre indiferenciada nas crianças, ou associada, segundo a idade, a graus variáveis de mialgias, artralgias, cefaléia, dor retroorbitária, exantema e manifestações digestivas como vômitos e dor abdominal. O período de incubação da FHD é semelhante ao da FD ocorrendo de 2 a 7 dias. Em qualquer momento da doença, é possível a prova do laço tornar-se positiva ou aparecerem hemorragias espontâneas. O período mais crítico da FHD ocorre quando a febre regride para níveis normais, onde, neste ponto, o paciente pode se recuperar ou progredir para a fase de extravasamento de plasma. Instalam-se os derrames em cavidades serosas como ascite ou hidrotórax, as manifestações hemorrágicas aparecem ou pioram e os doentes apresentaram hipotensão e choque (Revisão em Torres, 2005).

A Síndrome do Choque do Dengue é a mais grave manifestação da FHD e foi definida pela Organização Mundial de Saúde como a FHD acrescida de sinais de insuficiência circulatória. Ocorre quando o extravasamento de líquidos para o interstício causa queda na pressão arterial, seguida de hemoconcentração resultando em um choque hipovolêmico onde, sem tratamento adequado, pode levar à morte (Halstead, 2007). Os principais sinais de advertência para o quadro de choque são: dor abdominal, vômitos persistentes, agitação e uma súbita mudança da febre para hipotermia com sudorese e prostração (Rigau-Pérez *et al.*, 1998).

As manifestações clínicas da dengue têm sido descritas como uma pirâmide onde: na base podemos encontrar as infecções assintomáticas correspondendo de 50-90% de todos os casos. O meio da pirâmide está representando os casos sintomáticos não relatados e os relatados que correspondem a menos de 10%. A doença mais grave, FHD/SCD, é encontrada no topo da pirâmide e sua incidência varia significativamente entre as infecções primárias e secundárias (Figura 2). A infecção secundária do dengue ocorre quando uma pessoa previamente infectada com um sorotipo é exposta à outro sorotipo diferente e isto tem sido

relatado sendo com o fator de risco mais importante para o desenvolvimento da forma mais grave da dengue (Kyle & Harris, 2008).



**Figura 2:** Pirâmide que representa as manifestações clínicas da dengue.

Fonte: Adaptado de Kyle JL e Harris E, 2008.

### 1.1.5 Diagnóstico

Na Febre do Dengue, por causa da presença da febre e mal-estar, os pacientes procuram atenção médica dentro de dois dias após o início dos sintomas. Neste estágio, o diagnóstico é possível apenas pela detecção do RNA viral ou pela presença de proteínas do dengue no sangue. O diagnóstico sorológico não é possível até passar o período febril, porque nesta fase não são detectados os anticorpos IgM e IgG no sangue (Guzmán & Kouri, 2004; Halstead, 2007).

O isolamento viral pode ser realizado por inoculação em culturas celulares como células C6/36, oriundas de *A. albopictus*. A observação da alteração morfológica (efeito citopático) faz-se suspeitar da presença viral, contudo este achado não é constante. A detecção de anticorpos específicos no soro do paciente (o ELISA de captura de IgM - MAC-ELISA) é um exame útil para a vigilância, porque requer somente uma amostra de soro na maioria dos casos, além de ser simples e rápido (Gubler, 1998 e Guzmán & Kouri, 2004).

Por causa do desejo dos médicos e pacientes por um diagnóstico no período febril, existe uma necessidade em aperfeiçoar e simplificar os métodos de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (Halstead, 2007). A transcrição reversa – reação em cadeia da polimerase

(RT-PCR) pode ser usada para identificar o sorotipo específico. É um método rápido, sensível e específico que permite a detecção do vírus em pequenas quantidades do soro do paciente durante o período de viremia. São usados oligonucleotídeos iniciadores (“primers”) específicos para os sorotipos do *Dengue virus* (Lanciotti *et al.*, 1992; Malavige *et al.*, 2004).

#### 1.1.6 Tratamento

Não existe até o momento, uma droga antiviral em uso clínico, que tenha ação efetiva contra o *Dengue virus*. Nos casos benignos, como a Febre do Dengue, a medicação administrada é apenas sintomática com o uso de analgésicos e antitérmicos. Contudo, devem ser evitados os salicilatos, que podem favorecer o aparecimento de manifestações hemorrágicas e a acidose.

Os pacientes com Febre Hemorrágica do Dengue devem ser observados cuidadosamente para a identificação dos primeiros sinais de choque. O período crítico para o aparecimento destes sintomas ocorre após o terceiro dia de doença. Em casos menos graves, quando os vômitos ameaçam causar desidratação ou acidose, ou houver sinais de hemoconcentração, a reidratação deve ser realizada em nível ambulatorial (Figueiredo & Fonseca, 2004).

#### 1.1.7 Controle e prevenção

Atualmente, muitas doenças transmitidas por vírus contam com vacinas eficazes, como a da febre amarela, ou com medicamentos geralmente eficientes, como no caso da malária. Todavia, o controle do vetor ainda é imprescindível para se prevenir diversas doenças, entre as quais a dengue é o melhor exemplo; a qual é parte integrante de muitos programas de saúde.

O controle dos vetores não pode depender de um só método, ele deve dispor de várias alternativas, adequadas à realidade local, que permitam sua execução de forma integrada e seletiva. Os componentes do controle incluem a vigilância, o controle biológico, o controle químico com uso de inseticidas e repelentes, as armadilhas e o manejo da resistência à inseticidas (Braga, 2007).

Com relação à dengue, são bem conhecidas sua etiologia e seus mecanismos de transmissão. O seu espectro clínico é muito amplo, variando de formas assintomáticas ou oligosintomáticas até as formas graves e letais. Por outro lado, apesar de muito pesquisada,

ainda não está disponível uma vacina preventiva e eficaz. Da mesma forma, não se pode contar ainda com uma quimioprofilaxia efetiva. No momento, o único elo vulnerável na cadeia de transmissão do dengue é o vetor (Tauil, 2002).

## 1.2 *Dengue virus*

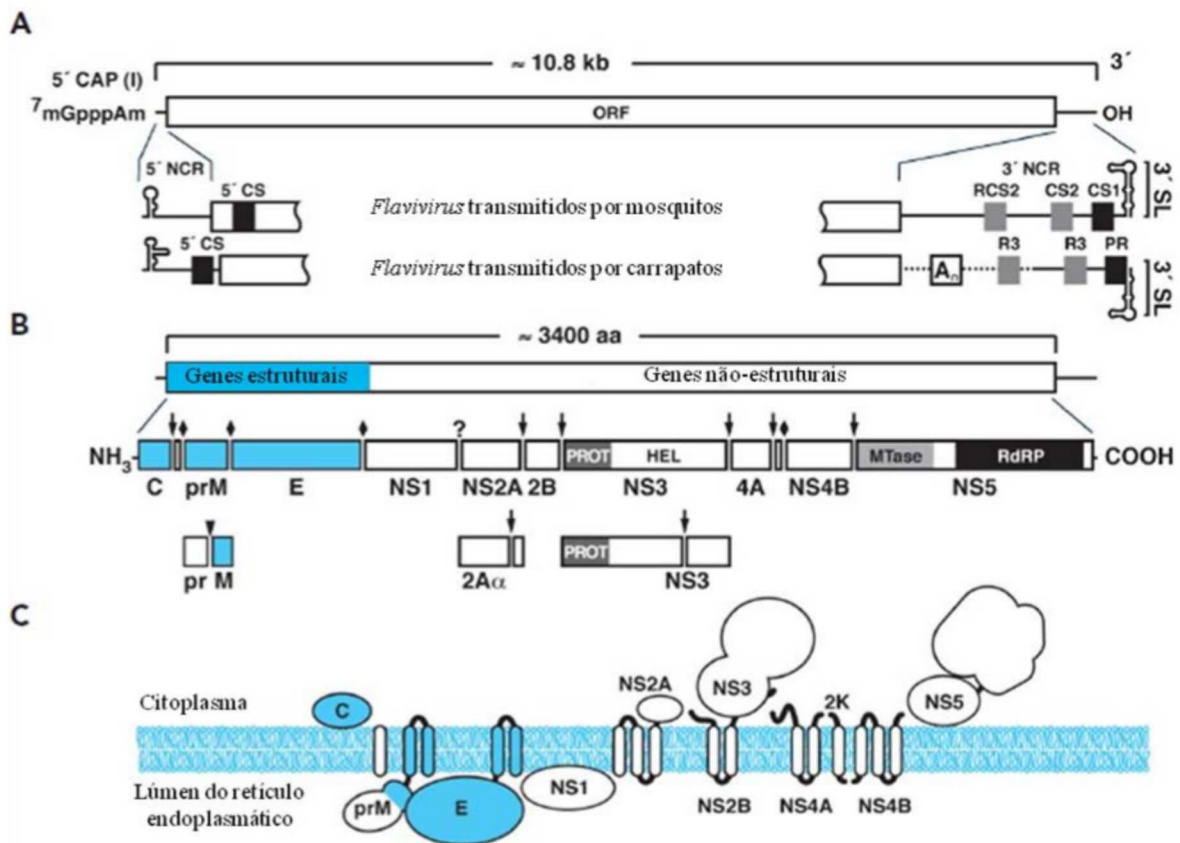
O nome *Flavivirus* é derivado da palavra latina *Favus* que significa amarelo, e corresponde à icterícia causada pela febre amarela em pessoas contaminadas. A família Flaviviridae consiste de três gêneros: *Flavivirus*, *Pestivirus* e *Hepacivirus*. O gênero *Flavivirus* abrange aproximadamente 70 vírus, incluindo o *Dengue virus*, o vírus da encefalite japonesa, o vírus da encefalite transmitida por carrapatos, o vírus do Oeste do Nilo e o vírus da febre amarela. Os flavivirus são transmitidos por membros do Filo Arthropoda, principalmente mosquitos (Mukhopadhyay *et al.*, 2005). O *Dengue virus* é classificado em quatro sorotipos antigenicamente distintos, os quais podem ainda apresentar variações genóticas. O DENV-2, por exemplo, é filogeneticamente agrupado em 4 ou 5 genótipos, sendo que dois são os mais usuais: o genótipo Americano e o do Sudeste Asiático. O Americano foi endêmico no Hemisfério Ocidental e também em ilhas do Pacífico Sul por cerca de cinco décadas, entretanto, atualmente esse genótipo só é encontrado no Norte do México e Peru. Em contraste, o genótipo do Sudeste Asiático foi detectado a princípio nas Américas, durante uma epidemia de FHD em Cuba em 1981 e vem substituindo o genótipo Americano (Rico-Hesse *et al.* 1997).

Os *Dengue virus* são vírus de RNA envelopados, esféricos, que medem de 40 a 60 nm de diâmetro. Possuem um nucleocapsídeo poliédrico coberto com um envelope lipídico derivado da célula do hospedeiro, e possui pequenas espículas que se projetam do mesmo. O genoma é formado por uma molécula de RNA de fita simples com sentido positivo. Assim como os vírus de RNA senso positivo, o genoma do DENV é considerado um material infeccioso, pois funciona como RNA mensageiro.

O RNA viral é composto por aproximadamente 11.000 nucleotídeos e possui uma pequena região 5' capeada e não codificadora (NCR), uma janela aberta de leitura (ORF) e uma região não codificadora terminal 3', que é desprovida de cadeia poli-A, o que o diferencia dos RNAs mensageiros celulares. A ORF codifica uma poliproteína de 3.400 aminoácidos que é clivada co- e pós-traducionalmente por proteases virais e da célula hospedeira para gerar um conjunto de 3 proteínas estruturais e das 7 não-estruturais. As

proteínas estruturais codificadas pelo genoma são: do capsídeo (C), de membrana (M, expressa por prM, precursora da proteína de membrana que é proteoliticamente clivada por uma protease celular para formar proteína M em vírions maduros) e do envelope (E), além de sete proteínas não-estruturais, NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 essenciais na replicação viral mas cujas funções não estão totalmente identificadas (Lindenbach *et al.*, 2007; Chambers *et al.*, 1990; Mukhopadhyay *et al.*, 2005).

A proteína C é o primeiro polipetídeo viral sintetizado e é capaz de neutralizar a molécula de RNA viral com a qual está associada, mas não é capaz de induzir anticorpos neutralizantes. A formação da proteína M a partir de um precursor (proteína prM) parece ser um fato crucial na morfogênese do vírus. A função desta proteína não está clara, mas tem por efeito um aumento da infectividade viral e uma reorganização da estrutura da superfície do vírus que permite a fusão à célula (Després, 1993). A glicoproteína E está associada a funções biológicas tais como a união a receptores, a hemaglutinação dos eritrócitos, a indução de anticorpos neutralizantes na resposta imunológica protetora, a fusão dos vírus com a membrana endossômica e o acoplamento viral (Chang, 1997). A figura 3 ilustra a estrutura e a expressão do genoma dos *Flavivirus*.



**Figura 3:** Estrutura e expressão do genoma dos *Flavivirus*.

**A.** Estrutura do genoma e elementos do RNA. O genoma apresenta uma pequena região 5' capeada e não codificadora, uma janela aberta de leitura (*open reading frame*, ORF) contendo mais de 10.000 nucleotídeos, uma região não codificadora terminal 3' (desprovida de cadeia poli-A) e as regiões não codificadoras 5' e 3' (NCR). A janela aberta de leitura codifica proteínas estruturais e não estruturais. **B.** Processamento da poliproteína e clivagem dos produtos. As caixas abaixo do genoma indicam os precursores e as proteínas geradas pela cascata proteolítica. Proteínas estruturais estão na cor azul e as não estruturais (NS) estão na cor branca. Sítios de clivagem ( $\blacklozenge$ , serino proeases virais ( $\blacktriangledown$ ), furinas ou proteases relacionadas ( $\blacktriangledown$ ) e proteases não conhecidas (?) estão indicadas. **C.** A proposta de topologia dos produtos de clivagem da poliproteína com a indicação do retículo endoplasmático e citoplasma. As áreas das proteínas são proporcionais ao número de aminoácidos e o arranjo segue a ordem (da esquerda para a direita) do aparecimento da poliproteína. Proteínas estruturais maduras estão na cor azul e os seguimentos M e E que atravessam a membrana C-terminal estão indicados.

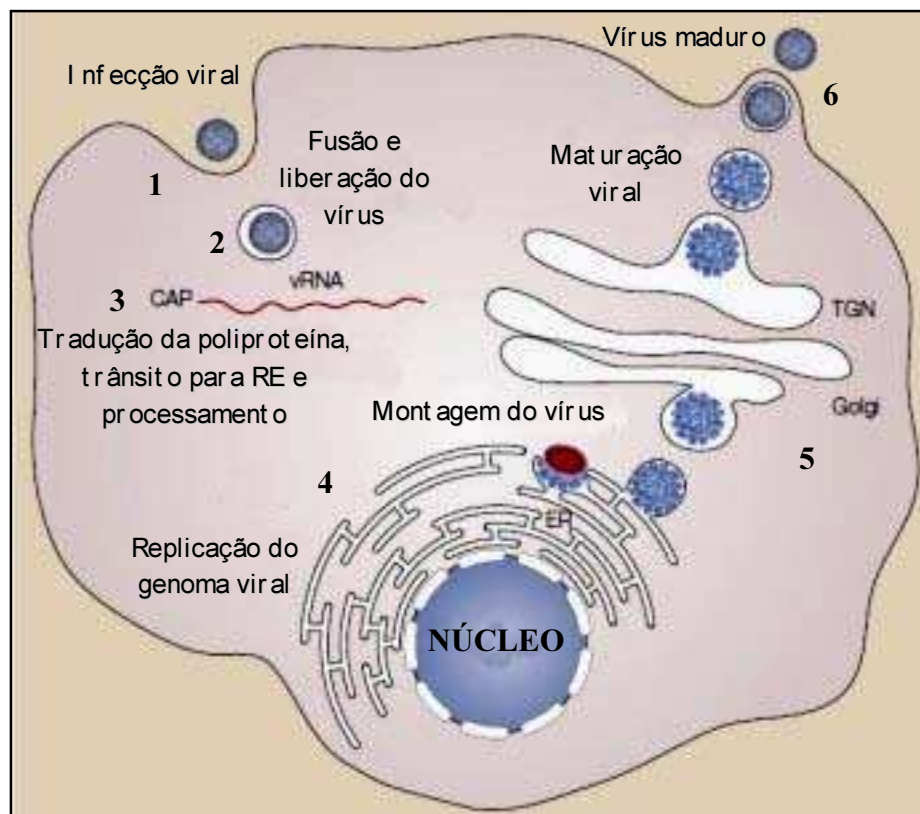
**Fonte:** Adaptado de Lindenbach BD *et al.*, 2007

### 1.2.1 Ciclo de multiplicação

Os *flavivirus* podem se replicar em uma variedade de células, de diferentes tecidos, dependendo do hospedeiro. O ciclo de replicação dos *Flavivirus* (Figura 4) se inicia quando os vírus penetram na célula através de endocitose mediada por receptor (1). O ambiente ácido do endossoma inicia um processo irreversível de trimerização da proteína E (envelope), o que resulta na fusão das membranas do endossoma e do vírus (2). Após a fusão, o nucleocapsídeo viral é liberado no citoplasma, o RNA e o capsídeo protéico se dissociam e o processo de



replicação viral e a montagem da partícula é iniciado. O genoma viral liberado no citoplasma vai ser traduzido em uma série de proteínas virais e servir de molde durante a replicação do RNA (3). É então sintetizada uma fita de RNA sentido negativo que serve como molde para a produção de fitas de RNA sentido positivo. A replicação do genoma ocorre nas membranas intracelulares e a partícula imatura é formada na luz do retículo endoplasmático (RE). A poliproteína viral é sintetizada em associação com o RE e posteriormente é processada em três proteínas virais estruturais: proteína C, prM e E e sete não-estruturais (4). Estas partículas não infecciosas recém sintetizadas são transportadas para o Complexo de Golgi (5). Nele ocorre a clivagem da prM criando uma partícula madura e infecciosa, que é então liberada por exocitose (6) (Mukhopadhyay *et al.*, 2005).



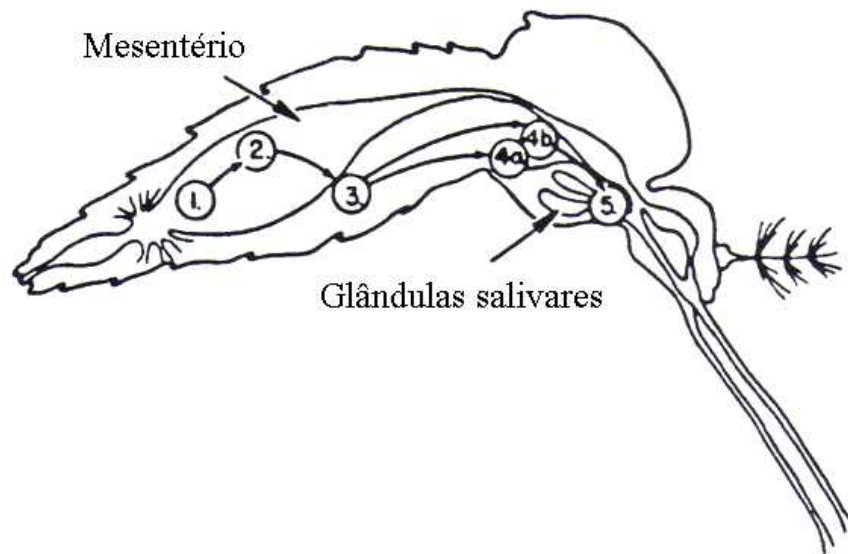
**Figura 4:** Ciclo de replicação dos *Flavivirus*.

**Fonte:** Adaptado de Mukhopadhyay S *et al.*, 2005

### 1.2.2 Multiplicação do *Dengue virus* no vetor

Os mosquitos adquirem o *Dengue virus* (Figura 5) após ingestão de sangue contaminado do hospedeiro vertebrado (1). As partículas virais se infectam e se replicam nas células epiteliais do intestino médio do mosquito (2). Após estabelecer a infecção neste órgão,

deixam o intestino (3) e passam para a hemocele podendo alcançar as glândulas salivares através da corrente hemolinfática (4b) ou após infectar os órgãos secundários como os ovários e o corpo gorduroso (4a). Por fim, os vírus são liberados das células epiteliais das glândulas salivares e são transmitidos juntamente com a saliva para um novo hospedeiro vertebrado através do repasto sanguíneo (5) (Woodring *et al.*, 1996; Black IV *et al.*, 2002; Gubler *et al.*, 2007).



**Figura 5:** Infecção do *Dengue virus* no mosquito vetor.  
**Fonte:** Adaptado de Gubler DJ *et al.*, 2007

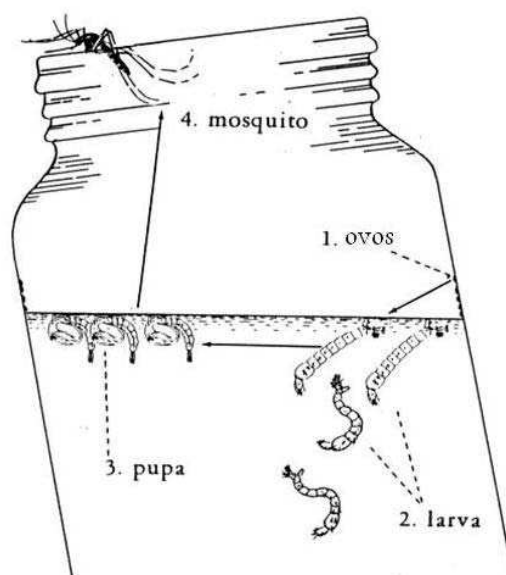
O período de incubação extrínseco (PIE), que vai desde o repasto infectante até a transmissão do vírus pela picada do mosquito dura em média 8-12 dias (Gubler, 1998). O PIE é dependente da amostra viral, do título viral e da quantidade de sangue que o inseto se alimenta (Halstead, 2008). Além disso, os fatores ambientais como a temperatura, a umidade e a competência vetorial podem influenciar na disseminação do vírus para as glândulas salivares do mosquito (Black IV *et al.*, 2002).

A competência vetorial é a habilidade intrínseca do vetor de transmitir o agente biológico da doença. Ela inclui a susceptibilidade à infecção, a reprodução ou desenvolvimento do patógeno, a duração do período de incubação extrínseco e a eficiência da transmissão (Beerntsen *et al.*, 2000). A competência vetorial para os arbovírus está associada à várias barreiras anatômicas que existem no inseto, as quais devem ser ultrapassadas pelos vírus para se estabelecer a infecção. Essas barreiras são classificadas como: a barreira de infecção do intestino médio, a barreira de escape do intestino médio e a barreira da glândula salivar (Black IV *et al.*, 2002).

### 1.3 Aspectos gerais da biologia do *A. aegypti*(Linnaeus, 1762) e do *A. albopictus* (Skuse, 1894)

Os mosquitos *A. aegypti* e *A. albopictus* pertencem à ordem *Diptera*, subordem *Nematocera*, família *Culicidae*, subfamília *Culicinae*, tribo *Aedini*, Gênero *Aedes*, Subgênero *Stegomyia* (Consoli & Oliveira, 1994).

Os Dípteros se desenvolvem através de metamorfose completa (holometabolía), e o ciclo de vida compreende quatro fases: ovo, larva (4 estádios larvários), pupa e adulto. Assim que os ovos entram em contato com a água, ocorre a eclosão das larvas. A larva passa por quatro estádios (L1, L2, L3 e L4) e sua duração depende da temperatura, da disponibilidade de alimento e da densidade larvária no criadouro. A fase larvária corresponde ao período de alimentação e de crescimento. Após o quarto estádio, a larva passa à fase pupal, durante a qual não se alimenta e sofre a metamorfose para a fase adulta (Consoli & Oliveira, 1994; Forattine, 2002) (Figura 6).



**Figura 6:** Ciclo de vida dos culicídeos. O desenho mostra os quatro estádios de desenvolvimento: 1 - ovo, 2 – larva (4 estágios larvares), 3 - pupa, 4 - mosquito adulto.

O tempo médio de vida do mosquito adulto é de 30 dias e a cada oviposição, a fêmea coloca em torno de 50 a 200 ovos (Gadelha & Toda, 1985). Ela é capaz de realizar inúmeras posturas no decorrer de sua vida, já que copula apenas uma vez com o macho, armazenando os espermatozoides em sua spermateca. Este órgão é utilizado para o armazenamento de esperma, a partir da inseminação até antes que os ovos estejam fertilizados. Assim que o ciclo

gonadotrófico (amadurecimento dos ovos) é completo, a fêmea está apta para a postura. Os ovos são geralmente depositados em paredes internas e úmidas dos locais onde, após um rápido desenvolvimento embrionário, são capazes de se manter viáveis por longos períodos de tempo (Consoli & Oliveira, 1994).

O *A. 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 seu dorso, que pode ser observado a olho nu. As 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 patas, que apresentam anéis brancos contrastando com a sua cor escura (Gadelha & Toda, 1985 e Rey, 2001) (Figura 7).



**Figura 7:** *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*.

O *A. aegypti*, que é originário da África, é o principal vetor da dengue e da febre amarela urbana (Paupy *et al.*, 2009). 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 sendo um dos principais obstáculos para o controle do *A. aegypti*, pois é ela que possibilita a dispersão passiva da espécie (Eiras, 2005). Já a dispersão ativa dos adultos é reduzida, sendo a sua autonomia de voo de aproximadamente 100 metros (Gadelha & Toda, 1985).

As fêmeas de *A. aegypti* são preferencialmente antropofílicas, apresentam hábito alimentar diurno, intra e peridomiciliar, com picos pré-crepusculares. Após a realização do

repasto sanguíneo (hematofagia), as fêmeas buscam os sítios para oviposição onde seus ovos são postos isoladamente nas paredes internas dos recipientes, próximos a lâminas d'água, que servirão de criadouros para o desenvolvimento de suas formas imaturas (quatro estádios larvais e pupa). Em geral os criadouros colonizados pelo *A. aegypti*, por ser uma espécie bastante domiciliada, são artificiais preenchidos por águas pluviais como os pneus, latas, garrafas, calhas, pratos de plantas domésticas e de cemitérios ou aqueles utilizados para o armazenamento de água, para o uso doméstico, todos situados nas proximidades das 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 *Dengue virus*, especialmente por causa do seu comportamento hematófago intermitente, podendo assim, se alimentar em mais de um hospedeiro durante um único ciclo gonadotrófico (Forattini, 1962 e Mackenzie *et al.*, 2004).

O *A. albopictus*, originário da Ásia, é o outro vetor do dengue no Sudeste Asiático e existente no Brasil desde 1986, onde foi identificado pela primeira vez no Rio de Janeiro (Forattini, 1986, Paupy *et al.*, 2009). Este mosquito também conhecido como “tigre asiático” pode ser encontrado na região da Ásia temperada e tropical, Europa, Norte e Sul da América, África e em alguns locais do Pacífico e Oceano Índico. O *A. albopictus* é um mosquito de cor negra, com uma faixa estreita, longitudinal, mediana, branco-prateada, abdômen com faixas basais brancas e pernas marcadas de branco e preto (Eiras, 2005) (Figura 7). Como é encontrado também em ambiente silvestre, não é passível, portanto, de eliminação pelos programas de controle urbanos. É um vetor secundário do dengue, uma vez que não é muito doméstico e nem muito antropofílico. Assim, mesmo que o *A. aegypti* seja eliminado, ainda existe, o risco de transmissão do dengue pelo *A. albopictus* (Tauil, 2002).

Em algumas áreas da Indonésia, têm ocorridos surtos de dengue com frequência, nas partes rurais do país, onde o *A. albopictus* é a espécie predominante. Estudos sobre a transmissão do dengue em vilas da Tailândia indicaram o importante papel do *A. albopictus* na transmissão da doença (Braga, 2007). Na Ásia, este mosquito tem um papel importante na transmissão da Encefalite Japonesa e *Dirofilaria immitis* (Hawley, 1998).

Nas Américas, o *A. albopictus* ainda não foi incriminado de maneira consistente como vetor do dengue, embora alguns estudos tenham encontrado larvas naturalmente infectadas (Serufo *et al.*, 1993). Em 1995, esse vetor foi encontrado pela primeira vez na América, naturalmente infectado com o *Dengue virus*, durante um surto da doença ocorrido no México (Ibañez-Bernal, 1997).

Os locais preferidos para as posturas têm, como características comuns, a superfície rugosa e o ambiente escuro presentes em recipientes naturais e artificiais. Os recipientes naturais correspondem a ocos de árvores, tocos de bambus e bromélias. E os artificiais correspondem, preferencialmente, aos pneus (Forattini, 2002).

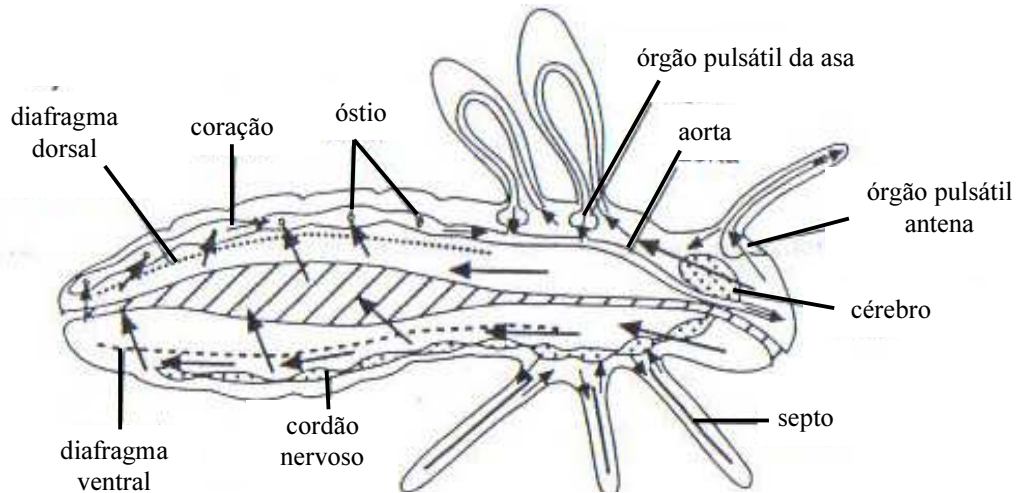
As fêmeas de *A. albopictus*, frequentemente depositam seus ovos em pequenos grupos, distribuídos em vários locais diferentes, o que facilita a dispersão da espécie. Nos demais aspectos da biologia são muito semelhante ao *A. aegypti*. Ressaltamos, resumidamente, que o *A. albopictus* é diurno, muito eclético quanto ao hospedeiro, sendo o homem e as aves suas vítimas mais frequentes; comparece muito ao domicílio humano, mas é muito mais comum no peridomicílio; seus ovos são resistentes à dessecação e sua densidade é diretamente influenciada pelas chuvas. É, porém, mais tolerante às temperaturas mais baixas (ex.: Norte da Ásia), enquanto o *A. aegypti* as evita. Devemos enfatizar que este mosquito pode tornar-se uma "ponte" entre os ciclos silvestres e urbanos da febre amarela e de outros arbovírus no Brasil, considerando-se a sua facilidade de frequentar, igualmente, os ambientes silvestres, rurais, suburbanos e urbanos (Consoli & Oliveira, 1994; Braga, 2007; Paupy *et al.*, 2009).

#### 1.4 Sistema circulatório dos insetos

Os insetos possuem 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 e 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 (diafragma 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 e Ruppert & Barnes, 1996) (Figura 8).



**Figura 8:** Sistema circulatório dos insetos. As setas indicam o sentido da circulação da hemolinfa.  
**Fonte:** Adaptado de Chapman RF, 1998.

### 1.5 Mecanismos de defesa dos insetos

Alguns animais multicelulares desenvolveram ao longo da evolução, formas de se protegerem contra as infecções de organismos, utilizando dois sistemas de defesa conhecidos como imunidade inata e adquirida. A imunidade inata necessita de fatores codificados da linhagem germicida para o reconhecimento e morte de invasores estranhos. Entretanto, a imunidade adquirida envolve a produção de moléculas efetoras que reconhecem os antígenos específicos que permitem ao organismo desenvolver uma memória imunológica (Fearon, 1997; Lavine & Strand, 2002; Jiravanichpaisal *et al.*, 2006; Strand, 2008).

O sistema de defesa dos invertebrados, em geral, se distingue fundamentalmente daquele dos vertebrados pela falta de imunoglobulinas, que são moléculas que apresentam alta especificidade contra os invasores. Na falta da imunidade adaptativa, a resposta de defesa dos invertebrados se apóia sobre um sistema de defesa complexo que envolve reações celulares e humorais coordenadas (Karp, 1990 e Strand, 2008). No entanto, respostas semelhantes à memória imunológica têm sido descritas em invertebrados como um fenômeno chamado de “immune priming” (Schmid-Hempel, 2005).

Um recente trabalho publicado na revista Science relata que quando ocorre uma reinfeção do *Anopheles gambiae* com o *Plasmodium falciparum*, o sistema imunológico do mosquito responde de forma exacerbada a essa segunda infecção diminuindo a quantidade de oocistos presentes no epitélio do intestino. A resposta imune também foi potencializada após a transferência da hemolinfa de mosquitos infectados para mosquitos saudáveis que depois foram submetidos à infecção, o que demonstrou o mesmo padrão de resposta. Essa “vacinação” gerou um aumento no número de hemócitos circulantes e uma diferenciação destas células. Possivelmente, fatores de diferenciação produzidos pelos hemócitos são liberados na hemolinfa dos mosquitos infectados que, quando transferidas para outro mosquito induzem a diferenciação dos hemócitos conferindo uma imunidade. Os autores desse trabalho concluem que o sistema imune do mosquito pode “lembrar-se” da infecção inicial e poder, desta forma, montar uma resposta mais eficiente e duradoura como se gerassem células de memória (Rodrigues *et al.*, 2010).

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 a 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 celulares e humorais, 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 efeito didático.

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 a composição química da cutícula representam as principais barreiras de defesa. Ela apresenta componentes antimicrobianos como: proteínas, lipídios, hidrocarbonetos, dióxido de enxofre, 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 diretamente envolvida na proteção contra os danos mecânicos, mas um dos principais papéis atribuídos a ela é a proteção contra os agentes patogênicos e toxinas; por promover uma barreira à transmissão e subsequente desenvolvimento desses agentes que penetram por via oral (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 & Richards (1977) a ingestão da alimentação sangüínea, assim como, a distensão do estômago por alimentos livres de proteínas e o aumento do lúmen do estômago estimulam a síntese da matriz peritrófica. É a partir da formação da matriz peritrófica que o intestino médio dos mosquitos passa a ser protegido dos danos mecânicos, das ações de patógenos e das toxinas.

A armadura cibarial ou cibário é um obstáculo físico dos insetos que funciona como um filtro, podendo impedir a entrada de microorganismos 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.

### 1.5.1 Hemolinfa

A hemolinfa é o único tecido fluido extracelular no corpo dos insetos. É composto pelo componente líquido, plasma linfático; e por células incolores suspensas, 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, o 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 e Barracco, 1982).

O papel da hemolinfa no transporte dos gases respiratórios é pouco relevante e 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 dos 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 *et al.* (1989) mencionaram ainda outras funções da hemolinfa tais como: lubrificante, armazenamento, proteção, 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 e Chapman, 1998). A hemolinfa também participa da resposta imune humoral como será descrito em outro parágrafo desta introdução.

### 1.5.2 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 & Stoloffolano Jr (1972), percorrem quase todas as regiões do corpo dos insetos, devido aos 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 de uma mesma espécie o número pode variar ao longo do desenvolvimento do inseto na fase larval, nas ecdises e nos adultos e em resposta ao stress, ferimentos e infecções (Lackie, 1988; Ratcliffe *et al.*, 1985; Brayner *et al.*, 2007).

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

### 1.5.2.1 *Origem dos hemócitos*

A população de hemócitos circulantes surge durante dois estágios no desenvolvimento do inseto. A primeira população de hemócitos é produzida no mesoderma anterior durante a embriogênese, enquanto que, a segunda população é produzida durante o estágio larval ou ninfal derivado do órgão hematopoiético ou por divisões celulares. O conhecimento atual sobre como a hematopoiese é regulada deriva dos estudos com *Drosophila* (Lanot *et al.*, 2001 e Strand, 2008). 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).

O órgão hematopoiético em *Drosophila* é chamado de gânglio linfático, o qual se forma bilateralmente ao longo da parte anterior da veia dorsal durante a embriogênese (Jung *et al.*, 2005).

### 1.5.2.2 *Classificação dos hemócitos*

Os diferentes tipos de hemócitos têm sido descritos na literatura, porém têm sido difícil uma classificação exata, porque as 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 à fresco em contraste de fase. Para o estudo da microscopia de luz a maioria dos autores prefere o contraste de fase devido à sua rapidez e a eficiência, além da vantagem de permitir a observação de células vivas (Jones, 1979 e 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 (Willott *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 quantidade e a fragilidade destas células, dependendo dos métodos utilizados para seu estudo, além dos parâmetros utilizados em sua classificação (Gupta, 1985 e Strand, 2008).

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) as 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 às 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 as ordens mais estudadas que são: Lepidoptera, Himenoptera, Coleoptera e Diptera (Chapman, 1998).

## 1.6 Resposta imune humoral

A defesa humoral é representada principalmente pela ação de proteínas e peptídeos antimicrobianos, a ativação de uma complexa cascata proteolítica que leva à coagulação, melanização da hemolinfa e à 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, 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). Os 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 as bactérias gram-positivas. Peptídeos antifúngicos específicos foram identificados em *Drosophila* (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 os grilos, as baratas e os gafanhotos, não sintetizam esses peptídeos antibacterianos. Na hemolinfa desses insetos, a atividade antimicrobiana é realizada principalmente pelas lisozimas, e estas estão presentes na hemolinfa de todas as espécies de insetos (Kanost, 1999).

No *A. aegypti*, após a invasão da hemocele por bactérias inicia-se a produção das defensinas e das cecropinas, peptídeos ativos contra as 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 e podem também ser ativados por precursores e liberados na hemolinfa por outros tecidos (Boman, 1998; Lowenberger, 2001; Lackie, 1988; Dimopoulos *et al.*, 2000; Bartholomay *et al.*, 2004; Irving *et al.*, 2005).

### 1.6.1 Importância das lectinas

Nos insetos, as lectinas são proteínas com alta afinidade por motivos de carboidratos e estão relacionadas a vários fenômenos de reconhecimento celular, incluindo adesão à hemócitos e microorganismos. Desempenham, portanto, um papel importante na imunidade dos artrópodes, funcionando como opsoninas ao se aderirem aos microorganismos invasores estimulando a fagocitose ou como receptores na membrana dos hemócitos. As lectinas também podem estimular os hemócitos a degranular, resultando na coagulação ou liberação dos componentes da cascata da profenoloxidase (Paskewitz & Christensen, 1996).

As lectinas têm sido detectadas na hemolinfa, no intestino e nas membranas celulares. São produzidas pelo corpo gorduroso e pelos hemócitos durante os processos infecciosos, injúrias ao tegumento e na degradação dos tecidos durante os estágios de desenvolvimento. É uma classe de glicoproteínas, que participa de muitos processos biológicos e especificamente,

se ligam à glicolípídios, glicoprotéínas ou polissacarídeos 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; Paskewitz & Christensen, 1996; 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 microorganismos 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. Em ninfas não desafiadas, as lectinas não são detectadas (Boucias & Pendland, 1993). Moléculas de lectinas na membrana dos hemócitos têm sido relatadas por vários pesquisadores (Bradley *et al.*, 1989 e 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).

As lectinas têm sido utilizadas na tentativa de marcar diferencialmente os hemócitos de algumas espécies de insetos (Mckenzie & Preston, 1992; Hypša & Grubhoffer, 1997; Hillyer & Christensen, 2002; Hillyer *et al.*, 2003a; Castillo *et al.*, 2006). O uso de anticorpos monoclonais (mAbs) para distinguir molecularmente as diferentes populações de hemócitos também são empregados para marcar hemócitos. Populações de hemócitos individuais de *Hyalophora cecropia*, *Manduca sexta* e *Pseudoplusia includens* podem ser distinguidos por uma variedade de características como ligação de anticorpos à superfície de membranas, citoplasma, inclusões citoplasmáticas e até mesmo no núcleo (Gillespie & Kanost, 1997). Alguns anticorpos monoclonais ligam-se aos mesmos tipos de hemócitos em diferentes espécies (Willott *et al.*, 1995) entretanto, outros exibem diferentes características de marcação (Ribeiro & Brehelin, 2006).

A coagulação da hemolinfa, fenômeno freqüentemente observado após um ferimento no exoesqueleto do inseto, está 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).

A fenoloxidase é uma enzima que catalisa 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 às infecções. A fenoloxidase é uma enzima bastante ativa e os produtos intermediários de sua ativação são tóxicos tanto para os microorganismos invasores bem 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, 2000 e Strand, 2008)

### 1.7 Resposta imune celular

Os hemócitos participam ativamente dos mecanismos de defesa dos insetos tais como: o reconhecimento, a fagocitose, a encapsulação, a coagulação, a formação de nódulos e a citotoxicidade. Elas ocorrem em combinação com as defesas humorais (Dunn, 1986 e 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 e Meyer-Fernandes Jr *et al.*, 2000).

Os hemócitos reconhecem uma variedade de objetos estranhos, pela interação direta dos receptores de superfície celular com as 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 e Brayner *et al.*, 2007).

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

### 1.7.1 Fagocitose

A fagocitose é considerada a resposta celular primária de defesa, em muitos insetos, que ocorre contra vírus, bactérias, protozoários, fungos, corpos apoptóticos ou material inerte particulado tanto *in vivo* como *in vitro*, sendo similar ao que ocorre em macrófagos de mamíferos (Lanot *et al.*, 2001; Lavine & Strand, 2002; Strand, 2008). Ela é evolutivamente conservada sendo um processo complexo baseado no reconhecimento, no englobamento e na destruição intracelular de patógenos (Blandin & Levashina, 2007). Entretanto, não é apenas uma resposta imune inata estabelecida contra microorganismos invasores mas, também um processo contra as células apoptóticas e debris que são gerados durante o desenvolvimento do inseto (Jiravanichpaisal *et al.*, 2006).

O reconhecimento do organismo invasor pode ocorrer de forma direta com a ligação do receptor com a superfície do patógeno, ou mediado via fatores de opsonização que marcam a partícula a ser fagocitada (Bayne, 1990). A fagocitose necessita da ação de filamentos de actina conectados por moléculas adaptadoras aos receptores de superfície celular que podem ser uma forma especializada de endocitose mediada por receptor. O processo inicia-se com a aderência de partículas na superfície dos hemócitos, provavelmente através da interação com as proteínas de membrana dos hemócitos. Este reconhecimento ocorre através de proteínas de reconhecimento padrão que funcionam como opsoninas, ligando a superfície do microorganismo a receptores presentes nos hemócitos. Esta aderência de uma partícula à superfície do hemócito estimula uma via de transdução de sinal que resulta na formação de pseudópodes que englobam a partícula. Quando a endocitose ocorre, a partícula ingerida é aprisionada numa vesícula intracelular conhecida como fagossomo. O fagossomo se funde com o lisossomo que contém enzimas que estão envolvidas na morte intracelular do patógeno. Entretanto, ainda é pouco conhecido o mecanismo usado para a morte de patógenos fagocitados em artrópodes (Stuart & Ezekowitz, 2005; Barillas-Mury *et al.*, 2005; Strand, 2008).

Os plasmatócitos são as principais células fagocíticas, que ao receberem sinais da presença de bactérias ou outro microorganismo, 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, 2000; Russo *et al.*, 2001). Um microorganismo quando fagocitado pode ser destruído ou se multiplicar no hemócito e provocar sua lise (Silva, 2002).

### 1.7.2 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 (Ratcliffe & Gagen, 1977).

Para haver a formação do nódulo, os granulócitos se autodestroem ou são destruídos por outras células. A degranulação descarrega na hemolinfa substâncias sinalizadoras que atraem os plasmatócitos para a região e aglutinam os microorganismos. 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. Para finalizar, este nódulo é removido da circulação (Miller *et al.*, 1994; Menezes & Mosig, 1999). A velocidade e a intensidade da formação desses nódulos variam entre os insetos e alguns podem ser eventualmente encapsulados.

A formação dos nódulos têm sido considerada como a principal resposta imune celular contra infecção bacteriana em insetos, já que resulta no isolamento de um grande número de bactérias. Os hemócitos envolvidos na formação de nódulos são os plasmatócitos e granulócitos (Dean *et al.*, 2004).

### 1.7.3 Encapsulação

Quando o corpo estranho é muito grande para ser fagocitado por elementos isolados da hemolinfa, como as larvas e os 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 Jr *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 se torna rígida 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 microorganismos (Silva, 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).

#### 1.7.4 A resposta imune contra a infecção por arbovírus

O díptero *Drosophila melanogaster* é considerado o modelo de estudo dos princípios básicos da imunidade inata. A resposta humoral é iniciada por receptores de reconhecimento padrão (PRRs – pattern recognition receptors) que se ligam especificamente aos padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs – pathogen associated molecular patterns) como os lipopolissacarídeos e peptídeo-glicanos constituintes da parede de bactérias. Estes estudos com *D. melanogaster* tem exibido que as respostas imunes de artrópodes são reguladas por duas vias principais: a Toll e a imunodeficiente (IMD) (Revisão em Xi *et al.*, 2008).

Os receptores de reconhecimento padrão ativam as vias iniciando uma cascata celular que resulta na ativação de fatores de transcrição, que penetram no núcleo e se ligam à sequências específicas do DNA que promovem a expressão de um conjunto de genes, entre eles, os genes codificadores de peptídeos antimicrobianos (Fragkoudis *et al.*, 2009). A via Toll responde à infecção por fungos, bactérias gram-positivas e vírus e conduz uma cascata de eventos que resulta na degradação do regulador negativo Cactus, na translocação para o núcleo de fatores de transcrição como Dif, ocasionando um rápido aumento de moléculas antimicrobianas. Esta via está envolvida especificamente na resposta anti-dengue em *A. aegypti*. A via IMD possui um importante papel na produção de peptídeos antimicrobianos (AMP), que respondem às infecções contra bactérias gram-negativas. A ativação desta via conduz uma cascata similar à observada na via Toll levando à degradação do regulador negativo Caspar e na translocação para o núcleo do fator de transcrição Relish (Lemaitre *et al.*, 1995; Revisão em Xi *et al.*, 2008). Recentemente, foi demonstrada a importância desta via no controle da infecção do *Sindbis virus* em *Drosophila* (Avadhanula *et al.*, 2009). Os fatores de transcrição da família Rel, Dif e Relish em *Drosophila* ou seus correspondentes em mosquitos Rel1 e Rel2 atualmente são estudados através do uso do RNAi (RNA de

interferência) como silenciador dos respectivos reguladores negativos Cactus e Caspar (Revisão em Xi *et al.*, 2008).

A primeira evidência do envolvimento da via JAK/STAT - Janus Kinase (JAK) e transdutor de sinal e ativador de transcrição (STAT) - na resposta imune de insetos foi através de estudos com *Anopheles gambiae*. O principal ponto da ativação da via JAK-STAT é a translocação do ativador de transcrição STAT para o núcleo onde ativa genes-alvo. Esta via contribui para a imunidade através da indução dos fatores tipo complemento, como a proteína contendo tiol-ester (TEP) (Agaisse & Perrimon, 2004). A via JAK-STAT também tem sido relacionada na defesa antiviral em *Drosophila* (Dostert, 2005) e na defesa contra DENV em *A. aegypti* (Souza-Neto *et al.*, 2009).

Nos últimos anos, houve um aumento no conhecimento de genes relacionados à imunidade dos mosquitos, principalmente através dos projetos de sequenciamento do *A. gambiae* e *A. aegypti* (Holt *et al.*, 2002 e Nene *et al.*, 2007). Grande parte dos trabalhos pioneiros sobre resposta imune de mosquitos está relacionado à interação de *Plasmodium* com *Anopheles* (Barillas-Mury & Kumar, 2005). Entretanto, existem poucas informações sobre a imunidade inata dos mosquitos em resposta à infecção por arbovírus se comparado com os estudos sobre *Anopheles*/malária e *Drosophila*.

Em estudos com *D. melanogaster* infectadas com vírus X de *Drosophila*, foi observado que existe a ativação das vias Toll e IMD, ocasionando um aumento na produção de peptídeos antimicrobianos, chegando a níveis comparáveis aos vistos em infecções por bactérias. Porém, a análise de mutantes para genes destas vias demonstrou que apenas a via Toll parece ser essencial na defesa do organismo contra a infecção viral. Entretanto, estudos com mutantes que super-expressam estes peptídeos, não mostram nenhuma diminuição na infecção pelo vírus. Sendo assim, se estas moléculas possuem algum papel no combate à infecção, este papel parece ser indireto, provavelmente auxiliando na ativação dos hemócitos e na resposta celular de combate ao vírus (Zambon *et al.*, 2005). Esta teoria é sustentada pela observação de estudos com lepidópteros onde, os hemócitos são capazes de reconhecer e melanizar as células infectadas por vírus (Trudeau *et al.*, 2001).

A via Toll de *A. aegypti* possui um papel importante em controlar a replicação do *Dengue virus* após o estabelecimento da infecção no mosquito (Ramirez & Dimopoulos, 2010). Xi *et al.* (2008) exibiram que a infecção pelo *Dengue virus* tipo 2 induz à expressão de um conjunto de genes correspondentes à via Toll e JAK-STAT. A ativação da via Toll e IMD através do silenciamento, mediado pelo RNAi, de Cactus e Caspar causou uma redução nos níveis de infecção viral que eram controlados primariamente pela via Toll. A repressão da via

Toll através do silenciamento do gene MID88 resultou em altos níveis de infecção pelo *Dengue virus*.

Em muitas espécies de lepidópteras, os hemócitos facilitam a amplificação dos baculovírus e posteriormente a sua disseminação para outros órgãos através das traquéolas (Engelhard *et al.*, 1994; Keddie *et al.*, 1989). Entretanto, a resistência à infecção por baculovírus é atribuída aos hemócitos no lepidóptero *Spodoptera frugiperda* que evitam a infecção através da remoção dos vírus da hemolinfa (Clarke & Clem, 2002). Os hemócitos também podem diminuir a propagação viral através do processo de apoptose, que reduz o número de células infectadas (Feng *et al.*, 2007). Embora importante no desenvolvimento em vertebrados, a apoptose ou morte celular programada é também uma resposta inata à infecção por vírus em insetos que podem limitar sua replicação e propagação.

Girard *et al.* (2004) especulam que alguns arbovírus, podem requerer um sítio de amplificação externo ao epitélio do intestino. Hardy *et al.* (1983) especulam que mosquitos que se alimentam de sangue com baixas concentrações de vírus, necessitam de um sítio de amplificação secundário diferente do epitélio do intestino.

Em geral, os hemócitos respondem à presença de patógenos como bactérias, fungos e parasitas (*Plasmodium*) através da melanização e estão envolvidos nos eventos de sinalização celular através da produção de peptídeos antimicrobianos em associação ao corpo gorduroso (Bartholomay *et al.*, 2004; Hernández-Martínez *et al.*, 2002; Hillyer *et al.*, 2003a, b; Infanger *et al.*, 2004; Lowenberger, 2001).

O papel dos hemócitos de mosquitos na replicação, disseminação e resposta antiviral à infecção por arbovírus não é bem compreendida. A infecção de hemócitos de mosquitos por arbovírus tem sido relatada na literatura (Foy *et al.*, 2004; Salazar *et al.*, 2007; Sriurairatna & Bhamarapravati, 1977), entretanto, ainda não foi bem caracterizada, isso ocorre devido à dificuldade em se coletar e trabalhar com estas células.

## 2 JUSTIFICATIVA

As respostas imunes têm um papel crítico na complexa relação que existe entre vetores artrópodes, humanos e os patógenos que eles transmitem, podendo reduzir ou restringir a capacidade vetorial de alguns organismos. A habilidade em se isolar e identificar os hemócitos é essencial para os estudos de imunidade celular em insetos. A classificação destas células baseada na morfologia e características funcionais tem sido bem desenvolvida em modelos como *Drosophila melanogaster* e alguns lepidópteros. Entretanto, muito pouco é conhecido sobre os tipos de hemócitos presentes em outros insetos, incluindo numerosas espécies de importância médica como os mosquitos.

Desta forma, a caracterização morfológica dos hemócitos de insetos é o primeiro passo para melhor compreender a resposta imune desencadeada por esses tipos celulares. Além disso, o estudo da presença de resíduos de carboidratos na membrana destas células, capacidade de fagocitose e as alterações observadas ultraestruturalmente na presença de patógenos são outras formas de avaliar a resposta imune celular.

O conhecimento sobre o sistema imunológico do *A. aegypti* e do *A. albopictus* é de grande relevância para o desenvolvimento de metodologias de controle de endemias transmitidas por estes insetos. Desta forma, o presente estudo visa esclarecer alguns aspectos da imunidade celular destas espécies sob o ponto de vista morfológico, funcional e ultraestrutural.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Caracterizar morfológicamente os hemócitos do *A. aegypti* e do *A. albopictus* e avaliar a resposta imune dos hemócitos do *A. aegypti* após a infecção pelo *Dengue virus* sorotipo 2.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- a) Caracterização morfológica dos hemócitos de *A. albopictus* através da microscopia óptica e eletrônica de transmissão.
- b) Diferenciação das subpopulações de hemócitos através da utilização de marcadores de superfície (lectinas).
- c) Identificação dos hemócitos envolvidos no processo de endocitose de partículas de látex e albumina e quais exibem marcação pelo anticorpo lisossomal.
- d) Análise da dinâmica hemocitária do *A. aegypti* e do *A. albopictus* sadios e após o desafio com o *Dengue virus*.
- e) Identificação das células alvo para o *Dengue virus*.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Mosquitos

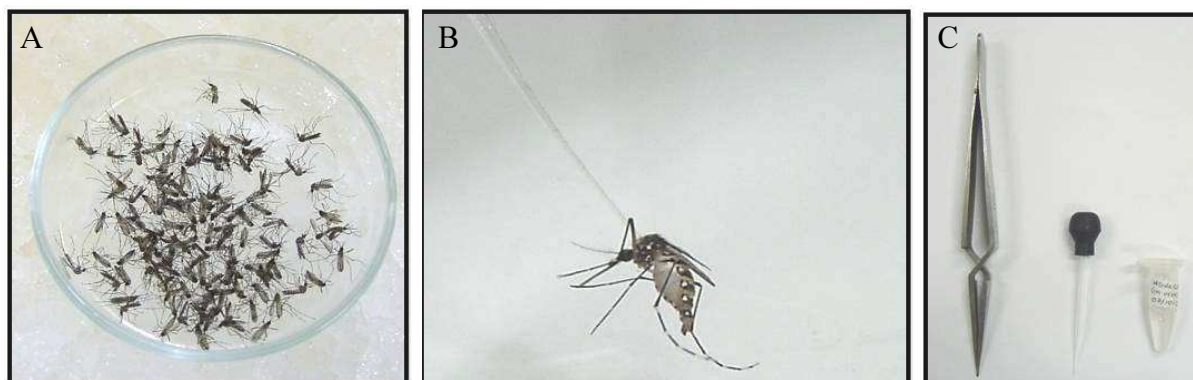
A colônia de mosquitos *A. aegypti*, foi estabelecida em 1999, pelo Dr. Paulo Pimenta no insetário do Laboratório de Entomologia Médica do Instituto René Rachou (IRR), Belo Horizonte, Minas Gerais, a partir de coletas realizadas em Campos dos Goitacazes, no estado do Rio de Janeiro. A colônia de mosquitos *A. albopictus* foi estabelecida em 2007 a partir de ovos cedidos pelo Laboratório de Entomologia do Instituto Aggeu Magalhães, Recife, Pernambuco.

As colônias de mosquitos foram mantidas, sob condições padrão, num insetário a 28°C, com umidade relativa do ar de 80% e sendo submetidos a um fotoperíodo de 12h de claro e 12h de escuro. As fêmeas adultas foram alimentadas com solução de glicose 10%, oferecida permanentemente e sendo diariamente renovada. Semanalmente, as fêmeas foram alimentadas com camundongos albinos sadios, anestesiados com thiopentax na dosagem de 3,5mg/animal. Para a obtenção da desova, após três dias da alimentação sanguínea foi colocado dentro da gaiola um recipiente contendo água isenta de cloro e um pedaço de papel filtro. Para eclosão dos ovos, o papel contendo a desova foi colocado em uma bandeja plástica contendo água preparada (sem cloro e com oito gotas de iodo). As larvas recém eclodidas foram transferidas para novas bandejas com água preparada e alimentadas diariamente com ração de peixe (Goldfish Colour®). As pupas foram coletadas e transferidas para gaiolas próprias, até o momento em que os adultos emergiam, os quais foram utilizados em todos os experimentos.

### 4.2 Coleta da hemolinfa através da técnica de perfusão intratorácica

Para a realização da perfusão, os mosquitos foram colocados no gelo (1-2 minutos) para imobilização. A hemolinfa foi retirada através de perfusão no tórax, com o auxílio de um microcapilar de vidro, através da inoculação de 1µl do fixador Formaldeído 4% (Electron microscopy sciences®), utilizados para os experimentos envolvendo a microscopia de luz e laser confocal. Para a microscopia eletrônica de transmissão foi utilizado o fixador Karnovsky (3% Glutaraldeído e 2% Formaldeído em Tampão Fosfato de Sódio 0,1M pH 7.2) modificado segundo artigo de Hillyer & Christensen (2002). Esta técnica foi utilizada em todos os

experimentos que envolviam caracterização dos hemócitos de *A. aegypti* e *A. albopictus* (Figura 9).



**Figura 9 (A-C):** Perfusão no tórax para coleta de hemolinfa.

**Figura A** - Mosquitos anestesiados no gelo. **Figura B** - Inoculação da solução fixadora no tórax do mosquito e retirada da hemolinfa. **Figura C** - Materiais utilizados nesta técnica: pinça, microcapilar de vidro e fixador.

**Fonte:** Araújo, H.R.C.

#### 4.3 Microscopia de Luz

Após a realização da perfusão, como descrito no item 4.2, as amostras de hemolinfa colhidas foram colocadas individualmente em lâmina para secar a temperatura ambiente por 20-30 minutos. As células foram coradas através da utilização do kit Panótico Rápido® (Laborclin) através da imersão da lâmina por um minuto na solução n°1, posteriormente na solução n°2 e para finalizar na solução n°3, sempre retirando o excesso apoiando a lâmina em papel toalha. As lâminas foram lavadas em água corrente, com fluxo suave e em seguida secas à temperatura ambiente. Após a coloração, foram montadas sob uma lamínula em Entellan® (Merck). As células foram caracterizadas utilizando como parâmetro, a morfologia e o tamanho. Para isso, foram visualizados todos os campos no microscópio óptico de campo claro. Foram formados três grupos de 10 mosquitos para o estudo com esta metodologia.

#### 4.4 Microscopia de Contraste de Interferência Diferencial

Para melhor caracterizar os diferentes tipos morfológicos de hemócitos através da microscopia óptica, a hemolinfa foi coletada por perfusão dos mosquitos, com meio de cultura Grace, em seguida foi colocada em placas de cultivo MatTek 35mm (MatTek Corporation,



Ashland, MA USA) que também continham meio de cultura. Os hemócitos foram observados vivos ao microscópio confocal Leica AOBS SPII. As imagens foram adquiridas em tempo real utilizando contraste diferencial.

#### 4.5. Microscopia Eletrônica de Transmissão

A hemolinfa de 300 insetos foi coletada como descrito no item 4.2 e colocada diretamente em um microtubo de plástico de 1,5ml contendo fixador e previamente tratado com Sigmacote® (Sigma) por no mínimo duas horas. O pool de hemolinfa obtido foi centrifugado a 3.000 rpm por 10 minutos, lavado duas vezes com tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7,2 e pós-fixado com 1% tetróxido de ósmio e ferricianeto de potássio 0,8% (Pimenta & De Souza, 1985) por 30 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Em seguida, a amostra foi lavada por duas vezes no mesmo tampão e desidratadas em séries crescentes de acetona para posterior infiltração e emblocamento em resina Epon 812 (Electron Microscopy Sciences). Após a polimerização dos blocos, foram obtidos cortes ultrafinos em ultramicrótopo, que foram coletados em grades e contrastados com acetato de uranila por 60 minutos e citrato de chumbo por 05 minutos. As imagens foram analisadas ao microscópio eletrônico de transmissão JEM 1011, JEOL (Tokyo, Japão) e os registros fotográficos foram obtidos por meio da câmera digital Gatan BioScan Modelo 792 e software de captação de imagens Gatan Digital Micrograph 3.6.5 (Gatan Inc., Warrendale, Estados Unidos da América).

#### 4.6 Marcação com lectinas

Para reconhecer os possíveis marcadores na superfície dos hemócitos, as hemolinfas de 50 mosquitos foram obtidas como descrito no item 4.2 e colocadas em microtubos de plástico de 1,5ml previamente tratados com Sigmacote® contendo fixador (Formaldeído a 4%). O pool de hemolinfa obtido foi lavado três vezes em PBS por 10 minutos, sendo centrifugado a 3.000rpm por 10 minutos. O sedimento foi ressuspensionado em PBS, distribuído em lamínula tratada previamente com poli-L-lisina (Sigma), deixada em câmara úmida à temperatura ambiente durante 24hs para a aderência das células. A lamínula foi incubada em PBS/ BSA 1%/TRITON 0,2% por 30 minutos. A partir deste momento, as amostras foram acondicionadas em câmara úmida ao abrigo de luz. Em seguida, as amostras foram incubadas

com as seguintes lectinas conjugadas a FITC: BSI (*Bandeiraea simplicifolia*), ConA (*Canavalia ensiformis*), HPA (*Helix pomatia*), PNA (*Arachis hypogea*), UEA (*Ulex europeus*), WGA (*Triticum vulgare*), LPL (*Limulus polyphemus*) e RCA (*Ricinus communis*) diluídas na concentração de 1:100 em PBS/ BSA 1%/ TRITON 0,2% durante 1 hora. Após a incubação as amostras foram lavadas por três vezes em PBS/ BSA 1%/ TRITON 0,2% por 5 minutos e incubada na presença do corante nuclear DAPI 14.000nM (4 - Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride – Molecular Probes) diluído 1:250 em PBS/ TRITON 0,2% por 30 min. Para finalizar, as amostras foram lavadas 1 vez em PBS e as lamínulas foram montadas utilizando meio de montagem que não perde a fluorescência, Mowiol® (Aldrich) e guardadas em geladeira protegidas da luz. As amostras foram observadas ao microscópio laser confocal Zeiss SLM 510. As imagens foram adquiridas na objetiva de 63X utilizando o laser 488nm e filtro BP 505 - 530 para leitura do FITC e a leitura para DAPI foi feita pela HBO. As células que exibiram fluorescência após o tratamento foram consideradas positivas e a intensidade das marcações foi analisada.

As características de cada uma das lectinas utilizadas, mencionando os seus respectivos nomes comuns e científicos, além de suas especificidades para os diferentes tipos de açúcares estão na tabela abaixo:

Tabela 1 – Lista de lectinas

<b>SIGLAS</b>	<b>NOME COMUM</b>	<b>NOME CIENTÍFICO</b>	<b>ESPECIFICIDADE</b>
BSI	-	<i>Bandeiraea simplicifolia</i>	$\alpha$ -gal, $\alpha$ -gal/NAc
ConA	Concavalin A	<i>Canavalis ensiformis</i>	$\alpha$ -man, $\alpha$ -glc
HPA	Roman snail	<i>Helix pomatia</i>	GalNAc
PNA	Peanut	<i>Arachis hypogea</i>	B-gal (1→3)GalNAc
UEA	Furze	<i>Ulex europaeus</i>	$\alpha$ -L-Fuc
WGA	Wheat germ	<i>Triticum vulgare</i>	(GlcNAc) <sub>2</sub> , NeuNAc
LPL	Horseshoe crab	<i>Limulus polyphemus</i>	NeuNAc, GalNAc, GlcNAc
RCA	Castor bean	<i>Ricinus communis</i>	GalNAc, $\beta$ -Gal

Fonte: catálogo da Sigma

## 4.7 Ensaio de endocitose

### 4.7.1 Partículas de látex-FITC

Para a observação da fagocitose de partículas abióticas, as partículas de látex (Latex beads polystyrene, sulfate modified fluorescent – SIGMA) previamente acopladas à substância fluorescente FITC de 0,526 µm de diâmetro (solução aquosa, 2,5% de conteúdo sólido), foram diluídas na proporção de 1:10 em PBS estéril, pH 7,2. Cerca de 50 fêmeas de *A. albopictus* (com idade de quatro dias após a emergência) foram inoculadas com 1µl no tórax com o auxílio de um microcapilar de vidro. Após 1 hora da inoculação, os hemócitos foram coletados como descrito no item 4.2 e colocados por 30 minutos em microtubos de plástico de 1,5ml previamente tratados com Sigmacote® contendo o mesmo fixador. O pool de hemolinfa obtido foi centrifugado a 3.000rpm durante 10 minutos, em seguida lavado três vezes em PBS por 10 minutos. O sedimento foi ressuspensionado em PBS, distribuído em lamínula tratada previamente com Poly-L-lisina, deixada em câmara úmida à temperatura ambiente e protegida da luz durante 24hs para a aderência das células. As lamínulas foram montadas em lâminas, utilizando meio de montagem que não perde a fluorescência, Mowiol® (Aldrich), e guardadas em geladeira protegidas da luz. O material foi visualizado e fotografado ao microscópio confocal Zeiss SLM 510 na objetiva de 63X utilizando o laser 488nm e filtro BP 505 - 530 para leitura do FITC.

### 4.7.2 Albumina-rodamina

Cerca de 50 fêmeas de *A. aegypti* (com idade de quatro dias após a emergência) foram inoculadas no tórax, com o auxílio de um microcapilar de vidro, com 5µg/ml de albumina conjugada à rodamina (Albumin, Bovine – Rhodamine B Isothiocyanate from bovine serum, A4537, SIGMA) diluída em PBS. Após os tempos de 30 min e 1 hora da inoculação, os hemócitos foram coletados como descrito no item 4.2 e colocados em microtubos de plástico de 1,5ml previamente tratados com Sigmacote® contendo o fixador (Formaldeído a 4%) por 30 minutos. O pool de hemolinfa obtido foi centrifugado a 3.000rpm durante 10 minutos, em seguida lavado 3X em PBS por 10 minutos. O sedimento foi ressuspensionado em PBS, distribuído em lamínula tratada previamente com Poly-L-lisina, deixada em câmara úmida à temperatura ambiente e protegida da luz durante 24hs para a aderência das células. Após este período, a lamínula foi incubada com corante nuclear DAPI na concentração de 1:250 em

PBS/TRITON X100 (Sigma) por 30 min, lavado 1X com PBS e montado em Mowiol®. A lâmina foi guardada em geladeira e protegida da luz. O material foi visualizado e fotografado ao microscópio confocal Zeiss SLM 510 na objetiva de 63X utilizando o laser 543nm e filtro LP 560 para leitura da Rodamina. Para Dapi, a leitura foi feita pela HBO.

#### 4.8 Marcação com anticorpo lisosomal

As hemolinhas de 50 mosquitos foram retiradas através da técnica de perfusão, como descrito no item 4.2; e colocadas em microtubos de plástico de 1,5ml previamente tratados com Sigmacote® contendo o fixador Formaldeído a 4%. O pool de hemolinfa obtido foi lavado três vezes em PBS por 5 minutos, sendo centrifugado a 3.000rpm por 10 minutos. O sedimento foi ressuspenso em PBS, distribuído em lamínula tratada previamente com poly-L-lisina, deixada em câmara úmida à temperatura ambiente durante 24hs para a aderência das células. A lamínula foi incubada em PBS/ BSA 1%/ TRITON 0,2% por 30 minutos. Em seguida, as amostras foram incubadas durante 2 horas com marcador lisossomal Anti-LAMP1 (anticorpo contra proteína de membrana lisossomal LAMP1 produzido em coelho – SIGMA/L1418) diluídas em diluidor de anticorpos com propriedades redutoras de fundo (DAKO), de forma que a concentração final fosse 5µg/ml. Após a incubação, as amostras foram lavadas por três vezes em PBS/ BSA1%/ TRITON 0,2% por 5 minutos. A partir deste momento, as amostras foram acondicionadas em câmara úmida ao abrigo de luz para posterior incubação com anticorpo secundário anti-coelho conjugado à FITC. O anticorpo secundário foi diluído na concentração de 1:100 com diluidor DAKO® e incubado por 2 horas à temperatura ambiente. Após a incubação, as amostras foram lavadas por três vezes em PBS/ BSA1%/ TRITON 0,2% por 5 minutos e incubadas na presença do corante nuclear DAPI diluído 1:250 em PBS/ TRITON 0,2% por 30 min. Para finalizar, as amostras foram lavadas 1 vez em PBS, montadas em Mowiol® e guardadas em geladeira protegidas da luz. As amostras foram observadas ao microscópio laser confocal Zeiss SLM 510. As imagens foram adquiridas na objetiva de 63X utilizando o laser 488nm e filtro BP 505 - 530 para leitura do FITC e a leitura para DAPI foi feita pela HBO. As células que exibiram fluorescência após o tratamento foram consideradas positivas. As amostras controle receberam o mesmo procedimento citado acima, entretanto, não foram incubadas com anticorpo primário Anti-LAMP 1.

#### 4.9 Cultura celular e multiplicação viral

##### 4.9.1 Manutenção das células C6/36

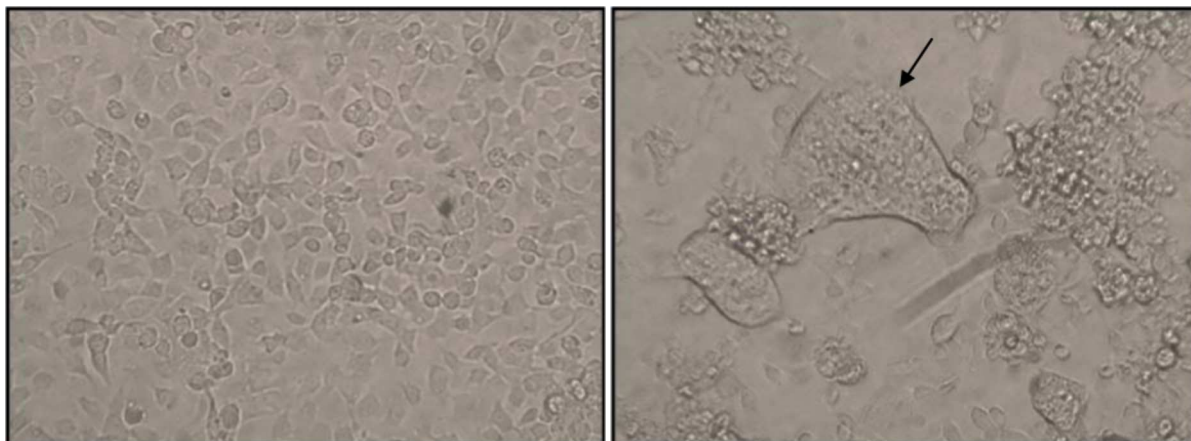
A linhagem celular contínua C6/36 originárias de larvas de mosquitos *A. albopictus*, gentilmente cedidas pelo Dr. Cláudio Antônio Bonjardim (ICB/UFMG), foi cultivada em meio Leibovitz (L-15, Cultilab) contendo 100 UI/mL de Penicilina e Streptomina, 2µg/ml de Fungizon (Anfotericina B), 100µg/ml de Ciprofloxacina, suplementado com 10% soro fetal bovino inativado (SFB, Cultilab) e mantido em estufa tipo Biologic Oxigen Demand (B.O.D.) à 28°C.

##### 4.9.2 *Dengue virus*

A cepa do vírus utilizada para os experimentos foi a DENV-2/SPH, isolada do soro de um paciente diagnosticado com Febre Hemorrágica do Dengue, na cidade de Ribeirão Preto, São Paulo no ano de 1991. Esta cepa foi obtida do Laboratório de Virologia e Microbiologia Molecular, na Fundação Ezequiel Dias (Belo Horizonte – MG) e vem sendo mantida no Laboratório de Entomologia Médica em culturas de células C6/36.

##### 4.9.3 Infecção das células C6/36

Utilizamos uma garrafa de 25 cm<sup>2</sup> apresentando uma monocamada de células C6/36 contendo 70% de confluência. As células foram lavadas duas vezes com PBS e adicionado 1 ml do sobrenadante de células infectadas com *Dengue virus 2* mantidos no freezer -70°C. O meio contendo o DENV foi homogeneizado sobre a monocamada de células a partir de leves movimentos com a garrafa de cultura, a cada intervalo de 10 minutos. Após 1 hora de adsorção foi adicionado meio L-15 suplementado com 10% de SFB e mantido em B.O.D. à 28°C. A infecção foi observada através da presença do efeito citopático (formação de sincícios) característicos da presença da infecção viral na cultura de células (Figura 10). Neste momento, o sobrenadante da monocamada foi coletado, clarificado de restos celulares por centrifugação e congeladas à -70 °C até o momento dos experimentos de inoculação. Para os experimentos de alimentação oral utilizamos os vírus logo após a coleta da cultura de células.



**Figura 10 (A-B): Monocamada das células de mosquito *A. albopictus* clone C6/36.**

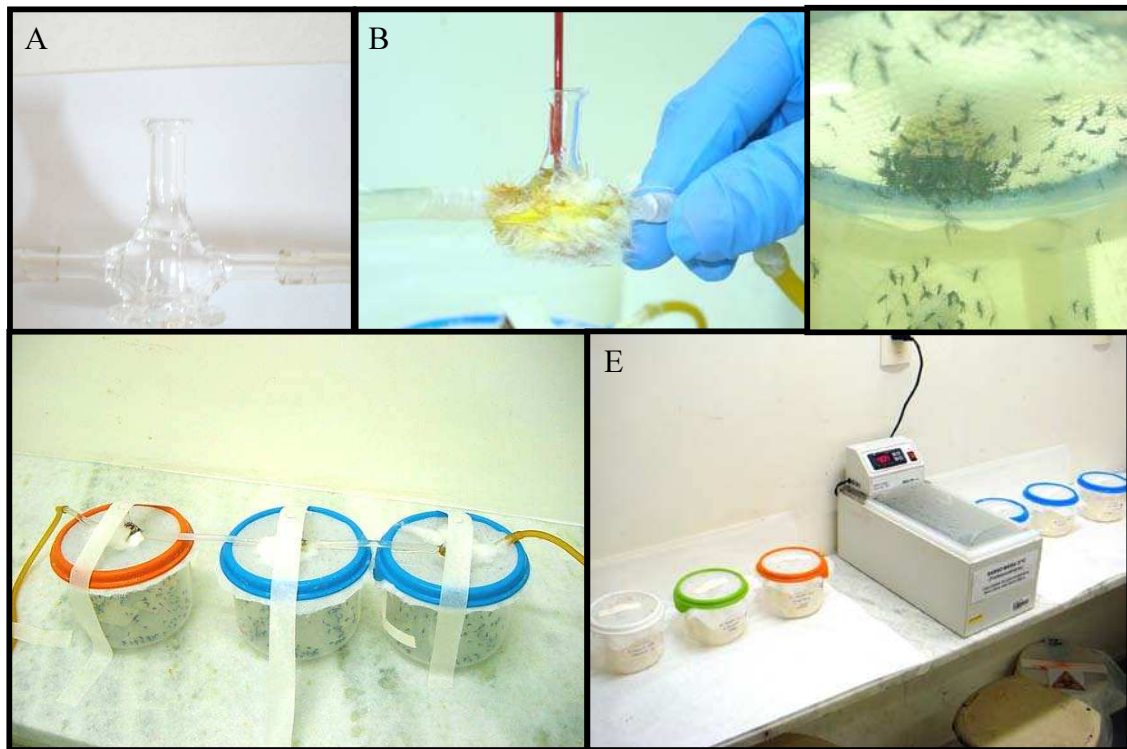
**Figura A** – Células C6/36 não infectadas. **Figura B** - Células C6/36 infectadas com *Dengue virus* apresentando sincícios. Aumento de 25X.

**Fonte:** Araújo, H. R. C.

#### 4.10 Alimentação oral dos mosquitos com *Dengue virus*

Cerca de 300 fêmeas de *A. aegypti* com idade de 2 dias pos-eclosão foram utilizadas nos experimentos de alimentação oral. As fêmeas foram anestesiadas com CO<sub>2</sub>, separadas e colocadas em gaiolas devidamente identificadas sem a solução de açúcar 24 horas antes da alimentação. O repasto infectante foi realizado através de um sistema artificial, onde pequenos funis de vidro transparente com capacidade de 300-500µl foram colocados invertidos e conectados através de finas mangueiras para a passagem de água aquecida. A parte inferior dos alimentadores artificiais foi revestida com membrana animal dissecada da pele de *Gallus domesticus* (um dia de vida). Foi retirado sangue de camundongo (*Mus musculus*) previamente anestesiado com Tiopental com seringa de 1 ml contendo heparina. Após centrifugação do sangue a 2000rpm por 5 minutos, o plasma foi separado das hemácias. Em seguida o plasma foi colocado em banho-maria por 1 hora a 56°C para sua inativação e as hemácias foram lavadas uma vez com PBS estéril. As hemácias foram misturadas com plasma inativado e mantidas a 4°C até sua utilização. Na parte superior do alimentador foi adicionada uma mistura de 2/3 de sangue contendo plasma inativado e 1/3 do sobrenadante de células C6/36 infectadas com o DENV-2. A temperatura dos alimentadores foi mantida a 37°C pela circulação de água aquecida nas mangueiras vinda do banho-maria a 40°C. O tempo de repasto durou cerca de duas a três horas e, ao fim do processo, as fêmeas não alimentadas foram retiradas das gaiolas. As fêmeas ingurgitadas foram mantidas no infectório a 28°C e

alimentadas diariamente com solução açucarada a 10% durante todo o período do experimento. As etapas de infecção e manutenção dos mosquitos infectados foram realizadas seguindo as normas internacionais de segurança e executadas dentro do infectório de alta segurança presente no Laboratório de Entomologia Médica (Figura 11).



**Figura 11 (A-E): Material utilizado no experimento de alimentação oral dos mosquitos.**

**A.** Alimentador artificial. **B.** Sangue sendo colocado no alimentador artificial montado com membrana. **C.** Momento da realização do repasto pelos mosquitos. **D.** Disposição das gaiolas contendo os mosquitos conectadas por manguейras onde circula água aquecida. **E.** Banho-maria utilizado para aquecer a água que passa pelos alimentadores.

Fonte: Araújo, H. R. C.

## 4.11 Titulação viral

A titulação viral foi realizada através do método TCID<sub>50</sub> (50% da dose infecciosa da cultura de tecido) realizado em placa de 96 poços como descrito por Schoepp & Beaty (1984) com modificações.

Para a realização deste procedimento células C6/36 foram cultivadas em placas de 96 poços com meio L15 suplementado com 1% de SFB, sendo implantadas  $2,5 \times 10^5$  células/poço. Uma cadeia de diluições seriadas (de  $10^{-2}$  a  $10^{-7}$ ) contendo o vírus a ser titulado foi inoculada sobre a placa contendo as células C6/36. Como controles foram utilizados duas colunas com células não infectadas. Após incubação por duas horas em B.O.D. à 28°C, completou-se o volume de cada poço com 100µL de meio L15 suplementado com 10% de SFB e adicionado com antibióticos. Em seguida, as placas permaneceram na B.O.D. à 28°C de 5 a 7 dias. Para avaliação da titulação, foi realizada a contagem dos poços positivos, os quais possuíam a presença de sincícios.

O cálculo do TCID<sub>50</sub> foi realizado através do método Reed-Muench (1938). O título do vírus utilizado nos experimentos de alimentação oral foi de  $1,0 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>/ml. Nestes experimentos utilizamos o vírus retirado da cultura de células C6/36 infectadas, como descrito no item 4.10.3. O título viral da alíquota congelada, utilizada nos experimentos de inoculação, foi estimado em  $1,0 \times 10^4$  TCID<sub>50</sub>/ml. A Figura 12 mostra o desenho esquemático da placa de titulação e de como foram realizadas as diluições.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		CO	CO	$10^{-2}$	$10^{-2}$	$10^{-2}$	$10^{-2}$	$10^{-2}$	$10^{-2}$	$10^{-2}$	$10^{-2}$	
C		CO	CO	$10^{-3}$	$10^{-3}$	$10^{-3}$	$10^{-3}$	$10^{-3}$	$10^{-3}$	$10^{-3}$	$10^{-3}$	
D		CO	CO	$10^{-4}$	$10^{-4}$	$10^{-4}$	$10^{-4}$	$10^{-4}$	$10^{-4}$	$10^{-4}$	$10^{-4}$	
E		CO	CO	$10^{-5}$	$10^{-5}$	$10^{-5}$	$10^{-5}$	$10^{-5}$	$10^{-5}$	$10^{-5}$	$10^{-5}$	
F		CO	CO	$10^{-6}$	$10^{-6}$	$10^{-6}$	$10^{-6}$	$10^{-6}$	$10^{-6}$	$10^{-6}$	$10^{-6}$	
G		CO	CO	$10^{-7}$	$10^{-7}$	$10^{-7}$	$10^{-7}$	$10^{-7}$	$10^{-7}$	$10^{-7}$	$10^{-7}$	
H												

**Figura 12: Desenho esquemático da placa de titulação.**

Legenda: PBS (azul), controle não infectado (laranja) e diluições seriadas do vírus (bege).



#### 4.12 Dinâmica hemocitária

Para a realização da contagem total e diferencial dos hemócitos utilizamos o protocolo descrito por Castillo *et al.* (2006) com modificações. Esta técnica foi adaptada pelos Doutores Fábio Brayner, Luiz Carlos Alves e Janneth Rodrigues no Laboratory of Malaria and Vector Research, NIAID do National Institutes of Health, NIH – USA. Utilizamos esta forma de extração da hemolinfa para realização de todos os experimentos envolvendo contagem de células neste projeto.

A contagem foi realizada em hemolinfa diluída, utilizando hemocitômetro descartável (InCyto®). Os mosquitos foram colocados no gelo (1-2 minutos) para imobilização e em seguida foram injetados em seus tórax com 10µl da solução anticoagulante que consiste de: 60% meio Schneider's (Sigma), 10% soro fetal bovino (FBS) (Hyclone) e 30% tampão citrato (98mM NaOH, 186mM NaCl, 1.7mM EDTA e 41mM ácido cítrico), pH 4.5 vol/vol. A hemolinfa diluída, contendo os hemócitos, foi coletada através do local onde encontra-se inserido as patas do mosquito e por uma pequena incisão no abdômen, o líquido foi capturado com o auxílio de uma pipeta contendo ponteira siliconizada (Figura 13). Para realização da contagem total e diferencial dos hemócitos do *A. aegypti* e do *A. albopictus* não infectados, foram realizadas contagens das células de 6 mosquitos individualmente, não alimentados, nos dias 1, 2, 3, 7 e 8 pós-eclosão. Para realização da contagem total e diferencial dos hemócitos do *A. aegypti* alimentado com sangue contendo *Dengue virus*, foram realizadas contagens das células de 6 mosquitos individualmente nos dias 1, 3, 5, 7, 10 e 11 dias pós-alimentação oral. Como grupo controle para o experimento de alimentação oral, realizamos a contagem de mosquitos alimentados somente com açúcar e com sangue sem vírus nos mesmos intervalos de tempo. Os gráficos e as análises estatísticas foram realizados utilizando o programa GraphPad Prisma 5.0 (GraphPad Software, USA). O teste ANOVA foi utilizado para verificar se as médias obtidas foram significativamente diferentes entre os grupos e o teste de Tukey para realizar uma comparação múltipla entre as médias visando identificar quais grupos diferem entre si. Na contagem diferencial utilizamos Teste t student para comparar as médias dos grupos controle e alimentado para cada tipo celular. Todos os níveis de significância aqui adotados foram de 5%.



**Figura 13: Obtenção de hemolinfa conforme descrito por Castillo JC *et al.*, 2006 com modificações.**

Fonte: Araújo, H. R. C.

#### 4.13 Inoculação dos mosquitos *A. aegypti* com *Dengue virus*

Os mosquitos *A. aegypti* (com idade de 2-3 dias após a emergência) foram inoculados com uma agulha de vidro intratoracicamente contendo aproximadamente 1 $\mu$ l do vírus DENV-2, que se encontrava congelado, diluído 1:5 em PBS (Figura 14). O grupo controle foi inoculado com 1 $\mu$ l de PBS. As agulhas foram preparadas com micropipetas de vidro utilizando aparelho próprio para a confecção de microagulhas (P-2000/Sutter Instrument C.O.). Após a infecção, os mosquitos foram mantidos em gaiolas no infectório à 28°C, alimentando-se somente de solução açucarada. Após 48 horas do desafio, a hemolinfa foi obtida através da técnica de perfusão como descrito no item 4.2 e processada para os experimentos envolvendo microscopia de luz como descrito no item 4.3. Para os experimentos envolvendo microscopia eletrônica, o material obtido foi processado como descrito no item 4.5 e para os experimentos de microscopia laser confocal, a hemolinfa obtida foi processada como descrito no item 4.14.



**Figura 14: Microinjetor Nanoject II (Drummond)**

Fonte: Araújo, H. R. C.

#### 4.14 Imunomarcção dos hemócitos para o *Dengue virus*

A hemolinfa dos mosquitos inoculados com *Dengue virus* foram obtida como descrito no item 4.2 e colocadas em microtubos de plástico de 1,5ml previamente tratados com Sigmacote® contendo o fixador (Formaldeído a 4%). Após duas horas, o pool de hemolinfa obtido foi lavado três vezes em PBS por 10 minutos, sendo centrifugado a 3.000 rpm por 10 minutos. O sedimento foi ressuspensionado em PBS, distribuído em lamínula tratada previamente com poly-L-lisina, deixada em câmara úmida à temperatura ambiente durante 24hs para a aderência das células. O material foi incubado por duas horas em meio RPMI (Gibco®), em temperatura ambiente. Logo após, incubou-se as amostras em PBS/BSA 1%/TRITON 0,2% por 30 minutos. Posteriormente foi realizada a incubação por 24 horas com o anticorpo primário anti-DENV 2 (mouse policlonal) na diluição 1:125 (preparado com diluidor de anticorpos DAKO). Este anticorpo foi gentilmente cedido pelo Dr. William C. Black IV do Laboratório de Arbovirose e de Doenças infecciosas da Universidade Estadual do Colorado de Fort Collins nos Estados Unidos.

Após a incubação com o anticorpo primário, as amostras foram lavadas em PBS/BSA 1% /TRITON 0,2% por três vezes de 5 minutos cada. Posteriormente foi feita a incubação do

material com o anticorpo secundário (Anti-mouse) conjugado a FITC (Sigma) 1:100 (preparado com diluidor de anticorpos DAKO) durante duas horas. Em seguida, as amostras foram lavadas novamente em PBS/BSA 1%/TRITON 0,2% por três vezes sendo de 5 minutos cada lavagem, incubadas na presença do corante nuclear DAPI diluído 1:250 em PBS/TRITON 0,2% por 30 min e depois lavadas novamente em PBS por três vezes de 5 minutos cada. O grupo controle consiste na utilização de mosquitos *A. aegypti* que não receberam vírus. Os hemócitos deste grupo receberam o mesmo tratamento do grupo infectado com vírus. Para finalizar, as amostras foram montadas em Mowiol®, observadas e analisadas sob o microscópio laser confocal LSM-510 (Zeiss). As imagens foram adquiridas na objetiva de 63X utilizando o laser 488nm filtro para leitura BP 505 - 530 para FITC e leitura feita pela HBO para DAPI. As células que exibiram fluorescência após o tratamento foram consideradas positivas.

#### 4.15 Detecção do *Dengue virus* na hemolinfa dos mosquitos

##### 4.15.1 Extração do RNA

Cerca de 50 mosquitos *A. aegypti* foram inoculados com DENV-2, como descrito no item 4.13 e após 48 horas a hemolinfa foi retirada utilizando RNALater® (Qiagen), que garante a integridade do RNA durante o processo de lise celular. Como controle positivo utilizamos partículas virais obtidas da cultura de células C6/36 infectadas como descrito no item 4.9.3 de materiais e métodos. As células foram centrifugadas a 2.000rpm por 5 minutos e lavadas com PBS 1X. A extração do RNA total foi realizada utilizando o kit QIAamp® Viral RNA Mini kit (Qiagen) de acordo com o protocolo do fabricante. O RNA total purificado foi estocado à - 70°C para a posterior realização da RT-PCR.

##### 4.15.2 RT-PCR

O RNA viral foi convertido em DNA complementar (cDNA) sintetizado à partir do iniciador anti-senso D2 desenvolvido por Lanciotti RS *et al.* (1992) através da técnica de transcrição reversa (RT) utilizando a enzima M-MLV Reverse Transcriptase (Promega) e seguindo as instruções do fabricante. A reação ocorre com a adição de 2µl do oligonucleotídeo reverso D2 (10pmol) à 5µl do RNA extraído, onde foi posteriormente

aquecido à 70°C por 5 minutos. Após a incubação no gelo (4°C) por 5 minutos, foi adicionado 13µl do mix: 4µl Tampão 5X (Tris-HCl a 250 mM pH 8,3; KCl a 375 mM e MgCl<sub>2</sub> a 15 mM), 4µl da mistura de dNTPs (10mM), 1µl da enzima M-MLV (200U) e 4µl de água livre de RNase. A reação foi então incubada por 60 minutos à 42°C e resfriada no gelo.

#### 4.15.3 PCR

O cDNA obtido foi amplificado através de uma PCR “semi-nested” utilizando os oligonucleotídeos iniciadores usados para o *Dengue virus* sorotipo 2 como descrito no trabalho de Lanciotti RS *et al.* (1992) e listados na Tabela 2.

Tabela 2 – Oligonucleotídeos iniciadores.

Iniciadores	Sequência (5' – 3')	Posição no genoma	Tamanho do Fragmento
D1*	TCAATAGCTGAAACGCGCGAGAACCG	134 – 161	
D2**	TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGGTTC	616 – 644	511 pb (D1 e D2)
TS2**	CGCCACAAGGGCCATGAACAG	232 – 252	119 pb (D1 e TS2)

\* Iniciador senso; \*\* Iniciador anti-senso

Fonte: Lanciotti RS *et al.*, 1992

A PCR foi realizada em duas etapas: na primeira etapa foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores D1 e D2 para amplificação do fragmento correspondente aos 4 sorotipos de dengue que contem 511pb. Foram utilizados: Tampão da reação GoTaq<sup>TM</sup>(1,5mM MgCl<sub>2</sub>), Mix de dNTPs (10mM), Primer senso D1 (10pmol), primer anti-senso D2 (10pmol), Go Taq<sup>TM</sup> DNA polimerase (5U), cDNA (20%) e água livre de nuclease. Na segunda etapa, realizamos uma segunda reação de PCR utilizando os iniciadores D1 e TS2 para a amplificação do fragmento específico para o sorotipo 2 do *Dengue virus* que contem 119pb. A reação consiste de: produto gerado na primeira PCR (molde) diluído 50X em água estéril e apirogênica, tampão da reação GoTaq<sup>TM</sup>(1,5mM MgCl<sub>2</sub>), mix de dNTPs (10mM), primer senso (10pmol), primer anti-senso (10pmol), Go Taq<sup>TM</sup> DNA polimerase (5U) e água livre de nuclease.

As reações de PCR foram processadas no termociclador GeneAMP<sup>®</sup> PCR System 9700 (Applied Biosystems). Os ciclos de PCR foram adaptados em relação aos tempos originais citados em Lanciotti RS *et al.* (1992) onde as condições foram:

1° PCR:

Temperatura	Tempo	Número de ciclos
95°C	5'	1 ciclo
94°C	30''	35 ciclos
55°C	30''	
72°C	30''	
72°C	10'	1 ciclo
4°C	∞	∞

2° PCR:

Temperatura	Tempo	Número de ciclos
95°C	5'	1 ciclo
94°C	30''	27 ciclos
55°C	30''	
72°C	30''	
72°C	10'	1 ciclo
4°C	∞	∞

#### 4.15.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida a 0,8%

Para visualização dos resultados obtidos, 6µl do produto da PCR e o marcador de peso molecular 100pb DNA Ladder<sup>®</sup> (Promega) foram aplicados em um gel de poliacrilamida 0,8%. Este gel foi preparado à partir de uma solução de bis-acrilamida (30%) e acrilamida (0,8%) em tampão Tris-borato/ácido bórico/EDTA (TBE 1X), adicionado N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina (TEMED) e persulfato de amônio (APS). O gel foi submetido à eletroforese (100V) por 1 hora aproximadamente em tampão TBE 1X. O gel foi fixado em solução fixadora (2% ácido acético, 4% álcool etílico v/v) por 10 minutos sob agitação constante. Posteriormente foi corado com solução de nitrato de prata 0,2% por 10 minutos. Em seguida, o gel foi lavado 2X por 1 minuto em água destilada e revelado utilizando a solução de NaOH 3% adicionado à 5% de formaldeído e mantido sob agitação até a visualização das bandas. A reação foi interrompida pela adição da solução fixadora utilizada anteriormente. O gel foi visualizado e fotografado utilizando Câmera fotográfica e negatoscópio (Easydoc 100 - Bioagency).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Caracterização morfológica dos hemócitos de *A. albopictus*

Nossos estudos utilizando microscopia óptica e eletrônica de transmissão identificaram seis tipos morfológicos de hemócitos circulantes na hemolinfa de *A. albopictus*, são eles: prohemócitos, adipohemócitos, granulócitos, plasmatócitos, oenocitóides e trombocitóides, os quais são morfológicamente semelhantes aos descritos anteriormente por nós em *A. aegypti* (Araújo *et al.*, 2008 – ver anexo 2).

#### Prohemócitos:

Os prohemócitos foram as menores células encontradas na hemolinfa, geralmente apresentam-se em grupos, possuem perfil esférico, oval ou até alongado, medindo cerca de 5-7 $\mu$ m de diâmetro (Figura 25A). Possuem um núcleo largo localizado no centro da célula, que ocupa praticamente todo o citoplasma exibindo uma superfície lisa e homogênea, sem projeções (Figuras 26A e 30 A, C). A análise ultraestrutural revela uma cromatina dispersa no núcleo e em algumas células, o nucléolo é evidente. Apresentam poucas organelas, como: retículo endoplasmático liso (REL) e mitocôndrias (Figura 27A).

#### Adipohemócitos:

Os adipohemócitos são células frágeis, redondas ou ovais que medem aproximadamente 12-50 $\mu$ m de diâmetro (Figura 30B e D). As células observadas neste estudo apresentam um núcleo redondo, localizado centralmente ou deslocado para a periferia da célula (Figuras 25B). Seu citoplasma é bastante característico com a presença de grandes vesículas lipídicas, poucos grânulos escuros quando observados ao contraste de fase (Figura 26B). Ao nível ultraestrutural podem-se observar mitocôndrias e o complexo de golgi bem desenvolvidos localizados adjacentes à membrana (Figura 27B).

#### Granulócitos:

Os granulócitos apresentam formato que varia de circular à oval, com 8-20 $\mu$ m de diâmetro e aderem-se bem na lamina de vidro (Figura 30 A e E). A membrana plasmática é



irregular e o citoplasma exibe alguns grânulos densos (Figura 25C e 26C). Fotomicrografias eletrônicas mostram que o núcleo destas células pode ser esférico ou lobado com ilhas de heterocromatina presentes. Em algumas células, o nucléolo proeminente pode ser observado. O citoplasma exibe filopódios, grânulos de diferentes elétrons-densidade, envoltos por membrana e muitas vesículas de diversos tamanhos preenchendo praticamente todo o citoplasma. Diferentes tipos de vesículas contendo materiais eletrondensos ou eletronluscetes são encontrados em praticamente todas as células (Figura 27C).

#### Plasmatócitos:

Os plasmatócitos são células bastante polimórficas, variando de arredondadas a alongadas com 9-40 $\mu$ m de diâmetro. São facilmente reconhecidos por aderirem à lâmina, formando projeções citoplasmáticas (Figura 25D e 30G). A membrana plasmática possui a superfície irregular exibindo filopódios e pseudópodes, com características de fibroblastos como descritos por muitos autores (Figura 26D).

A análise ultraestrutural exibe um núcleo redondo ou alongado, geralmente localizado centralmente, com ilhas de heterocromatina distribuídas na periferia e um nucléolo evidente. No citoplasma, observam-se mitocôndrias alongadas, além de vacúolos de variados tamanhos, preenchidos ou não com material eletrondenso (Figura 27D). Podem conter ou não grânulos. Identificamos através de análises ultraestruturais, um plasmatócito de *A. albopictus* fagocitando uma célula em processo de apoptose (Figura 28).

#### Oenocitóides:

Os oenocitóides medem aproximadamente 7-10 $\mu$ m de diâmetro, possuem formato redondo, com núcleo pequeno, lobulado e excêntrico (Figuras 25E e 26E). Bastante semelhante aos prohemócitos, quando observadas na câmara de Neubauer diferem-se apenas pelo tamanho (Figura 30A). A ultraestrutura revela um núcleo sem a presença de nucléolo proeminente e de citoplasma homogêneo com escassas organelas. Estão presentes, mitocôndrias pouco desenvolvidas, pequenas vesículas eletronluscetes e retículo endoplasmático rugoso espaçado (Figura 27E).

#### Trombocitóides:

São as mais raras células encontradas, geralmente apresentam forma piriforme, medem aproximadamente 10-14µm de diâmetro (Figuras 25F, 26F e 30H). Ultra-estruturalmente possuem uma área perinuclear evidente e citoplasma homogêneo, com organelas pouco desenvolvidas. Similar aos oenocitóides, estas células exibem poucas mitocôndrias, pequenos vacúolos e grânulos elétron-denso que podem ser visualizados (Figura 27F).

## 5.2 Marcação por lectinas

Como não existem atualmente anticorpos contra proteínas que possam ser marcadoras dos diferentes tipos de hemócitos presentes nos mosquitos do gênero *Aedes*, resolvemos diferenciar as subpopulações dos hemócitos presentes em *A. aegypti* e *A. albopictus*, utilizamos lectinas que possuem especificidade para diferentes resíduos de carboidratos (Tabela 01). As lectinas conjugadas a fluorocromos testadas neste estudo marcaram as subpopulações de hemócitos das duas espécies de mosquitos com variações na intensidade.

Em *A. aegypti*, as lectinas ConA, UEA, WGA e LPL foram as que exibiram padrões de marcação mais fortes, seguidas da lectina PNA que exibiu um padrão moderado. As lectinas BS1, HPA e RCA não marcaram nenhum hemócito de *A. aegypti* (Tabela 03 e Figura 34).

Em *A. albopictus*, as lectinas UEA e WGA foram as que exibiram padrões de marcação mais fortes, seguidas da lectina PNA que exibiu um padrão moderado e das lectinas BSI, ConA e HPA que marcaram fracamente as células. A lectina LPL não marcou nenhum hemócito de *A. albopictus*. Não realizamos a marcação com a lectina RCA (Tabela 04 e Figura 35).

Das oito lectinas utilizadas em nosso estudo, metade delas marcaram hemócitos de ambas as espécies (ConA, PNA, UEA e WGA). As células de *A. albopictus* foram marcadas fracamente pela BS1 e HPA, entretanto em *A. aegypti* estas lectinas foram negativas. A lectina LPL foi a única que marcou hemócitos de *A. aegypti*, mas não houve marcação desta lectina em *A. albopictus*, sendo a única negativa para esta espécie (Tabelas 03 e 04).

As lectinas não marcaram especificamente um único tipo de hemócito, desta forma, não podemos separar as subpopulações de acordo com as marcações.

Tabela 1 – Lista de lectinas

SIGLAS	NOME COMUM	NOME CIENTÍFICO	ESPECIFICIDADE
BSI	-	<i>Bandeiraea simplicifolia</i>	$\alpha$ -gal, $\alpha$ -gal/NAc
ConA	Concavalin A	<i>Canavalis ensiformis</i>	$\alpha$ -man, $\alpha$ -glc
HPA	Roman snail	<i>Helix pomatia</i>	GalNAc
PNA	Peanut	<i>Arachis hypogea</i>	B-gal (1 $\rightarrow$ 3)GalNAc
UEA	Furze	<i>Ulex europaeus</i>	$\alpha$ -L-Fuc
WGA	Wheat germ	<i>Triticum vulgare</i>	(GlcNAc) <sub>2</sub> , NeuNAc
LPL	Horseshoe crab	<i>Limulus polyphemus</i>	NeuNAc, GalNAc, GlcNAc
RCA	Castor bean	<i>Ricinus communis</i>	GalNAc, $\beta$ -Gal

Fonte: catálogo da Sigma

Tabela 3 – Marcação dos hemócitos de *A. aegypti* com lectinas

HEMÓCITOS	LECTINAS							
	BSI	ConA	HPA	PNA	UEA	WGA	LPL	RCA
Prohemócito	-	*	*	*	+++	*	*	*
Adipohemócito	*	*	*	*	++	*	+++	*
Granulócito	*	+++	*	+	+++	+++	*	-
Plasmatócito	*	*	*	-	+++	*	*	*
Oenocitóide	-	+++	-	-	+++	+++	*	*
Trombocitóide	*	*	*	++	*	*	*	*

Intensidade de marcação: +++ forte, ++ moderada, + pouca, - nenhuma  
\* Não encontrado

Tabela 4 – Marcação dos hemócitos de *A. albopictus* com lectinas

HEMÓCITOS	LECTINAS						
	BSI	ConA	HPA	PNA	UEA	WGA	LPL
Prohemócito	*	*	*	-	++	*	-
Adipohemócito	*	*	*	*	*	*	*
Granulócito	*	+	*	++	+++	*	*
Plasmatócito	*	*	*	-	++	++	-
Oenocitóide	+	*	+	-	++	+++	-
Trombocitóide	*	-	*	-	*	*	*

Intensidade de marcação: +++ forte, ++ moderada, + pouca, - nenhuma  
\* Não encontrado

### 5.3 Ensaio de endocitose

Para a realização dos experimentos envolvendo endocitose, inoculamos albumina conjugada à rodamina em mosquitos *A. aegypti*. Realizamos a identificação das células após os primeiros 30 minutos e após 1 hora de incubação *in vivo*. O prohemócito, granulócito e oenocitóide foram os tipos celulares que se encontraram positivos após 30 minutos de incubação (Figura 32 A,B e C). O oenocitóide foi o único tipo celular positivo após 1 hora de incubação (Figura 32D). Apenas 27% das células identificadas neste experimento encontraram-se positivas onde, 20% foram prohemócitos, 20% granulócitos e 60% de oenocitóides.

Para a identificação dos hemócitos que são responsáveis pela resposta imune contra as partículas abióticas em *A. albopictus*, realizamos o desafio imune com as partículas de látex acopladas a uma substância fluorescente.

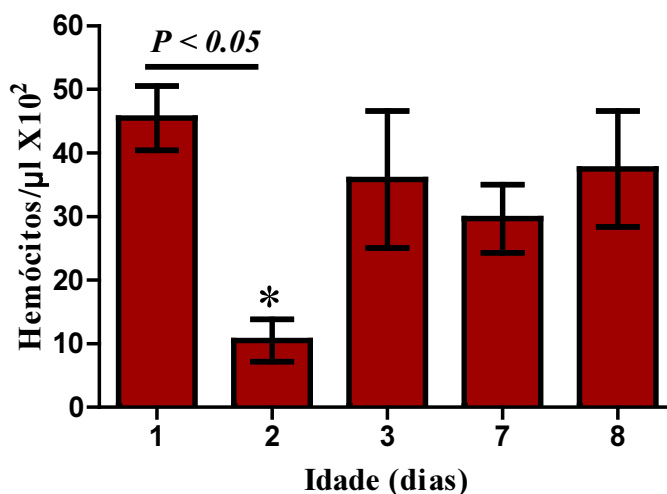
A resposta imune celular, desencadeada 1 hora após a inoculação *in vivo* das partículas de látex conjugadas à FITC em *A. albopictus*, foi a fagocitose realizada pelo granulócito e plasmatócito (Figura 31). Com relação aos outros hemócitos não observamos nenhuma alteração morfológica significativa (dados não exibidos).

### 5.4 Marcação com anticorpo lisossomal

O anticorpo lisossomal anti-LAMP 1 identificou lisossomos presentes em maiores quantidades nos plasmatócitos e nos oenocitóides de *A. aegypti* (Figura 33A e B). Em *A. albopictus* os granulócitos, plasmatócitos e oenocitóides foram as células que apresentaram marcações para este anticorpo (Figura 33C,D,E e F).

### 5.5 Dinâmica hemocitária

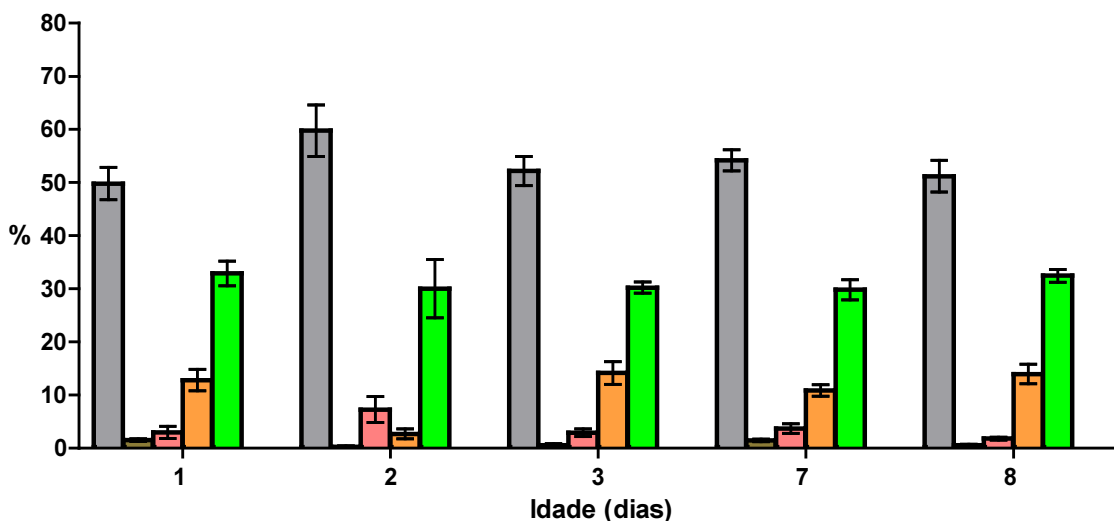
A contagem total dos hemócitos circulantes na hemolinfa do *A. aegypti* sadio, quando avaliada nos primeiros dias em que os mosquitos emergiram para adultos, variou entre 11 e  $46 \times 10^2$  hemócitos/ $\mu$ l em cada mosquito. O teste ANOVA demonstrou que existem diferenças significantes entre o número de células de acordo com a idade do mosquito. Estas diferenças foram encontradas entre o primeiro e o segundo dia após eclosão (Tukey's test), onde houve uma redução de aproximadamente 24% no número de células. A partir do 3º dia o número de células aumentou mantendo-se sem diferença significativa até o 8º dia (Figura 15).



**Figura 15** – Contagem total do número de hemócitos presentes na hemolinfa de *A. aegypti* de acordo com a idade. As barras representam as médias ( $\pm$  erro padrão da média); os asteriscos indicam as diferenças que são estatisticamente significantes (Tukey's test, n=6).

Em relação à média da contagem diferencial entre as subpopulações de hemócitos presentes no *A. aegypti*, os prohemócitos (53.3%), oenocitóides (30.8%) e plasmatócitos (12%) foram os tipos celulares mais freqüentes durante os dias analisados, onde juntos constituem cerca de 96% do total de células. Os trombocitóides foram o tipo celular mais raro, constituindo apenas 0.02% da população celular, seguido pelos adipohemócitos (0,7%) e granulócitos (3,2%) (Figura 16). A figura 29 exhibe todos os tipos celulares visualizados na câmara de Neubauer.

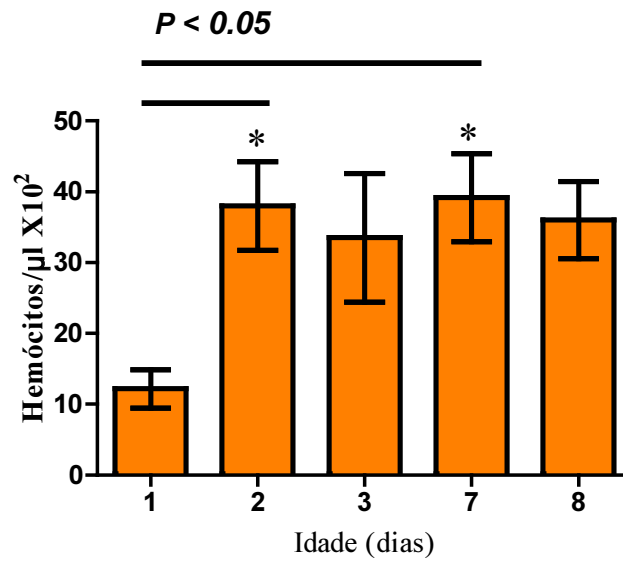
As células responsáveis pela redução no número total observada entre o primeiro e segundo dia pós-eclosão no *A. aegypti* foram os adipohemócitos e os plasmatócitos. Os oenocitóides e prohemócitos foram os únicos tipos celulares que permaneceram praticamente com a mesma proporção em todos os dias analisados (Figura 16).



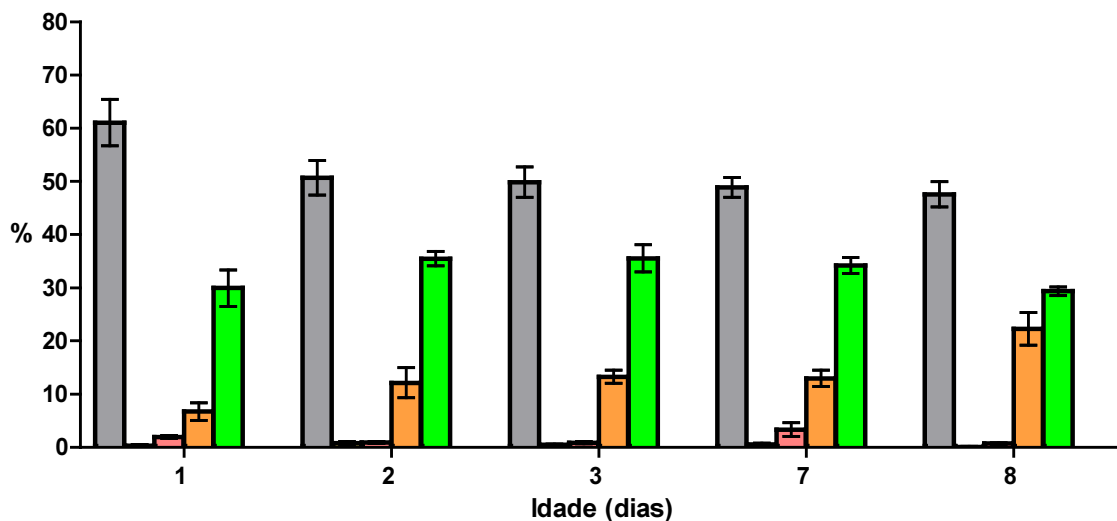
**Figura 16** - Contagem diferencial dos hemócitos presentes na hemolinfa de *A. aegypti* (n=6). As barras representam as médias ( $\pm$  erro padrão da média).

Prohemócitos, 
  Adipohemócitos, 
  Granulócitos, 
  Plasmatócitos, 
  Oenocitóides, 
  Trombocitóides.

Quando os hemócitos dos *A. albopictus* sadios foram analisados foi observado que apresentam entre  $12$  e  $39 \times 10^2$  hemócitos/ $\mu$ l de hemolinfa em cada mosquito. Inversamente ao que foi observado no *A. aegypti*, os hemócitos do *A. albopictus* sofreram um aumento significativo entre o primeiro e o segundo dia pós-eclosão. O que não ocorreu nos dias 3, 7 e 8 pós-eclosão (Figura 17). A contagem diferencial seguiu praticamente a mesma proporção das células presentes em *A. aegypti* onde, os prohemócitos correspondem a 50.8%, os oenocitóides a 32%, os plasmatócitos a 15%, os granulócitos a 1.5%, os adipohemócitos a 0.7% e os trombocitóides a 0.01% (Figura 18). O aumento ocorrido a partir do 1º dia pós-eclosão foi proporcional entre os adipohemócitos, plasmatócitos e oenocitóides. A figura 30 exhibe todos os tipos celulares visualizados na câmara de Neubauer.



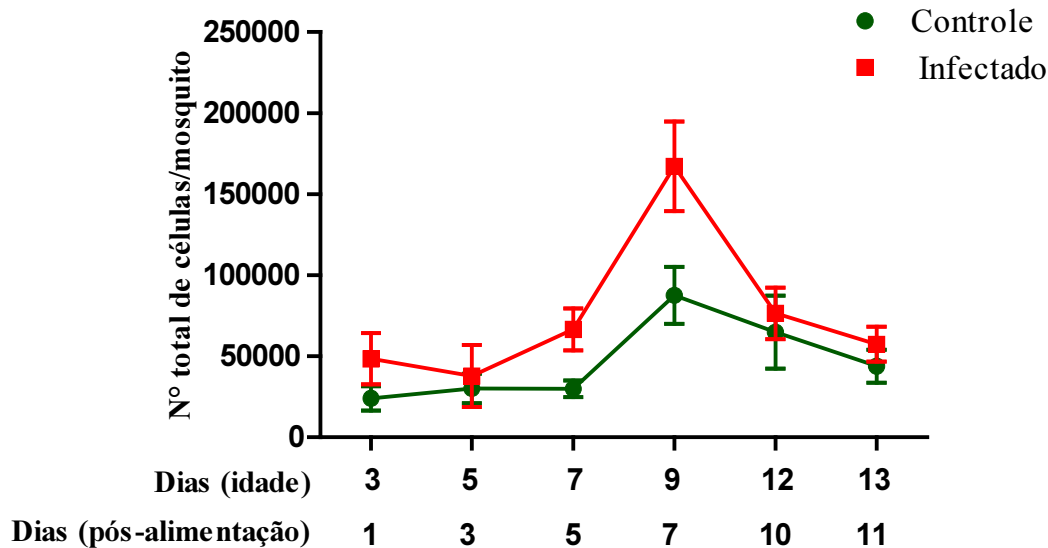
**Figura 17** - Contagem total do número de hemócitos presentes na hemolinfa de *A. albopictus* de acordo com a idade. As barras representam as médias ( $\pm$  erro padrão da média); os asteriscos indicam as diferenças que são estatisticamente significativas (Tukey's test; n=6).



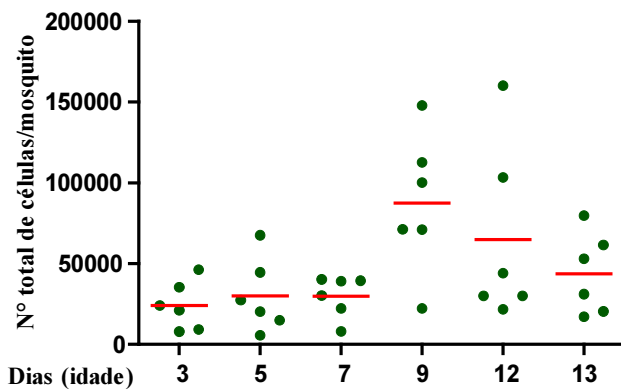
**Figura 18** - Contagem diferencial dos hemócitos presentes na hemolinfa de *A. albopictus* (n=6). As barras representam as médias ( $\pm$  erro padrão da média).

Prohemócitos, 
  Adipohemócitos, 
  Granulócitos, 
  Plasmatócitos, 
  Oenocitóides, 
  Trombocitóides.

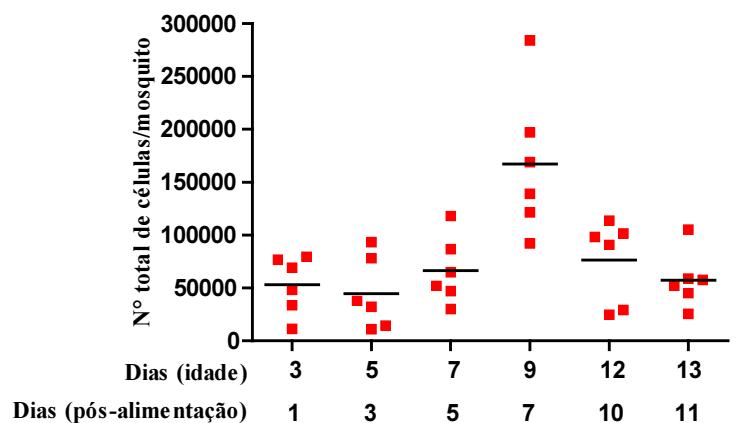
A contagem total dos hemócitos presentes na hemolinfa do *A. aegypti* após alimentação com sangue contendo *Dengue virus* exibiu um aumento estatisticamente significativo do número de células no 5º ( $p=0,049$ ) e 7º dia pós-alimentação ( $p= 0,0357$ ), quando comparado com o grupo controle (Figura 19, 20 e 21).



**Figura 19:** Contagem total dos hemócitos de *A. aegypti* no grupo controle e alimentados com sangue contendo *Dengue virus*, analisados até o 11º dia após a infecção. Cada ponto representa a média ( $\pm$  erro padrão da média). Notar a diferença significativa que houve no 7º dia pós-alimentação (Test  $t$  não pareado;  $n=6$ ).



**Figura 20:** Distribuição dos números de células por mosquito *A. aegypti* no grupo controle durante os dias 3, 5, 7, 9, 12 e 13 pós-eclosão. Cada círculo representa um indivíduo e a barra representa a média do somatório de todas as células ( $n=6$ ).



**Figura 21:** Distribuição dos números de células por mosquito *A. aegypti* infectado durante os dias 1, 3, 5, 7, 10 e 11 pós-alimentação. Cada quadrado representa um indivíduo e a barra representa a média do somatório de todas as células ( $n=6$ ).



A contagem diferencial de células no mosquito *A. aegypti* demonstrou que os prohemócitos diminuíram no 1º e 5º dia pós-alimentação quando comparado os dois grupos. Posteriormente, a proporção destas células permaneceu constante durante todos os tempos analisados (Figura 22).

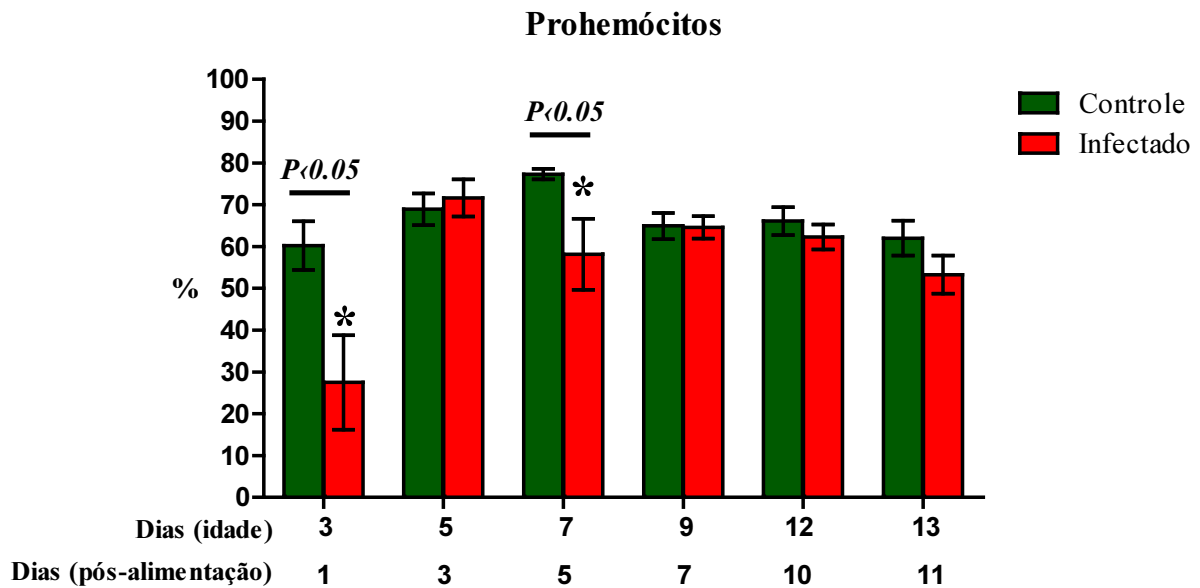
Os oenocitóides aumentaram significativamente apenas no 1º dia pós-alimentação quando comparado com o grupo controle. No grupo controle foi observada uma redução natural do número destas no 7º dia pós-eclosão, o que equivale ao 5º dia pós-alimentação. Entretanto nos dias subsequentes estas células voltaram a apresentar a mesma proporção (Figura 22).

A proporção relativa de plasmatócitos aumentou significativamente apenas no 13º dia pós-eclosão (equivalente ao 11º pós-alimentação) quando comparado com todos os outros dias analisados no grupo controle. Entretanto, após o 5º dia da alimentação sanguínea com *Dengue virus*, os plasmatócitos e granulócitos apresentaram um aumento significativo em comparação com o grupo controle (Figura 23).

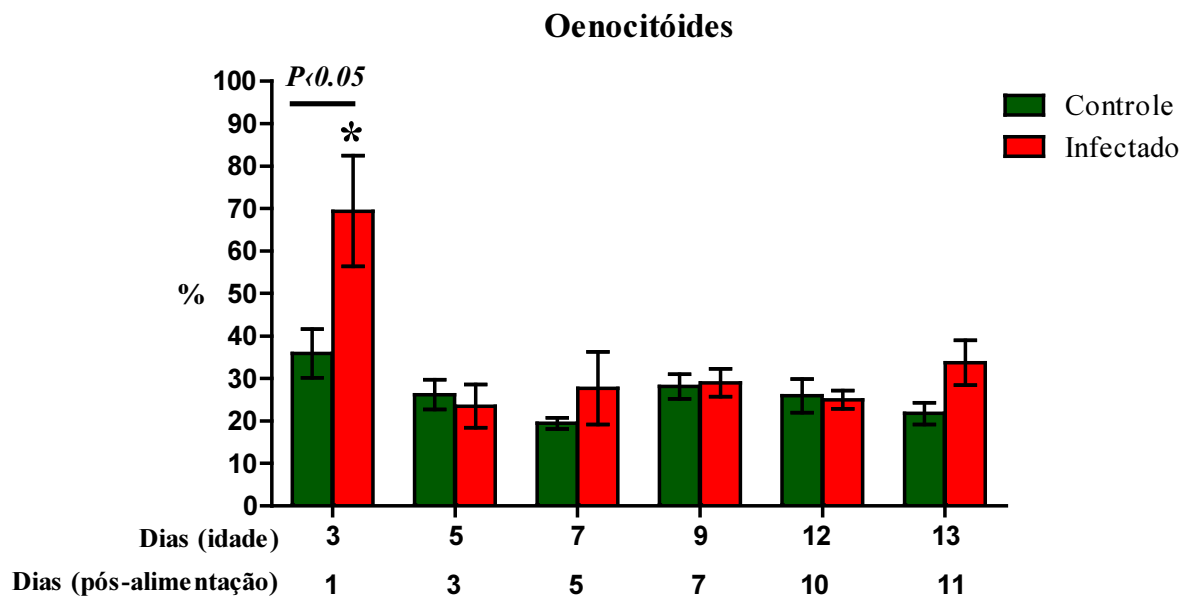
Os adipohemócitos foram os tipos celulares que não apresentaram nenhuma diferença significativa em todos os dias analisados em ambos os grupos (Figura 24). Com relação ao trombocitóide, só foi visualizado uma única célula no 11º dia pós-alimentação, o que equivale a 0,04% do total de células presentes neste dia analisado.

Com relação ao grupo controle não houve diferença estatisticamente significativa quando utilizamos mosquitos alimentados com açúcar e mosquitos alimentados apenas com sangue sem vírus (dados não exibidos).

A)

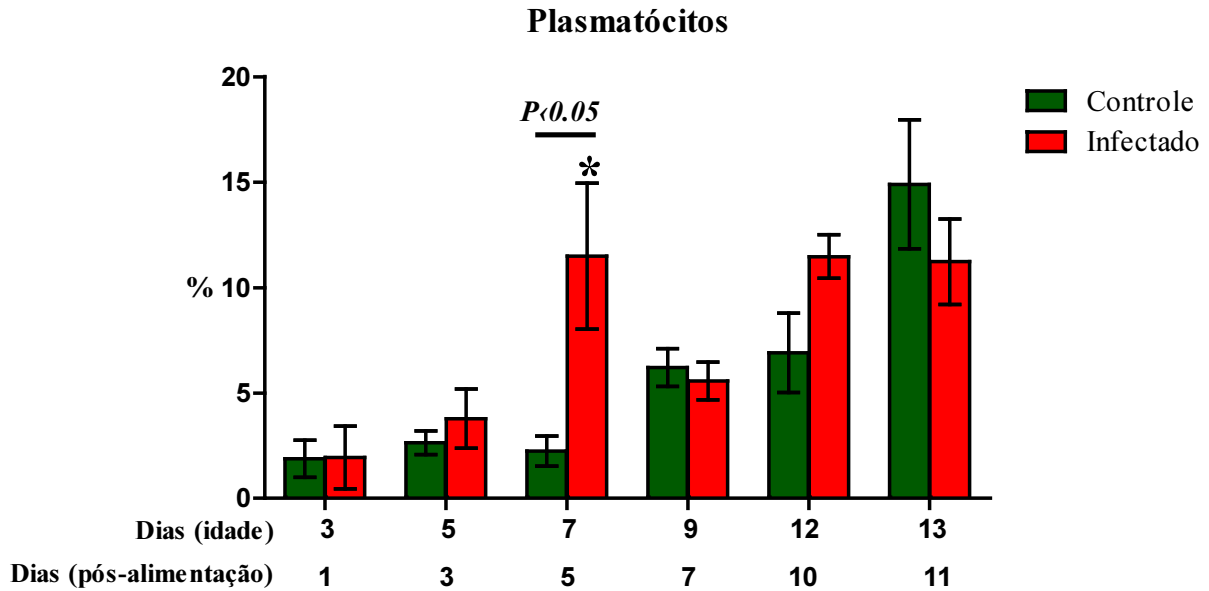


B)

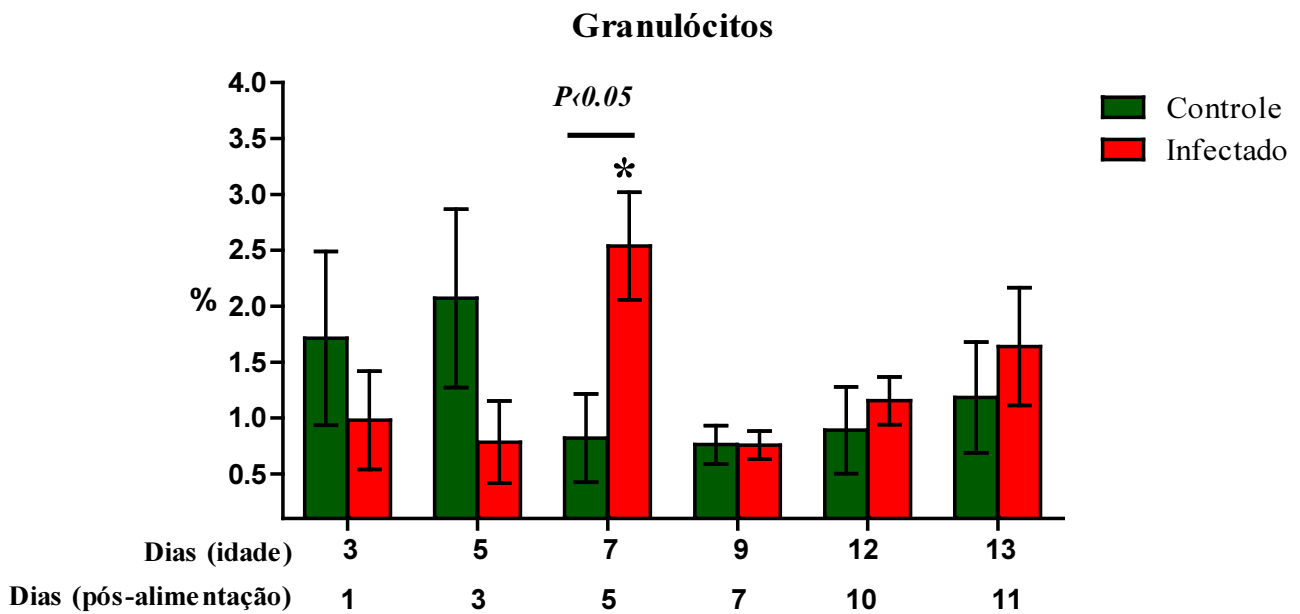


**Figura 22:** Proporção do número de prohemócitos (A) e oenocitóides (B) presentes nos mosquitos *A. aegypti* controle e infectado. As barras representam as médias ( $\pm$  erro padrão da média); os asteriscos indicam as diferenças que são estatisticamente significantes (Tukey's test;  $n=6$ ).

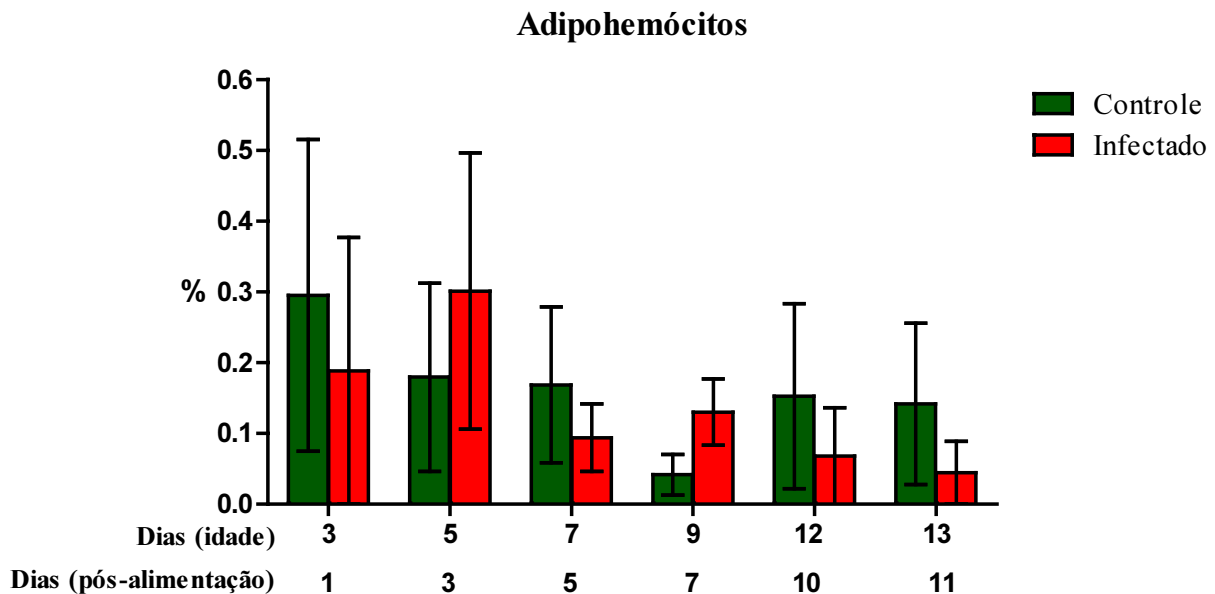
A)



B)



**Figura 23:** Proporção do número de plasmatócitos (A) e granulócitos (B) presentes nos mosquitos *A. aegypti* controle e infectado. As barras representam as médias ( $\pm$  erro padrão da média); os asteriscos indicam as diferenças que são estatisticamente significantes (Tukey's test; n=6).



**Figura 24:** Gráfico ilustrando a proporção do número de adipohemócitos presentes nos mosquitos *A. aegypti* controle e infectado. As barras representam as médias ( $\pm$  erro padrão da média) ( $n=6$ ).

### 5.6 Hemócitos de *A. aegypti* após desafio com *Dengue virus*

Através da inoculação do *Dengue virus* na hemolinfa dos mosquitos *A. aegypti* identificamos os hemócitos que se infectam e respondem a presença do vírus. Optamos por realizar este procedimento para poder romper algumas barreiras de infecção e analisar a resposta dos hemócitos que receberam os vírus diretamente na hemolinfa. Nossos resultados demonstraram que, após 48 horas da inoculação com *Dengue virus*, os plasmatócitos e os oenocitóides responderam à presença do vírus na hemolinfa exibindo alterações morfológicas características. Através da microscopia de luz podemos observar que os plasmatócitos apresentaram um aumento na vacuolização e na emissão de projeções citoplasmáticas (Figura 36D) e os oenocitóides exibiram aumento no número de vacúolos presentes no citoplasma (Figura 36B).

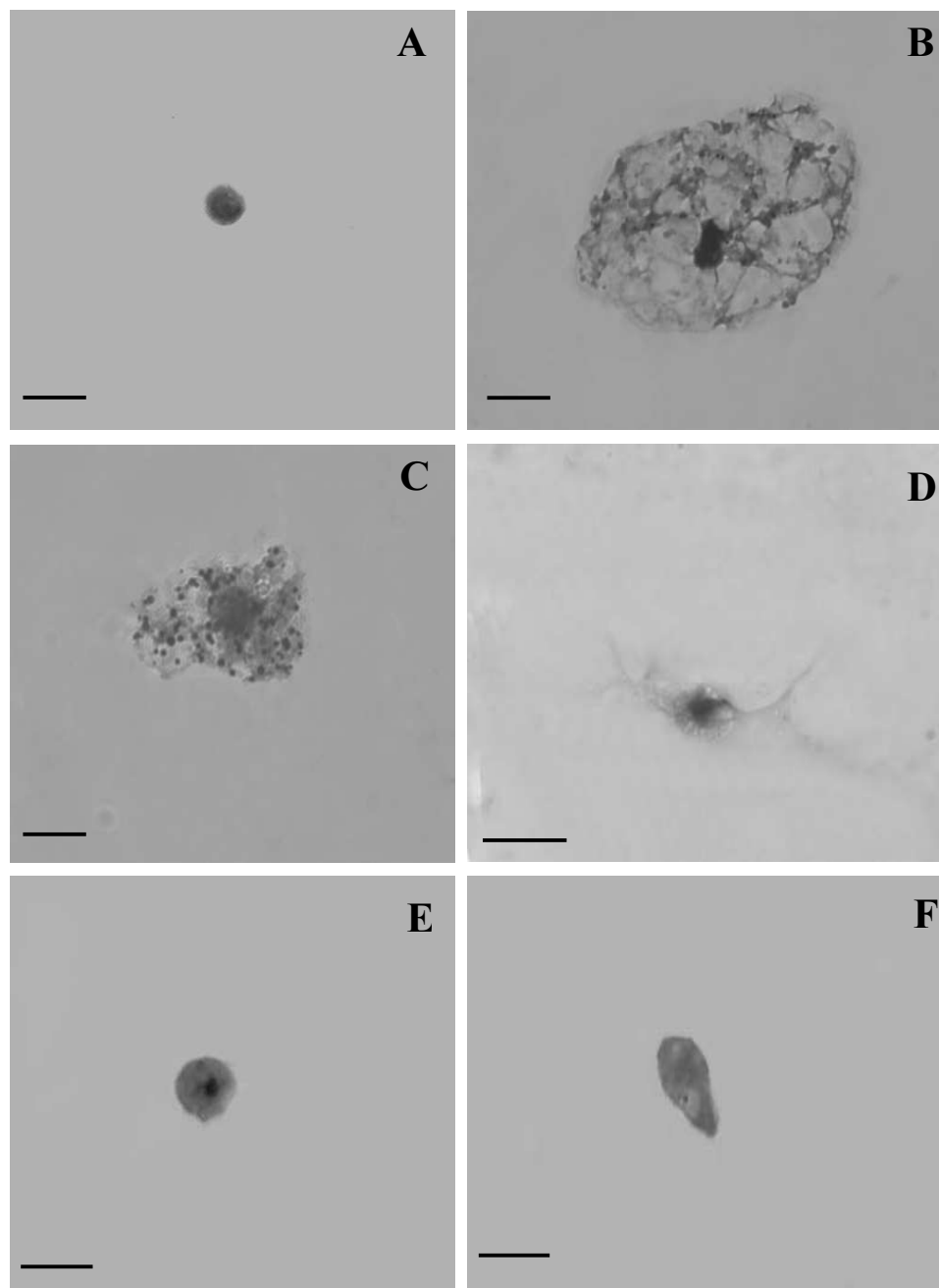
A imunomarcação dos hemócitos presentes nos mosquitos *A. aegypti* desafiados com DENV exibiu células positivas na hemolinfa após 48h de infecção. Os granulócitos, os plasmatócitos e os oenocitóides foram as células que exibiram marcação com anticorpo policlonal anti-dengue (Figura 37). O granulócito exibe partículas virais agrupadas numa determinada região do citoplasma (Figura 37 A-D). O oenocitóide exibe partículas virais aglomeradas na superfície da célula sugerindo que estejam em processo de endocitose (Figura 37 E-H). O plasmatócito foi a célula que mais exibiu marcação para a presença dos antígenos virais no citoplasma (Figura 37 I-L).

O núcleo celular desloca-se para a periferia da célula e grandes vacúolos contendo material eletrondenso podem ser visualizados. O retículo endoplasmático rugoso e um grande número de mitocôndrias alongadas são encontrados no citoplasma destas células (Figura 38). A área de replicação viral é caracterizada pelo aumento das cisternas do RER (Figura 39 B) e pela presença de estruturas lisas de membrana (“smooth-membrane structure” - SMS) (Figura 39C). As figuras 39A e D exibem numerosos ribossomos bem desenvolvidos aderidos à membrana nuclear que se liga ao RER. Este aumento do tamanho e densidade dos ribossomos sugere a síntese de proteínas virais.

Os prohemócitos, os adipohemócitos e os trombocitóides não apresentaram nenhuma alteração característica através da MET (Figura 40 A, B e C respectivamente) após 2 e 48h pós-infecção. A microscopia eletrônica revelou células com características morfológicas de apoptose. Estas células exibiram fragmentação nuclear, condensação e retração do citoplasma. Numerosas vesículas podem ser encontradas, algumas aparentando estarem sendo liberadas para o meio extracelular (Figura 40D). Apesar do mecanismo de apoptose ser uma importante forma de defesa antiviral, não podemos concluir apenas com estes resultados preliminares que este fenômeno está influenciando a infecção viral, outros experimentos terão de ser realizados futuramente.

### 5.7 Detecção do *Dengue virus* na hemolinfa

A presença do *Dengue virus* na hemolinfa dos mosquitos *A. aegypti*, após 48 horas da inoculação, foi confirmada através da realização da técnica de PCR desenvolvida por Lanciotti RS *et al.* (1992). A técnica “semi-nested” RT-PCR tem como objetivo detectar e identificar os quatro sorotipos do DENV, tanto em soros de pacientes, quanto em mosquitos infectados, sendo realizada através de 2 PCRs. Os oligonucleotídeos iniciadores amplificaram um produto de 511 pares de base (pb), entretanto a presença do *Dengue virus* sorotipo 2 foi caracterizada por uma banda que apresentava peso molecular de 119pb revelada em gel de poliacrilamida à 0,8%, corado com nitrato de prata (Figura 41).



**Figura 25 – Morfologia dos hemócitos de *A. albopictus* fixados e observados através da microscopia de luz.**

**Figura A** - Prohemócito

**Figura B** – Adipohemócito

**Figura C** – Granulócito

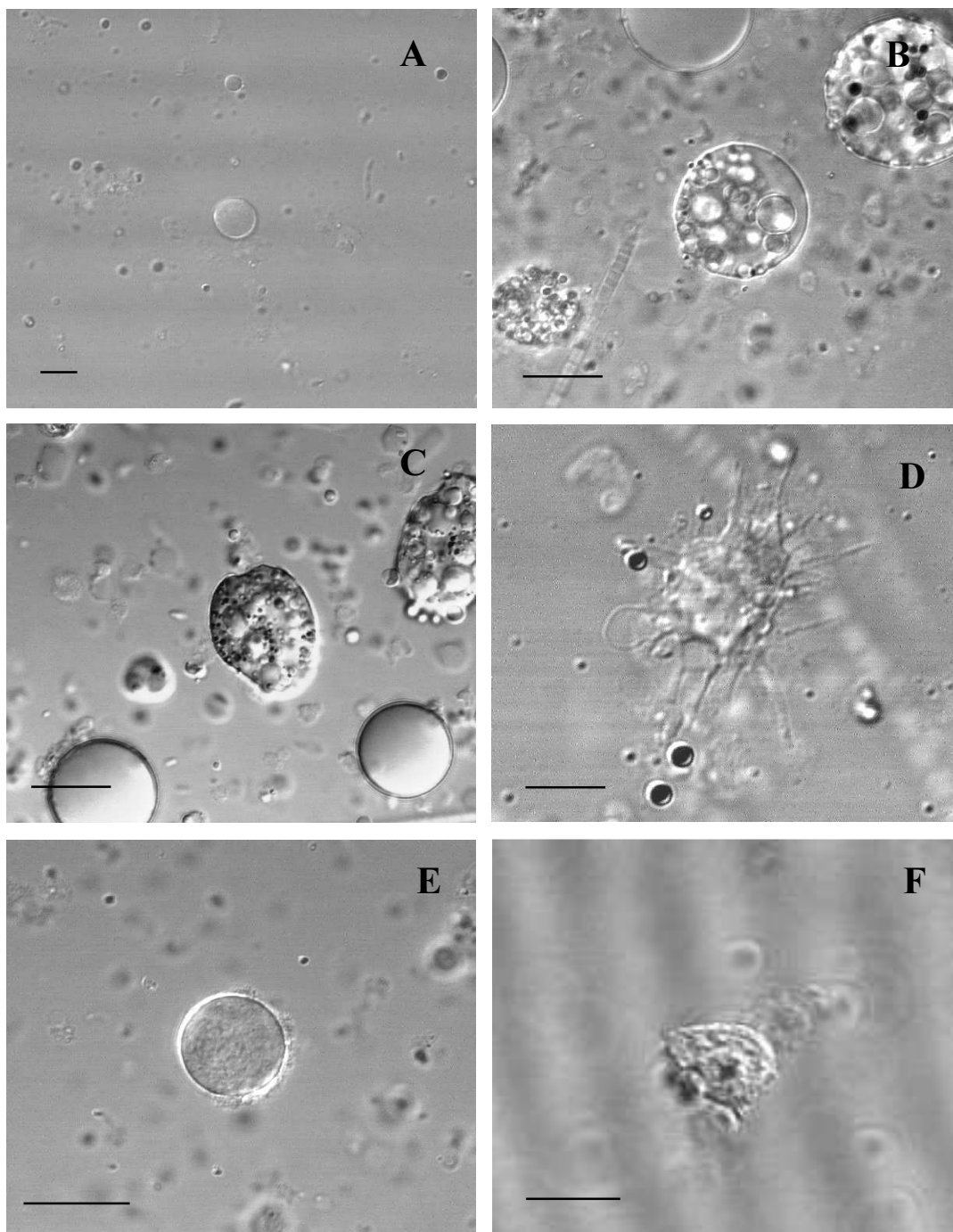
**Figura D** – Plasmatócito

**Figura E** – Oenocitóide

**Figura F** - Trombocitóide

Barras = 10µm





**Figura 26 – Morfologia dos Hemócitos de *A. albopictus* através da microscopia de contraste de interferência diferencial.**

Figura A – Prohemócito

Figura B – Adipohemócito

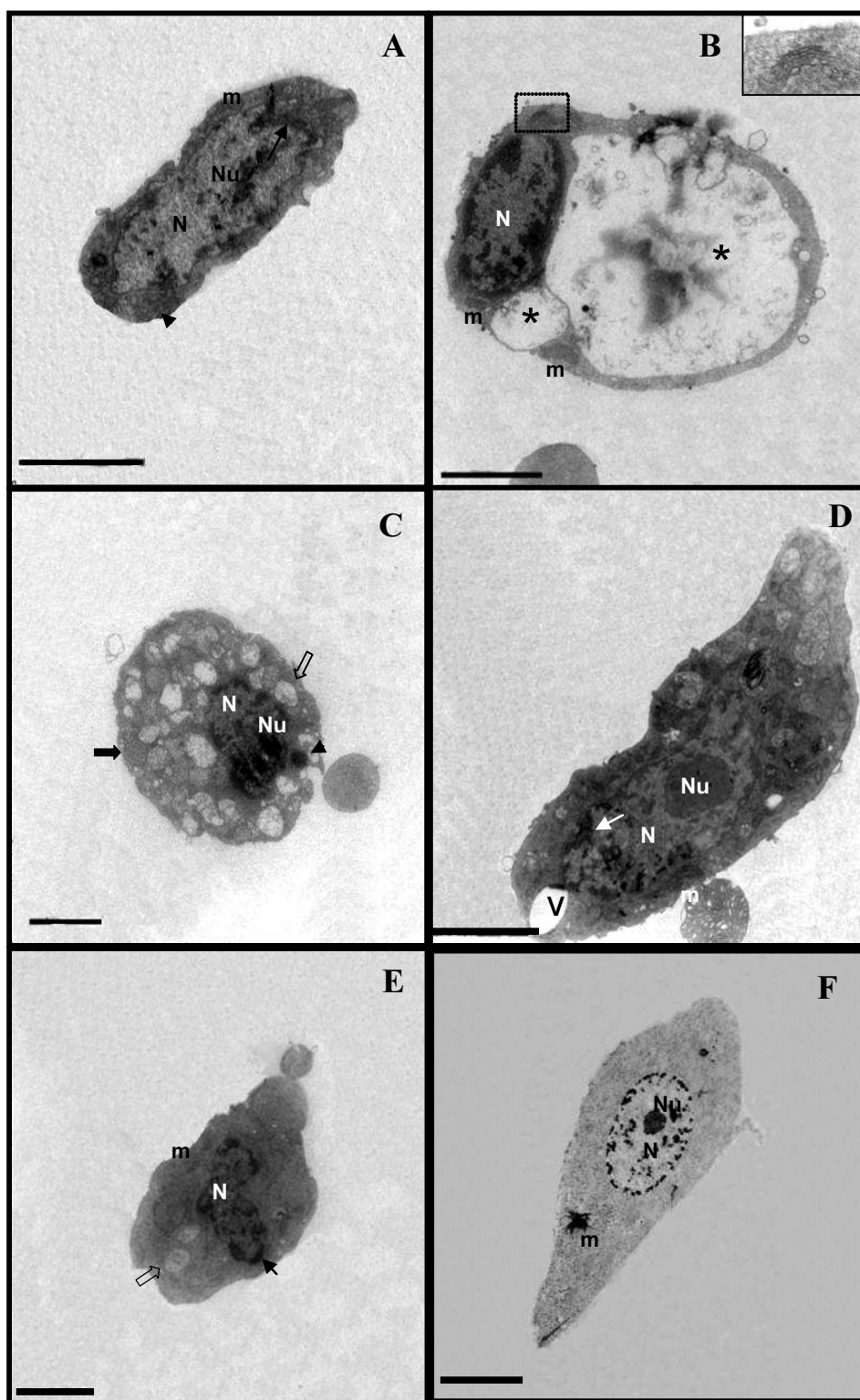
Figura C - Granulócito

Figura D – Plasmatócito

Figura E - Oenocitóide

Figura F – Trombocitóide

Barras A, C, D, E, F = 10 $\mu$ m; B = 20 $\mu$ m.



**Figura 27 - Caracterização ultraestrutural dos hemócitos de *A. albopictus***

**Figura A** - Prohemócito exibindo um núcleo (N) largo localizado centralmente, contendo nucléolo (Nu). O citoplasma exibe poucas organelas como as mitocôndrias (m) e retículo endoplasmático liso (cabeça de seta).

**Figura B** - Adipohemócito exibindo um núcleo largo (N), citoplasma contendo grandes e pequenas vesículas lipídicas (asterisco preto) e mitocôndrias (m). Note-se o complexo de golgi (inset).

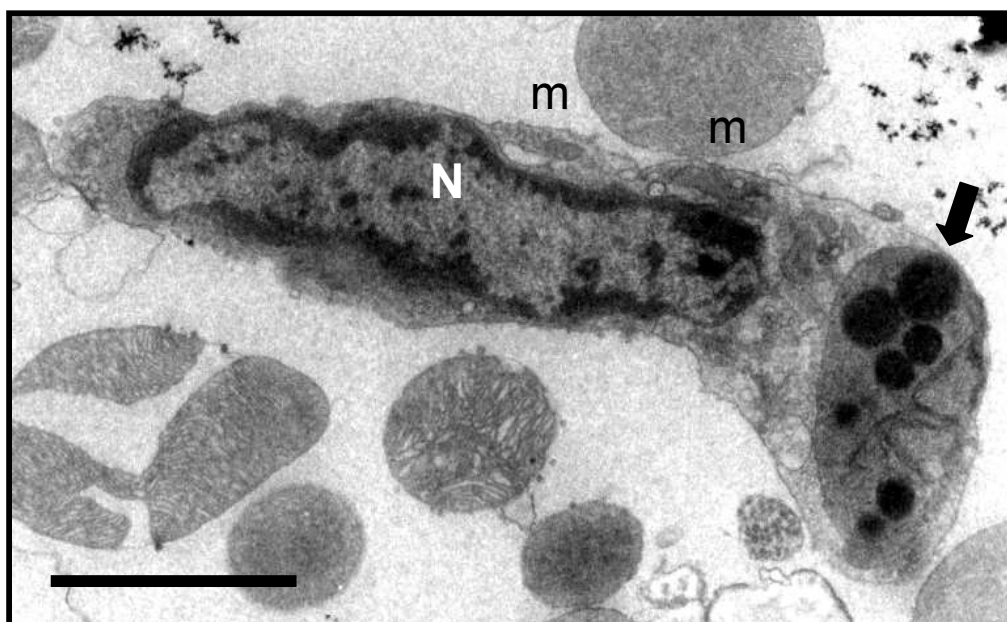
**Figura C** - Granulócito com citoplasma preenchido com vesículas delimitadas por membranas (setas) e núcleo (N). Algumas vesículas contêm grânulos eletrondensos (seta fechada), eletron-lucentes (seta aberta) e com alta eletrondensidade (cabeça de seta).

**Figura D** - Plamatócito exibindo núcleo alongado (N), com nucléolo evidente (Nu). Algumas ilhas de heterocromatina estão presentes (seta). Citoplasma contendo mitocôndrias (m) e vesículas (V).

**Figura E** - Oenocitóide exibindo núcleo lobado excêntrico (N) com ilhas de heterocromatina (seta). Vacúolos citoplasmáticos (seta aberta) e mitocôndrias (m) estão presentes.

**Figura F** - Trombocitóide contendo núcleo (N), com nucléolo bem evidente (Nu) e citoplasma homogêneo contendo mitocôndrias (m).

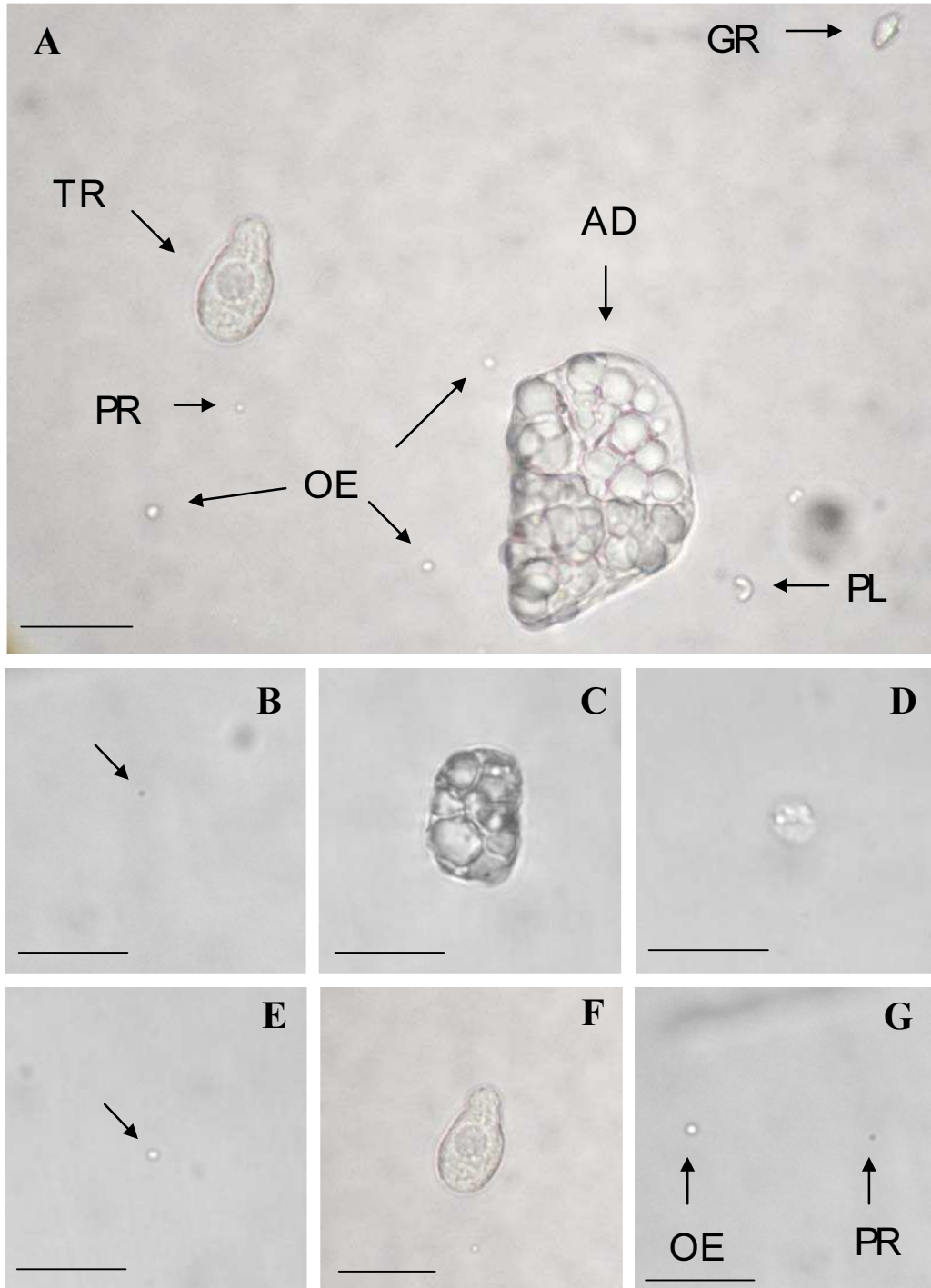
Barras = 2 $\mu$ m.



**Figura 28 – Plasmatócito fagocitando uma célula apoptótica.**

Nota: Célula exibindo núcleo (N) com heterocromatina perifericamente localizada, mitocôndrias (m) alongadas e um corpo apoptótico sendo fagocitado (seta).

Barra = 2 $\mu$ m



**Figura 29 - Hemócitos de *A. aegypti* vivos observados em Câmara de Neubauer através da microscopia de luz.**

**Figura A** – Todos os tipos celulares

**Figura B** – Prohemócito (PR)

**Figura C** – Adipohemócito (AD)

**Figura D** – Granulócito (GR)

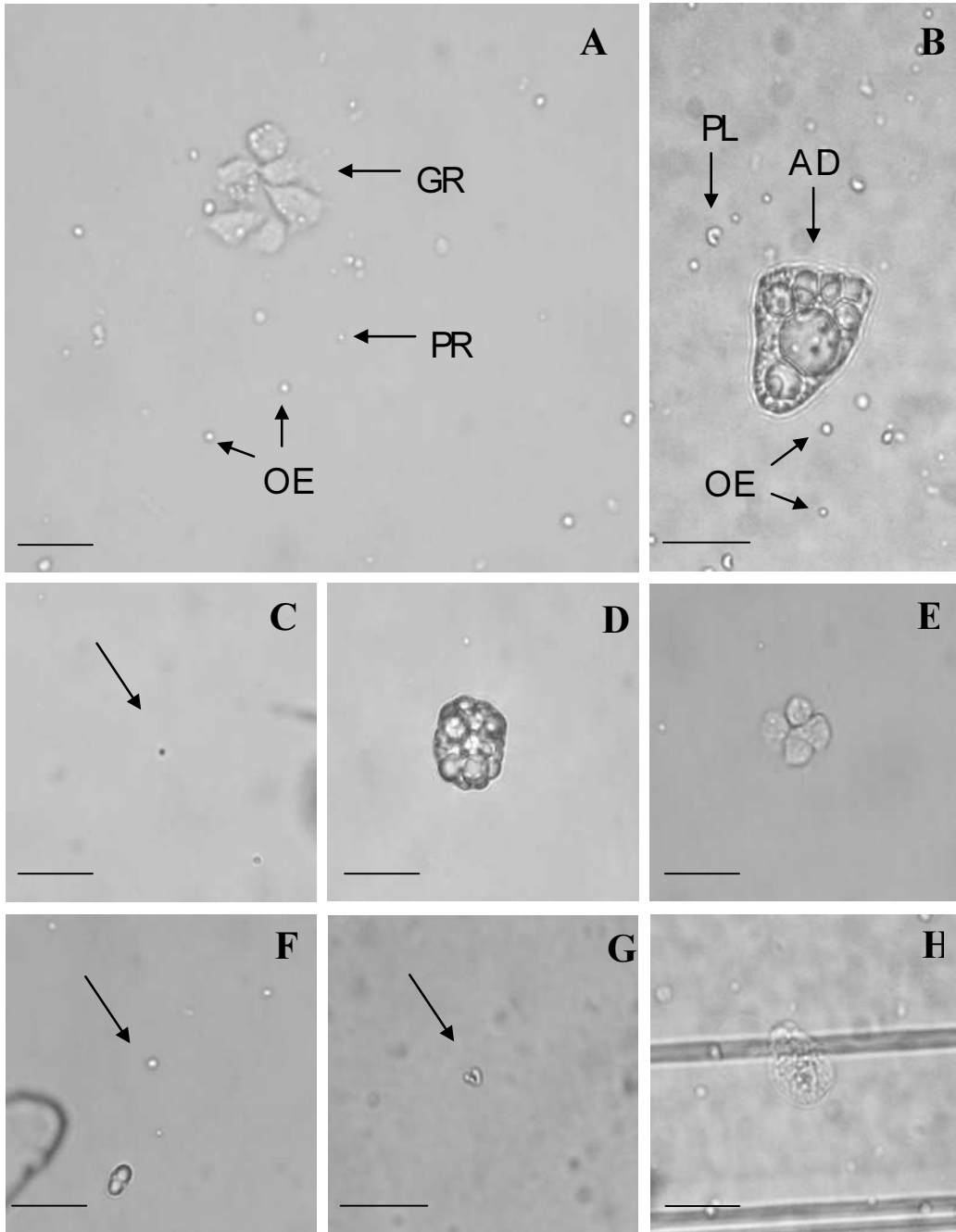
**Figura E** – Oenocitóide (OE)

**Figura F** – Trombocitóide (TR)

**Figura G** – Oenocitóide e Prohemócito

Barras = 25µm





**Figura 30 - Hemócitos de *A. albopictus* vivos observados em Câmara de Neubauer através da microscopia de luz.**

**Figura A** – Proemócitos (PR), oenocitóides (OE) e granulócitos (GR).

**Figura B** – Adipohemócito (AD), Plasmatócito (PL) e oenocitóides (OE).

**Figura C** - Prohemócito

**Figura D** – Adipohemócito

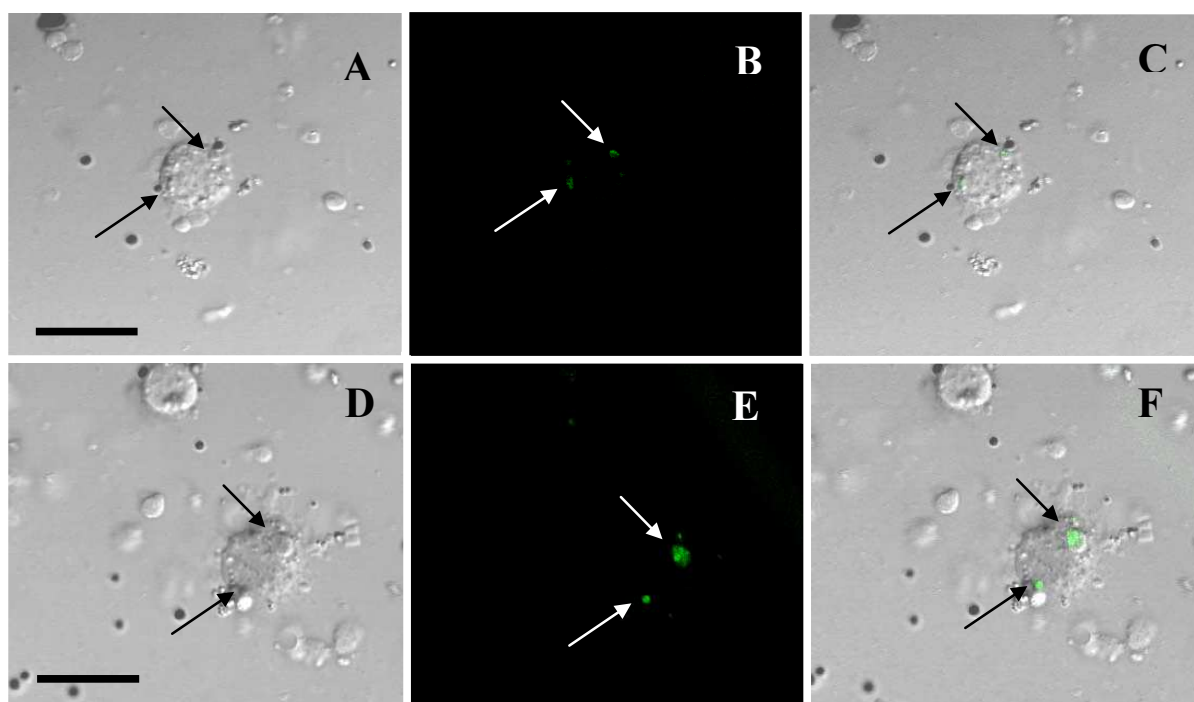
**Figura E** – Granulócitos

**Figura F** – Oenocitóide

**Figura G** – Plasmatócito

**Figura H** - Trombocitóde (TR)

Barras = 25µm



**Figura 31 – Endocitose (fagocitose) de partículas de látex pelos hemócitos de *A. albopictus*.**

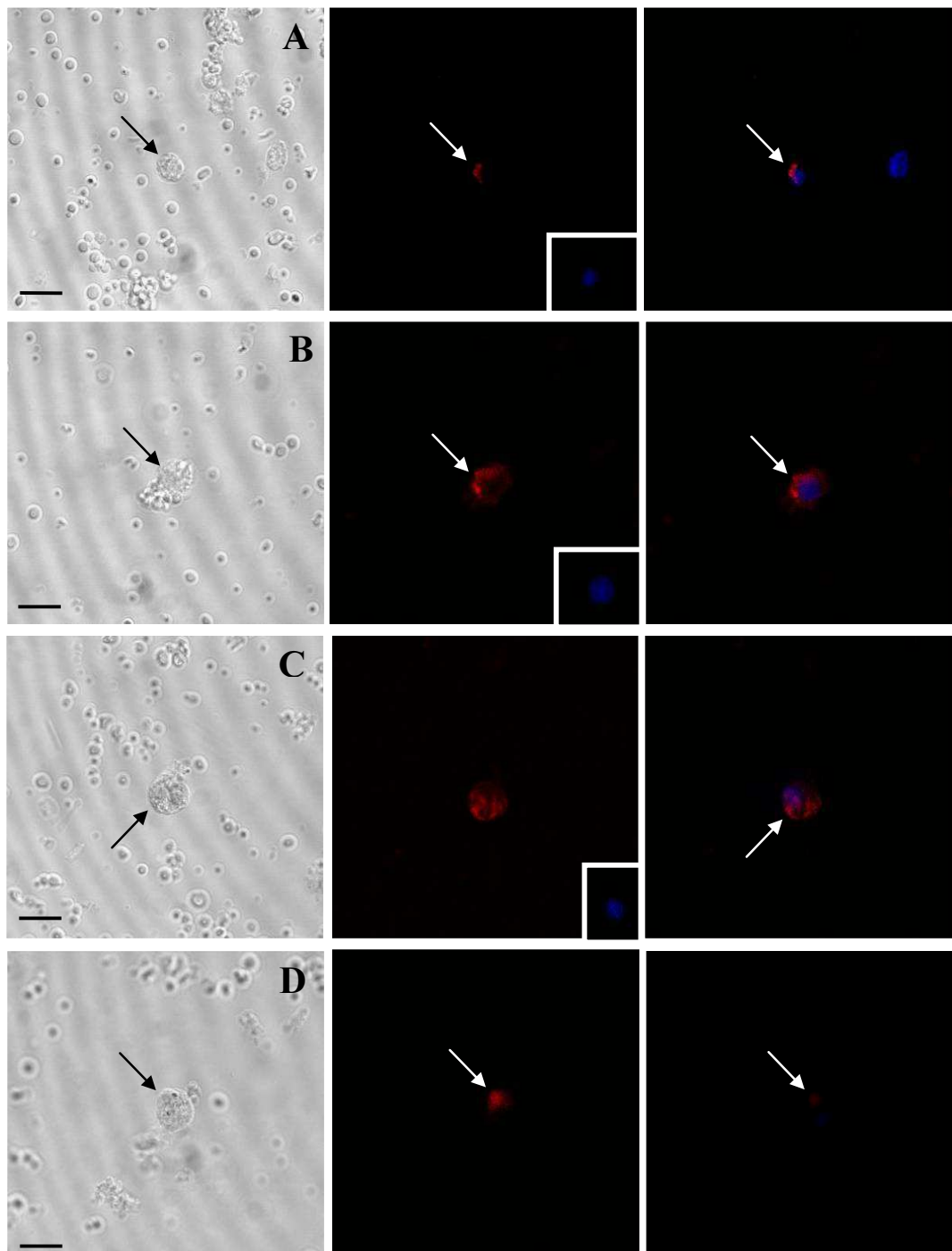
**Figura A** - Imagem em DIC do granulócito de *A. albopictus*

**Figura D** – Imagem em DIC do plasmatócito de *A. albopictus*

**Figura B, E** – Imagem do confocal exibindo partículas de látex conjugadas à FITC

**Figura C, F** - Imagem sobreposta do granulócito de *A. albopictus*

Barras = 11,9µm.



**Figura 32 – Endocitose de albumina-rodamina pelos hemócitos de *A. aegypti*.**

**Figura A** - Prohemócito após 30 minutos de incubação

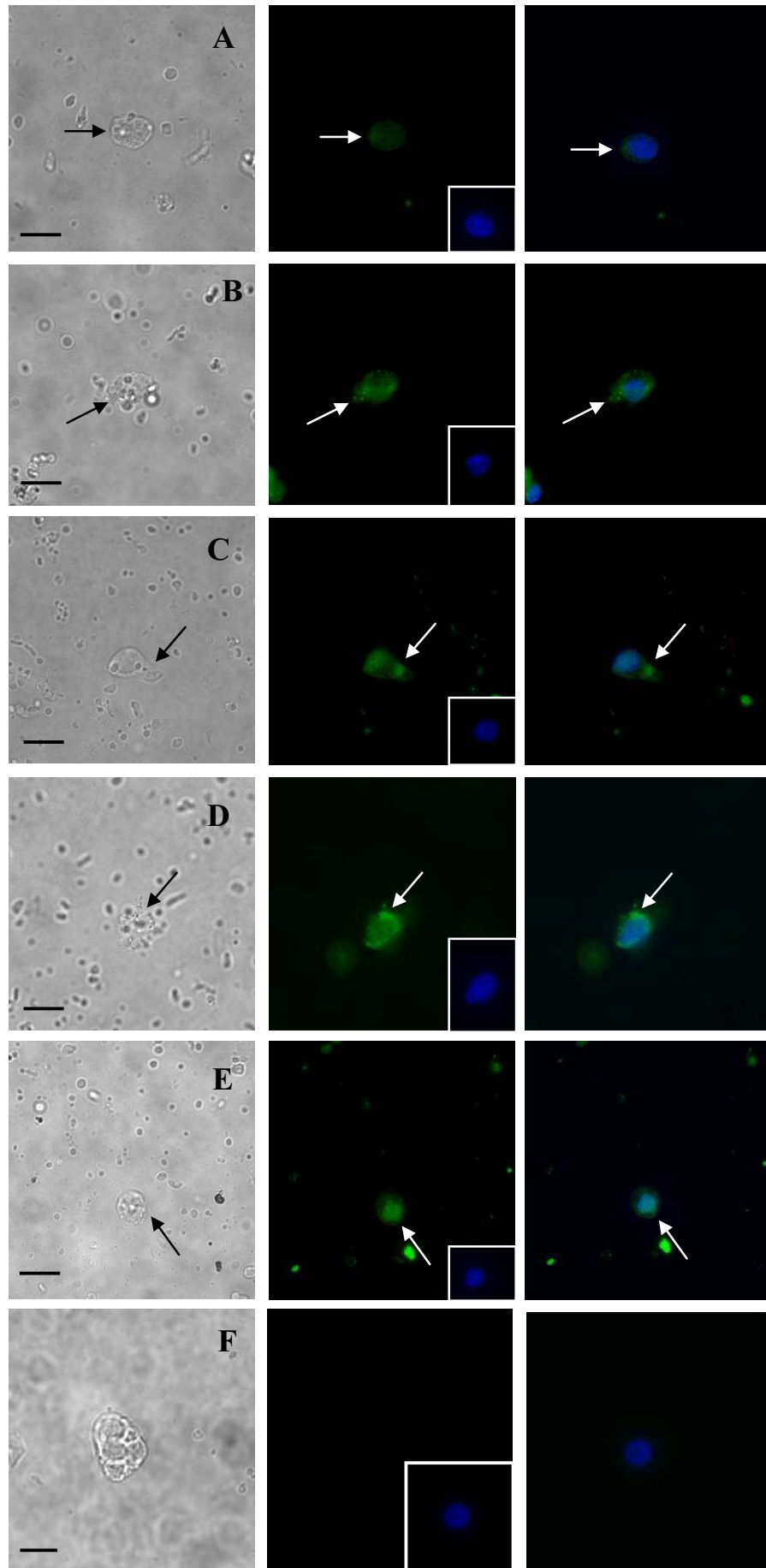
**Figura B** - Granulócito após 30 minutos de incubação

**Figura C** - Oenocitóide após 30 minutos de incubação

**Figura D** - Oenocitóide após 1 hora de incubação.

Note albumina – rodamina em vermelho e no detalhe o núcleo marcado com DAPI em azul.

Barras = 10µm



**Figura 33 - Marcação dos lisossomos presentes nos hemócitos de *A. aegypti* e *A. albopictus*.**

**Figura A** – Oenocitóide de *A. aegypti*

**Figura B** - Plamatócito de *A. aegypti*

**Figura C** – Plamatócito de *A. albopictus*

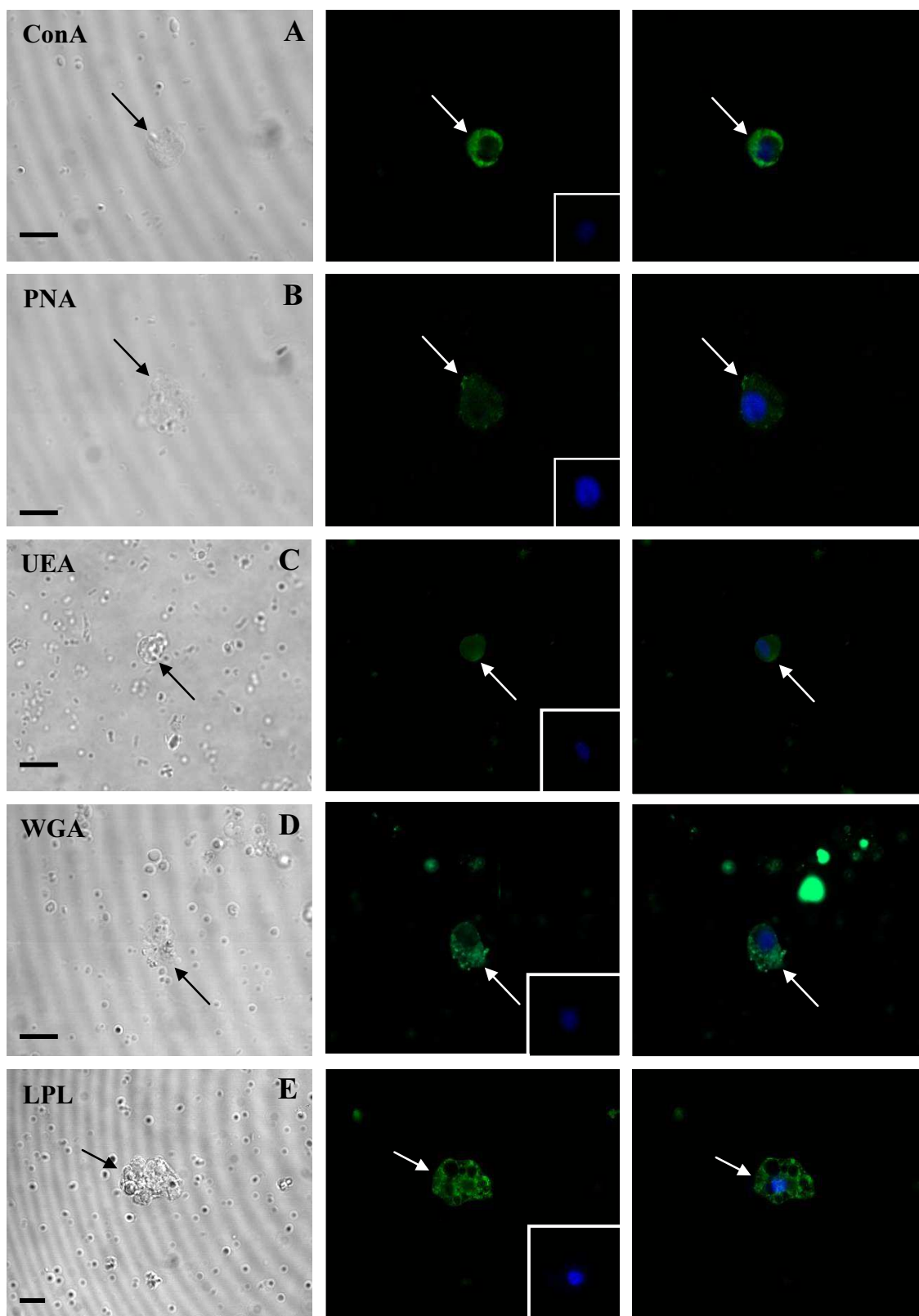
**Figura D** – Granulócito de *A. albopictus*

**Figura E** – Oenocitóide de *A. albopictus*

**Figura F** - Controle

Barras = 10µm.





**Figura 34 - Ligação das lectinas aos hemócitos de *A. aegypti***

**Figura A** - Oenocitóide marcado com a lectina ConA.

**Figura B** - Trombocitóide marcado com a lectina PNA.

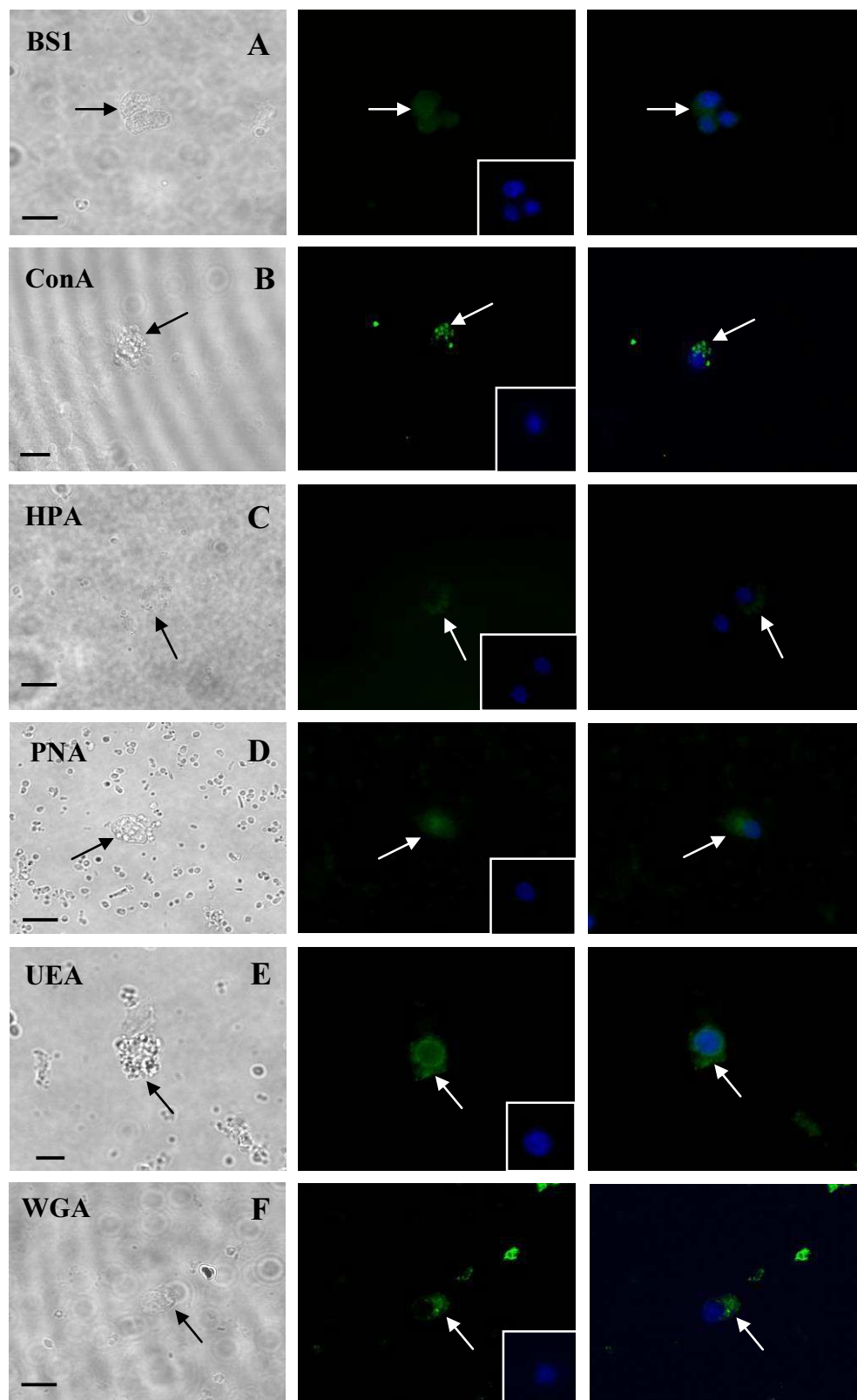
**Figura C** - Prohemócito marcado com a lectina UEA.

**Figura D** - Granulócito incubado com a lectina WGA.

**Figura E** - Adipohemócito incubado com a lectina LPL.

Em verde estão as lectinas conjugadas à FITC. No detalhe: DAPI em azul.

Barras = 10µm



**Figura 35 - Ligação das lectinas aos hemócitos de *A. albopictus***

**Figura A** - Oenocitóide marcado com a lectina BS1.

**Figura B** - Granulócito marcado com a lectina ConA.

**Figura C** - Oenocitóide marcado com a lectina HPA.

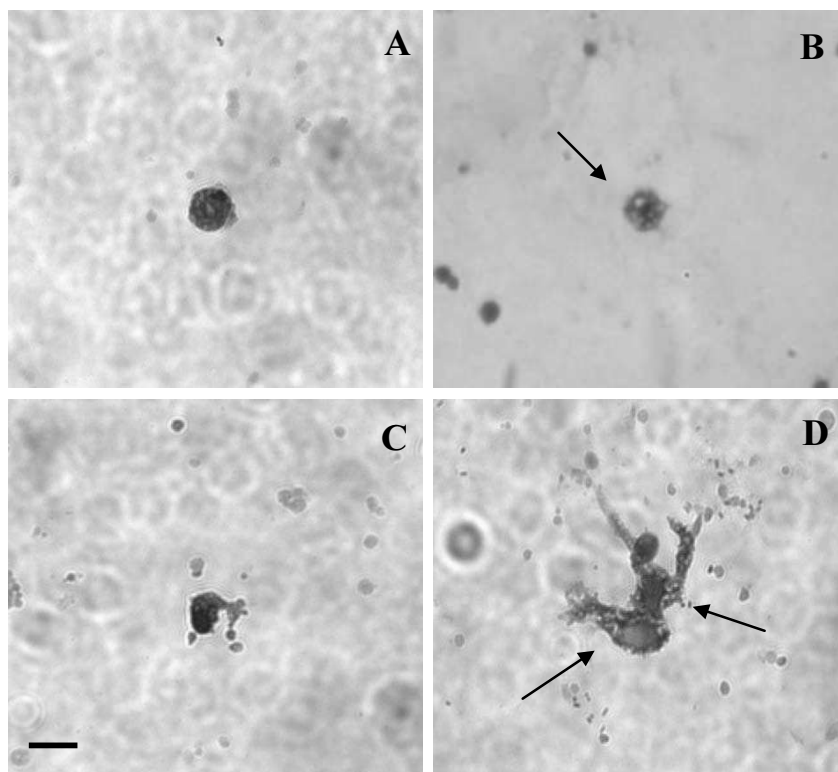
**Figura D** - Granulócito marcado com a lectina PNA.

**Figura E** - Granulócito marcado com a lectina UEA.

**Figura F** - Oenocitóide marcado com a lectina WGA.

Em verde estão as lectinas conjugadas à FITC. No detalhe DAPI em azul.

Barras = 10µm



**Figura 36 - Hemócitos de *A. aegypti* após 48h horas da inoculação com *Dengue virus 2* observados através da microscopia de luz.**

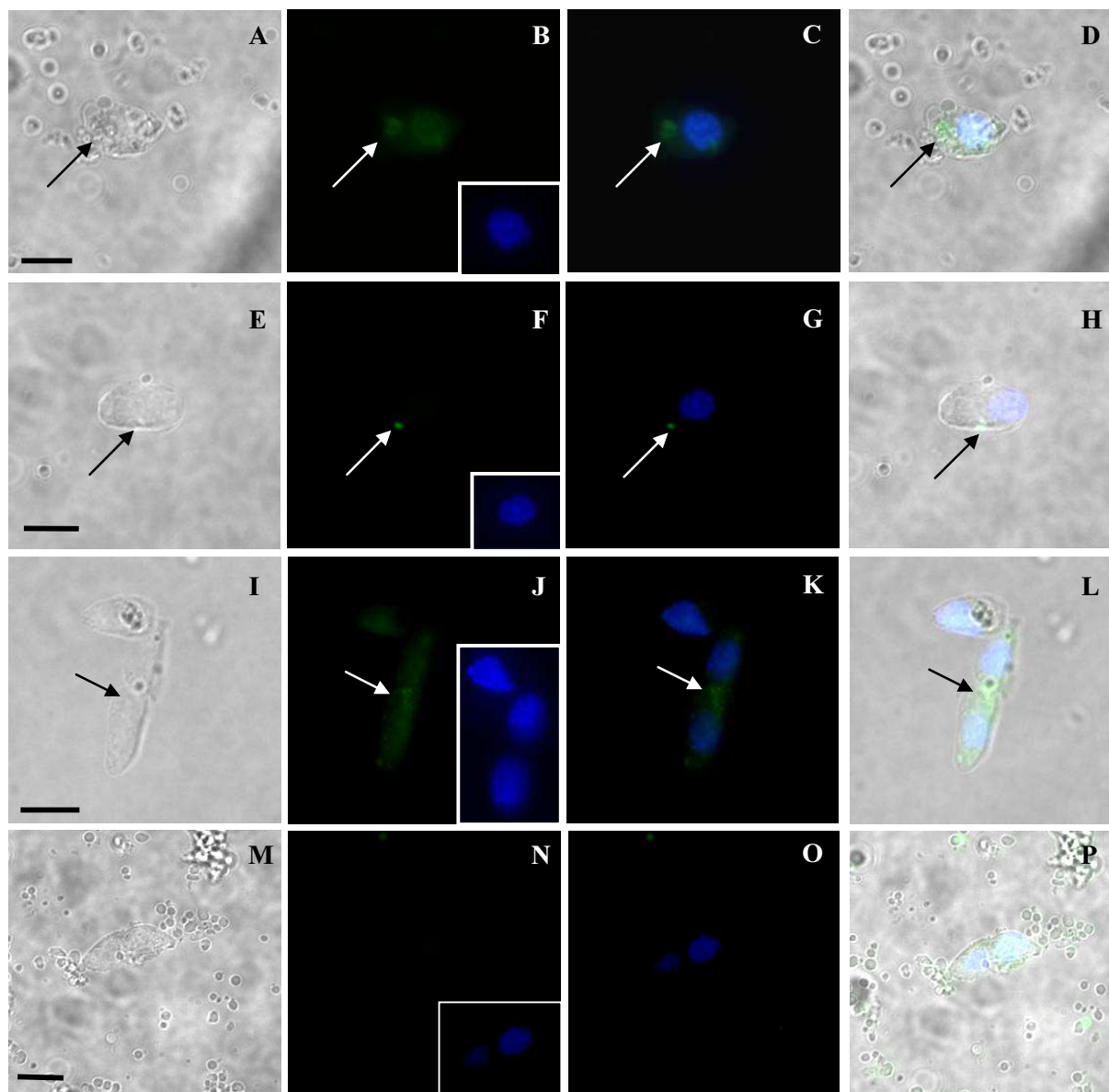
**Figura A** - Oenocitóide presente na hemolinfa dos mosquitos controle.

**Figura B** - Oenocitóide apresentando citoplasma vacuolizado após a exposição da hemolinfa ao vírus.

**Figura C** - Plasmatócito presente na hemolinfa dos mosquitos controle.

**Figura D** - Plasmatócito após o desafio com vírus exibindo diversas projeções citoplasmáticas e vacúolos no seu citoplasma.

Barra = 10 $\mu$ m



**Figura 37 - Imunomarcção dos hemócitos de *A. aegypti* após 48 horas da inoculação com *Dengue virus 2*.**

**Figura A** –Granulócito presente na hemolinfa dos mosquitos inoculados com vírus.

**Figura E** - Oenocitóide presente na hemolinfa dos mosquitos inoculados com vírus.

**Figura I** – Plamatócito presente na hemolinfa dos mosquitos inoculados com vírus.

**Figura M** – Plasmatócitos presentes na hemolinfa dos mosquitos controle.

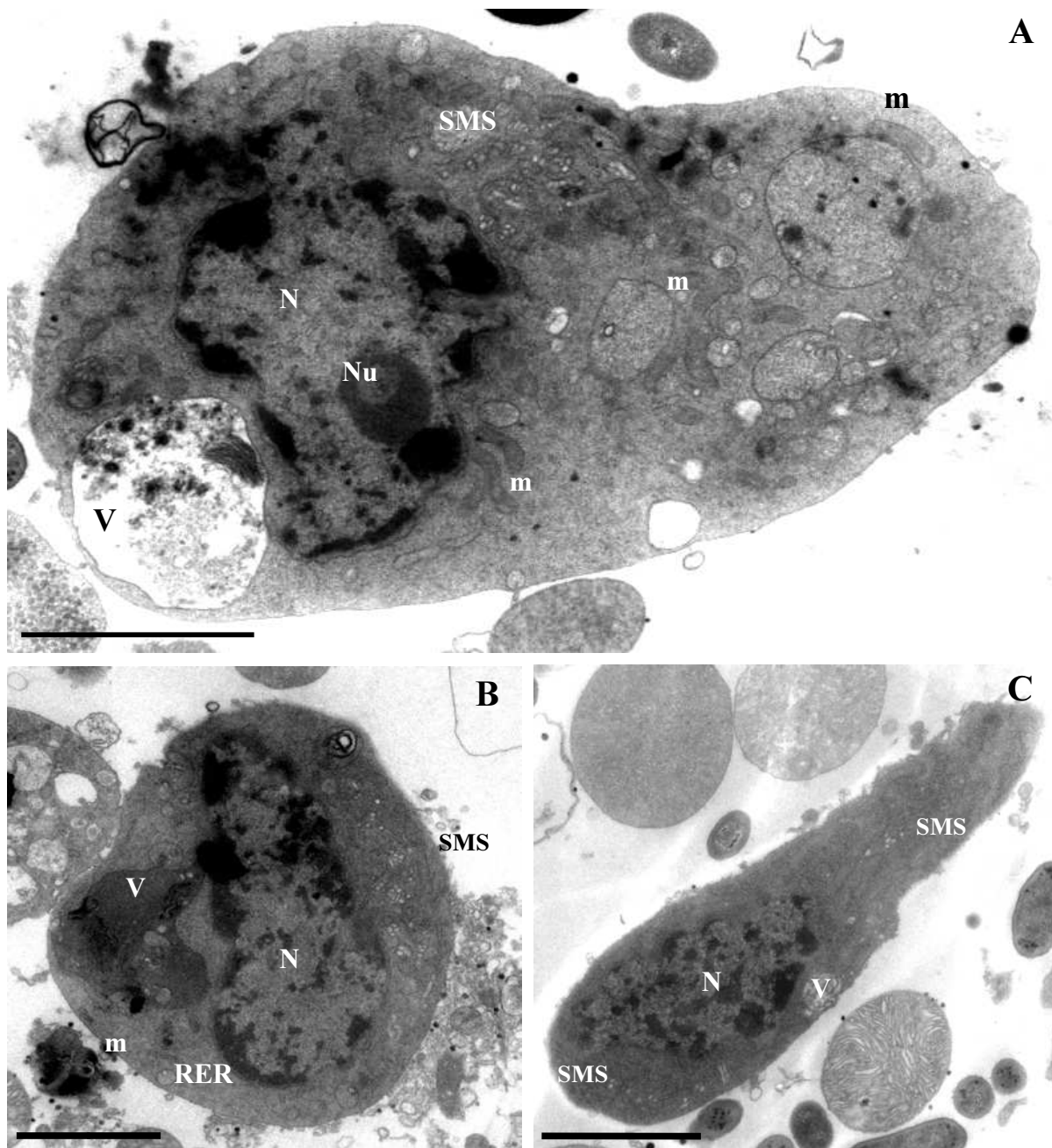
**Figura B, F, J, N** – Imunomarcção com anticorpo anti-dengue conjugado à FITC (verde). No detalhe, notar o núcleo da célula marcado com DAPI (azul).

**Figura C, G, K, O** – Sobreposição da marcação do anticorpo anti-dengue (verde) com o marcador nuclear DAPI (azul).

**Figura D, H, L, P** – Sobreposição das imagens de DIC, anticorpo anti-dengue (verde) e marcador nuclear (azul).

Barra = 10µm





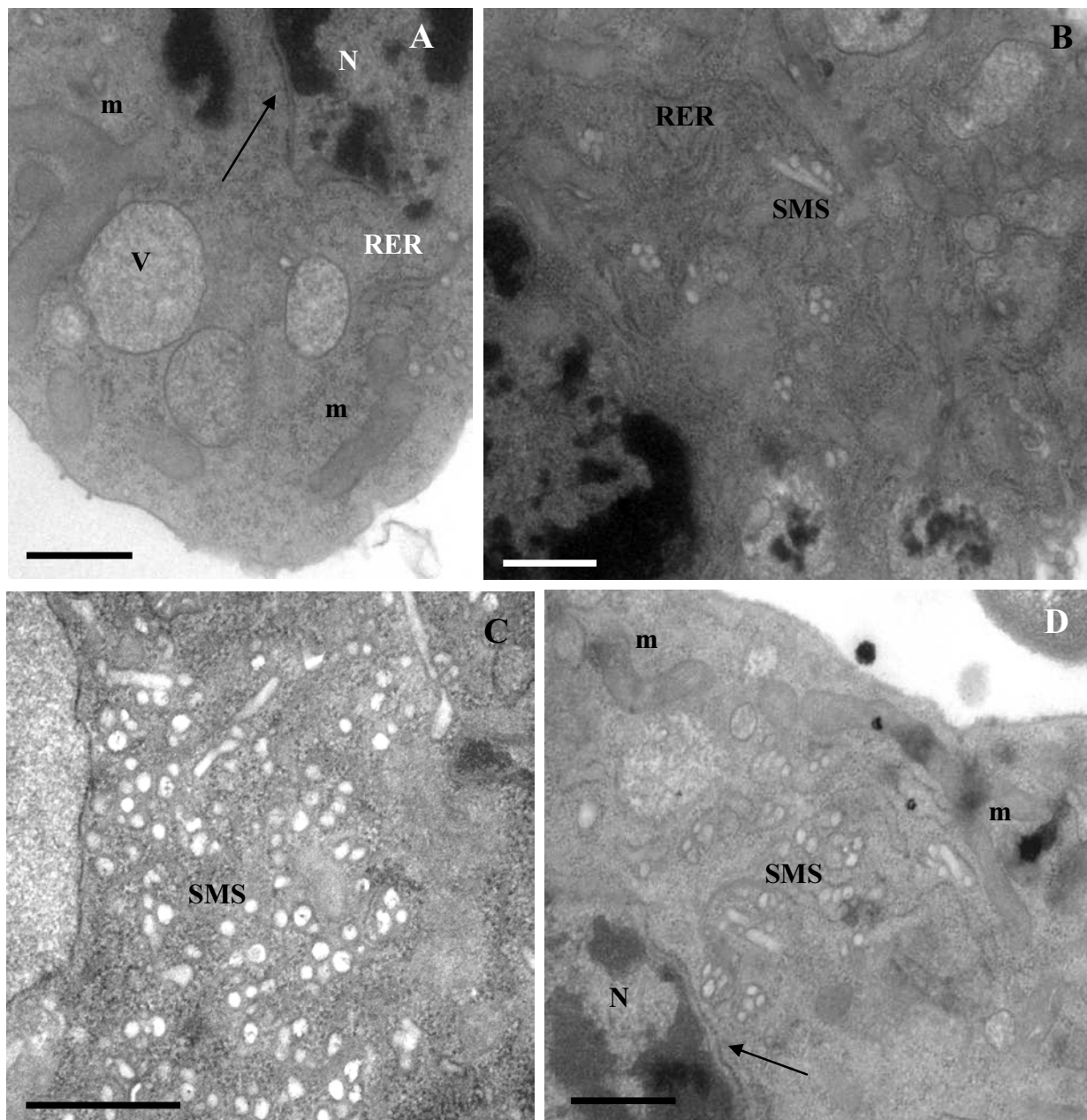
**Figura 38 - Ultraestrutura dos hemócitos de *A. aegypti* após 48h do desafio com *Dengue virus 2*.**

**A** – Oenocitóide exibindo núcleo (N) deslocado, nucléolo (Nu), diversas mitocôndrias alongadas (m), vacúolos (V) contendo debris celulares e estruturas lisas de membrana (SMS).

**B** – Oenocitóide possuindo núcleo (N) localizado centralmente, estruturas lisas de membranas (SMS), mitocôndrias (m), vacúolo (V) contendo material eletron-denso e retículo endoplasmático rugoso (RER) bem desenvolvido.

**C** – Plasmatócito exibindo núcleo (N), estruturas lisas de membranas (SMS) e vacúolo (V).

Barras A, B, C = 2 $\mu$ m.



**Figura 39 - Detalhes das estruturas lisas de membrana (SMS) e outras alterações morfológicas presentes nos hemócitos em resposta à infecção pelo *Dengue virus 2*.**

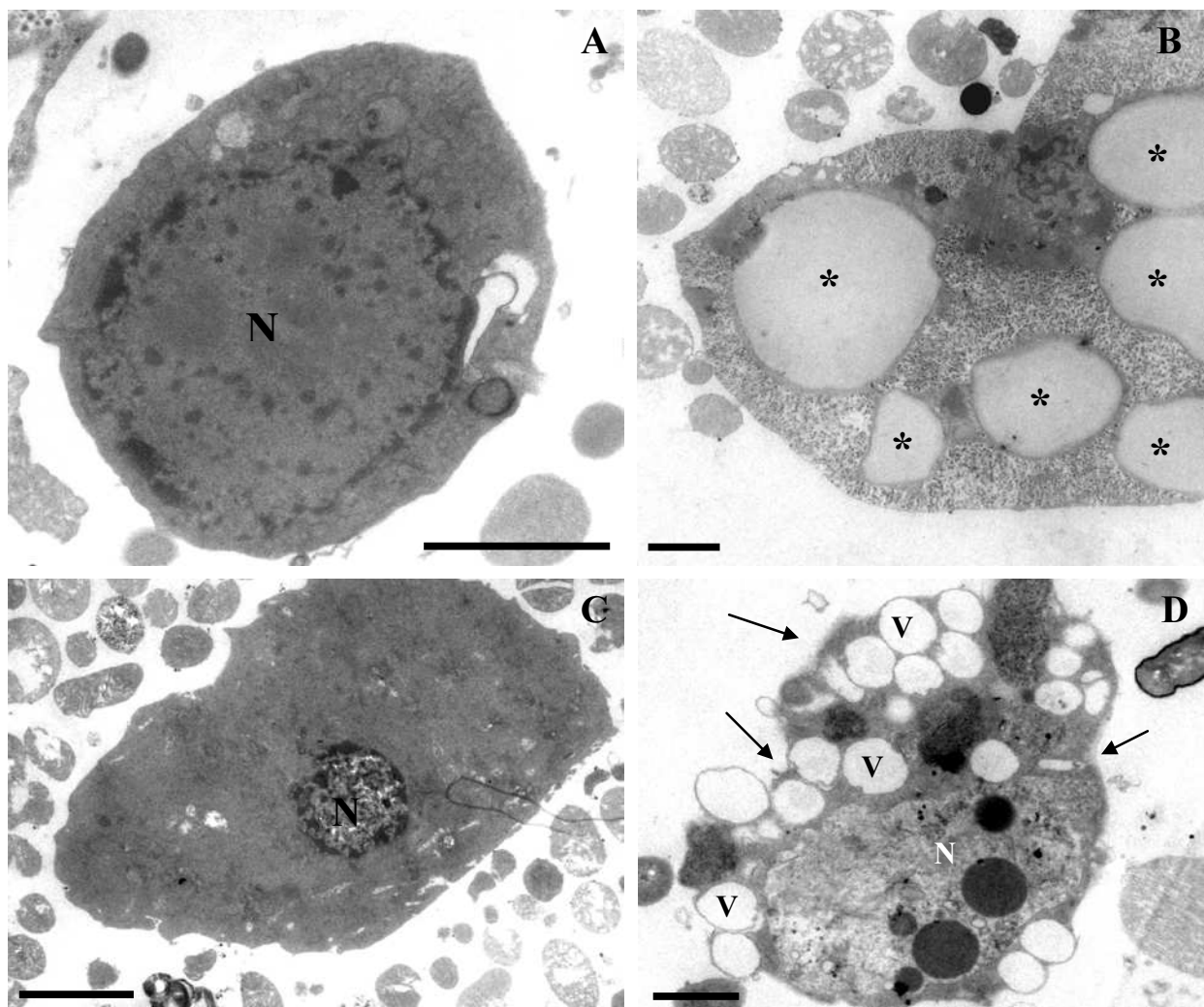
**A** – Mitochondrias (m) alongadas dispersas pelo citoplasma da célula. Note ribossomos bem desenvolvidos (seta) na face citoplasmática da membrana que reveste o núcleo (N), vacúolos (V) e retículo endoplasmático (RER) rugoso.

**B** – Alguns SMS dentro do retículo endoplasmático rugoso (RER) que encontra-se bem desenvolvido.

**C** – Numerosos SMS circulares e alongados.

**D** – Núcleo (N) possuindo ribossomos bem desenvolvidos (seta) na membrana nuclear, citoplasma contendo SMS e muitas mitochondrias alongadas (m).

Barras = 0,5µm.



**Figura 40** - Ultraestrutura dos hemócitos de *A. aegypti* não exibindo alterações morfológicas após 2h e 48h do desafio com *Dengue virus 2*.

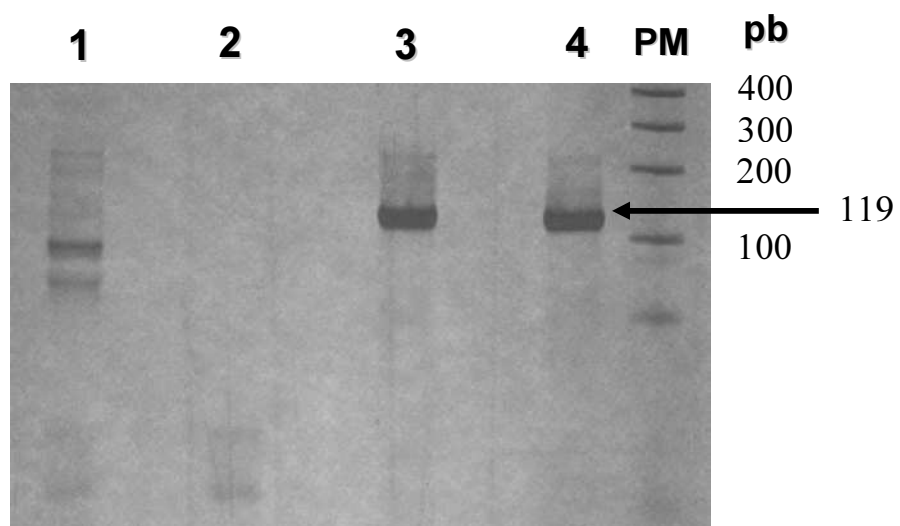
**A** – Prohemócito exibindo núcleo (N) largo preenchendo praticamente todo o citoplasma.

**B** – Adipohemócito contendo diversas vesículas lipídicas (\*) no citoplasma da célula.

**C** – Trombocitóide com núcleo (N) localizado centralmente e citoplasma pobre em organelas.

**D**- Célula apoptótica exibindo contração celular (setas), condensação e fragmentação nuclear (N) e intensa vacuolização (V) citoplasmática.

Barras A, B = 2 $\mu$ m, C = 5 $\mu$ m e D = 1 $\mu$ m



**Figura 41 - Detecção do *Dengue virus 2* na hemolinfa de *A. aegypti* após 48 horas da inoculação através da RT-PCR.**

Amplicons gerados por RT-PCR visualizados em gel de poliacrilamida a 0,8% e corado com nitrato de prata.

**Canaleta 1** - Hemolinfa não infectada;

**Canaleta 2** – Controle negativo;

**Canaleta 3** – Pool de hemolinfa infectada exibindo uma banda de 119pb;

**Canaleta 4** – Controle positivo (vírus) exibindo uma banda de 119pb.

**PM** – Marcador de peso molecular (100pb DNA Lader®)



## 6 DISCUSSÃO

### 6.1 Caracterização dos hemócitos de *A. albopictus*

O atual sistema de classificação dos hemócitos de insetos é bastante controverso e a terminologia utilizada para designar cada tipo celular é diferente dependendo da espécie estudada. Uma classificação compreensiva é difícil, porque estas células podem apresentar morfologias diferentes, dependendo das técnicas utilizadas no seu estudo.

Rowley & Ratcliffe (1981) e Drif & Brehélin (1994) classificaram em cinco os tipos principais de hemócitos existentes. São eles: prohemócitos, plasmatócitos, granulócitos, esferulócitos, oenocitóides. Gupta (1985), em ampla revisão da literatura, adicionou mais dois tipos celulares a esta classificação, os adipohemócitos e coagulócitos. Provavelmente, o mais conhecido e mais usado sistema de classificação dos hemócitos é o que foi desenvolvido por Jones (1962), o qual está baseado no estabelecimento de que há três tipos celulares bem definidos na maioria dos insetos (prohemócitos, plasmatócitos, granulócitos), mais quatro outros tipos que também são encontrados (cistócitos ou coagulócitos, células esféricas, adipohemócitos e oenocitóides) e dois tipos extremamente especializados presentes em alguns poucos insetos (podócitos e células vermiformes). Alguns autores relatam que os podócitos, vermiformes e trombocitóides não sejam populações celulares distintas, pois, são ultraestruturalmente similares aos plasmatócitos (Gupta, 1985 e Paskewitz & Christensen, 1996).

Como podemos observar, a classificação dos hemócitos de insetos é bastante vasta e controversa, desta forma, nosso grupo inicialmente realizou a caracterização dos hemócitos de *A. aegypti* utilizando a técnica de extração da hemolinfa por perfusão como descrito no item 4.2 de matérias e métodos. Identificamos e descrevemos as principais características morfológicas de cada tipo celular utilizando a microscopia de luz (ML), de contraste de interferência diferencial (DIC) e eletrônica de transmissão (MET). Com base nestas ferramentas classificamos os hemócitos de *A. aegypti* em seis tipos: prohemócitos, adipohemócitos, granulócitos, plasmatócitos, oenocitóides e trombocitóides. Estes resultados foram publicados em 2008 na MICRON, uma revista internacional especializada na área de microscopia e microanálise (Araújo *et al*, 2008 – ver anexo 2).

Para os posteriores critérios de comparação, realizamos a caracterização dos hemócitos presentes na hemolinfa de *A. albopictus* sob as mesmas condições daquelas empregadas na caracterização dos hemócitos de *A. aegypti*. Desta forma, identificamos que a hemolinfa das

fêmeas de *A. albopictus* possuem os mesmo seis tipos de hemócitos descritos anteriormente em *A. aegypti*, que variam na morfologia e no tamanho, são eles: prohemócitos, adipohemócitos, granulócitos, plasmatócitos, oenocitóides e trombocitóides.

O único estudo que relata a descrição de hemócitos de *A. albopictus* data de 1975, onde Bhat & Singh descrevem os hemócitos de larvas de 4º estágio, retirando a hemolinfa através de um corte no coração após pressionar o abdômen. Os hemócitos foram observados através da microscopia de contraste de fase e da coloração com giemsa. As células foram classificadas em cinco tipos principais: prohemócitos, pequenos e grandes podócitos, plasmatócitos e esferulócitos.

Kaaya & Ratcliffe (1982) analisando a hemolinfa de larvas, de pupas e de adultos de diversas ordens de insetos de importância médica, inclusive *A. aegypti* e *Culex quinquefasciatus*, obtiveram resultados similares aos nossos. Os autores identificaram prohemócitos, plasmatócitos, granulócitos, adipohemócitos, oenocitóides e células alongadas. Entretanto, naquele estudo realizado através da microscopia óptica, não foi identificado o hemócito denominado trombocitóide. Hillyer & Christensen (2002) e Hillyer *et al.* (2003a) observaram, através da microscopia óptica e eletrônica de transmissão, em *A. 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 *C. 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.

Castillo *et al.* (2006) conduziram um estudo comparativo com hemócitos de *Anopheles gambiae* e *A. aegypti*, onde classificaram as células presentes na hemolinfa destas espécies como: granulócitos, oenocitóides e prohemócitos através da combinação de observações morfológicas no DIC e da utilização de marcadores funcionais. É importante salientar que estes autores utilizaram um método diferente do empregado por Hillyer & 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.

Os prohemócitos são células com características muito distintas de outros tipos celulares, por seu pequeno tamanho, citoplasma pobre em organelas e a alta relação núcleo-citoplasma. É necessário ter muito cuidado para não confundi-las com restos celulares. Estas células foram descritas também por muitos autores em outras ordens de insetos (Bhat & Singh, 1975; Kaaya & Ratcliffe, 1982; Hypša & Grubhoffer, 1997; Hernández *et al.*, 1999; Gardiner & Strand, 1999; Da Silva *et al.*, 2000; Silva, 2002; Lavine & Strand, 2002; Ling *et al.*, 2003; Andrade *et al.*, 2003; Falleiros *et al.*, 2003; Giulianini *et al.*, 2003; Paily *et al.*, 2005; Brayner *et al.*, 2005; Castillo *et al.*, 2006; Araújo *et al.*, 2008 – ver anexo 2). Segundo a literatura, estas células estão envolvidas no processo de hematopoiese, pois se dividem ativamente originando os demais tipos de hemócitos como os plasmatócitos e os granulócitos. Alguns autores sugerem que, todos os hemócitos representam fases de desenvolvimento de um único tipo celular (Lavine & Strand, 2002; Silva, 2002). A identificação de células com morfologias intermediárias entre os prohemócitos e os plasmatócitos; e entre os plasmatócitos e os granulócitos sugerem uma possível diferenciação celular entre estes tipos de hemócitos (Gupta, 1985; Jones, 1962). Entretanto, os resultados do nosso estudo demonstram que, existem células com características de ambos os tipos, mas não conclui uma diferenciação entre elas. Estudos posteriores são necessários para contribuir para esta discussão.

Ribeiro & Brehélin M (2006) identificaram, em várias espécies de Lepidópteros, pequenos hemócitos com características de prohemócitos, mas não confirmam a presença deste tipo celular. Entretanto, Falleiros *et al.* (2003) identificaram o prohemócito na hemolinfa de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae) com as mesmas características das células deste estudo. Em larvas de *Drosophila*, os prohemócitos são identificados como as células que originarão as células secretórias, os plasmatócitos, as células cristais e os lamelócitos (Lanot *et al.*, 2001).

O prohemócito identificado por membros do nosso grupo Brayner *et al.* (2005) e Araújo *et al.* (2008) (ver anexo 2) através da análise da hemolinfa do *C. quinquefasciatus* e do *A. aegypti*, respectivamente, possui as mesmas características da célula descrita em nosso estudo. Entretanto, Hillyer & Christensen (2002) não relatam a presença dos prohemócitos em *A. aegypti*. Estes autores descrevem este tipo celular, como pequenas estruturas biológicas esféricas, como núcleos ou grandes mitocôndrias de adipohemócitos lisados. Em nosso estudo, nós observamos através das imagens de microscopia óptica e eletrônica que os prohemócitos são facilmente diferenciados das outras células ou até de restos celulares.

Os adipohemócitos, observados no presente estudo, têm como características principais a presença de numerosas vesículas lipídicas preenchendo praticamente todo o

citoplasma, as quais facilitaram sua identificação. Segundo Hillyer & 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 similarmente em insetos de várias ordens (Kaaya & Ratcliffe, 1982; Hillyer & Christensen, 2002; Hillyer *et al.*, 2003a; Brayner *et al.*, 2005). Porém, Da Silva *et al.* (2000) através da análise por microscopia de luz dos hemócitos de *C. quinquefasciatus* encontraram o adipohemócito em pouca quantidade, provavelmente, devido ao processo de preparação da lâmina segundo os autores.

Os adipohemócitos têm sido classificados como esferulócitos por apresentarem esférules que deformam a superfície da célula, muito parecido com as deformações que as vesículas lipídicas oferecem (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.* (2005), que descreveram este mesmo tipo celular como presente na hemolinfa de *C. quinquefasciatus*. A partir desta descrição e de nossas observações em fotomicrografias, podemos afirmar que os adipohemócitos de *A. albopictus*, e de *A. aegypti* também, não possuem nenhuma similaridade com os esferulócitos presentes em outros mosquitos.

Outros autores indicam que estas células são morfológicamente similares aos granulócitos e às células do corpo gorduroso que podem contaminar as preparações histológicas (Kaaya & Ratcliffe, 1982; Hypša & Grubhoffer, 1997; Falleiros *et al.*, 2003).

Os granulócitos de *A. albopictus* possuem como característica principal, a presença de diversos grânulos elétrons densos de diferentes tamanhos no seu citoplasma. Hillyer & Christensen (2002) descreveram similarmente esse tipo celular na hemolinfa de *A. aegypti*. Para Silva (2002) e Giulianini *et al.* (2003), esta célula é facilmente identificada através do tamanho e características do citoplasma como a presença dos grânulos. Através da ML e DIC, facilmente identificamos os grânulos presentes nestas células, mas, as observações ultraestruturais revelam a presença de células que apresentavam características de degranulação e alguns grânulos em formação. Isto ocorre devido à fragilidade destas células se comparadas com prohemócitos e plasmatócitos (Ratcliffe & Rowley, 1979). Por causa desta facilidade em se romper, sua presença na hemolinfa é evidenciada pela visualização de uma massa de grânulos e núcleos.

O papel dos granulócitos, após entrar em contato com um corpo estranho, é liberar o seu conteúdo granular na hemolinfa para atrair os plasmatócitos (Schmit & Ratcliffe, 1977; Gillespie & Kanost, 1997). Em seguida, os plasmatócitos formam camadas multicelulares

entorno dos agregados de granulócitos desintegrados e de patógenos (Wiesner & Gotz, 1993). Esta é a maneira que o *C. quinquefasciatus* responde à infecção por *Candida albicans*, por exemplo. (Da Silva *et al.*, 2000). Desta forma, os granulócitos degranulam rapidamente *in vitro* e durante uma variedade de respostas imunes como a fagocitose, a formação de nódulos e a encapsulação.

Castillo *et al.* (2006) descrevem os granulócitos, após a marcação com faloidina e anti-histona H1, com muitos filopódios após aderência à lamina. Nos ensaios de fagocitose, eles são os únicos tipos celulares que internalizaram bactérias. Falleiros *et al.* (2003) descrevem os granulócitos, como possuindo membrana plasmática com muitos filopódios claramente visualizados e a presença de dois tipos de grânulos rodeados por membrana: grânulos densos com conteúdo eletrondenso e homogêneo, e grânulos estruturados com conteúdo cristalóide. Entretanto, outros autores relatam que os granulócitos não formam extensões citoplasmáticas, o que difere estas células dos plasmatócitos (Kaaya & Ratcliffe, 1982). Nos nossos estudos, os granulócitos e plasmatócitos aderiram muito bem à lâmina de vidro e visualizamos alguns filopódios nos granulócitos, mas, nenhuma destas células apresentou projeções citoplasmáticas características de plasmatócitos.

Diferenças morfológicas na aderência dos hemócitos podem acarretar em diferenças nas funções destas células. Em muitos lepidópteros, por exemplo, granulócitos que aderem simetricamente *in vitro* são fagócitos profissionais. Entretanto, plasmatócitos que aderem assimetricamente são não-fagocíticos e estão envolvidos na formação de cápsulas (Lavine & Strand, 2002; Strand *et al.*, 2006). Das células fagocíticas de *Drosophila*, os plasmatócitos, variam no tamanho e na morfologia de aderência em relação aos lamelócitos que formam cápsulas (Lanot *et al.*, 2001). Entretanto, Castillo *et al.* (2006) identificaram que granulócitos, que apresentavam morfologias diferentes, fagocitaram bactérias.

Para autores como Hypša & Grubhoffer (1997) o termo granulócito não é aceitável, porque estas células estariam muito próximas dos plasmatócitos ou seriam a diferenciação destas. Eles descrevem os plasmatócitos granulares e agranulares na hemolinfa do *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) comumente descritas na literatura como granulócitos e plasmatócitos. Estes autores demonstraram que plasmatócitos granulares contém grânulos compostos por fibras arranjadas de forma mais regular, com uma matriz que varia de denso a amorfo. De acordo com a terminologia de Hypša & Grubhoffer (1997) os diferentes tipos de prohemócitos dão origem a duas linhagens celulares: plasmatócitos granulares e agranulares. Por outro lado, Lavine & Strand (2002), mencionam que os prohemócitos são células totipotentes e, portanto podem se diferenciar em qualquer tipo de hemócito.

O problema desta classificação ainda tem sido discutido. Alguns autores enfatizam a dificuldade em distinguir estes dois tipos celulares em várias espécies de insetos e propõem diferentes soluções para este problema. Enquanto alguns sugerem que apenas as células sem nenhum grânulo, daqueles encontrados nos granulócitos, poderiam ser consideradas plasmatócitos (Gupta, 1991), outros identificam os plasmatócitos como possuindo uma natureza amebóide com a presença ou ausência de grânulos (Ratcliffe & Price, 1974). Os plasmatócitos também têm sido considerados como uma forma de transição no desenvolvimento dos prohemócitos para granulócitos (Gupta, 1979). 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.

Brayner *et al.* (2005) demonstram que as células denominadas granulócitos são muito diferentes dos plasmatócitos em vários aspectos. O processo de formação de grânulo em granulócitos é único e muito complexo, incluindo a organização de polissomos dentro de vesículas que são produzidas pelo aparelho de Golgi, a síntese de um material proteínico e a condensação da matriz do grânulo com a reciclagem de membranas ao final do processo. A síntese de um segundo tipo de grânulo, foi também observado ocorrendo dentro de vesículas quase livre de ribossomos, as quais contêm uma matriz provavelmente composta por outras substâncias que não sejam as proteínas. Por outro lado, os plasmatócitos não mostraram nenhuma maquinaria para síntese de grânulos, porém apresentaram várias pequenas inclusões lipídicas entre as membranas do retículo endoplasmático.

Hillyer & Christensen (2002) descrevem que diferentes tipos de vesículas podem ser observados e cada granulócito pode conter um ou mais tipos. Elas são grânulos eletróluscentes pouco estruturados, grânulos eletróluscentes estruturados, grânulos eletrondensos pouco estruturados e grânulos eletrondensos estruturados formando figuras como a mielina. Hypša & Grubhoffer (1997) descrevem três tipos de grânulos presentes nos plasmatócitos, através de análises realizadas em microscopia eletrônica de transmissão, os grânulos podem variar de estruturados compostos por mais ou menos fibras arrançadas regularmente, a poucos estruturados com alta eletrondensidade.

Em relação aos plasmatócitos observados no nosso estudo, eles apresentam a morfologia variada devido às expansões citoplasmáticas, possuem um citoplasma com ou sem a presença de grânulos, RER, complexo de golgi e vacúolos. Estas descrições estão de acordo com as observações feitas por muitos autores (Kaaya & Ratcliffe, 1982; Ribeiro, 1996; Da Silva *et al.*, 2000; Brayner *et al.*, 2005; Ribeiro & Brehélin, 2006). Plasmatócitos binucleados ocasionalmente foram observados em Lepidópteros e Dípteros (Falleiros *et al.*, 2003; Brayner

*et al.*, 2005). Os plasmatócitos são descritos como células fagocíticas em muitas espécies de insetos (Ratcliffe & Rowley, 1979; Anggraeni & Ratcliffe, 1991; Wiesner & Gotz, 1993; Da Silva *et al.*, 2000), onde formam cápsulas ao redor de corpos que são muito grandes para serem fagocitados ou nódulos quando a concentração de patógenos é muito grande. Cápsulas e nódulos são idênticos ao nível citológico (Ratcliffe & Gagen, 1977; Silva, 2002; Lavine & Strand, 2002). Em *Drosophila*, os hemócitos que exibem características de plasmatócitos são chamados de lamelócitos. Os plasmatócitos de *Drosophila* possuem diferenças histológicas, citológicas, comportamentais quando presentes em monocamadas e possuem funções diferentes dos plasmatócitos descritos neste estudo (Ribeiro & Brehélin, 2006). Em experimentos de resposta imune, o material particulado injetado na hemocele é fagocitado pelos lamelócitos (Brehélin, 1982; Lanot *et al.*, 2001). Desta forma, o papel dos plasmatócitos na fagocitose ainda é contestado. Para alguns autores, eles são fagócitos (Tojo *et al.*, 2000; Ling, Yu, 2006) mas, para outros, eles não possuem esta capacidade (Beaulaton, 1979; Costa *et al.*, 2005).

Este estudo demonstra que existem, em muitos aspectos, diferenças ultraestruturais significantes entre os granulócitos e os plasmatócitos, estudos funcionais posteriores são necessários para confirmar este fato.

Os oenocitóides exibem como características ultraestruturais, citoplasma homogêneo com poucas organelas, pequenos vacúolos e a presença de alguns grânulos. Esta mesma descrição foi relatada por Giulianini *et al.* (2003), através de análises por MET, encontraram oenocitóides com alguns grânulos densos muito similares aos grânulos encontrados nos granulócitos. Hypša & Grubhoffer (1997), também descrevem a presença de poucos grânulos densos localizados na periferia desta célula. Brayner *et al.* (2005), observaram que em oenocitóides de *C. quinquefasciatus*, estes grânulos estavam completamente ou parcialmente preenchidos com um material amorfo.

Muitos autores relatam a presença da enzima fenoloxidase nestas células (Iwama & Ashida, 1986; Ashida *et al.*, 1988; Hillyer & Christensen, 2002; Ribeiro & Brehélin, 2006). Em *Drosophila*, as células cristais exibem características estruturais e funcionais de oenocitóides (Rizki, 1957; Ribeiro & Brehélin, 2006).

Raros trombocitóides foram encontrados na hemolinfa de *A. albopictus*, eles possuem citoplasma homogêneo e são pobres em organelas como os oenocitóides. Estes resultados são similares aos de Hillyer & Christensen (2002), Hillyer *et al.* (2003a), Araújo *et al.* (2008) – ver anexo 2. Kaaya & Ratcliffe (1982) observaram trombocitóides em *Glossina austeni* (Diptera: Glossinidae), *Calliphora erythrocephala* (Diptera: Calliphoridae), *Stomoxys*

*calcitrans* (Diptera:Muscidae) e *Lucilia sericata* (Diptera:Calliphoridae), com exceção do *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus*. Esses autores descreveram que os trombocitóides apresentavam diversos processos citoplasmáticos e aderiam à superfície da lâmina como típicos plasmatócitos. Hillyer & Christensen (2002) acreditam que os trombocitóides de *A. aegypti* não sejam hemócitos circulantes, mas estejam aderidos aos tecidos.

Zachary & Hoffmann (1973), ao identificarem o trombocitóide na hemolinfa de *Calliphora erythrocephala* (Diptera: Calliphoridae), relataram que este termo deriva da participação deste hemócito na formação de uma rede, que lembra um típico trombo encontrado no sangue dos vertebrados. Esta célula possui invaginações na membrana que produzem uma compartimentalização do citoplasma, em territórios de diferentes tamanhos, que são fragmentados e liberados na hemolinfa. Estes autores acreditam que os trombocitoides sejam análogos aos megacariócitos que originam as plaquetas. As redes que são formadas em *C. erythrocephala* são exclusivamente derivadas de fragmentos citoplasmáticos de hemócitos.

Quando estudamos as células circulantes na hemolinfa de insetos, verificamos que não existe uma única técnica que possa determinar exatamente os tipos de hemócitos e sim diferentes técnicas devem ser empregadas em conjunto para minimizar a polêmica que existe na classificação desses tipos celulares. É necessário conhecer as limitações de cada método empregado, para poder chegar a uma melhor alternativa para se estudar estas células.

A maioria dos estudos com hemócitos de mosquitos tem trabalhado exclusivamente com microscopia de luz e eletrônica. Chiang *et al.* (1988) realizou em estudo comparativo com microscopia de luz, microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia eletrônica de transmissão com hemócitos de *Blattella germanica* (Dictyoptera: Blattellidae) e os autores apontaram que todos os tipos de hemócitos podem ser reconhecidos por MET, diferente da ML e MEV que podem deixar dúvidas quanto à classificação. Desta forma, podemos concluir que os recursos ultraestruturais, principalmente a microscopia eletrônica de transmissão, favorecem a uma melhor caracterização destes tipos celulares.

Portanto, nosso trabalho é o primeiro a descrever os hemócitos de *A. albopictus* através da utilização de três diferentes métodos de análise: ML, DIC e MET. Acreditamos que a relevância dos nossos resultados esteja correlacionada aos métodos empregados.

Além da observação dos caracteres morfológicos utilizando a microscopia, é necessário o emprego de outras técnicas na tentativa de identificar as subpopulações de hemócitos e poder, desta forma, melhor avaliar a função de cada tipo celular.



A citocímica 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 pode tornar possível a separação dos diferentes tipos celulares (Willott *et al.*, 1995; Gardiner & Strand, 1999).

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 *A. aegypti* e *A. albopictus* expressam resíduos de carboidratos que se ligam às lectinas de uma maneira heterogênea. É interessante notar que, os resultados demonstram uma variedade de padrões de marcações para cada lectina testada em *A. aegypti* e *A. albopictus*.

Das oito lectinas utilizadas em nossos experimentos, apenas quatro (ConA, HPA, PNA e WGA) tinham sido utilizadas anteriormente por outros autores em hemócitos de mosquitos. Hillyer & Christensen (2002) realizaram uma caracterização dos hemócitos de *A. aegypti*, através da morfologia, da marcação com lectinas, da atividade enzimática e da imunocitoquímica. Estes autores utilizaram as lectinas ConA (*Conavalia ensiformis*), HPA (*Helix pomatia*), PNA (*Arachis hypogaea*), WGA (*Triticum vulgares*), GNL (*Galanthus nivalis*), SBA (*Soybean agglutinin*) e PWM (*Pokeweed*). As únicas que marcaram os granulócitos, os oenocitóides, os adipohemócitos e os trombocitóides foram as lectinas HPA, WGA e GNL com diferentes 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 as lectinas HPA, WGA e GNL. Castillo *et al.* (2006) utilizaram apenas três lectinas (PNA, WGA e SBA) para caracterizar os hemócitos de *A. aegypti* e *A. gambiae* e obtiveram resultado positivo em todas as marcações. Nossos resultados demonstraram que, apenas os hemócitos de *A. albopictus* foram positivos para HPA, concordando com os achados de Hillyer & Christensen (2002) e Hillyer *et al.* (2003a). A marcação pela lectina PNA foi positiva nos hemócitos de ambas as espécies estudadas, concordando com os resultados obtidos por Castillo *et al.* (2006). Entretanto, Hillyer & Christensen (2002) e Hillyer *et al.* (2003a) não identificaram células positivas para esta lectina. A lectina ConA marcou as células de *A. aegypti* e *A. albopictus* em nossos estudos, entretanto, este resultado não concorda com os achados de Hillyer, Christensen (2002) e Hillyer *et al.* (2003a). A WGA foi a única lectina que marcou os hemócitos em diferentes espécies de mosquitos, inclusive em caramujos e triatomíneos

(Hypša & Grubhoffer, 1997; Hillyer & Christensen, 2002; Hillyer *et al.*, 2003a; Castillo *et al.*, 2006; Martins-Souza *et al.*, 2006).

Como podemos observar diversos autores utilizaram as lectinas na tentativa de marcar as diferentes populações de hemócitos, entretanto, sua aplicação é limitada porque podem reconhecer estruturas de carboidratos que podem ser compartilhadas por muitos outros componentes teciduais.

## 6.2 Ensaio de endocitose

A endocitose é importante por manter a homeostase celular, o que inclui a manutenção da área total da membrana plasmática, que é aumentada pelo processo de exocitose e para obtenção de vários nutrientes essenciais aos organismos e células. O material a ser ingerido é progressivamente englobado por uma pequena porção de membrana plasmática, da qual se formam e brotam as vesículas endocíticas. Este material é encaminhado para os lisossomas, onde é digerido. É através da endocitose que as células podem modular a resposta a estímulos exógenos, como por exemplo, os hormônios e os fatores de crescimento (Mellman, 1996).

O estudo do processo endocítico é amplamente estudado nos tripanossomatídeos pertencentes ao gênero *Trypanosoma*. Eles possuem um complexo ciclo de vida e algumas das diferentes formas evolutivas observadas, requerem componentes exógenos para seu crescimento, como o colesterol e o ferro. A forma tripomastigota sanguínea do *Trypanosoma brucei*, o agente etiológico da doença do sono em humanos, tornou-se o modelo de endocitose melhor estudado em tripanossomatídeos. Verificou-se através dos diversos estudos realizados, que esta espécie possui uma intensa atividade endocítica. Enquanto a albumina sérica é adquirida através da endocitose de fase fluida, a transferrina e a lipoproteína de baixa densidade (LDL) são interiorizadas através de endocitose mediada por receptor (Soares & De Souza, 1991; Porto-Carreiro *et al.*, 2000).

Em *Entamoeba histolytica*, o estudo do processo endocítico demonstra que existem duas formas de endocitose: a forma não específica, detectada pela internalização de partículas de látex e outra, que é específica onde envolve a participação de receptores de superfície que facilitam a internalização de porções das células hospedeiras e bactérias (Orozco *et al.*, 1983).

Em nossos estudos de endocitose de fase fluida, utilizando como modelo experimental os hemócitos do mosquito *A. aegypti*, nós identificamos os oenocitóides como às células que mais endocitaram a proteína albumina, seguidos dos granulócitos e prohemócitos.

A primeira resposta imune descoberta em invertebrados foi a fagocitose, que é uma forma especializada de endocitose mediada por receptor (Gillespie & Kanost, 1997; Garcia-Garcia & Rosales, 2002; Hart *et al.*, 2004; Blandin & Levashina, 2007). É um importante mecanismo de defesa contra as infecções causadas por pequenas partículas como as bactérias e efetiva para a eliminação de células apoptóticas geradas durante o desenvolvimento (Hart *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2004). Em vertebrados, fagócitos profissionais como os macrófagos e células dendríticas estão envolvidos na fagocitose (Rabinovitch, 1995). Em insetos, plasmatócitos e granulócitos são as células mais envolvidas no processo de fagocitose (Gupta, 1991; Gillespie & Kanost, 1997; Barillas-Mury *et al.*, 2005). Outros hemócitos, como os oenocitóides, também foram identificados fagocitando células bacterianas (Giulianini *et al.*, 2003).

Em nossos experimentos, onde partículas de látex acopladas à um marcador fluorescente entraram em contato com hemócitos de *A. albopictus*, observamos o processo de fagocitose destas partículas realizado pelos plasmatócitos e pelos granulócitos. Além disso, identificamos através de micrografias ultraestruturais, o plasmatócito de *A. albopictus* fagocitando uma célula em processo de apoptose. Em prévios estudos do nosso grupo com *A. aegypti*, foi identificado apenas o plasmatócito como célula fagocítica de partículas inertes (Araújo *et al.*, 2008 – ver anexo 2).

Hillyer *et al.* (2003a), estudando a fagocitose e a melanização mediada por hemócitos em *Armigeres subalbatus*, demonstraram que os granulócitos e oenocitóides foram os principais fagócitos envolvidos nesta resposta. Resultados similares foram obtidos em *A. aegypti* infectado com bactérias e esporozoítos de *Plasmodium* (Hillyer *et al.*, 2003b).

Em insetos, como os 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 os oenocitóides foram os únicos hemócitos envolvidos na fagocitose de partículas de látex *in vivo* por *Cetonischema aeruginosa*. Entretanto, estes autores não descartam a possibilidade do plasmatócito também estar envolvido neste processo. Esta função de fagocitose realizada 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; *A. aegypti* e *A. gambiae* Castillo *et al.*, 2006). Entretanto, Da Silva *et al.* (2000) examinando a hemolinfa de *C. quinquefasciatus* infectado com *Cândida albicans* descreveram a fagocitose deste fungo por plasmatócitos.

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. Ao estudar hemócitos do lepidóptero *Spodoptera littoralis*, estes autores identificaram apenas o granulócito como sendo a única célula fagocítica em experimentos *in vivo* e *in vitro*. Na mosca da fruta, *D. melanogaster*, entre plasmatócitos, células cristais e lamelócitos, apenas os plasmatócitos estão envolvidos na fagocitose (Meister & Lagueux, 2003). Dean *et al.* (2004) identificaram hemócitos hiperfagocíticos em *Manduca sexta*, englobando um grande número de bactérias e partículas de látex, além disso, estas células encontram-se envolvidas nos estágios iniciais de formação do nódulo. Eles representam apenas 1% da população total de hemócitos que possuem capacidade de fagocitose e se diferenciam dos outros tipos celulares porque emitem extensos filopódios. De acordo com Ling & Yu (2006), em *M. sexta*, os plasmatócitos estão envolvidos na fagocitose de partículas de látex e os granulócitos foram os únicos que fagocitaram as células mortas. Estes autores acreditam que, os hemócitos hiperfagocíticos estão envolvidos na formação do nódulo e na fagocitose das partículas inertes ou bactérias nos estágios iniciais de infecção. Enquanto que, plasmatócitos e granulócitos estão envolvidos na fagocitose das partículas inertes ou bactérias remanescentes.

A fagocitose depende de numerosos fatores biológicos, químicos e físicos. O estudo da função de cada tipo celular pode ser usado e correlacionado com a ultraestrutura para complementar a caracterização.

Como discutido anteriormente, a fagocitose é um componente essencial na resposta imune inata. Os vacúolos fagocíticos possuem propriedades degradativas e microbicidas, através de uma complexa série de interações com as endomembranas. Este processo chamado de maturação do fagossoma culmina na fusão do fagossoma com os lisossomas, resultando numa organela híbrida enriquecida com enzimas hidrolíticas, espécies reativas do oxigênio e peptídeos antimicrobianos que promovem a morte e a degradação de microorganismos internalizados (Huynh *et al.*, 2007). Os lisossomas têm sido definidos baseados na sua função como sendo organelas ricas em enzimas hidrolíticas e responsáveis pela degradação de macromoléculas derivadas do espaço extracelular, via fagocitose ou endocitose, ou até dentro da célula via autofagia (Hunziker & Geuze, 1996). Dois dos mais abundantes componentes lisossomais são proteínas transmembrana, altamente glicosiladas, encontradas em todos os lisossomas chamadas de LAMP - 1 e LAMP - 2 (lisosome-associated membrane proteins) (Winchester, 2001). Em nossos experimentos, utilizamos como marcador lisossomal o

anticorpo Anti-LAMP 1 (Sigma) e identificamos os plasmatócitos, os oenocitóides e os granulócitos como os hemócitos que possuíam muitos lisossomos no citoplasma em *A. albopictus*. Entretanto, em *A. aegypti* apenas os plasmatócitos e os oenocitóides foram as células que apresentam esta organela em abundância.

Algumas células como os plasmatócitos possuem o citoplasma rico em lisossomos, confirmado pela presença da fosfatase ácida. A abundância desta organela reflete a participação deste tipo celular na fagocitose (Barracco & Loch, 1989).

Desta forma, podemos concluir que, em nossos estudos de endocitose utilizando como modelo experimental os mosquitos *A. aegypti* e *A. albopictus* identificamos o plasmatócito como a célula que internalizou as partículas de látex, os corpos apoptóticos e possuía uma presença acentuada de lisossomos.

### 6.3 Dinâmica hemocitária

Na natureza, a estimativa do número total de hemócitos depende de inúmeros fatores como: espécie, tamanho dos insetos, o estágio de desenvolvimento, entre outros. Segundo alguns autores, os mosquitos adultos fêmeas possuem cerca de 10.000 hemócitos, entretanto, adultos de *Periplaneta* (Baratas) possuem mais de 9.000.000. As lagartas de *Euxoa* possuem cerca de 4.000 hemócitos no segundo estágio de desenvolvimento e no sexto estágio este número sobe para 2.400.000. Em insetos hemimetábolos, o número de células geralmente é muito similar entre larvas e adultos, entretanto, nos holometábolos as larvas possuem mais células por volume de hemolinfa que os adultos. Em geral, as fêmeas possuem mais hemócitos que os machos (Chapman, 1998). A técnica utilizada para a coleta da hemolinfa deve ser levada em consideração, pois, existe uma variação na quantidade de células obtidas. Através da técnica de perfusão intratorácica estima-se que aproximadamente 76% da hemolinfa seja removida e que aproximadamente 2.000 hemócitos estejam presentes (Christensen *et al.*, 1989). Esta foi a técnica empregada em nossos experimentos para caracterização dos diferentes tipos celulares presentes na hemolinfa do *A. aegypti* e do *A. albopictus* como descrito no item 4.2 de materiais e métodos. É sempre bom lembrar que apenas uma pequena fração destas células circula livremente na hemolinfa, onde a maioria encontra-se aderida a órgãos internos abdominais como o intestino médio e a traquéia (Pinto *et al.*, 2009).

Hillyer *et al.* (2005) descreveram que o *A. aegypti* possui cerca de 1.000 hemócitos presentes na hemolinfa no 1º dia pós-eclosão e que este número diminui cerca de 24% até o

5º dia. Esta redução observada do 1º ao 5º dia é idêntica à redução relatada em estudos prévios por este mesmo grupo onde, o número de hemócitos circulantes continuava a declinar até o 14º dia, diminuindo cerca de 55% (Christensen *et al.*, 1989). Inicialmente realizamos experimentos para estabelecer a média e proporção de cada tipo celular circulante na hemolinfa do *A. aegypti* e do *A. albopictus* colonizados no laboratório de Entomologia Médica. Para estes experimentos utilizamos a mesma técnica empregada por Castillo *et al.* (2006) com modificações, como descrito no item 4.12 de materiais e métodos. Observamos que nossos resultados são similares aos descritos na literatura para o *A. aegypti* apenas entre o primeiro e o segundo dia pós-eclosão, onde houve uma redução de aproximadamente 24% no número de células. Nos dias subsequentes, 3, 7, 8 e 9, o número de células se restabeleceu e não exibiu alterações significantes, entretanto, permaneceu mais baixo que o 1º dia. O aumento do número de células circulantes pode resultar na produção de novas células ou possivelmente, pelo recrutamento de células aderidas aos tecidos. A redução no número dos hemócitos pode resultar na morte celular ou no aumento da quantidade de células aderidas aos tecidos (Chapman, 1998).

A contagem diferencial dos hemócitos de *Anopheles albimanus* exibiu que o plasmatócito foi o tipo mais comumente encontrado (74%), seguido pelas células granulares (17%) e pelos prohemócitos (9%) (Hernández *et al.*, 1999). Em *Anopheles gambiae*, os granulócitos correspondem a mais de 90% do número total de células presentes na hemolinfa de larvas, pupas e adultos. Os outros 10%, correspondem aos prohemócitos e aos oenocitóides (Castillo *et al.*, 2006). Estudos com outro díptero de importância médica, o *Culex quinquefasciatus*, demonstraram que os granulócitos e plasmatócitos correspondem à cerca de 83% do total das células encontradas na hemolinfa, seguidos pelos prohemócitos, oenocitóides, esferulócitos e adipohemócitos (Da Silva *et al.*, 2000 e Brayner *et al.*, 2005). Os granulócitos e plasmatócitos também correspondem à maioria dos hemócitos presentes em larvas de Lepidópteras. Segundo Lavine & Strand (2002), estas células compreendem mais de 50% da população total. Nossos resultados exibem os prohemócitos, oenocitóides e plasmatócitos correspondendo à cerca de 97% da população total de células circulantes na hemolinfa de *A. aegypti* e *A. albopictus* seguido pelos granulócitos, adipohemócitos e trombocitóides.

Como descrito por Beerstsen *et al.* (2000) os mosquitos são capazes de elaborar uma resposta imune intensa e específica contra a invasão de patógenos. O aumento do número total de hemócitos na hemolinfa dos insetos é uma resposta comum ao parasitismo (Silva *et al.*,

2002). De acordo com Christensen *et al.* (1989) um aumento significativo do número total de hemócitos foi observado como resposta imune de *A. aegypti* inoculados com microfilárias de *Dirofilaria immitis*. Resultados similares foram observados por Da Silva *et al.* (2000) em *C. quinquefasciatus* infectados com *C. albicans*. Nesses estudos foi demonstrado que não existe diferença significativa na contagem total de hemócitos quando os mosquitos foram simplesmente desafiados com solução salina. Nossos resultados concordam com a literatura onde mostraram um aumento do número total dos hemócitos de *A. aegypti* após alimentação sanguínea com *Dengue virus* quando comparado com o grupo controle. De acordo com Christensen *et al.* (1989) este subsequente aumento do número de hemócitos após o desafio, pode estar relacionado com a atividade mitótica dessas células, ou pode ser resultado da liberação dos hemócitos, que estavam fixados nos tecidos, na circulação dos insetos.

Salazar *et al.* (2007) descreveram as taxas de infecção presentes na glândula salivar de mosquitos *A. aegypti* alimentados com sangue contendo *Dengue virus*. No 5º dia pós-alimentação cerca 26-50% deste órgão encontrou-se infectado e no 7º dia essa taxa aumentou para 51-75%. Em nosso estudo, a contagem total dos hemócitos de *A. aegypti* exibiu um aumento estatisticamente significativo do número de células no 5º e 7º dia pós-alimentação. Desta forma podemos sugerir que a partir do 5º dia, os vírus possivelmente entraram em contato com a hemolinfa infectando a glândula salivar e iniciando uma resposta imune contra a presença do vírus. Esta ativação do mecanismo de defesa do inseto acarretou em um aumento súbito no número dos hemócitos neste período, que são células importantes na defesa imune inata do *A. aegypti*.

A hemolinfa contribui para disseminação de muitos vírus em seus hospedeiros. Entretanto, a resistência dos hemócitos, apoptose ou uma efetiva resposta imune celular contra a infecção pode restringir a replicação de alguns vírus em seus hospedeiros específicos (Barrett *et al.*, 1998, Trudeau *et al.*, 2001, Clarke & Clem, 2002). O encapsulamento de elementos traqueais infectados por vírus é uma maneira que os hemócitos encontraram de conter a propagação viral e, desta forma, controlar a progressão da doença (Washburn *et al.*, 1996)

As alterações na contagem diferencial dos hemócitos após infecção com patógenos também foram descritas na literatura. Da Silva *et al.* (2000) indicaram que a proporção dos plasmatócitos aumentou, enquanto que a proporção dos granulócitos tinha diminuído, ambos significativamente, após a infecção do *C. quinquefasciatus* com o fungo *C. albicans*. Estudando as alterações dos hemócitos em larvas parasitadas e não parasitadas de *Anastrepha obliqua* (Diptera: Tephritidae), Silva *et al.* (2002) descreveram uma redução na proporção dos

prohemócitos e dos plasmatócitos em insetos parasitados. Brayner *et al.* (2005) analisando hemolinfa de *C. quinquefasciatus* infectado com *W. bancrofti* observaram um aumento significativo dos prohemócitos, plasmatócitos, granulócitos e oenocitóides, quando comparados com os insetos do grupo controle. Devemos levar em consideração que estes modelos de infecção são contra helmintos e fungos, os quais podem trazer resultados diferentes das infecções virais.

Os estudos com larvas da lagarta da soja, *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae), infectada com o *A. gemmatalis* M nucleopoliedrovírus (AgMNPV), utilizado hoje como agente de controle biológico, demonstraram que apenas a porcentagem de granulócitos foi diferente entre larvas infectadas e não infectadas, indicando que estas células responderam rapidamente à infecção viral após 2 horas do desafio. Estes autores detectaram a diminuição no número de granulócitos e manutenção das populações de plasmatócitos, esferulócitos, prohemócitos, oenocitóides e vermiformes em larvas infectadas com vírus AgMNPV (Andrade *et al.*, 2010). Apesar de se tratarem de infecções por vírus, nossos resultados mostraram que os oenocitóides aumentaram e os prohemócitos diminuíram significativamente apenas após o 1º dia pós-alimentação e que os granulócitos e plasmatócitos aumentaram apenas após o 5º dia. Este fato pode indicar que os prohemócitos se diferenciaram nos outros tipos celulares importantes para defesa do inseto que aumentaram subsequente (oenocitóides, granulócitos e plasmatócitos). O prohemócito é um dos mais freqüentes tipos celulares observados na hemolinfa de *A. aegypti* e alguns autores sugerem que esta célula possui a função de originar os demais tipos celulares (Gupta, 1985; revisão de Lavine & Strand, 2002).

Os plasmatócitos e granulócitos são as principais células envolvidas nos mecanismos de defesa imunológicas dos insetos. Elas são as células capazes de aderir à superfícies estranhas, sendo muito importantes para os mecanismos de fagocitose, nodulação e encapsulação (revisão em Lavine & Strand, 2002). A diferença nas quantidades destas células em nossos experimentos sugere que a infecção viral é responsável por alterações na população destas células, assim como foi responsável pelas alterações ultraestruturais observadas.

Como as porcentagens de adipohemócitos e trombocitóides permaneceram as mesmas nos mosquitos sadios e alimentados e nenhuma alteração quanto a sua morfologia foi observada, podemos sugerir que estes tipos celulares não estão diretamente envolvidos na resposta imune ao *Dengue virus*. Os adipohemócitos foram os únicos hemócitos presentes na hemolinfa do lepdóptera *Anticarsia gemmatalis* que não se infectaram com baculovírus (Silveira *et al.*, 2004).



Alguns autores como Ratcliffe *et al.* (1985) e Rivers *et al.* (2002), relataram que a presença de patógenos poderá causar uma diminuição no número de hemócitos circulantes para conter a infecção. Esta diminuição está relacionada com a formação de nódulos e encapsulação ao redor dos invasores, assim como, a degranulação de alguns tipos celulares. Em contraste, Richards & Edwards (1999) e Russo *et al.* (2001) relatam que a presença de patógenos na hemocele estimula a hematopoese, aumentando o número de células na hemolinfa. Desta forma, podemos perceber que não existe um consenso na associação da resposta de defesa com a diminuição ou o aumento do número total de hemócitos.

#### 6.4 Hemócitos de *A. aegypti* após o desafio com DENV

Um dos primeiros trabalhos envolvendo replicação de *Dengue virus*, em células de mosquitos, através da utilização da microscopia foi o de Sriurairatna & Bhamarapravati (1977). Estes autores verificaram ultraestruturalmente a presença do *Dengue virus 2* (Nova Guiné C) em diversos tecidos de mosquitos *A. albopictus* após a injeção intratorácica. Análises ultraestruturais evidenciaram partículas virais na glândula salivar, no tecido nervoso, no intestino, no corpo gorduroso e inclusive nos hemócitos. Em 1979, Ko *et al.*, também realizaram observações ultraestruturais de células de *A. albopictus* infectadas com *Dengue virus* (DENV- 1, 2, 3 e 4) entretanto, estes autores utilizaram células de cultura C6/36. Neste estudo, foi observado que o título do *Dengue virus 2* diminuiu logo após a infecção das células C6/36 mas, aumentou gradativamente após o 1 dia.

Como podemos observar a microscopia eletrônica desde muito tempo tem sido utilizada como uma eficiente ferramenta para o estudo do processo de replicação dos vírus da família Flaviviridae. A maioria dos trabalhos envolve clones de células C6/36 (linhagem celular de *A. albopictus*) infectadas com *Dengue virus* e utilizam a microscopia eletrônica como principal ferramenta de estudo. Estes estudos serviram para elaborar um modelo de replicação do vírus e desta forma, melhor compreender o ciclo de vida dos *Flavivirus* em seus vetores (Barth, 1991, 1992, 1999; Barth & Schatzmayr, 1992; Barth *et al.*, 1997, Barth & Cortes, 1997). Nosso estudo busca descrever este ciclo de replicação em hemócitos, utilizando a microscopia eletrônica de transmissão e, somado a outros experimentos, analisar a resposta imune destas células frente ao desafio viral. Um dos maiores obstáculos encontrados é a dificuldade em se obter estas células visto que, não são cultivadas em laboratório.

Experimentos com células de cultura de *A. aegypti* (Aag2) infectadas com *Dengue virus 2* Nova Guiné C demonstram que os títulos virais aumentaram significativamente após

48h da infecção (Sim & Dimopoulos, 2010). Utilizando estas observações e sabendo que o ciclo de replicação do *Dengue virus* dura cerca de 30 horas, realizamos nossos experimentos após 48 horas da infecção com o objetivo de se obter material em um tempo onde os títulos virais aumentam significativamente.

Autores como Styer *et al.* (2007), em experimentos envolvendo a transmissão do vírus do Oeste do Nilo - WNV (gênero *Flavivirus*) à hospedeiros vertebrados, descrevem que mosquitos que se alimentaram oralmente ou receberam vírus através de inoculação, não exibiram variação na quantidade de vírus inoculados nos hospedeiros. Eles sugerem que, a inoculação intratorácica de baixas doses de WNV (30PFU - unidades formadoras de placas) não interfere na quantidade de vírus na saliva se comparados aos mosquitos que se alimentaram oralmente.

A inoculação intratorácica é um procedimento muito utilizado, quando se quer obter uma alta dose de vírus nos mosquitos e assegurar a infecção. Esta não é a rota natural de infecção por arbovírus, mas, evita-se a interferência das barreiras de infecção que existem nos mosquitos (Kramer *et al.*, 1981; Bowers *et al.*, 2003). Alguns estudos sugerem que os arbovírus podem reduzir a sobrevivência do hospedeiro, dependendo da rota e da dose do inoculo (Cooper *et al.*, 2000). Entretanto, também deve ser observado que a ferida ocasionada pela agulha durante a inoculação inicia uma rápida resposta humoral e celular nos mosquitos, com a finalidade de cicatrizar a ferida ocasionada (Lai *et al.*, 2001). Em nossos experimentos, utilizamos a inoculação intratorácica porque esta foi a forma encontrada para desafiar os hemócitos rapidamente e garantir a infecção. O grupo controle foi muito importante para podermos comparar as células desafiadas com os vírus daquelas que receberam apenas uma injúria. Não identificamos alterações morfológicas significantes no grupo controle em relação ao grupo desafiado com os vírus.

Parikh *et al.* (2009) estudaram o tropismo de arbovírus por hemócitos de mosquitos. Para isso, este grupo inoculou intratoracicamente *Sindbis virus* (gênero alphavirus) em mosquitos *A. aegypti*. Os hemócitos se infectaram logo após as primeiras 6 horas e a infecção foi evidente nestas células ao longo de 4 dias. O granulócito foi a célula que frequentemente encontrava-se infectada, entretanto, em alguns momentos, os oenocitóides foram vistos infectados. Estes resultados estão de acordo com os nossos, onde identificamos antígenos virais presentes nos granulócitos, nos oenocitóides e nos plasmatócitos através da imunofluorescência. Estes autores classificam e descrevem os hemócitos da mesma forma que Hillyer & Christensen (2002) e Castillo *et al.* (2006). Entretanto, os granulócitos encontrados

neste estudo possuem uma forma bastante semelhante aos nossos plasmatócitos, podendo ser até o mesmo tipo celular.

Os granulócitos infectados descritos por Parikh *et al.* (2009) exibiam extensões bulbosas na membrana plasmática, a partir de 48 horas de infecção. Nossos resultados, obtidos através da microscopia de luz, exibiram a presença de muitos pseudópodes em plasmatócitos presentes em mosquitos desafiados com vírus após 48 horas, como podemos observar na Figura 36D. Estes dados indicam que, estas células responderam à presença do vírus circulante na hemolinfa, o que foi confirmado através da detecção do RNA viral pela técnica de PCR (Figura 41). Estes autores, também descrevem que a proporção de células infectadas foi de 100% após 24 horas e após 48 horas alcançou-se o pico máximo do título viral na hemolinfa dos mosquitos. Eles atribuem este título à replicação do vírus unicamente nos hemócitos, porque a positividade das células foi visualizada através da observação da fluorescência. Os vírus utilizados neste estudo possuem no seu genoma a proteína verde fluorescente (green fluorescent protein- GFP), que apenas é expressa durante a replicação viral. Os autores concluem que, a expressão e a acumulação de GFP é uma medida válida para indicar a replicação do *Sindbis virus* nos hemócitos de *A. aegypti*. Estes dados indicam que os arbovírus infectam e se replicam em hemócitos, o que torna estas células sérias candidatas a serem um sítio de amplificação de arbovírus em rota para glândula salivar (Parikh *et al.*, 2009). Em outros vírus como baculovírus, os hemócitos tem um papel central na patogênese, sendo utilizados como sítio de amplificação e disseminação da infecção (Granados e Lawler AL, 1981).

Além de Parikh *et al.* (2009), Salazar *et al.* (2007) também detectaram hemócitos de *A. aegypti* infectados com vírus. Estes autores identificaram hemócitos infectados com *Dengue virus 2* após 10 dias da realização de alimentação oral. Neste mesmo período, foi detectado que cerca de 76-95% das glândulas salivares estavam infectadas.

A ultraestrutura revelou que os hemócitos apresentam as mesmas características morfológicas, que indicam presença de infecção viral visualizadas em células de cultura de mosquito (C6/36) por outros autores como: o aumento do diâmetro celular, o deslocamento do núcleo para a periferia da célula, a presença de largos vacúolos inclusive SMS. (Barth, 1992, 1999). Nos experimentos de imunofluorescência, utilizando anticorpo específico anti-dengue 2, foi visualizada a fluorescência em locais específicos do citoplasma. Isto pode corresponder aos compartimentos celulares onde existe um maior processo de replicação viral (Barth, 1997) (Figura 37). As partículas virais são formadas dentro do lúmen do retículo endoplasmático rugoso, com uma participação ativa dos ribossomos que estão aderidos à membrana, vesículas

e túbulos de “smooth-membrane structure” (Ko *et al.*, 1979; Barth, 1992). Os SMS ocorrem como vesículas e pequenos ou longos túbulos que estão agrupados dentro das cisternas do RER ou no citoplasma dependendo da origem da célula infectada se é de inseto ou mamífero. Elas aparecem quando a replicação viral é iniciada e antes que novos vírus sejam detectados, ao final um grande número destas estruturas está presente no citoplasma celular. A natureza destas estruturas ainda não está bem esclarecida, acredita-se que elas representem uma resposta da célula à infecção viral e que armazenem substâncias com uma atividade antiviral (Barth, 1992).

Muitos membros da família baculovírus induzem apoptose durante a infecção em cultura de células de insetos, este fato depende da combinação vírus-hospedeiro e pode limitar-se severamente à replicação viral (Clarke & Clem, 2003). Parikh *et al.* (2009), descreveram que em 84h pós-infecção de *A. aegypti* com *Sindbis virus*-GFP, a intensidade da fluorescência e o número de granulócitos infectados começa a declinar. Este evento não aparenta ser resultado de morte celular, porque o número total de hemócitos não diminui. Em nossos experimentos de infecção viral, encontramos células em estágio avançado de apoptose, onde pode ser visto em detalhes na Figura 40D. Embora a morte celular programada, seja uma resposta inata à infecção por vírus que pode limitar sua replicação e sua propagação, nosso grupo precisa realizar experimentos que indiquem a participação da apoptose como um importante mecanismo de contenção da infecção.

Como podemos observar, a infecção de hemócitos de mosquitos por arbovírus é relatada, mas ainda não foi bem caracterizada. Além disso, todo o processo de replicação, disseminação e atividade antiviral não é detalhadamente conhecido, o que não é de se surpreender por causa da dificuldade em se obter e trabalhar com estas células.

Desta forma, o presente estudo é o primeiro a descrever alterações morfológicas em hemócitos de *A. aegypti* desafiados com *Dengue virus*, além de identificar modificações no número dessas células após alimentação oral com sangue infectado.

## 7 CONCLUSÕES

1 - A hemolinfa de fêmeas de *A. albopictus*, analisada tanto por microscopia óptica quanto por eletrônica de transmissão, possui os seguintes hemócitos circulantes: prohemócitos, adipohemócitos, granulócitos, plasmatócitos, oenocitóides e trombocitóides;

2 – Os mosquitos *A. aegypti* e *A. albopictus* possuem, em média, cerca de 3.000 hemócitos/ $\mu$ l de hemolinfa;

3 - A proporção dos diferentes tipos celulares presentes na hemolinfa do *A. aegypti* e do *A. albopictus* seguiu esta ordem: prohemócitos> oenocitóides> plasmatócitos> granulócitos> adipohemócitos> trombocitóides;

4 – Em *A. albopictus*, o granulócito e o plasmatócito apresentaram atividade fagocítica contra partículas de látex;

5 - Em *A. aegypti*, o prohemócito, o granulócito e o oenocitóide foram os tipos celulares que endocitaram a albumina;

6 - O anticorpo anti-lisossomal identificou lisossomos em plasmatócitos e oenocitóides de *A. aegypti* e nos granulócitos, plasmatócitos e oenocitóides de *A. albopictus*;

7 - As lectinas BS1, ConA, HPA, PNA, UEA, WGA, LPL e RCA marcaram as subpopulações de hemócitos de *A. aegypti* e *A. albopictus* com variações na intensidade. Contudo, estas lectinas utilizadas no reconhecimento de resíduos de carboidratos não servem como parâmetro para classificação dos hemócitos destas duas espécies;

8 – Os hemócitos do *A. aegypti* sofreram um aumento significativo no 5º e 7º dia após a alimentação oral contendo *Dengue vírus*;

9 – A infecção dos *A. aegypti* por *Dengue vírus* alterou a proporção das células na hemolinfa onde, os prohemócitos sofreram uma diminuição e os oenocitóides, plasmatócitos e granulócitos sofreram um aumento significativo;

10 – Os plasmatócitos e os oenocitóides de *A. aegypti* responderam à presença do vírus na hemolinfa exibindo alterações morfológicas características, observadas através da microscopia óptica e eletrônica de transmissão;

11 - Além dos plasmatócitos e dos oenocitóides de *A. aegypti*, os granulócitos também exibiram uma marcação positiva com anticorpo policlonal anti-dengue;

12 - A presença do *Dengue virus* foi confirmada, na hemolinfa dos mosquitos *A. aegypti*, após a inoculação através da PCR.

## 8 PERSPECTIVAS

- Estudar o perfil de expressão de genes do sistema imune em hemócitos de *A. aegypti* infectados com *Dengue virus* sorotipo 2.

## **9 ANEXOS**

### **9.1 ANEXO 1 – Artigo submetido à publicação**



**Morphological, quantitative and functional studies of the *Aedes albopictus*  
(Skuse, 1894) hemocytes**

**Araújo, H.R.C\*.; Alves, L. C.\*\*; Brayner, F. A.\*\*; Pimenta, P.F.\*<sup>+</sup>**

\*Laboratório de Entomologia Médica, Centro de Pesquisas René Rachou-Fiocruz, Av. Augusto de Lima 1715, 31190-002 Belo Horizonte, MG, Brasil \*\*Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães-Fiocruz, Recife, PE, Brasil.

**ABSTRACT**

In the current investigation the cellular population in the hemolymph of adult of *A. albopictus* has been characterized by means of light and electron microscopy analysis. Phagocytosis assays were performed *in vivo* to identify the hemocyte types involved in phagocytosis and diferents lectins were used to labelling of molecules expressed on the surface of cells. Six morphotypes of circulating hemocytes were found: prohemocytes, adipohemocytes, granulocytes, plasmacytes, oenocytoids and trombocytoids. The hemocytes isolated from *Ae. albopictus* expressed ligands to BSI, ConA, HPA, PNA, UEA and WGA lectins with distinct intensities of labeling, but one used lectin (LPL) did not bind in any hemocytes. After *in vivo* artificial non-self challenge treatments, *A. albopictus* hemocytes showed an immune response involving phagocytosis performed by plasmacytes and granulocytes.

Keywords: hemocytes; ultrastructure; latex beads; phagocytosis; cellular immunity and *Aedes albopictus*.

---

Financial support: Fiocruz-CNPq, FAPEMIG, PRONEX

+ Corresponding author: pimenta@cpqrr.fiocruz.br

## INTRODUCTION

Mosquitoes, like all insects, are exposed to a variety of microbes in their natural habitats, and possess an innate immune system that is capable of mounting a potent response against microbial challenge. They have a well-developed innate immune system that allows a general and rapid response to infectious agents. The innate immune system of insects relies on both humoral and cellular responses (Lowenberger, 2001). Humoral immune responses include several antimicrobial peptides, enzymic cascades that regulate coagulation and melanization of hemolymph and the production of reactive oxygen species and reactive nitrogen species. Cellular responses include phagocytosis, nodulation and encapsulation (Lavine & Strand, 2002). Despite this, mosquitoes act as efficient vectors for many viral, bacterial, and parasitic organisms. Vectorial capacity for individual pathogens varies widely between species and this variation may be a reflection of innate differences in immune mechanisms.

The circulating hemocytes are essential for the insect immunity, while their number decreases drastically during an infection and new hemocytes are produced from hematopoietic tissues, to balance the lost hemocytes. In *Drosophila*, lymph glands are the larval hematopoietic organs where hematopoiesis occurs during the embryonic and larval stages. Lymph gland-derived hemocytes are secreted into hemolymph during late third instar larvae, just before the onset of pupation (Lanot *et al.*, 2001).

None of the individual methods for studying the various morphological types of hemocytes is entirely satisfactory for all insects or for all types of cells within a given insect. Differences in technique have often led and are likely to continue to lead to conflicting views

until systematic comparative studies are forthcoming (Jones, 1962). Classification of insect circulating hemocytes is a subject of controversy, and the terminology used to designate each cellular type is often different from one species to another. However, a survey of the literature on insect hemocytes suggests that there are resemblances for most of the cell types and functions, in different insect species (Ribeiro & Brehelin, 2006).

In the last decades, the use of electron microscopy for ultrastructural studies of hemocytes has been instrumental in recognizing major types of insect hemocytes, with some discrete controversies still remaining. In the mosquito, the most common types of hemocytes described in the literature are prohemocytes, plasmatocytes, granulocytes, spherulocytes, adipohemocyte, oenocytoid and coagulocyte (Gupta, 1979).

The Asian tiger mosquito, *Aedes albopictus* (Skuse, 1894), is an invasive species that can be found on all continents. The geographical spread of *A. albopictus* has mostly occurred during the last three decades and, following the spread of *Aedes aegypti* and *Culex pipiens*, the spread of *A. albopictus* is the third example of the spread of a mosquito vector that was caused by human activities (Paupy *et al.*, 2009). *A. albopictus* was suspected of being a vector or secondary vector of several viruses, particularly of the viruses that cause dengue fever and dengue hemorrhagic fever (Black IV *et al.*, 2002).

The only study that describes the *A. albopictus* hemocytes was in 1975 where, five types of hemocytes were detected in *A. albopictus* larvae hemolymph by light microscopy. They were prohemocytes, plasmatocytes, 2 types of podocytes and spherules (Bhat & Singh, 1975). Mosquito hemocytes are also important sources of signaling and effector molecules released into hemolymph (Dimopoulos *et al.*, 2000; Hillyer *et al.*, 2003). However, current understanding of the hemocyte types of mosquito production, their relative abundance, and their functions is limited.

In insects, lectins are synthesized by hemocytes and released in hemolymph, or are expressed on the surface of circulating hemocytes, where they are able to act as cytophylic receptors (Paskewitz & Christensen, 1996).

The aim of this study was to characterize the hemocytes in *A. albopictus* female adults using light and electron microscopies, as well as to quantify these cells through the total and differential counts, to verify lectin binding and phagocytosis capacity on circulating hemocytes.

## MATERIALS AND METHODS

### Mosquito rearing

The females of *A. albopictus* were obtained from a colony originated from captured mosquitoes from the city of Recife in the State of Pernambuco, Brazil in 2007. This colony is maintained in the insectary of the Laboratory of Medical Entomology of the Fundação Oswaldo Cruz at Belo Horizonte, State of Minas Gerais. The mosquitoes are created in an acclimatized room (temp. 28°C; 80% relative humidity) under a 12-hour light/dark cycle and fed up with 10% glucose solution *ad libitum*.

### Hemocyte collection and quantification

Adult Mosquitoes from one, two, three, seven and eight days post-eclosion were anesthetized by cold (4°C, 1-2 min) and the hemocytes collected using a slight modification of a procedure previously described (Castillo *et al.*, 2006). Briefly, anticoagulant solution consisting of 60% Schneider's medium, 10% fetal bovine serum, and 30% citrate buffer (98

mM NaOH, 186 mM NaCl, 1.7 mM EDTA, and 41 mM citric acid; buffer pH 4.5) was injected gradually into the thorax. An incision was made in the abdominal wall using a sterile micro-forceps, and a total volume of 10µl of diluted hemolymph collected using a pipettman with sterile pipette tip. The sample was immediately placed in a sterile disposable hemocytometer slide (Neubauer Improved, iNCYTO C-Chip DHC-N01) (Rodrigues *et al.*, 2010). The number of cells in the four squares was counted using a light microscope (40× objective), and the total number of hemocytes per mosquito was determined. Counts of the six individual hemocyte cell types were simultaneously done, and the proportions in percentages were determined per individual mosquito. Hemocyte counts were confirmed in three independent experiments. For each experiment, groups of 6 mosquitoes were analyzed individually and the total number of cells or the proportion of each cell population expressed as the mean ( $\pm$  SEM). The data obtained to the total and differential count were analyzed through ANOVA and Tukey's test ( $p < 0.05$ ).

### Light microscopy

Perfused hemolymph was placed on a clean microscope slide. The hemocytes in the perfusate were allowed to settle for 5 min and then were fixed with methanol. Slides were stained with Giemsa stain (3 drops in 1 ml of water for 3 min) pH 7.2, washed in tap water, dried, and examined under a light microscope.

### Transmission Electron Microscopy (TEM)

The hemolymph of at least 300 insects (4-day old) was collected from a punctured thorax perfused directly with Karnovsky fixer solution (3% glutaraldehyde, 2%

paraformaldehyde in sodium phosphate buffer 0.1M, pH 7.2). The hemocytes were fixed in the same fixative at room temperature overnight. The sample was centrifuged at 3.000rpm for 10 min, washed sodium phosphate buffer 0.1M and post-fixed in 1% osmium tetroxide plus 0,8% potassium ferricyanide for 30 minutes. After dehydration in graded acetone series the samples were embedded in EMBED 812/ Araldite (Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, PA). Thin sections were obtained with a ultramicrotome, stained with uranyl acetate and lead citrate, observed and photographed with a JEM 1011, JEOL (Tokyo, Japan).

### Lectin staining

Fluorescent lectins were used in an attempt to identify different hemocytes subpopulation by the sugar moieties at their cell surfaces. Fluorescein isothiocyanate (FITC) conjugated with *Bandeiraea simplicifolia* (BSI), *Canavalis ensiformis* (ConA), *Helix pomatia* (HPA), *Arachis hypogea* (PNA), *Ulex europaeus* (UEA), *Triticum vulgare* (WGA) and *Limulus polyphemus* (LPL) were used in this study (all obtained from Sigma).

The hemolymph from 50 insects was collected in tubes directly in a fixative containing 4% paraformaldehyde. After fixation, the samples were gently rinsed with 1× PBS (Phosphate buffered saline), centrifuged at 3.000rpm for 10 min and placed on coverslips covered by 0.1% poly-l-lysine that were kept in a humid chamber. After the adhesion, the cells were incubated with PBS-T (1× PBS containing 1%BSA and 0.2% Triton X-100) for 30 min at room temperature. PBS-T was removed and cells incubated for 1h in the dark with FITC conjugated lectin (Sigma Aldrich) in PBS plus 0.1% Triton X-100. Cells were washed three times with 1×PBS and incubated with DAPI (nuclear marker) for 30 min. Cells were mounted with Mowiol mounting medium and images obtained using a Zeiss LSM 510

confocal microscope. The cells presenting fluorescence after treatment were considered as labelled.

### Phagocytosis Experiments

The capacity of the hemocytes to phagocytose was assayed *in vivo*. These experiments were carried out by using glass needle to inject mosquito thorax with fluorescent latex beads (0.526µm diameter; Sigma) resuspended in PBS. Hemolymph was collected from these mosquitoes after 1 hour and placed in tubes directly in a fixative containing 4% paraformaldehyde. Fixed cells were gently rinsed with PBS and placed on glass slides that were kept in a humid chamber. Hemocytes were incubated with PBS-T (PBS containing 1%BSA and 0.2% Triton X-100) for 30 min at room temperature. PBS-T was removed and cells incubated for 1 h in the dark with DAPI for 30 min. Cells were washed three times with 1×PBS, and a drop Mowiol mounting medium was added. Cells were mounted and observed under a Zeiss LSM 510 confocal microscope.

## RESULTS

### Hemocytes types: morphological characteristics

Six of hemocytes types were characterized in the hemolymph of the *A. albopictus*: prohemocytes (PR), adipohemocytes (AD), granulocytes (GR), plasmatocytes (PL), oenocytoids (OE) and trombocytoids (TR).

The PR were the smallest cells observed and characterized by the presence of the big, voluminous and central nucleus, scarce cytoplasm, some mitochondria and smooth cellular

surface (Figs.1A and 2A). The AD exhibited a large lipid like vesicle, elongated mitochondria and a well-developed Golgi complex. They were extremely labile and frequently lysed after perfusion (Figs.1B and 2B). The GR were round cells, with round and central nucleus, several cytoplasmic vacuoles, some filled with an electron-dense material and others completely empty (Fig 2C).. Granular cells attached and spread on glass slides (Fig 1C). The PL were polymorphic cells, with form varying from oval to round, central nucleus, homogeneous cytoplasm and abundant cytoplasmic projections (Fig. 2D). These cells spread forming pseudopodia and frequently were seen attached to the slide (Fig. 1D). The OE was the largest cellular types observed. They were round, with small and eccentric nucleus, homogeneous cytoplasm and plasmatic membrane without projections (Figs. 1E and 2E). The TR were fusiform cells, with elongated extremities, prolonged and central nucleus, sometimes with slightly granular cytoplasm and smooth cellular surface (Figs. 1F and 2F).

#### Total hemocytes count

Total hemocyte count (THC) is a measure of the concentration of hemocytes within the hemolymph per mosquito (cells/ $\mu$ l). The total hemocytes count of *A. albopictus* varied between 12 and  $39 \times 10^2$  hemocytes/ $\mu$ l (Fig. 3). All of the premises of ANOVA were met, and the rest revealed significant differences among THC values for the samples studied (ANOVA,  $F=0.0052$ ,  $P=4.190$ ). All means an significant differences are shown in fig. X. Differences were found between THC values from 1 and 2 day-old (Tukey's test,  $n=6$ ,  $P<0.05$ ) and 1 and 7 day-old (Tukey's test,  $n=6$ ,  $P<0.05$ ).

#### Differential hemocytes count



The differential hemocyte count (DHC) represents the count of individual hemocyte types within the total hemocyte population. PR (50.8%), OE (32%) and PL (15%) were the most conspicuous cells types throughout all days studied, together constituting 97.8% of the total cell population. TR were rare along all the day analyzed, constituting 0.01% of the cell population, followed by AD (0.7%) and GR (1.5%) (Fig.4). The increase observed from 2 day-old was relative between AD, PL and OE.

#### Lectin-binding assay

Fluorescent lectins staining were used to stain hemocytes in an attempt to find cell surface carbohydrates diagnostic for specific hemocyte populations.

The significant differences between hemocytes were observed with respect to their ability to bind lectins. The positive reactions were observed on the surface of the PR, GR, PL and OE. No reactivity to all lectins tested were observed in AD and TR. The lectins UEA and WGA exhibited strong patterns (Figs.5E and F) followed by PNA that exhibited a pattern of moderate (Fig. 5D) and BSI, ConA and HPA that labeled poorly the cells (Figs. 5A, B and C). The lectin LPL has not labeled *A. albopictus* hemocyte.

#### Phagocytosis

Phagocytosis *in vivo* was investigated using fluorescent latex beads (green) of uniform diameter which could be injected readily into the mosquito hemocoel. Fluorescent labeled beads could be easily seen within the PL and GR (Fig. 6).

## **DISCUSSION**

Hemocytes are the primary mediators of cell-mediated immunity in insects. However, the classification of insect circulating hemocytes is somewhat controversial and the terminology used to classify each cellular type is different. Besides, class types differ substantially among different orders and inside the same order (Lavine and Strand, 2002; Ribeiro and Brehelin, 2006).

Previously, mosquito hemocytes were obtained by different procedures. In the current study we adapted the Castillo *et al.* (2006) perfusion method to obtain *A. albopictus* hemocytes. Under these conditions, the hemocytes were seen with good morphological characteristics. The hemolymph of *A. albopictus* contains six general cell types commonly described for mosquitoes: prohemocytes (PR), adipohemocytes (AD), granulocytes (GR), plasmatocytes (PL), oenocytoids (OE) and trombocytoids (TR). Kaaya and Ratcliffe (1982) studying several medical important dipterans described a similar range of morphological types of hemocytes by LM analysis. Hemocytes from adult *Aedes aegypti* were recently classified with the same types described in *A. albopictus* (PR, AD, GR, PL, OE, TR) on the basis of morphology (Araújo *et al.*, 2008). Hillyer and Christensen (2002) and Hillyer *et al.* (2003) described only four morphological cell types in *A. aegypti* and *Armigeres subalbatus*, respectively. They are: granulocytes, oenocytoids, adipohemocytes and thrombocytoids.

In the present study, we observed that prohemocytes displayed unmistakable characteristics such as small size and large nuclear–cytoplasmic ratio, with a morphology identical to that described in previous hemocyte studies (Hyps̃a and Grubhoffer, 1997; Falleiros *et al.*, 2003; Giulianini *et al.*, 2003). These cells generally were considered to be stem cells from which originate other types of hemocyte (Jones, 1962; Kaaya, Ratcliffe, 1982).

Few adipohemocytes were observed in the present work, mostly because of the instability of these cells. Besides large lipid vesicles, other cellular organelles could be readily identified, i.e., scarce RER and mitochondria. Hillyer *et al.* (2003) described that these cells were the second most common cells obtained from naïve mosquitoes.

Oenocytoids were described in the dipterans *Culex quinquefasciatus*, *Aedes aegypti* and *Armigeres subalbatus* (Hillyer and Christensen, 2002; Hillyer *et al.*, 2003; Brayner *et al.*, 2005). Oenocytoids have been described as cells typically containing a greater number of dense granules located at the cell periphery (Hypšá and Grubhoffer, 1997; Giulianini *et al.*, 2003). In EM analyses, we detected that in oenocytoids from *A. albopictus* cytoplasmic granules were completely or partially filled with amorphous material.

In insects like Lepidoptera, granulocytes are usually the professional phagocytes, plasmacytes are the main capsule forming cell, oenocytoids are a source of phenoloxidasases, prohemocytes are putative stem cells, and spherule cells are potentially a source of cuticular components (Lanot *et al.*, 2001). Additional developmental and functional studies will be needed to understand the lineage fate and activity of each hemocyte type present in *A. albopictus*.

Besides the morphological and ultrastructural characterization, we tried to discriminate individual hemocyte types on the base of their ability to bind the lectins. It was shown previously for that significant differences might be in the composition of carbohydrate moieties of surface structures between individual hemocytes types.

In this study we identified granulocyte and plasmacyte how the types of cells involved in the mechanism of phagocytosis. The granulocyte is known as the main cell type endowed with phagocytosis and nodulation of foreign targets in arthropods (Jiravanichpaisal *et al.*, 2006; Da Silva *et al.*, 2000). Some authors have named phagocytic, adhesive hemocytes from mosquitoes as plasmacytes (Drif and Brehelin, 1983; Kaaya and Ratcliffe, 1982), we

concur with these authors and identified this same type of cell and the granulocyte phagocytosing latex beads in the hemolymph of *A. albopictus*.

We can conclude with *A. albopictus* hemolymph have six different types of hemocytes (Prohemocyte, adipoemocyte, granulocyte, plasmatocyte, oenocytoid and thrombocytoid) which exhibit a diverse pattern in the recognition of different lectins. We show that this mosquito has approximately 3.000 hemocytes/ $\mu$ l circulating of hemolymph and that plasmatocytes and granulocytes were the cells that realized phagocytosis mechanism.

### REFERENCES

Lowenberger C. Innate immune response of *Aedes aegypti* 2001. *Insect biochem. mol. biol.* 31: 219-229.

Lavine MD, Strand MR 2002. Insect hemocytes and their role in immunity. *biochem. mol. biol.* 32: 1295–1309.

Lanot R, Zachary D, Holder F, Meister M 2001. Postembryonic hematopoiesis in *Drosophila*. *Dev. biol.* 230: 243–257.

Jones JC 1962. Current concepts concerning insect hemocytes. *Am. Zoologist.* 2: 209-246.

Ribeiro C, Brehelin M 2006. Insect haemocytes: what type of cell is what? *J. insect physiol.* 52: 417–429.

Gupta AP 1979. Structure and taxonomic significance. In:\_\_\_\_\_. Insects Hemocytes. Cambridge: Cambridge University Press; p. 85-128.

Paupy C, *et al.* 2009. *Aedes albopictus*, an arbovirus vector: from the darkness to the light. *Microbes and Infect.* 1(14-15): 1177-1185.

Black IV WC *et al.* 2002. Flavivirus susceptibility in *Aedes aegypti*. *Arch. med. res.* 33: 379-388.

Bhat UKM, Singh KRPT. 1975. The haemocytes of the *Aedes albopictus* and their comparison with larval cells cultured *in vitro*. *Experientia.* 31: 1331-1332.

Dimopoulos G *et al.* 2000. *Anopheles gambiae* pilot gene discovery project: identification of mosquito innate immunity genes from expressed sequence tags generated from immune-competent cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97: 6619-6624.

Hillyer JF *et al.* 2003 Hemocyte-mediated phagocytosis and melanization in the mosquito *Armigeres subalbatus* following immune challenge by bacteria. *Cell tissue res.* 313: 117-127.

Araújo HRC *et al.* 2008. Hemocytes ultrastructure of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Micron.* 39: 184-189.

Paskewitz SM, Christensen BM. 1996. Immune responses of vectors. In: Beaty BJ, Marquardt WC, editores. The biology of disease vectors. Colorado: University Press, p.371-392.

Castillo JC *et al.* 2006. Characterization of hemocytes from the mosquitoes *Anopheles gambiae* and *Aedes aegypti*. *Insect biochem. mol. biol.* 36: 891-903.

Rodrigues J *et al.* 2010. Hemocyte Differentiation Mediates Innate Immune Memory in *Anopheles gambiae* Mosquitoes. *Science*. 329: 1353-1355.

Kaaya GP, Ratcliffe NA 1982. Comparative study of hemocytes and associated cells of some medically important dipterans. *J. morphol.* 173: 351-365.

Hypša V, Grubhoffer L. 1997. Two hemocyte populations in *Triatoma infestans*: ultrastructural and lectin-binding characterization. *Folia parasitol.* 44: 62-70.

Falleiros AMF *et al.* 2003. Ultrastructural and quantitative studies of hemocytes in the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *Braz. arch. biol. technol.* 46: 287-294.

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

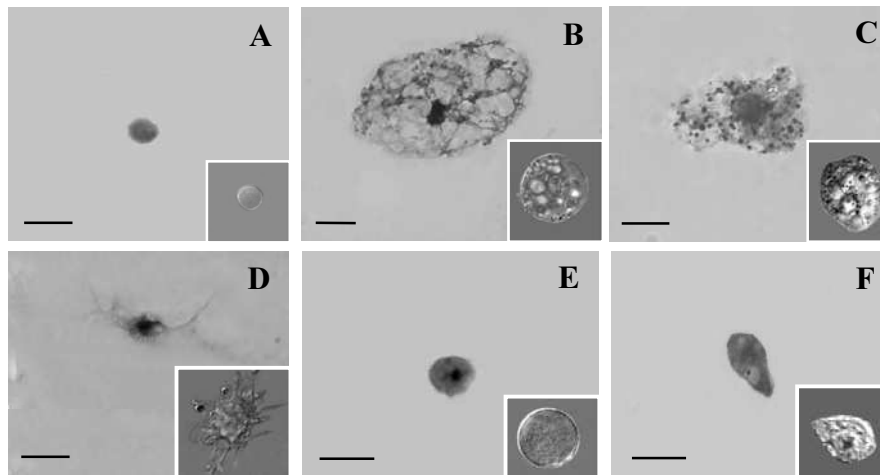
Ribeiro C, Brehelin M. 2006. Insect haemocytes: what type of cell is what? *J. insect physiol.* 52: 417-429.

Jiravanichpaisal, P., Lee, B.L., Söderhäll, K. 2006. Cell-mediated immunity in arthropods: Hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. *Immunobiology* 211, 213-236.

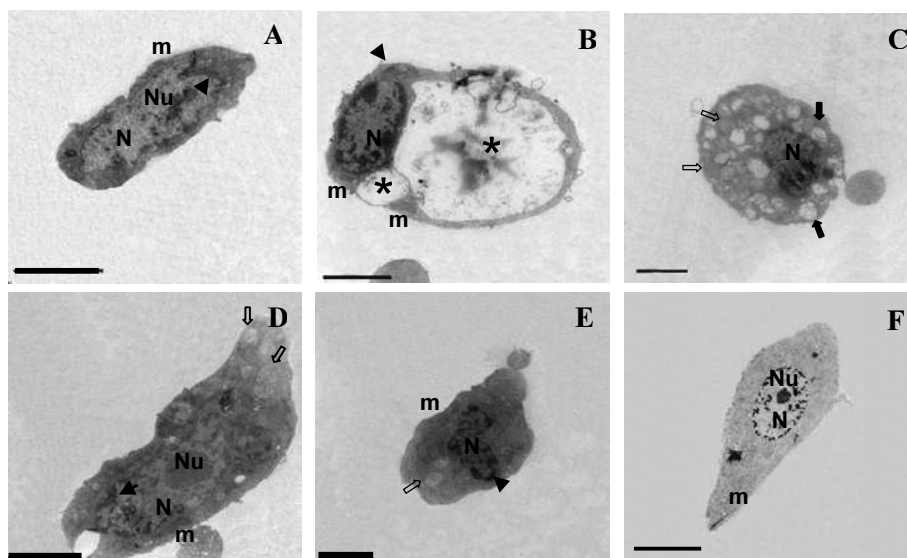
Da Silva, J.B. *et al.* 2000. Immune defense mechanisms of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) against *Candida albicans*. *J. Invert. Pathol.* 76, 257–262.

Lanot, R. *et al.* 2001. Postembryonic hematopoiesis in *Drosophila*. *Dev. Biol.* 230, 243–257.

Drif L, Brehélin M. Structure, classification and functions of insect haemocytes. In: Pathak JPN, editor. *Insect Immunity*. New Delhi: Oxford and IBH Publishing Co; 1993. 1-14.

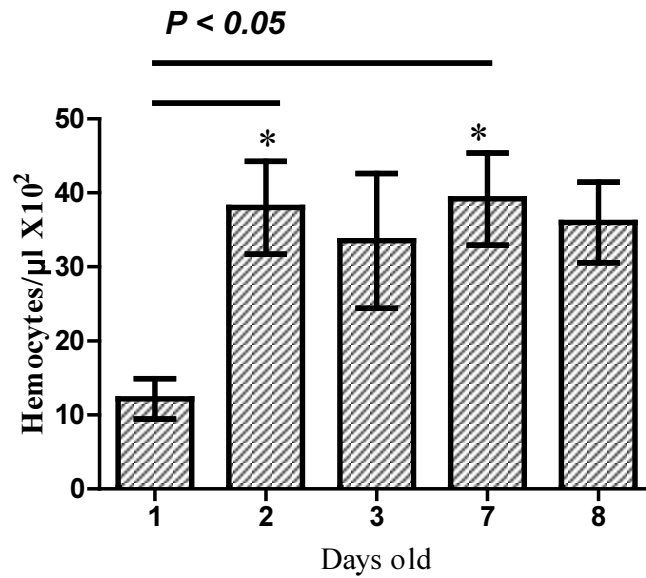


**Figure 1 – Hemocytes from *Ae. albopictus*.** (A) prohemocytes, (B) adipohemocytes, (C) granulocyte, (D) plasmatocytes, (E) oenocytoid, (F) thrombocytoids. In detail, micrographs of cells by DIC optics are shown. Scale Bar A, C, D, E = 10 $\mu$ m; B, F = 20 $\mu$ m.

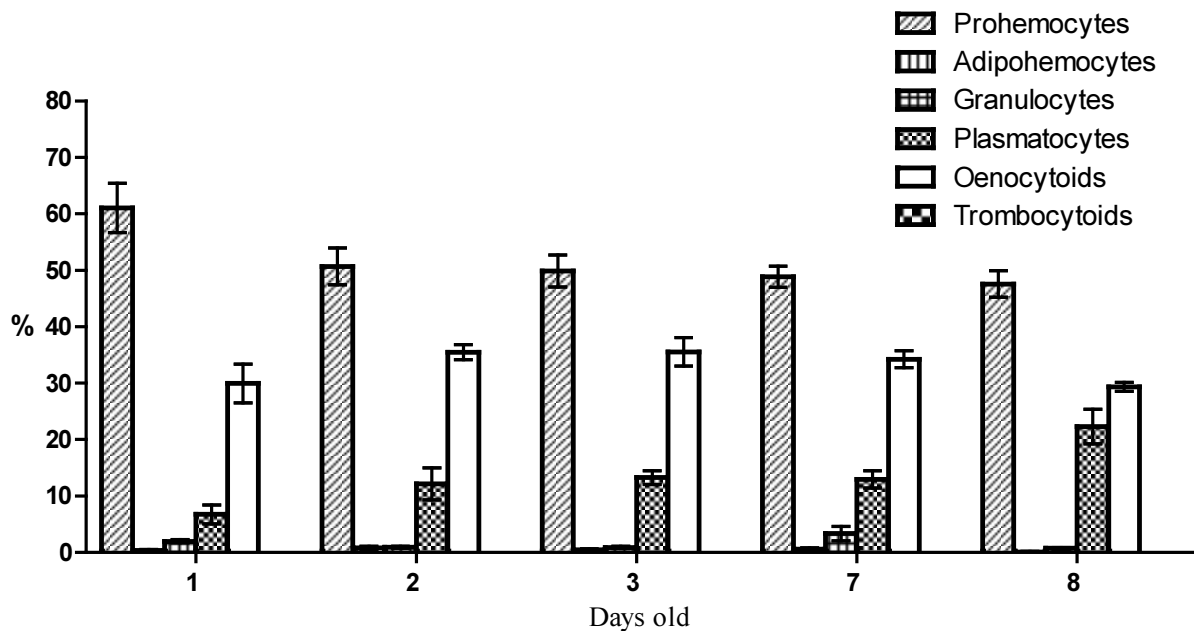


**Figure 2 - Hemocytes from *Ae. albopictus*.** (A) Prohemocytes with a large central nucleus (N) containing nucleolus (Nu) and a thin cytoplasm with few organelles. Lumps of heterochromatin (arrows) and Mitochondria (m) are also indicated. (B) Adipohemocytes with oval profile showing large nucleus (N) and cytoplasm with lipid vesicles inside (stars) and mitochondria (m). Note a well-developed Golgi complex (arrowheads). (C) Granulocyte with a cytoplasm filled with membrane-delimited vesicles (arrow) and nucleus (N). Some vesicles contain empty vacuoles (close arrow) and structured electron-dense granules (open arrow). (D) Plasmatocyte showing an elongated nucleus (N) with nucleolus (Nu). Some heterochromatin lumps are visualized (arrows) inside the nucleus and mitochondria (m) and numerous vesicles (open arrows) are observed inside the cytoplasm. (E) An oenocytoid showing an eccentric lobated nucleus (N) with clumps of heterochromatin (arrows). Cytoplasmic vacuoles (opened arrow) and mitochondria (m) are visualized. (F) Thrombocytoid has a large nucleus (N) with nucleolus (Nu) and a homogeneous cytoplasm with mitochondria (m). Magnification 2.700X. Scale Bar=2 $\mu$ m.

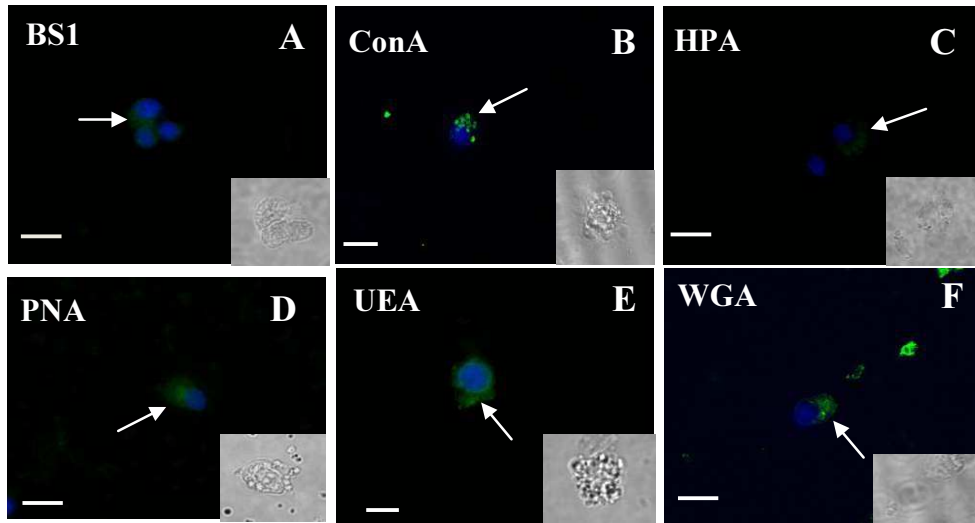




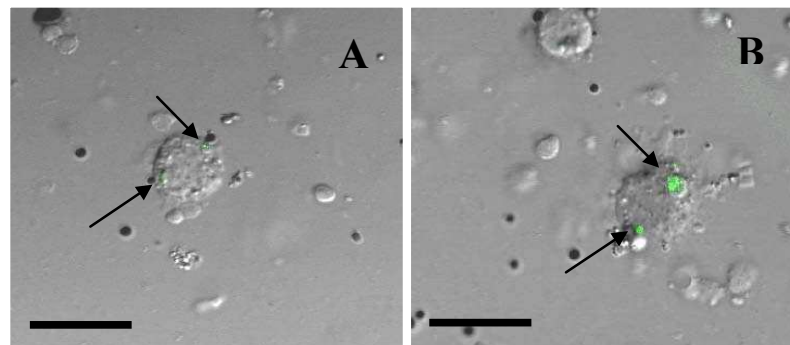
**Figure 3.** Mean  $\pm$  SD total hemocyte counts from *A. albopictus* perfused for 1 – 8 days following adult ecdysis. Bars represent mean  $\pm$  SEM; asterisks indicate differences that are statistically significant (Tukey multiple comparison test,  $n = 6$ ,  $P < 0.05$ ).



**Figure 4.** Mean  $\pm$  SD differential hemocyte counts from *A. albopictus* perfused for 1 – 8 days following adult ecdysis. Bars represent mean  $\pm$  SEM; asterisks indicate differences that are statistically significant (Tukey multiple comparison test,  $n = 6$ ,  $P < 0.05$ ).



**Figure 5 - Confocal image hemocytes stained with different Lectins – FITC (green). Scale Bars = 10 $\mu$ m.**



**Figure 6 - Phagocytosis of latex beads. Overlapping image of DIC and epifluorescent exhibiting granulocytes (A) phagocytized latex-FITC beads (green) and plasmatocytes (B). Scale Bars = 11,9 $\mu$ m.**

## **9.2 ANEXO 2 – Artigo aceito para publicação**

Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

Micron 39 (2008) 104–109

[www.elsevier.com/locate/micron](http://www.elsevier.com/locate/micron)

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

H.C.R. Araújo<sup>\*</sup>, M.G.S. Cavalcanti, S.S. Santos, L.C. Alves, F.A. Brayner

Departamento de Biologia Celular e Ultra-estrutural, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (FIOCRUZ) and  
Laboratório de Imunopatologia Celular e Humoral (LICKA), 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 defense 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%), plasmatocytes (27%), oenocytes (7%) and thrombocytes (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 dilate rough endoplasmic reticulum (RER) and a round or elongated mitochondria. Electron-dense granules with a proteinaceous material were also present. The plasmatocytes were polymorphic and exhibited plasma membrane with irregular processes, filopodia and pedicelopodia. Ultrastructural investigations reveal that the reticular cytoplasm showed a well-developed RER, a Golgi and vacuoles. Oenocytes 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. Thrombocytes were very fragile and few in number. Similar characteristics were found in oenocytes, 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 (Beertsen 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 (Vas and Nappi, 2001).

Humoral defenses include inducible antimicrobial peptides (Lowenberger, 2001; Virzoli et al., 2001; Meister et al., 2000), reactive oxygen or nitrogen intermediates (Kumar et al., 2003; Vas and Nappi, 2001), and complex enzymatic cascades that regulate coagulation or melanization of hemolymph (Lavine and Strand, 2002; Muta and Iwama, 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

<sup>\*</sup> Corresponding author at: Departamento de Biologia Celular e Ultra-estrutural, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (FIOCRUZ), Av. Moraes Barros, Campus de UFPE, CEP 50670-420 Recife, Pernambuco, Brazil.  
Tel.: +55 81 21012643; fax: +55 81 34532449.  
E-mail address: [hcra@cpqam.fiocruz.br](mailto:hcra@cpqam.fiocruz.br) (H.C.R. Araújo).

the key factor required for a successful immune reaction (Russo et al., 2008). 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 ( $27 \pm 3$  °C) with 85 ± 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), tied directly on to a glass slide and allowed to dry in natural air conditions for 20–30 min. Cells were fixed in methanol for 30 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 Eutebian.

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 (Hypfá and Grubhofer, 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.

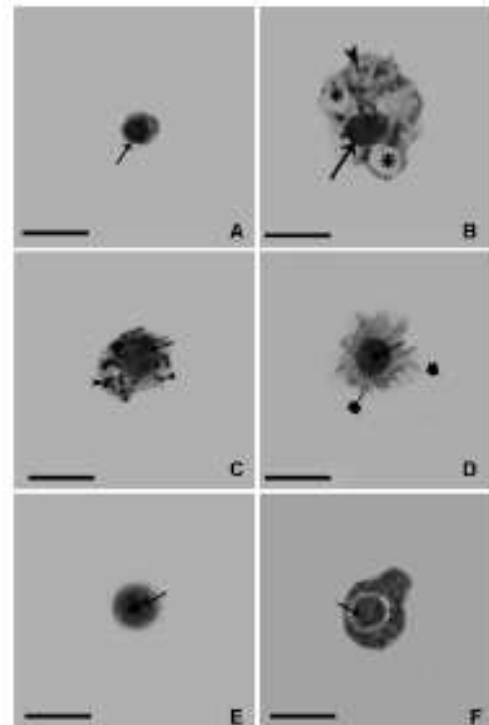


Fig. 1. (A–F) light microscopy of *Aedes aegypti* hemocytes. (A) A prohemocyte with a large nucleus (thin arrow) and a thin cytoplasmic rim. (B) An adipohemocyte showing an irregular cell profile and a large lipid droplet (star) in the cytoplasm (star). Electron-dense granules (arrowhead) and nucleus (thin arrow) are present. (C) A granulocyte filled with the typical granules in the cytoplasm (arrowhead) and large nucleus (thin arrow). (D) A plasmatocyte exhibiting a central nucleus with nucleus (thin arrow). Filopodium processes (short arrow) is shown. (E) An oenocytoid with a round eccentric nucleus (thin arrow). (F) Thrombocytoid showing nucleus with the perinuclear area (thin arrow). Bars A, C, E, F = 10 µm; B, D = 20 µm.

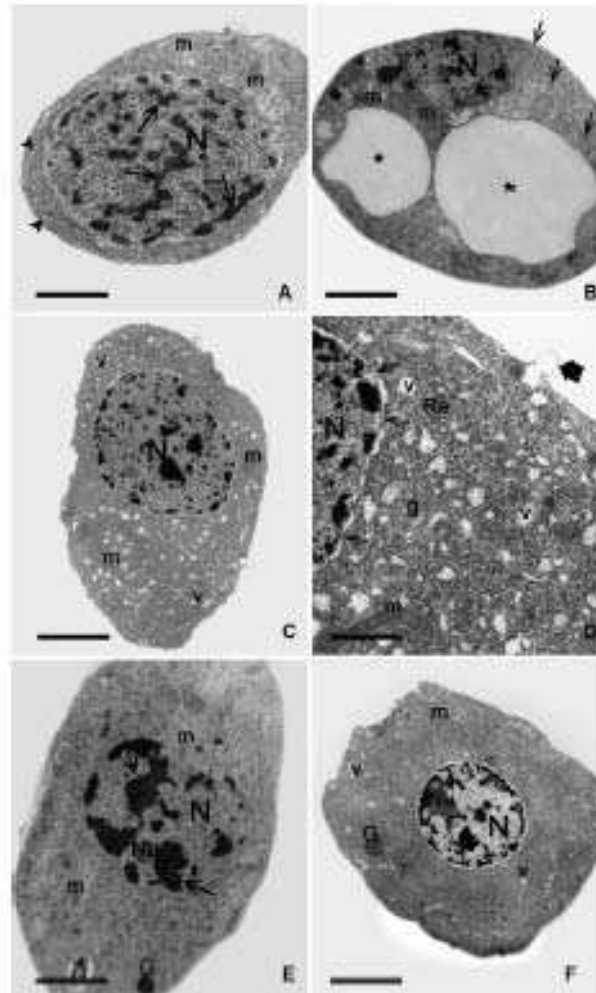


Fig. 2. (A–F) Electron micrographs of *A. aegypti* hemocytes. (A) Prohemocyte displaying spherical profiles with a large central nucleus (N), lumps of heterochromatin (arrows) (in boxes). Thin cytoplasm with few organelles. Note mitochondria (m) and SER (arrows) are also indicated. (B) Adipohemocyte with oval profile showing large nucleus (N). Observe cytoplasm with several large lipid droplets (stars), mitochondria (m) and many glycogen particles (thin arrow). (C) Plasmohemocyte showing a nucleus (N), within the cytoplasm several elongated and round mitochondria (m) and vesicles (v) are present. (D) High magnification of plasmohemocyte reticular cytoplasm containing nucleus (N), mitochondria (m), vesicles (v), SER (Re), granules (g) and coated vesicles (large short arrow) in the cytoplasm. Note that nucleopores (thin arrow) are present. (E) Anisocytoid showing a nucleus (N) with clumps of heterochromatin (short arrow) and nucleolus (Nu). Mitochondria (m) and granules (G) are also present. (F) Thrombocytoid 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, B, E = 1  $\mu$ m; C = 1.5  $\mu$ m; F = 2  $\mu$ m.

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 found in oval cells measuring 30–40  $\mu$ m 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  $\mu\text{m}$  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  $\mu\text{m}$  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.

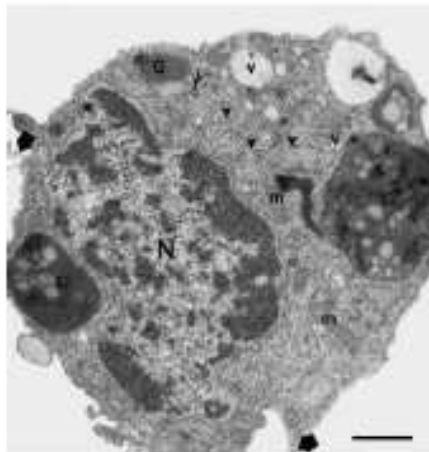


Fig. 3. A granulocyte showing a nucleus (N) with large mass of heterochromatin. The cytoplasm contains numerous mitochondria (m), sparse RER and abundant ribosomes (arrowheads) with formation of polysomes (thin arrow). Condensation of the granules with production vesicles (v) and granules (G) are indicated.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

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

### 3.5. Oenocytoids

Oenocytoids ranged 7–12  $\mu\text{m}$  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  $\mu\text{m}$  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 *Armigyrus subalbatus*, natural vectors of virus dengue and filarial nematodes, respectively: granulocytes, oenocytoids, adipohemocytes and thrombocytoids by DIC, LM and TEM. Recently, Binzyer 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 sphenocytes.

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; Binzyer 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 lipid and glycogen form. Their characteristics and size are similar to those observed by Hillier and Christensen (2002) and Hillier 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 *Cetoniachina 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 polyosomes 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.

Plasmotocytes 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 plasmotocytes, granular and aggranular (Hypfa and Grubhofer, 1997), others described this cell as granulocytes (Hillier and Christensen, 2002; Hillier et al., 2003). However, our study showed that cells termed granulocytes were quite different from plasmotocytes in some aspects, because we managed to find plasmotocytes 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 Hillier 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 Hillier and Christensen (2002) have identified only four hemocytes types, by using a different methodology we have managed to find other two different hemocytes.

#### Acknowledgments

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 Orswaldo Cruz (FIOCRUZ) and Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKAUFPE).

#### References

- Baay, B.J., 2000. Genetic manipulation of vectors: a potential novel approach for control of vector borne diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 10295–10297.
- Barman, B.T., James, A.A., Christensen, B.M., 2000. Genetic of mosquito vector competence. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64 (1), 115–137.
- Brayner, P.A., Araújo, H.R.C., Cavalcanti, M.G., Alves, L.C., Pinoto, C.A., 2005. Ultrastructural characterization of the hemocyte of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Microsc* 36, 359–367.
- Christensen, B.M., Huff, B.M., Minsinger, G.S., Harris, K.L., Christensen, J.A., 1989. Hemocyte population change during the immune response of *Aedes aegypti* to inoculated microfilariae of *Dirofilaria immitis*. *J. Parasitol.* 75, 119–123.
- De Silva, J.B., Albuquerque, C.M.R., Araújo, H.C., Pinoto, C.A., Hard, H., 2001. Immune defense mechanisms of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) against *Candida albicans* infection. *J. Invert. Pathol.* 76, 257–262.
- Dunn, P.E., 1966. Biochemical aspects of insect immunity. *Ann. Rev. Entomol.* 31, 321–339.
- Giulianini, P.G., Bernis, F., Battaglia S., Arimondi, G.A., 2003. Ultrastructure of the hemocytes of *Cetoniachina aeruginosa* larvae (Coleoptera, Scarabaeidae): involvement of both granulocytes and oenocytoids in *in vivo* phagocytosis. *Tissue Cell* 35, 263–281.
- Gupta, A.F., 1983. Cellular elements in the hemolymph. In: Korten, G.A., Gilbert, L.I. (Eds.), *Comprehensive Insect Physiology Biochemistry and Pharmacology*, vol. 3. Pergamon Press, Oxford.
- Hernández, S., Lator, H., Rodríguez, M.H., Torres, J.A., Martínez-Palomo, A., Tazum, V., 1999. Morphological and cytochemical characterization of female *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae) hemocytes. *J. Med. Entomol.* 36, 426–434.
- Hillier, J.F., Christensen, B.M., 2002. Characterization of hemocytes from the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Histochem. Cell Biol.* 313, 117–127.
- Hillier, J.F., Schmidt, S.L., Christensen, B.M., 2003. Hemocyte-mediated phagocytosis and melanization in the mosquito *Anopheles gambiae* following immune challenge by bacteria. *Cell Tissue Res.* 313, 117–127.
- Hypfa, V., Grubhofer, L., 1997. Two hemocyte populations in *Tribonia infernalis*: ultrastructural and lectin-binding characterization. *Helv. Parasitol.* 44, 63–70.
- Kaaya, G.P., Ratcliffe, N.A., 1982. Comparative study of hemocytes and associated cells of some medically important Diptera. *J. Morphol.* 173, 351–365.
- Kumar, S., Chatterjee, G.K., Chatter, R., Chatter, B., Haq, Y.S., Meister, S., Dhanraj, G., Karim, F.C., Basilio-Mary, C., 2003. The role of vacuole oxygen species on Plasmodium melanotic encapsulation in *Anopheles gambiae*. *PLoS* 100 (24), 14139–14144.
- Lator, M.D., Broad, M.R., 2002. Insect hemocytes and their role in immunity. *Invert. Biochem. Mol. Biol.* 32, 1295–1309.
- Lorenzberger, C., 2001. Insect immune response of *Aedes aegypti*. *Invert. Biochem. Mol. Biol.* 31, 219–229.
- Mead, G.F., Ratcliffe, N.A., Rawwani, L.B., 1966. The separation of insect hemocyte types on paraffin gradient methodology and problems. *J. Insect Physiol.* 32, 167–177.
- Meister, M., Horta, C., Hoffmann, J.A., 2000. The antimicrobial host defense of *Drosophila*. In: Du Pasquier, L., Littman, 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., Isejima, S., 1986. The role of hemolymph coagulation in insect 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.



- Nara, M., Melnikova, C., Dietloff, M., Weiss, C., Ziegler, M., Wimmer, 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., Reichlin, M., Carton, Y., 2001. Haemocyte changes in resistance and susceptible strains of *D. melanogaster* caused by virulent and avirulent strains of the parasitic wasp *Leptopilina boulardi*. *J. Insect Physiol.* 47, 167–172.
- Scherich, G., Theopold, U., Strand, M., 2001. Innate immunity and invasion and suppression by hymenopteran endoparasitoids. *BioEssays* 23 (6), 344–351.
- Silva, J.E.B., Stehli, L.C., Simões, Z.L.P., 2002. Hemocyte types and total differential counts in unparasitized and parasitized *Anastrepha obliqua* (Diptera, Tephritidae) larvae. *Braz. J. Biol.* 62, 689–699.
- Siva, S., Nappi, A.J., 2001. Insect immunity. *BioEssays* 51, 529–535.
- Vincent, J., Shuker, P., Hoffmann, J.A., Kadara, F.C., Müller, H.M., Ursprung, G., 2001. Gambicin: a novel insect 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.

**10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Agaisse H, Perrimon, N. The roles of JAK/STAT signaling in *Drosophila* immune responses. *Immunol. Rev. Copenhagen*. 2004; 198: 72-82.

Andrade FG *et al.* Hemocytes of *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) larvae: morphological and quantitative studies. *Acta Microsc. Caracas*. 2003; 12 (1): 59-64.

Andrade FG, Negreiro MCC, Levy SM, Fonseca ICB, Moscardi F, Falleiros AMF. Hemocyte Quantitative Changes in *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) Larvae Infected by AgMNPV. *Braz. Arch. Biol. Technol. Curitiba*. 2010; 53 (2): 279-284.

Andreu D, Rivas L. Animal antimicrobial peptides: an overview. *Biopolymers*. New York. 1998; 47 (6): 415 – 433.

Anggraeni T, Ratcliffe NA. Studies on cell-cell cocoperation during phagocytosis by purified haemocytes populations of the wax moth, *Galleria melonella*. *J. Insect Hysiol. Oxford*. 1991; 37: 453-460.

Araújo HRC, Cavalcanti MGS, Santos SS, Alves LC, Brayner FA. Hemocytes ultrastructure of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Micron. Oxford*. 2008; 39: 184-189.

Ashida M, Ochiai M, Niki T. Immunolocalization of prophenoloxidase among hemocytes of the silkworm, *Bombyx mori*. *Tissue Cell. Edinburgh*. 1988; 20: 599–610.

Avadhanula V, Weasner BP, Hardy GG, Kumar JP, Hardy RW. A novel system for the launch of alphavirus RNA synthesis reveals a role for the Imd pathway in arthropod antiviral response. *PLoS Pathog. San Francisco*. 2009;5 (9): e1000582.

Barracco MA. Estudo dos hemócitos e hemolinfa de *Trichosia pubescens* (Diptera: Sciaridae) [Tese] São Paulo (BR): Universidade de São Paulo; 1982.

Barracco MA, Loch CT. Ultrastructural studies of the hemocytes of *Panstrongylus Megistus* (Hemiptera: Reduviidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz. Rio de Jeniro*. 1989; 84 (2): 171-188.

Barrett JW, Brownwright AJ, Primavera MJ, Retnakaran A, Palli SR. Concomitant primary infection of the midgut epithelial cells and the hemocytes of *Trichoplusia ni* by *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus. *Tissue Cell. Edinburgh*. 1998; 30: 602-616.

Barillas-Mury C, Paskewitz S, Kanost MR. Immune responses of vectors. In: Marquardt WC, editor. *Biology of disease vectors*. 2<sup>nd</sup> ed. Massachusetts: Elsevier Academic Press; 2005. p. 363-376.

Barillas-Mury C, Kumar S. *Plasmodium*–mosquito interactions: a tale of dangerous liaisons. *Cell Microbiol. Oxford*. 2005; 7: 1539–1545.

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

Barth OM. Replication of dengue virus type 2, brazilian strain, in mosquito cell cultures. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. Rio de Janeiro. 1991; 86 (1): 123-124.

Barth OM. Replication of dengue virus in mosquito cell cultures – a model from ultrastructural observations. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz*. Rio de Janeiro. 1992; 87 (4): 565-574.

Barth OM, Schatzmayr HG. Brazilian dengue virus type 1 replication in mosquito cell cultures. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz*. Rio de Janeiro. 1992; 87 (1): 1-7.

Barth OM, Cortes LMC. Morphology of dengue virus induced cell syncytia. *Acta Microsc. Caracas*. 1997; 6 (2): 1-8.

Barth OM *et al.* Dengue virus (Flavivirus) morphogenesis: Ultrastructural aspects. *Acta Microsc. Caracas*. 1997; 6 (2): 9-13.

Barth OM. Ultrastructural aspects of the dengue virus (flavivirus) particle morphogenesis. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol. Bologna*. 1999; 31 (3): 407-412.

Bartholomay LC, Cho WL, Rocheleau TA, Boyle JP, Beck ET, Fuchs JF *et al.* Description of the transcriptomes of immune response-activated hemocytes from the mosquito vectors *Aedes aegypti* and *Armigeres subalbatus*. *Infect. Immun. Washington*. 2004; 72: 4114-4126.

Bayne CJ. Phagocytosis and non-self recognition in invertebrates. *BioScience*. Washington. 1990; 40: 723-731.

Bhat UKM, Singh KRPT. The haemocytes of the *Aedes albopictus* and their comparison with larval cells cultured in vitro. *Experientia*. Basel. 1975; 31: 1331-1332.

Beaulaton J. Hemocytes and hemocytopoiesis in silkworms. *Biochimie. Paris.* 1979; 61 (2): 157–164.

Beerntsen BT, James AA, Christensen BM. Genetics of mosquito vector competence. *Microbiol Mol Biol Rev.* Washington. 2000; 64: 115-37.

Billingsley PF, Rudin W. The role of the mosquito peritrophic membrane in bloodmeal digestion and infectivity of *Plasmodium* species. *J. Parasitol.* Lawrence. 1992; 78: 430-440.

Black IV WC, Bennett KE, Gorrochótegui-Escalante N, Barillas-Mury CV, Fernández-Salas I, Muñoz ML *et al.* *Flavivirus* susceptibility in *Aedes aegypti*. *Arch. Med. Res. Mexico.* 2002; 33: 379-388.

Blandin SA, Levashina EA. Phagocytosis in mosquito immune responses. *Immunol. Rev.* Copenhagen. 2007; 219: 8-16.

Bogdan C, Rollinghoff M, Diefenbach A. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Curr. Opin. Immunol.* Philadelphia. 2000; 12: 64-76.

Boman HG. Gene-Encoded Peptide Antibiotics and the Concept of Innate immunity: An Update Review. *Scand. J. Immunol.* Oslo. 1998; 48: 15-25.

Bombonato MT, Gregório EA. Estudo morfológico e quantitativo dos hemócitos em larvas de *Diatraea sacharalis* (Fabricius) (Lepidoptera, Pyralidae). *Rev. Bras. Zool.* São Paulo. 1995;12 (4): 867-879.

Borror DJ Triplehorn CA, Johnson NF. An introduction to the study of insects. 6 ed. New York: Harcodrt Brace Jobanovich Colleg Publishers; 1989.

Boucias DG, Pendland JC. The galactose binding lectin from the beet armyworm, *Spodoptera exigua*: distribution and site of synthesis. *Insect Biochem. Mol. Biol.* Oxford. 1993; 23 (2): 233-242.

Bowers DF, Coleman CG, Brown DT. Sindbis virus associated pathology in *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol.* Honolulu. 2003; 40: 698–705.

Bradley RS, Stuart GS, StilesB, Hapner KD. Grasshopper haemagglutinin: Immunochemical localization in haemocytes and investigation of opsonic properties. *J. Insect Physiol.* Oxford. 1989; 35 (5): 353-361.

Braga IA. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. Epidemiol. Serv. Saúde. Brasília. 2007; 16 (4): 279-293.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Guia de Vigilância Epidemiológica. 7. ed. Brasília: MS, 2009. ISBN 98-85-334-1632-1. Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/gve\\_7ed\\_web\\_atual.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/gve_7ed_web_atual.pdf). Acesso em: 17 maio 2011.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Nota Técnica nº 33. Atualização em 17/01/2011. Assunto: Isolamento do sorotipo DENV 4 em Manaus/AM. Brasília: CGPNCD/DEVEP/SVS/MS. Manaus: FVS/SES-AM. SMS - Manaus. 3p. Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/nt\\_33\\_denv4\\_manaus\\_05\\_02\\_2011\\_3.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/nt_33_denv4_manaus_05_02_2011_3.pdf). Acesso em: 08 fev. 2011.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Informe epidemiológico da dengue. Análise de situação e tendências – 2010. Brasília: MS/SVS, [s.d]. 42 p. Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/informe\\_dengue\\_se\\_26\\_final\\_11\\_8\\_10.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/informe_dengue_se_26_final_11_8_10.pdf). Acesso em: 31 jan. 2011.

Brayner FA, Araújo HRC, Cavalcanti MGS, Alves LC, Peixoto CA. Ultrastructural characterization of the hemocytes of *Culex quinquefasciatus* (DIPTERA: Culicidae). Micron. Oxford. 2005; 36: 359-367.

Brayner FA, Araújo HRC, Santos SS, Cavalcanti MGS, Alves LC, Souza JRB, Peixoto CA. Hemocyte population and ultrastructural changes during the immune response of *Culex quinquefasciatus* (DIPTERA: Culicidae) to microfilariae of *Wuchereria bancrofti*. Med. Vet. Entomol. Oxford. 2007; 21 (1): 112-20.

Brehélin M. Comparative study of structure and function of blood cells from two Drosophila species. Cell Tissue Res. Berlin. 1982; 221: 607–615.

Bulet P, Hetru C, Dimarcq JL, Hoffmann D. Antimicrobial peptides in insects; structure and function. Dev. Comp. Immunol. Elmsford. 1999; 23: 329-344.

Castillo JC, Robertson AE, Strand MR. Characterization of hemocytes from the mosquitoes *Anopheles gambiae* and *Aedes aegypti*. Insect Biochem. Mol. Biol. Oxford. 2006; 36: 891-903.

Centers for Disease Control and Prevention. Division of Vector-Borne Infectious Diseases. Dengue Fever. Atlanta: CDC, 2008.

Disponível em: < <http://www.cdc.gov/dengue/> >. Acesso em: 17 maio 2011.

Chambers TJ, Hahn CS, Galler R, Rice CM. Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annu. Rev. Microbiol. Palo Alto.* 1990; 44: 649-688.

Chang GJ. Molecular biology of dengue viruses. In Gubler DJ, Kuno G. (Eds.) *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever.* New York: CAB international. 1997; p.175-198.

Chapman RF. Circulatory system blood and immune systems. In: \_\_\_\_\_. *The insects: structure and function.* 4. ed. Cambridge: Cambridge University; 1998. p.94-131.

Chapman RF. The circulatory system. In: \_\_\_\_\_. *The insects: structure and function.* London: Hodber and stonghton; 1983 p. 781-795.

Chen C, Rowley AF, Ratcliffe NA. Detection, purification by immunoaffinity chromatography and properties of  $\beta$ -1,3-glucan-specific lectins from the sera of several insect species. *Insect Biochem. Mol. Biol. Oxford.* 1998; 28: 721-731.

Chiang AS, Gupta AP, Han SS. Arthropod immune system. I. Comparative light and electron microscopic accounts of immunocytes and other haemocytes of *Blattella germanica* (Dictyoptera: Blattellidae). *J. Morphol. Philadelphia.* 1988; 198: 257–267.

Christensen BM, Huff BM, Miranpuri GS, Harris KL, Christensen LA. Hemocyte population changes during the immune response of *Aedes aegypti* to inoculated microfilaria of *Dirofilaria immitis*. *J. Parasitol. Lawrence.* 1989; 75: 119-123.

Clarke TE, Clem RJ. Lack of involvement of haemocytes in the establishment and spread of infection in *Spodoptera frugiperda* larvae infected with the baculovirus *Autographa californica* M nucleopolyhedrovirus by intrahaemocoelic injection. *J. Gen. Virol. London.* 2002; 83: 1565–1572.

Clarke TE, Clem RJ. Insect defense against virus infection: the role of apoptosis. *Int. Rev. Immunol. New York.* 2003; 22: 401–424.

Cociancich S, Bulet P, Hetru C, Hoffmann JA. The inducible antibacterial peptides of insect. *Parasitol. Today. Cambridge.* 1994; 10: 132-139.

Consoli RAGB, Oliveira RL. Principais Mosquitos de Importância Sanitária no Brasil. Rio de Janeiro: FIOCRUZ; 1994.

Cooper LA, Sina BJ, Turell MJ, Scott TW. Effects of initial dose of eastern equine encephalomyelitis virus dependent mortality in intrathoracically inoculated *Culiseta melamura* (Diptera: Culicidae). J. Med. Entomol. Honolulu. 2000; 37 (6): 815-819.

Costa SCP, Ribeiro C, Girard PA, Zumbihl R, Brehélin M. Modes of phagocytosis of Gram-positive and Gram-negative bacteria by *Spodoptera littoralis* granular haemocytes. J. Insect Physiol. Oxford. 2005; 51: 39-46.

Da Silva JB, De Albuquerque CMR, De Araújo EC, Peixoto CA, Hurd H. Immune defense mechanisms of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) against *Candida albicans* infection. J. Invertbr. Pathol. New York. 2000; 76: 257-262.

Dean P, Potter U, Richards EH, Edwards JP, Charnley AK, Reynolds SE. Hyperphagocytic haemocytes in *Manduca sexta*. J. Insect Physiol. Oxford. 2004; 50: 1027-1036.

Després P, Frenkiel MP, Deubel V. Differences between cell membrane fusion activities of two dengue type-1 isolates reflect modifications of viral structure. Virology. New York. 1993; 196 (1):209-219.

Dimopoulos G, Casavant TL, Chang S, Scheetz T, Roberts C, Donohue M *et al.* *Anopheles gambiae* pilot gene discovery project: identification of mosquito innate immunity genes from expressed sequence tags generated from immune-competent cell lines. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. Washington. 2000; 97: 6619-6624.

Dostert C, Jouanguy E, Irving P, Troxler L, Galiana-Arnoux D, Hetru C *et al.* The Jak-STAT signaling pathway is required but not sufficient for the antiviral response of *Drosophila*. Nat Immunol. New York. 2005; 6: 946-953.

Drif L, Brehélin M. Structure, classification and functions of insect haemocytes. In: Pathak JPN, editor. Insect Immunity. New Delhi: Oxford and IBH Publishing Co; 1993. 1-14.

Drif L, Brehélin M. Purification and characterization of an agglutinin from hemolymph of *Locusta migratoria* (Orthoptera). Insect Biochem. Mol. Biol. Oxford. 1994; 24 (3): 283-289.

Dunn PE. Biochemical aspects of insect immunity. Ann. Rev. Entomol. Palo Alto. 1986; 31: 321-339.

Eiras AE. Culicidae. In: Neves DP, editor. Parasitologia Humana. 11 ed. São Paulo: Atheneu; 2005. p. 355-367.

Engelhard EK, Kam-Morgan LNW, Washburn JO, Volkman LE. The insect tracheal system: a conduit for the systemic spread of *Autographa californica* M nuclear polyhedrosis virus. Proc Natl Acad Sci U.S.A. Washington. 1994, 91: 3224–3227.

Falleiros AMF, Bombonato MTS, Gregório EA. Ultrastructural and quantitative studies of hemocytes in the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae). Braz. Arch. Biol. Technol., Curitiba. 2003; 46: 287-294.

Fearon DT. Seeking wisdom in innate immunity. Nature. London. 1997; 388: 323-324.

Feng G, Yu Q, Hu C, Wang Y, Yuan G, Chen Q *et al.* Apoptosis is induced in the haemolymph and fat body of *Spodoptera exigua* larvae upon oral inoculation with *Spodoptera litura* nucleopolyhedrovirus. J Gen Virol. London. 2007; 88: 2185–2193.

Figueiredo LTM. Patogenia das infecções pelos vírus do dengue. Medicina. Ribeirão Preto. 1999; 32: 15-20.

Figueiredo LTM. The brazilian flavivirus. Microbes Infect. Paris. 2000; 2: 1643-1649.

Figueiredo LTM, Fonseca BAL. Dengue. In: Veronesi R, Focaccia R, editores. Tratado de Infectologia. 2 ed. São Paulo: Atheneu; 2004. p. 204-217.

Figueiredo RMP, Naveca FG, Bastos MS, Melo MN, Viana SS, Gomes MP *et al.* Dengue virus type 4, Manaus Brasil. Emerg. Infect. Dis. Atlanta. 2008; 14 (4): 667-669.

Forattini OP. Entomologia Médica. São Paulo: Faculdade de Higiene e Saúde Pública, 1962. v. 1.

Forattini OP. Identificação de *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse) no Brasil. Rev. Saúde Públ. São Paulo. 1986; 20 (3): 244-5.

Forattini OP. Culicidologia Médica. São Paulo: Edusp, 2002. v. .2.



Foy BD, Myles KM, Pierro DJ, Sanchez-Vargas I, Uhlířová M, Jindra M *et al.* Development of a new Sindbis virus transducing system and its characterization in three Culicine mosquitoes and two Lepidopteran species. *Insect Mol. Biol. Oxford.* 2004; 13: 89–100.

Fragkoudis R, Attarzadeh-Yazdi G, Nash AA, Fazakerley JK, Kohl A. Advances in dissecting mosquito innate immune responses to arbovirus infection. *J. Gen. Virol. London.* 2009; 90: 2061–2072.

Gadelha DP, Toda AT. Biologia e comportamento do *Aedes aegypti*. *Rev. Bras. Malariol. D. Trop. Brasília.* 1985; 37: 29-36.

Gallo D. *et al.* Aparelho Circulatório. In: \_\_\_\_\_. *Manual de Entomologia Agrícola.* 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres; 1978. p. 94-96.

Garcia-Garcia E, Rosales C. Signal transduction during Fc receptor-mediated phagocytosis. *J. Leukoc. Biol. Winston-Salem.* 2002; 72: 1092–108.

Gardiner EMM, Strand MR. Monoclonal antibodies bind distinct classes of hemocytes in the moth *Pseudoplusia includens*. *J. Insect Physiol. Oxford.* 1999; 45: 113-126.

Gillespie JP, Kanost M. Biological mediators of insect immunity. *Ann. Rev. Entomol. Palo Alto.* 1997; 42: 611–643.

Girard YA, Klingler KA, Higgs S. West Nile virus dissemination and tissue tropisms in orally infected *Culex pipiens quinquefasciatus*. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases. New York.* 2004; 4: 109–122.

Giulianini PG, Bertolo F, Battistella S, Amirante GA. Ultrastructure of the hemocytes of *Cetonia aeruginosa* larvae (Coleoptera, Scarabeidae): involvement of both granulocytes and oenocytoids in vivo phagocytosis. *Tissue Cell. Edinburgh.* 2003; 35: 243-251.

Granados RR, Lawler AL. In vivo pathway of *Autographa californica* baculovirus invasion and infection. *Virology. New York.* 1981; 108:297–308.

Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin. Microbiol. Rev. Washington.* 1998; 11: 480-496.

Gubler DJ, Meltzer M. Impact of dengue/dengue hemorrhagic fever on the developing world. *Adv. Virus Res. New York.* 1999; 53: 35–70.

Gubler DJ. Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21<sup>st</sup> century. *Trends Microbiol.* Cambridge. 2002; 10 (2): 100-103.

Gubler DJ *et al.* Flavivirus. In: Knipe DM, Howley, PM, editores. *Fields Virology*. 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007. p.1168-1179.

Gullan PJ, Cranston PS. External anatomy. In: \_\_\_\_\_. *The insects an outline of Entomology*. 2. ed. Oxford: Blackwell Publishing; 1994. p. 21-50.

Gupta AP. Structure and taxonomic significance. In: \_\_\_\_\_. *Insects Hemocytes*. Cambridge: Cambridge University Press; 1979. p. 85-128.

Gupta AP. Cellular elements in hemolymph. In: Kerkut GA, Gilbert LI, editores. *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. Oxford: Pergamon; 1985. v. 3. p. 401-451.

Gupta AP. Insect immunocytes and other hemocytes: roles in cellular and humoral immunity. In: \_\_\_\_\_. *Immunology of insects and other arthropods*. Boca Raton: CRC Press; 1991. p. 19-118.

Guzmán MG, Kouri G. Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas: lessons and challenges. *J. Clin. Virol.* Amsterdam. 2003; 27: 1-13.

Guzmán MG, Kouri G. Dengue diagnosis, advances and challenges. *Int. J. Infect. Dis.* 2004; 8 (2): 69–80.

Halstead, S. B. Etiologies of the experimental dengues of Siler and Simmons. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* Baltimore. 1974; 23 (5): 974-982.

Halstead, S. B. Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. *Science*. Washington. 1988; 239: 476-481.

Halstead, S. B. The XXth Century Dengue Pandemic: need for surveillance and research. *World Health statistics Quarterly*. 1992; 45: 292-298.

Halstead, S. B. Epidemiology of dengue and dengue hemorrhagic fever In: Gubler DJ, Kuno G, editors. *Dengue and dengue hemorrhagic fever*. New York: CAB International; 1997. p. 23-44.

Halstead, S. B. Dengue. *Lancet*. London. 2007; 307: 1644-1652.

Halstead, S. B. Dengue virus-mosquito interactions. *Ann. Rev. Entomol.* Palo Alto. 2008; 53: 273-291.

Hardy JL, Houk EJ, Kramer LD, Reeves WC. Intrinsic factors affecting vector competence of mosquitoes for arboviruses. *Ann. Rev. Entomol.* Palo Alto. 1983; 28: 229–262.

Hart SP, Smith JR, Dransfield I. Phagocytosis of opsonized apoptotic cells: roles for ‘old-fashioned’ receptors for antibody and complement. *Clin. Exp. Immunol.* London. 2004; 135: 181–185.

Hawley W. The biology of *Ae. albopictus*. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* Fresno C A. 1998; 4: 1-39.

Hernández SH, Lanz H, Rodríguez MH, Torres JA, Martínez-Palomo A, Tsutsumi V. Morphological and cytochemical characterization of female *Anopheles albimanus* (Diptera:Culicidae) hemocytes. *J. Med. Entomol.* Honolulu 1999; 36 (4): 426-434.

Hernández-Martínez S, Lanz H, Rodríguez MH, González-Ceron L, Tsutsumi V. Cellular-mediated reactions to foreign organisms inoculated into the hemocoel of *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol.* Honolulu. 2002; 39 (1): 61-9.

Hillyer JF, Christensen BM. Characterization of hemocytes from the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Histochem Cell Biol.* Berlin. 2002; 117: 431–440.

Hillyer JF, Schmidt SL, Christensen BM. Hemocyte-mediated phagocytosis and melanization in the mosquito *Armigeres subalbatus* following immune challenge by bacteria. *Cell Tissue Res.* Berlin. 2003a; 313: 117-127.

Hillyer JF, Schmidt SL, Christensen BM. Rapid Phagocytosis and melanization of bacteria and *Plasmodium* sporozoites by hemocytes of the mosquitoes *Aedes aegypti*. *J. Parasitol.* Lawrence. 2003b; 89: 62-69.

Hillyer JF, Schmidt SL, Fuchs JF, Boyle JP, Christensen BM. Age-associated mortality in immune challenged mosquitoes (*Aedes aegypti*) correlates with a decrease in haemocyte numbers. *Cell Microbiol.* Oxford. 2005;7 (1): 39-51.

Hoffman JA *et al.* Postembryonic development and differentiation: hemopoietic tissues and their functions in some insects. In: Gupta AP. *Insect Hemocytes*. Cambridge: Cambridge University Press; 1979. p. 29-66.

Holt RA, Subramanian GM, Halpern A, Sutton GG, Charlab R, Nusskern DR *et al.* The genome sequence of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Science*. Washington, v. 298, p. 129–149, 2002.

Hunziker W, Geuze HJ. Intracellular trafficking of lysosomal membrane proteins. *Bioessays*. Cambridge. 1996; 18 (5): 379-389.

Hultmark D, Steiner H, Rasmuson T, Boman HG. Insect immunity: Purification and properties of three inducible bactericidal proteins from haemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia*. *Eur. J. Biochem*. Berlin. 1980; 106: 160.

Huynh KK, Eskelinen EL, Scott CC, Malevanets A, Saftig P, Grinstein S. LAMP proteins are required for fusion of lysosomes with phagosomes. *EMBO J*. Oxford. 2007; 26: 313-324.

Hypša V, Grubhoffer L. Two hemocyte populations in *Triatoma infestans*: ultrastructural and lectin-binding characterization. *Folia Parasitol. Praha*. 1997; 44: 62-70.

Ibañez-Bernal S. First record in America of *Aedes albopictus* naturally infected with dengue virus during the 1995 outbreak at Reynosa, Mexico. *Med. Vet. Entomol.*, Oxford. v. 11, n. 4, p. 305-309, 1997.

Infanger LC, Rocheleau TA, Bartholomay LC, Johnson JK, Fuchs J, Higgs S. *et al.* The role of phenylalanine hydroxylase in melanotic encapsulation of filarial worms in two species of mosquitoes. *Insect Biochem. Mol. Biol.* Oxford. 2004; 34 (12): 1329-38.

Irving P, Ubeda JM, Doucet D, Troxler L, Lagueux M, Zachary D *et al.* New insights into *Drosophila* larval haemocyte functions through genome-wide analysis. *Cell. Microbiol.* Oxford. 2005; 7: 335–350.

Iwama R, Ashida M. Biosynthesis of prophenoloxidase in hemocytes of larval hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem*. Bristol. 1986; 16: 547–555.

Jiravanichpaisal P, Lee BL, Söderhäll K. Cell-mediated immunity in arthropods: Hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. *Immunobiol.* Stuttgart. 2006; 211 (4): 213-236.

Jones JC. Current concepts concerning insect hemocytes. *Am. Zoologist*. Utica. 1962; 2: 209-246.

Jones JC. Pathways and pitfalls in the classification and study of insect hemocytes. In: Gupta AP. *Insect Hemocytes*. Cambridge: Cambridge University; 1979. p. 279-300.

Jung SH, Evans CJ, Uemura C, Banerjee U. The *Drosophila* lymph gland as a developmental model of hematopoiesis. *Development*. Cambridge. 2005; 132: 2521-2533.

Kaaya GP, Ratcliffe NA. Comparative study of hemocytes and associated cells of some medically important dipterans. *J. Morphol.* Philadelphia. 1982; 173: 351-365.

Kanost MR. Serine proteinase inhibitors in arthropod immunity. *Dev. Comp. Immunol.* Elmsford. 1999; 23: 291-301.

Karp RD. Inducible humoral immunity in insects: does an antibody-like response exist in invertebrates? *Res. Immunol. Paris*. 1990; 141: 923-926.

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. 1996; 26 (4): 355-364.

Keddie BA, Aponte GW, Volkman LE. The pathway of infection of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus in an insect host. *Science*. Washington. 1989; 243: 1728-1730.

Ko KK, Igarashi A, Fukai K. Electron microscopic observations on *Aedes albopictus* cells infected with dengue viruses. *Arch. Virol.* Wien. 1979; 62: 41-52.

Kramer LD, Hardy JL, Presser SB, Houk E. Dissemination barriers for western equine encephalomyelitis virus in *Culex tarsalis* infected after ingestion of low virus doses. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* Baltimore. 1981; 30 (1): 190-197.

Kyle JL, Harris E. Global spread and persistence of dengue. *Annu. Rev. Microbiol.* Palo Alto. 2008; 62: 71-92.

Lackie AM. Immune Mechanisms in Insects. *Parasitol. Today*. Cambridge. 1988; 4 (4):98-105.

Lai SC, Chen CC, Hou RF. Electron microscopic observations on wound-healing in larvae of the mosquito *Armigeres subalbatus* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol.* Honolulu. 2001; 38: 836–843.

Lanciotti RS, Calisher CH, Gubler DJ, Chang GJ, Vorndam AV. Rapid Detection and Typing of Dengue Viruses from Clinical Samples by Using Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction. *J Clin Microbiol.* Washington. 1992; 30 (3): 545-551.

Lanot R, Zachary D, Holder F, Meister M. Postembryonic hematopoiesis in *Drosophila*. *Dev. Biol.* Orlando. 2001; 230: 243–257.

Lavine MD, Strand MR. Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochem. Mol. Biol.* Orford. 2002; 32: 1295-1309.

Lehane MJ. Peritrophic matrix structure and function. *Ann. Rev. Entomol.* Palo Alto. 1997; 42: 525-550.

Lemaitre B, Kromer-Metzger E, Michaut L, Nicolas E, Meister M, Gerorgel P et al. A recessive mutation, immune deficiency (*imd*), defines two distinct control pathways in the *Drosophila* host defense. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* Washington. 1995; 92: 9465-9469.

Lindenbach BD, Thiel HJ, Rice CM. Flaviviridae: The viruses and their replication. In: Knipe, D. M.; Howley, P. M. *Fields Virology*. 5 ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 2007, p. 1101-1152.

Ling E, Shirai K, Kanekatsu R, Kiguchi K. Classification of larval circulating hemocytes of the silkworm, *Bombyx mori*, by acridine orange and propidium iodide staining. *Histochem Cell Biol.* Berlin. 2003; 120: 505–11.

Ling E, Shirai K, Kanekatsu R, Kiguchi K. Hemocytes differentiation in the hematopoietic organs of the silkworm, *Bombyx mori*: prohemocytes have the function of phagocytosis. *Cell Tissue Res.* Berlin. 2005; 320 (3): 535-534.

Ling E, Yu XQ. Hemocytes from the tobacco hornworm *Manduca sexta* have distinct functions in phagocytosis of foreign particles and self dead cells. *Dev. Comp. Immunol.* Elmsford. 2006; 30: 301–309.

Lowenberger C. Innate immune response of *Aedes aegypti*. Insect Biochem. Mol. Biol. Oxford. 2001; 31: 219-229.

Mackenzie JS, Gubler DJ, Petersen LR. Emerging flavivirus: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue viruses. Nat. Med. New York. 2004; 10: 98 – 109.

Mairuhu ATA, Wagenaar J, Brandjes DPM, Van-Gorp ECM. Dengue: an arthropodeborne disease of global importance. Eur. J. Clin. Microbiol Infect Dis. Berlin. 2004; 23: 425- 433.

Malavige GN, Fernando S, Fernando DJ, Seneviratne SL. Dengue viral infections. Postgrad. Med. J. Oxford. 2004; 80 (948): 588–601.

Marmaras VJ, Bournazos SN, Katsoris PG, Lambropoulou M. Defense mechanisms in insects: certain integumental proteins and tyrosinase are responsible for nonselfrecognition and immobilization of *Escherichia coli* in the cuticle of developing *Ceratitis capitata*. Arch. Insect Biochem. Physiol. New York. 1993; 23: 169-180.

Martins-Souza RL, Pereira CAJ, Martins Filho OA, Coelho PMZ, Corrêa Jr A, Negrão-Corrêa D. Differential lectin labelling of circulating hemocytes from *Biomphalaria glabrata* and *Biomphalaria tenagophila* resistant or susceptible to *Shistosoma mansoni* infection. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro. 2006: 101 Suppl. 1: 185-192.

Mcgreevy PB, Bryan JH, Oothuman P, Kolstrup N. The lethal effects of cibarial and pharyngeal armatures of mosquitoes on microfilariae. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. London. 1978; 4: 316-368.

Mckenzie ANJ, Preston TM. Functional studies on *Calliphora vomitoria* haemocyte subpopulations defined by lectin staining and density centrifugation. Dev. Comp. Immunol. Elmsford. 1992; 16: 19–30.

Meister M, Lagueux M. Drosophila blood cells. Cell Microbiol. Oxford. 2003; 5:573–80.

Mellman I. Endocytosis and molecular sorting. Ann. Rev. Cell Dev. Biol. Palo Alto. 1996; 12: 575-625.

Menezes H, Mosig JMA. O sistema imune dos insetos e o controle de algumas doenças parasitárias humanas. Interciência. Rio de Janeiro. 1999; 24 (3).

Meyer-Fernandes Jr, Lanz-Mendoza H, Gondim KC. Ectonucleotide diphosphohydrolase activities in hemocytes of larval *Manduca sexta*. Arch. Biochem. Biophys. New York. 2000; 328 (1): 152-159.

Miller N, Lehane MJ. Peritrophic membranes, cell surface molecules and parasite tropisms within arthropod vectors, Parasitol. Today. Cambridge. 1993; 9; 1-30.

Miller JS, Nguyen T, Stanley-Samuelson DW. Eicosanoids mediate insect nodulation responses to bacterial infections. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. Washington. 1994; 91: 12418–12422.

Mosquera JA, Hernandez JP, Valero N, Espina LM, Añez GJ. Ultrastructural studies on dengue virus type 2 infection of cultured human monocytes. Virol. J. London. 2005; 2: 26-39.

Mukhopadhyay S, Kuhn RJ, Rossmann MG. A structural perspective of the flavivirus life cycle. Nat. Rev. Microbiol. London. 2005; 3 (1): 13-22.

Nappi AJ, Christensen BM. Hemocyte cell surface changes in *Aedes aegypti* in response to microfilariae of *Dirofilaria immitis*. J. Parasitol. Lawrence. 1986; 74: 875-879.

Nappi, AJ, Stoloffolano JG Jr Distribution of haemocytes in larvae of *Musca autumnalis* and possible chemotaxis during parasitization. J. Insect Physiol. Oxford. 1972; 18: 169-179.

Nardi JB, Gao C, Kanost MR. The extracellular matrix protein lacunin is expressed by a subset of hemocytes involved in basal lamina morphogenesis. J. Insect Physiol. Oxford. 2001; 47: 997–1006.

Nene V, Wortman JR, Lawson D, Haas B, Kodira C, Tu ZJ *et al.* Genome sequence of *Aedes aegypti*, a major arbovirus vector. Science. Washington. 2007; 316: 1718–1723.

Nogueira RMR, Araújo JMG, Schatzmayr HG. Dengue viruses in Brazil, 1986–2006. Rev. Panam. Salud Publica. 2007; 22 (5): 358-363.

Ochiai M, Niki T, Ashida M. Immunocytochemical localization of beta-1,3-glucan recognition protein in the silkworm, *Bombyx mori*. Cell Tissue Res. Berlin. 1992; 268 (3): 731-7.

Orozco E, Guarneros G, Martinez-Palomo A, Sánchez T. *Entamoeba histolytica*: phagocytosis as a virulence factor. Exp. Parasitol. New York. 1983; 67: 85-95.



Paily KP, Abidha, Kumar BA, Balaraman K. Changes in the haemocyte population of the mosquito, *Culex quinquefasciatus*, following infection with the filarial parasite, *Wuchereria bancrofti*. Med. Vet. Entomol. Oxford. 2005; 19 (1): 116 – 118.

Parikh GR, Oliver JD, Bartholomay LC. A haemocyte tropism for an arbovirus. J. Gen. Virol. London. 2009; 90: 292-296.

Paskewitz SM, Christensen BM. Immune responses of vectors. In: Beaty BJ, Marquardt WC, editores. The biology of disease vectors. Colorado: University Press Colorado; 1996. p.371-392.

Paupy C, Delatte H, Bagny L, Corbel V, Fontenille D. *Aedes albopictus*, an arbovirus vector: from the darkness to the light. Microbes and Infect. Paris. 2009; 11(14-15): 1177-1185.

Pimenta PF, De Souza W. Fine structure and cytochemistry of the endoplasmic reticulum and its association with the plasma membrane of *Leishmania mexicana amazonensis*. J. Submicrosc. Cytol. 1985; 17 (3): 413-9.

Pimenta PF, Modi GB, Pereira ST, Shahabuddin M, Sacks DL. A novel role for the peritrophic matrix in protecting *Leishmania* from the hydrolytic activities of the sand fly midgut. Parasitology. London. 1997; 115: 359-369.

Pinto SB, Lombardo F, Koutsos AC, Waterhouse RM, McKay K, An C *et al.* Discovery of *Plasmodium* modulators by genome-wide analyses of circulating hemocytes in *Anopheles gambiae*. Proc Natl Acad Sci USA. Washington. 2009; 106 (50): 21270-21275.

Porto-Carreiro I, Attias M, Miranda K, De Souza W, Cunha-e-Silva N. *Trypanosoma cruzi* epimastigote endocytic pathway: cargo enters the cytostome and passes through an early endosomal network before storage in reservosomes. Eur. J. Cell Biol. Stuttgart. 2000; 79 (11): 858-869.

Rabinovitch M. Professional and non-professional phagocytes: an introduction. Trends Cell Biol. Cambridge. 1995; 5: 85–7.

Ramirez JL, Dimopoulos G. The Toll immune signaling pathway control conserved anti-dengue defenses across diverse *Ae. aegypti* strains and against multiple dengue virus serotypes. Dev. Comp. Immunol. Elmsford. 2010; 34: 625-629.

Ratcliffe NA, Price CD. Correlation of light and electron microscopic hemocytes structure in the Dictyoptera. *J. Morphol. Philadelphia*. 1974; 144: 485-498.

Ratcliffe NA, Gagen SJ. Study of the in vivo cellular reactions in insects: an ultrastructural analysis of nodule formation in *Galleria mellonella*. *Tissue Cell. Edinburgh*. 1977; 9: 73–85.

Ratcliffe NA, Rowley AF. Role of hemocytes in defence against biological agents. In: Gupta AP, editors. *Insect Hemocytes: Development, Forms, Functions and Techniques*. Cambridge: Cambridge University Press; 1979. 331– 414.

Ratcliffe NA, Rowley AF, Fitzgerald SW, Rhodes CP. Invertebrate immunity: basic concepts and recent advances. *Int. Rev. Cytol. New York*. 1985; 97: 183-350.

Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am. J. Hyg. Baltimore*. 1938; 27 (3): 493- 497.

Rey L. *Parasitologia*. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001.

Ribeiro C, Simoes N, Brehelin M. Insect immunity: the haemocytes of the armyworm *Mythimna unipuncta* (Lepidoptera:Noctuidae) and their role in defence reactions. *J. Insect Physiol. Oxford*. 1996; 42: 815–822.

Ribeiro C, Brehelin M. Insect haemocytes: what type of cell is what? *J. Insect Physiol. Oxford*. 2006; 52: 417–429.

Richards AG, Richards PA. The peritrophic membrane of insects. *Annu. Rev. Entomol. Palo Alto*. 1977; 22: 219-40.

Richards EH, Edwards JP. Parasitization of *Lacanobia oleracea* (Lepidoptera: Noctuidae) by the ectoparasitic wasp *Eulophus pennicornis*: effects of parasitization, venon and starvation on host haemocytes. *J. Insect Physiol. Oxford*. 1999; 45: 1073-1083.

Rico-Hesse R. Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and 2 in nature. *Virology. New York*. 1990; 174: 479-93.

Rico-Hesse R, Harrison LM, Salas RA, Tovar D, Nisalak A, Ramos C. Origins of dengue type 2 viruses associated with increased pathogenicity in the Americas. *Virology. New York*. 1997; 230: 244–251.

Rigau-Pérez JG, Clark GG, Gluber DJ, Sanders EJ, Vorndam VA. Dengue and dengue haemorrhagic fever. *Lancet*. London. 1998; (352): 971-977.

Rivers DB, Ruggiero L, Hayes M. The ectoparasitic wasp *Nosonia vitripennis* (Walker) (Hymenoptera: Pteromalidae) differentially affects cells mediating the immune response of its flesh fly host, *Sarcophaga bullata* Parker (Diptera: Sarcophagidae). *J. Insect Physiol.* Oxford. 2002; 48: 1053-1064.

Rizki TM. Alterations in the haemocyte population of *Drosophila melanogaster*. *J. Morphol.* 1957; 100: 437-458.

Rodrigues J, Brayner FA, Alves LC, Dixit R, Barillas-Mury C. Hemocyte Differentiation Mediates Innate Immune Memory in *Anopheles gambiae* Mosquitoes. *Science*. Washington. 2010; 329: 1353-1355.

Romoser WS. The science of entomology. New York: Macmillan Publishing; 1973. p.72-85.

Romoser WS, Wasieloski LP Jr, Pushko P, Kondig JP, Lerdthusnee K, Neira M *et al.* Evidence for arbovirus dissemination conduits from the mosquito (Diptera: Culicidae) midgut. *J Med Entomol.* Honolulu. 2004; 41: 467-475.

Rowley AF, Ratcliffe NA. Insects. In: \_\_\_\_\_. *Invertebrate blood cells*. New York: Academic; 1981. v. 2. p. 421-490.

Ruppert EE, Barnes RD. *Zoologia de Invertebrados*. 6. ed. São Paulo: Roca, 1996.

Russell RC. Vector borne-disease and their control. *Med. J. Aust.* Sydney.1993; 158 (10): 681-690.

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. 2001; 47: 167- 172.

Salazar MI, Richardson JH, Sánchez-Vargas I, Olson KE, Beaty BJ. Dengue virus type 2: replication and tropisms in orally infected *Aedes aegypti* mosquitoes. *BMC Microbiol.* London. 2007; 7 (9): 1-13.

Schatzmayr H. Dengue Situation in Brazil by Year 2000. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro. 2000; 95 suppl. 1: 179-181.

Schmid-Hempel P. Evolutionary ecology of insect immune defenses. Annu. Rev. Entomol. 2005; 50: 529-551.

Schmit AR, Ratcliffe NA. The encapsulation of foreign tissue implants in *Galleria mellonella* larvae. J Insect Physiol. London. 1977; 23 (2): 175-84.

Schoepp RJ, Beaty BJ. Tritation of dengue viruses by immunofluorescence in microtiter plates. J. Clin. Microbiol. 1984; 20 (5): 1017-1019.

Serufo SC, Oca HM, Tavares VA, Souza AM, Rosa RV, Jamal MC *et al.* Isolation of dengue virus type 1 from larvae of *Aedes albopictus* in Campos Altos city, state of Minas Gerais, Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro. 1993; 88 (3): 503-504.

Shahabuddin M, Toyoshima T, Aikawa M, Kaslow DC. Transmission-blocking activity of a chitinase inhibitor and activation of malarial parasite chitinase by mosquito protease. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. Washington, 1993; 90: 4266-4270.

Shapiro M. Techniques for total and differential hemocyte counts and blood volume, and mitotic index determinations. In: Gupta AP, editor. Insect hemocytes. Cambridge: Cambridge University Press; 1979. p. 539-548.

Sim S, Dimopoulos G. Dengue virus inhibits immune responses in *Aedes aegypti* cells. PLoS ONE. 2010;5 (5): e10678.

Silva C, Gary BD, Rau ME. Interaction of hemocytes and prophenoloxidase system of fifth instar nymphs of *Acheta domesticus* with bacteria. Dev. Comp. Immunol. Elmsford. 2000; 24: 367-379.

Silva CC. Aspectos do sistema imunológico dos insetos. Biotecnologia Cienc. Desenvolv. Brasília. 2002; 24: 68-72.

Silva JEB, Boleli IC, Simões ZLP. Hemocytes types and total differential counts in unparasitized and parasitized *Anastrepha obliqua* (Diptera, Tephritidae) larvae. Braz. J. Biol. São Paulo. 2002; 62: 689-699.

Silva IG. Metodologia de criação de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae), em condições laboratoriais. Rev. Goiana Med. Goiânia. 1994; 39: 23-26.

Silveira EB, Cordeiro BA, Ribeiro BM, Bão SN. Morphological characterization of *Anticarsia gemmatalis* M nucleopolyhedrovirus infection in haemocytes from natural larval host, the velvetbean caterpillar *Anticarsia gemmatalis* (Hubner) (Lepidoptera: noctuidae). Tissue Cell. Edinburgh. 2004; 36: 171-180.

Simmons JS. Dengue Fever. Am. J. Trop. Med. Baltimore. 1931; s1-11 (2): 77-102.

Soares, MJ, De Souza W. Endocytosis of gold-labeled proteins and LDL by *Trypanosoma cruzi*. Parasitol Res. Berlin. 1991; 77: 461-469.

Souza-Neto JA, Sim S, Dimopoulos G. An evolutionary conserved function of the JAK-STAT pathway in anti-dengue defense. Proc Natl Acad Sci USA. Washington. 2009; 106 (42): 17841-17846.

Sriurairatna S, Bhamarapavati N. Replication of dengue-2 virus in *Aedes albopictus* mosquitoes. Am. J. Trop. Med. Hyg. Baltimore. 1977; 26 (6): 1199-1205.

Strand MR, Pech LL. Immunological basis for compatibility in parasitoid-host relationships. Annu. Rev. Entomol. Palo Alto. 1995; 40: 31-56.

Strand MR, Beck MH, Lavine MD, Clark KD. *Microplitis demolitor bracovirus* inhibits phagocytosis by hemocytes from *Pseudoplusia includens*. Arch. Insect Biochem. Physiol. 2006; 61: 134-145.

Strand MR. The insect cellular immune response. Insect Science. 2008; 15: 1-14.

Stuart LM, Ezekowitz RAB. Phagocytosis: elegant complexity. Immunity. Cambridge. 2005; 22: 539-550.

Styer LM, Kent KA, Albright RG, Bennett CJ, Kramer LD, Bernard KA. Mosquitoes inoculate high doses of West Nile virus as they probe and feed on live hosts. PloS pathog. San Francisco. 2007; 3 (9).

Tan SY, Sung H. "Carlos Juan Finlay (1833-1915): of mosquitoes and yellow fever". Singap. Med. J. Singapore. 2008; 49 (5): 370-1.

Tauil PL. Urbanização e ecologia do dengue. Cad. Saúde Pública. Rio de Janeiro. 2001; 17 (Supl): 99-102.

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

Teixeira MG, Barreto ML, Guerra Z. Epidemiologia e medidas de prevenção do dengue. Inf. Epidemiol. Sus. Brasília. 1999; 8: 5-33.

Tojo S, Naganuma F, Arakawa K, Yokoo S. Involvement of both granular cells and plasmatocytes in phagocytic reactions in the greater wax moth, *Galleria mellonella*. J. Insect Physiol. Oxford. 2000; 46: 1129–1135.

Torres, EM. Dengue. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2005. 344 p. illus.; tab.; Graf.

Trudeau D, Washburn JO, Volkman LE. Central Role of Hemocytes in *Autographa californica* M Nucleopolyhedrovirus Pathogenesis in *Heliothis virescens* and *Helicoverpa zea*. J Virol. Baltimore. 2001; 75 (2): 996-1003.

Vanetti F. Sistema Circulatório. In: \_\_\_\_\_. Entomologia Geral. Viçosa: Coopasul; 1978. p.212-225.

Vass E, Nappi AJ. Fruit fly immunity. BioEssays. Cambridge. 2001; 51: 529-535.

Washburn JO, Kirkpatrick BA, Volkman LE. Insect protection against viruses. Nature. London. 1996; 383:767.

Wasserthal LT. Antagonism between haemolymph transport and tracheal ventilation in an insect wing (*Attacus atlas* L.) J. Comp. Physiol. Berlin. 1982; 147: 27-40.

Wheeler MB, Stuart GS, Hapner KD. Agglutinin mediated opsonization of fungal blastospores in *Melanoplus differentialis* (Insecta). J. Insect Physiol. Oxford. 1993; 39 (6): 477-483.

Wiesner A, Gotz P. Silica beads induce cellular and humoral immune responses in *Galleria mellonella* larvae and in isolated plasmatocytes, obtained by a newly adapted nylon wool separation method. J. Insect Physiol. Oxford. 1993; 39: 865–876.

Winchester BG. Lysosomal membrane proteins. Eur. J. Paediatr. Neurol. London. 2001; 5: 11-19.

Willott E, Trenczek T, Thrower LW, Kanost MR. Immunochemical identification of insect populations monoclonal antibodies distinguish four major hemocyte types in *Manduca sexta*. Eur. J. Cell Biol. Stuttgart. 1994; 65: 417-423.

Willott E, Lowenberger C, Christensen BM, Kanost MR. 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. 1995; 19 (6): 451-461.

Wilson R, Chen C, Ratcliffe NA. 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. 1999; 162:1590-1596.

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

Xi Z, Ramirez JL, Dimopoulos G. The *Aedes aegypti* toll pathway controls dengue virus infection. PLoS Pathog. San Francisco. 2008; 4 (7): e1000098.

Zachary D, Hoffmann JA. The haemocytes of *Calliphora erythrocephala* (Diptera). Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat. 1973; 141: 55-57.

Zambon RA, Nandakumar M, Vakharia VN, Wu LP. The Toll pathway is important for an antiviral response in *Drosophila*. Proc Natl Acad Sci USA. Washington. 2005; 102 (20): 7257-7262.

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. Boil. New York. 2004; 63: 91–143.