

Fundação Oswaldo Cruz
Instituto René Rachou
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde
Área de Concentração em Biologia Celular e Molecular

Tese de Doutorado

**O corpo gorduroso de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera; Nematocera)
(Linnaeus, 1762): Estudo morfológico do órgão em diferentes idades e condições
alimentares, isolamento, cultivo primário e transcriptoma dos enócitos**

Gustavo Ferreira Martins

Belo Horizonte
Março/2008

Fundação Oswaldo Cruz
Instituto René Rachou
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde
Área de Concentração em Biologia Celular e Molecular

Tese de Doutorado

**O corpo gorduroso de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera; Nematocera)
(Linnaeus, 1762): Estudo morfológico do órgão em diferentes idades e condições
alimentares, isolamento, cultivo primário e transcriptoma dos enócitos**

Gustavo Ferreira Martins

**Tese apresentada com vistas à obtenção do
Título de Doutor em Ciências na área de
concentração em Biologia Celular e Molecular.
Orientação: Dr. Paulo F.P. Pimenta**

Belo Horizonte
Março/2008



Ministério da Saúde

FIOCRUZ


Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisa René Rachou

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

Ata da décima terceira defesa de tese de doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, do aluno Gustavo Ferreira Martins, sob a orientação do Dr. Paulo Filemon Paolucci Pimenta.

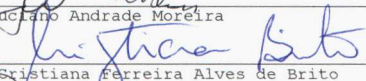
Aos vinte e oito dias do mês de março do ano de dois mil e oito, às quatorze horas, realizou-se no auditório do Centro de Pesquisa René Rachou, o exame da décima terceira tese de Doutorado, do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisa René Rachou/FIOCRUZ, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Ciências - área de concentração Biologia Celular e Molecular. A tese do aluno Gustavo Ferreira Martins intitula-se "O corpo gorduroso de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera;Nematocera) (Linnaeus, 1762): estudo morfológico do órgão em diferentes idades e condições alimentares, isolamento, cultivo primário e transcriptoma dos enócitos". A banca examinadora foi constituída pelos professores: Dr. Paulo Filemon Paolucci Pimenta - CPqRR/Fiocruz, (orientador e presidente da banca), Dr. Luciano Andrade Moreira - CPqRR/Fiocruz (membro titular), Dra. Cristiana Ferreira Alves de Brito - CPqRR/Fiocruz (membro titular), Dr. Pedro Lagerblad de Oliveira - UFRJ (membro titular), Dr. José Eduardo Serrão - UFV (membro titular) e Dr. Marcos Horácio Pereira - UFMG (suplente). Após arguir o aluno e considerar se o mesmo demonstrou capacidade no trato do tema escolhido e sistematização na apresentação dos dados, a Banca Examinadora assim se pronunciou: De acordo com o regulamento do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, o aluno foi considerado APROVADO. Uma vez encerrado o exame, eu, Paulo Filemon Paolucci Pimenta, presidente da Banca, assino a presente ata juntamente com os membros da Banca Examinadora. Belo Horizonte, vinte e oito de março de dois mil e oito.




Dr. Paulo Filemon Paolucci Pimenta



Dr. Luciano Andrade Moreira



Dra. Cristiana Ferreira Alves de Brito



Dr. Pedro Lagerblad de Oliveira



Dr. José Eduardo Serrão

Av. Augusto de Lima, 1715 Barro Preto Belo Horizonte MG Brasil Cep: 30190-002

Tel.: 55 0xx31 3295 3566 Fax: 55 0xx31 3295 3115 <http://www.cpqrr.fiocruz.br/ensino>

Agradecimentos

Por detrás desse trabalho há alegria, tristeza, força, paixão e prazer que tornaram esses quatro anos intensos. Durante a sua realização deixei algumas idéias advindas dos meus pensamentos, mas também histórias e sentimentos compartilhados pelos que aqui serão citados. Obrigado a todos pelos subsídios teóricos, práticos, afetuosos e financeiros. Finalmente, me perdoem aqueles que eu não tenha citado.

Agradeço...

... ao meu orientador Dr. Paulo Pimenta pelas oportunidades, confiança, amizade, conselhos e por ter acreditado no meu trabalho desde o início.

... ao Dr. Marcelo Ortigão pela oportunidade, ajuda nos experimentos de biologia molecular e pelo apoio pessoal durante a estadia nos Estados Unidos.

... ao Dr. José Eduardo Serrão, ex-orientador, amigo de sempre, pela ajuda nas análises de MET e ao Núcleo de Microscopia da UFV por terem permitido as análises.

... à Dra. Mary Ann McDowell da Universidade de Notre Dame pela oportunidade de trabalhar com sua equipe.

... ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do IRR, em especial à Secretaria Acadêmica e à Coordenação do curso pelo empenho em melhorá-lo.

... a todos do Laboratório de Entomologia Médica do IRR, pela amizade e momentos de descontração.

... à Dra. Luciana Maria Silva, à Márcia e à Dra. Consuelo L Fortes Dias do Laboratório de Biologia Celular e Cultura de Células da Funed pela ajuda nos experimentos com cultivo celular e pela oportunidade.

... aos amigos da Universidade de Notre Dame, a maioria do Departamento de Biologia, especialmente Sinji, Luciana, Deepak e Vinita, e à Noreen pelas valiosas aulas de inglês.

... aos amigos de república, Rodrigo e Iliano, pelo companheirismo e amizade.

... ao meu amor, Adriana, pelo apoio incondicional em todas as etapas dessa caminhada, por todo amor, paciência e carinho.

... aos meus familiares, minha mãe Alzira e meu irmão Henrique e principalmente amigos, primas e tias de BH que me apoiaram nestes anos, especialmente Beatriz, as tias Mariana e Olga e as primas Anna Maria e Mirtes por terem me acolhido.

Agradecimentos especiais

Ao IRR pela bolsa de Doutorado durante o primeiro ano, à CAPES pela bolsa no segundo ano e pela bolsa de Doutorado Sanduíche (PDDE), e ao CNPq pela bolsa nos últimos meses.

À Fiocruz, ao IRR, CAPES, CNPq (Pronex), Fapemig e Universidade de Notre Dame pelo suporte financeiro do meu trabalho.

Sumário

Lista de figuras	8
Lista de tabelas	10
Lista de abreviaturas e símbolos	11
Resumo.....	12
Abstract.....	13
1. Introdução e Revisão Bibliográfica	14
1.1. O <i>Aedes aegypti</i>	14
1.2. O corpo gorduroso dos insetos.....	14
1.3. Tipos celulares do corpo gorduroso	15
1.4. Modificações no corpo gorduroso dos insetos durante o período pós-embrionário	17
1.5. O corpo gorduroso do <i>A. aegypti</i> e seu desenvolvimento ao longo da vida adulta	19
1.6. Os enócitos	22
1.7. O corpo gorduroso e a resposta imune	25
1.8. O cultivo primário do corpo gorduroso.....	27
1.9. O transcriptoma do corpo gorduroso.....	30
2. Objetivos	35
3. Métodos	36
3.1. Mosquitos	36
3.2. Morfologia	36
3.2.1. Dissecção do corpo gorduroso de fêmeas adultas de <i>A. aegypti</i>	36
3.2.2. Histologia	37
3.2.3. Histoquímica.....	37
3.2.4. Microscopia eletrônica de varredura.....	38
3.2.5. Microscopia eletrônica de transmissão	38
3.2.6. Morfometria e análise estatística	38
3.3. Cultivo primário.....	39
3.3.1. Obtenção dos enócitos.....	39
3.3.2. Viabilidade celular	40
3.3.3. Microscopia laser confocal - Marcação do citoesqueleto	40
3.3.4. Microscopia eletrônica de varredura.....	40
3.3.5. Microscopia eletrônica de transmissão	41
3.4. Transcriptoma	41
3.4.1. Obtenção dos enócitos e extração de RNA	41

3.4.2. Obtenção da biblioteca de cDNA	41
3.4.3. Sequenciamento e análise da biblioteca de cDNA	43
4. Resultados	45
4.1. Estudo comparativo do corpo gorduroso de fêmeas de <i>A. aegypti</i> de diferentes idades e em distintas condições alimentares.....	45
4.1.1. Microscopia eletrônica de varredura.....	45
4.1.2. Histologia e histoquímica	54
4.1.3. Microscopia eletrônica de transmissão	60
4.1.4. Morfometria	65
4.2. O cultivo primário dos enócitos.....	65
4.6. Transcriptoma	71
5. Discussão	75
5.1. Estudo comparativo do corpo gorduroso de fêmeas de <i>A. aegypti</i> com diferentes idades e condições alimentares.....	75
5.1.1. Microscopia Eletrônica de Varredura	75
5.1.2. Histologia convencional e histoquímica.....	76
5.1.3. Microscopia eletrônica de transmissão	78
5.1.4. Morfometria.....	79
5.5. O cultivo primário dos enócitos.....	80
5.6. Transcriptoma	83
5.6.1. Genes de desintoxicação	83
5.6.3. Metabolismo de lipídios	85
5.6.4. Imunidade inata.....	86
6. Considerações finais.....	89
7. Anexo 1: Tabela 3: Transcritos encontrados nos enócitos de <i>A. aegypti</i>.....	91
8. Anexo 2: Artigos aceitos/submetidos para publicação	105
9. Referências bibliográficas.....	106

Lista de figuras

Introdução e revisão bibliográfica

Figura1: Ilustração representando a distribuição do corpo gorduroso de *A. aegypti*.

Métodos

Fig. 2: Gel dos produtos da amplificação do cDNA proveniente das placas de lise da biblioteca de cDNA obtida dos enócitos de *A. aegypti*.

Resultados

Fig. 3. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) do corpo gorduroso de fêmeas de *A. aegypti* recém-emergidas.

Fig. 4. MEV do corpo gorduroso de fêmeas de *A. aegypti* alimentadas com açúcar.

Fig. 5. MEV do corpo gorduroso de fêmeas de *A. aegypti* 18 horas após a alimentação sangüínea.

Fig. 6. MEV do corpo gorduroso de fêmeas de *A. aegypti* quatro dias após a alimentação sangüínea.

Figs. 7-8: Histologia convencional e histoquímica do corpo gorduroso de fêmeas de *A. aegypti*.

Figs 7a-c. Secções histológicas longitudinais do abdome de fêmeas recém-emergidas.

Fig. 7d. Corpo gorduroso de fêmeas de recém-emergidas corado pela reação de Feulgen e contracorado com verde rápido.

Fig. 7e. Corpo gorduroso de fêmeas de recém-emergidas corado pelo teste do PAS.

Fig. 8a. Corpo gorduroso de fêmeas de recém-emergidas corado pelo azul de bromofenol.

Fig. 8b. Corpo gorduroso de fêmeas após a alimentação sangüínea corado pelo azul de bromofenol.

Fig. 8c. Corpo gorduroso de fêmeas de recém-emergidas impregnado por ósmio.

Fig. 8d. Corpo gorduroso de fêmeas após a alimentação sangüínea impregnado por ósmio.

Figs. 9-10: Microscopia eletrônica de transmissão (MET) do corpo gorduroso de corpo gorduroso de fêmeas de *A. aegypti*.

Figs. 9a-c. Trofócitos de fêmeas de recém-emergidas.

Fig. 9d. Detalhe dos enócitos de fêmeas de recém-emergidas.

Fig. 9e. Trofócitos e enócitos de fêmeas de recém-emergidas.

Fig. 9f-10b. Detalhes dos trofócitos de fêmeas alimentadas com açúcar.

Figs. 10c-d. Detalhe dos trofócitos de fêmeas após a alimentação sangüínea.

Figs. 10e-f. Detalhes dos enócitos de fêmeas após a alimentação sangüínea.

Figs. 11-12e: Enócitos pupais de *A. aegypti* em cultivo primário por dois dias.

Figs. 11a-c. MEV.

Figs. 12a-b. Microscopia laser confocal.

Fig. 12c. Secção semi-fina.

Figs. 12d-e. MET.

Figs. 13a-b. Enócitos pupais de *A. aegypti* em cultivo primário por 57 dias.

Fig. 13a. Microscopia de contraste de fase.

Fig. 13b. Coloração por Giemsa.

Fig 14. Distribuição dos transcritos dos enócitos de *A. aegypti*.

Lista de tabelas

Resultados

Tabela 1: Diâmetro nuclear das células do corpo gorduroso de diferentes fêmeas de *A. aegypti* com diferentes idades e tipos de alimentação.

Tab. 2: Relação dos transcritos que codificam para proteínas envolvidas com desintoxicação, síntese de lipídios e imunidade nos enócitos pupais de *A. aegypti*.

Anexo 1:

Tab. 3: Relação de todos os transcritos similares aos encontrados nos enócitos pupais de *A. aegypti*.

Lista de abreviaturas e símbolos

BLASTn – Basic Local Alignment Search Tool – nucleotide
cDNA – complementary Deoxyribonucleic Acid (DNA complementar)
d – dia(s)
dbEST – EST database
CPR – NADPH citocromo P450 redutase
DNA – Deoxyribonucleic Acid (Ácido Desoxiribonucléico)
E – Valor de E/ E- value (Expected value)
EST(s) – Expressed Sequence Tag(s) – etiqueta(s) de sequência de expressão
FITC – Isotiocianato de Fluoresceína (Fluorescein Isothiocyanate)
GO – Gene Ontology
h – hora(s)
M – molar
MEV/MET – Microscopia/Microscópio Eletrônico de Varredura/Transmissão
MLC – Microscopia/Microscópio Laser Confocal
 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ – micrograma(s) /microlitro(s)
min – minuto(s)
mL – mililitro(s)
MLC – microscópio laser confocal
 μm – micrômetro(s)
NCBI – National Center for Biotechnology Information
P450 – citocromo P450
PAS – Periodic Acid Schiff
PBS – Phosphate Buffer Saline (tampão fosfato)
PCR – Polymerase Chain Reaction (reação em cadeia da polimerase)
pH – potencial hidrogeniônico
REL – Retículo Endoplasmático Liso
RER – Retículo Endoplasmático Rugoso
RNAm(s) – Ácido Ribonucléico mensageiro(s)

Resumo

O corpo gorduroso é o principal órgão do metabolismo intermediário dos insetos e a principal fonte de componentes da hemolinfa. Dois tipos celulares estão presentes no corpo gorduroso dos dípteros: os trofócitos e os enócitos. O presente trabalho teve como objetivos testar as seguintes hipóteses: (a) o corpo gorduroso de *A. aegypti* é capaz de se reorganizar do ponto de vista ultra-estrutural, histoquímico e morfométrico de acordo com a idade e com o tipo de alimentação; (b) os enócitos de *A. aegypti* podem ser cultivados e (c) os mesmos expressam transcritos relacionados com os processos de desintoxicação, síntese de lipídios e imunidade inata. Para tanto, foram utilizadas fêmeas recém-emergidas, fêmeas com 18d de idade, sendo um grupo 18h e outro quatro dias após a alimentação sangüínea e fêmeas com 18d alimentadas com açúcar. Nas fêmeas alimentadas com açúcar, o corpo gorduroso está mais desenvolvido do que nas pós-emergidas e nas alimentadas com sangue. Nessas mesmas fêmeas, os trofócitos apresentam o citoplasma preenchido basicamente por gotículas de lipídio devido à lipogênese. Após a alimentação sangüínea, os lóbulos do corpo gorduroso estão achatados, o que pode ser explicado pelo esvaziamento do órgão que exporta nutrientes para os ovários. As alterações dos trofócitos após a alimentação sangüínea incluem o aumento do diâmetro nuclear, a diminuição das gotículas de lipídios, o alargamento das mitocôndrias e a presença de lisossomos nos trofócitos. Os enócitos puderam ser mantidos viáveis por 57 dias em cultivo primário e o citoplasma dessas células é quase todo preenchido pelo retículo endoplasmático liso (REL). Os transcritos mais abundantes encontrados nos enócitos correspondem à citocromo P450, responsável pela desintoxicação e às outras proteínas relacionadas com o metabolismo de lipídios. Também são encontrados transcritos relacionados com o reconhecimento e de destruição de patógenos. Provavelmente, a presença do REL e a localização periférica dos enócitos no corpo gorduroso de *A. aegypti* facilita o processo de desintoxicação, a produção e a secreção de lipídios para a hemolinfa, além do reconhecimento de patógenos e da secreção de componentes antimicrobianos. A presença do REL desenvolvido e a expressão de várias enzimas comprometidas com a desintoxicação e o metabolismo de lipídios sugerem que os enócitos participam da homeostasia e síntese lipídica em *A. aegypti*. Além disso, nossos resultados confirmam o corpo gorduroso de *A. aegypti* como um órgão capaz de reorganizar sua microanatomia, componentes citoplasmáticos e aspectos subcelulares de acordo com a idade e o tipo de dieta. Também é possível cultivar os enócitos e sua purificação, cultivo primário e transcriptoma constituem importantes ferramentas para que futuros estudos possam investigar a atuação dessas células na fisiologia e na imunidade inata de mosquitos.

Abstract

The fat body is the insect's intermediary metabolism organ and the main source of hemolymph components. Two types of cells are found in the dipterans fat body: the trophocytes and the oenocytes. In the present work we tested the following hypotheses: (a) the *A. aegypti* fat body changes its ultrastructure, histochemistry and morphometry according age and diet; (b) the *A. aegypti* oenocytes can be cultivated and (c) them express detoxification, lipid processing and innate immunity transcripts. The fat body is formed by lobes located beneath the integument. In 18-day-old sugar-fed females, the fat body lobes are more developed than in newly-emerged and in blood-fed counterparts. In the same females, the trophocytes cytoplasm is filled with lipid droplets, because of lipogenesis. Four days after blood meal, the fat body has flattened lobes in comparison to the other female groups. The fat body changes after a blood meal may be important for midgut extension in order to maximize blood storage and ovary enlargement. Also, the depletion of fat body content during vitellogenesis could be responsible for the fat body flattening. The trophocyte remodeling after blood meal includes the increasing of nuclear diameter, lipid droplets reduction, mitochondria enlargement and lisosomes appearance. This last characteristic can be associated with the organelle turn over at the gonotrophic cycle end. Oenocytes are found as cell clusters in the pupae fat body and they could be maintained viable for 57 days under primary culture. Their cytoplasm is essentially filled with the smooth endoplasmic reticulum (SER). The most abundant oenocyte transcripts encode cytochrome P450 enzyme (P450) followed by other lipid metabolism enzymes as elongase and fatty acid synthase. The P450 is responsible for detoxification and for sterol metabolism. Other attributed functions to the oenocytes are the pathogen recognition and destruction throughout the production of signaling proteins and lysozymes. It can be inferred that the presence of SER and the oenocytes periphery location enhance detoxification, production, secretion and uptake of lipid from hemolymph. Also it can enhance the pathogen recognition and antimicrobial peptides secretion. The present work confirms that the cell remodeling is involved in the fat body functional changes and depends on mosquito diet and age. In addition, the oenocytes can be cultivated and their purification and primary culture represent an important step for studying the oenocytes in the mosquito. Also, the morphology and the transcriptional profile reveal that the oenocytes play role as detoxifying and lipid metabolism, providing an important data for understanding the oenocytes role in the *A. aegypti* homeostasis and in the innate immunity.

1. Introdução e Revisão Bibliográfica

1.1. O *Aedes aegypti*

O *A. aegypti* é uma espécie de mosquito incluído na Ordem Diptera, Subordem Nematocera, Família Culicidae e Subfamília Culicinae. A Subfamília Culicinae compreende dez tribos que reúnem 34 gêneros com mais de 3500 espécies pelo mundo (Consoli & Oliveira 1994, Foratini 2002).

Dentro da entomologia médica, os mosquitos são os que mais têm atraído a atenção da saúde pública. Isso se deve provavelmente ao fato desta família abrigar insetos envolvidos na transmissão de múltiplos patógenos ao homem e aos animais domésticos (Foratini 2002).

As fêmeas dos mosquitos, além de provocarem grande desconforto aos hospedeiros pela picada, transmitem ao homem e aos animais domésticos diversos agentes das helmintoses, protozooses e arboviroses. Há inúmeras espécies de mosquitos que desempenham importante papel como vetores de parasitos de malária, de filarioses e arboviroses (como por exemplo, o vírus dengue e o vírus da febre amarela) que acometem o homem em vastas áreas do mundo, sendo imensuráveis os danos causados ao homem pela veiculação desses parasitos (Lozovei 2001).

Dentro dos Culicinae, o *A. aegypti* é a espécie mais bem caracterizada por diferentes motivos. Um deles é o fato dessa espécie se adaptar facilmente às condições de laboratório, se tornando o principal modelo experimental utilizado nos estudos de biologia, genética, ecologia e competência vetorial de mosquitos. Por outro lado, a associação próxima dessa espécie com humanos faz dela a principal transmissora dos vírus da dengue e da febre amarela no mundo, o que pode justificar os esforços para se estudar essa espécie (OMS 2002).

1.2. O corpo gorduroso dos insetos

Os espaços existentes entre os órgãos na cavidade celomática dos insetos, bem como de outros grupos de artrópodes, são preenchidos por uma massa celular denominada corpo gorduroso. Este é o principal órgão do metabolismo intermediário dos insetos, sendo responsável pela síntese e pelo fornecimento da maioria dos componentes da hemolinfa, além de ser o principal local de armazenamento de reservas, como lipídios, carboidratos e proteínas, que são mobilizados durante a metamorfose, o vôo e a reprodução. O corpo gorduroso é um órgão amorfo, formado por um conjunto de células que constituem camadas e/ou lóbulos. Essas estruturas estão suspensas na hemocele pela lâmina basal, músculos e traquéias, e estão

em contato direto com a hemolinfa, o que facilita o intercâmbio de substâncias com os demais órgãos (Cruz-Landim 1975, Dean et al. 1985, Chapman 1998).

Geralmente, o corpo gorduroso dos insetos holometábolos é subdividido em parietal ou periférico e perivisceral. A porção parietal é formada por uma massa celular localizada imediatamente abaixo da epiderme. Já a porção perivisceral é formada por uma massa celular que se dispõe em torno dos sistemas digestivo e reprodutor (Cruz-Landim 1975, Dean et al. 1985, Haunerland & Shirk 1995).

Na maioria dos insetos holometábolos, como por exemplo, *Heliothis zea* (Lepidoptera) e *Apis mellifera* (Hymenoptera), o corpo gorduroso perivisceral e parietal são freqüentemente separados por tecido muscular. Essas duas porções são facilmente reconhecidas na fase larval e durante os primeiros dias da fase pupal. Porém, durante a metamorfose, a porção perivisceral do corpo gorduroso rapidamente se desenvolve e se torna a porção predominante na pupa e no adulto de *H. zea*. Entretanto, enquanto a porção perivisceral se desenvolve, a parietal se degenera (Cruz-Landim 1975, Haunerland et al. 1990, Wang & Haunerland 1992).

As porções periféricas e viscerais do corpo gorduroso também são distintas quanto às características funcionais nas larvas de *H. zea*. Supõe-se que a porção periférica seja predominantemente biossintética, devido à abundância de retículo endoplasmático rugoso (RER) em suas células. Já a porção perivisceral armazenaria nutrientes para serem utilizados durante o desenvolvimento pós-embriônico. Somente os corpos gordurosos periféricos larvais e pré-pupais de *H. zea* são capazes de sintetizar proteínas marcadas quando incubados com metionina radioativa *in vivo*. Estes resultados indicam que as duas porções distinguíveis do corpo gorduroso dessa espécie, funcionam como diferentes órgãos: a porção periférica é responsável pela atividade biossintética, enquanto a porção perivisceral é especializada em armazenamento (Haunerland et al. 1990, Wang & Haunerland 1992).

Klowden et al. (1987) ao implantarem o corpo gorduroso de fêmeas de *A. aegypti* alimentadas com sangue em fêmeas não alimentadas, mostraram que após o transplante o comportamento pela procura por hospedeiros é inibido, diminuindo o apetite por sangue das fêmeas. Esses dados mostram que o corpo gorduroso também pode atuar como órgão endócrino, influenciando o comportamento dos insetos, provavelmente através da secreção de fatores que ainda não foram identificados.

1.3. Tipos celulares do corpo gorduroso

Diferentes tipos celulares podem ocorrer no corpo gorduroso. Os mais comuns são os trofócitos, que podem ser denominados adipócitos ou células do corpo gorduroso

propriamente ditas. Os trofócitos são células globulares que geralmente apresentam um núcleo arredondado e um citoplasma rico em vacúolos, mitocôndrias e organelas comprometidas com a síntese protéica, como o RER e o complexo de Golgi. No citoplasma dos trofócitos existe uma abundância de componentes citoplasmáticos de caráter lipídico e protéico e grânulos de glicogênio. Essa última característica faz dos trofócitos o principal reservatório de nutrientes contido no corpo gorduroso (Cruz-Landim 1975, Dean et al. 1985, Grzelak & Kumaran 1986, Wang & Haunerland 1991, 1992, Marques-Silva et al. 2003).

Geralmente o conteúdo protéico dos trofócitos está contido em grânulos no citoplasma. Existem dois tipos de grânulos protéicos nos trofócitos das larvas de *Calpodes ethlius* (Lepidoptera). Um deles é composto somente por proteínas e o outro por proteínas e RNA. Esses grânulos são repletos de proteínas ricas em resíduos de tirosina, sendo esse aminoácido o principal componente das reservas protéicas dos insetos. A formação dos grânulos protéicos ocorre poucas horas antes da pupação e que eles resultam da fusão de microvesículas advindas do complexo de Golgi (Locke & Collins 1965).

O conteúdo das gotículas de lipídios dos trofócitos também varia. Por exemplo, em larvas de *Pachycondyla villosa* (Formicidae; Hymenoptera) ocorrem os ácidos graxos de cadeias insaturadas, como ácido oléico e linoléico, e os ácidos graxos saturados como o ácido palmítico e esteárico (Zara et al. 2003).

Além dos trofócitos, podem ser encontrados outros tipos celulares no corpo gorduroso como, por exemplo, os micetócitos, os urócitos e os enócitos. Dependendo da espécie de insetos, também existem células especializadas na produção de bioluminescência, como nos vaga-lumes, e de hemoglobina nos Chironomidae (Dean et al. 1985, Chapman 1998).

Os micetócitos ou bacteriócitos estão presentes no corpo gorduroso de insetos das ordens Isoptera, Blattaria, Hemiptera, Homoptera e Anoplura. Sabe-se que estas células abrigam bactérias simbiotes, produtoras de vitamina B e aminoácidos essenciais. Durante o processo reprodutivo essas bactérias migram para os ovários e colonizam o citoplasma dos ovócitos. Dependendo da espécie, os bacteriócitos estão separados uns dos outros, como nos Blattaria, ou agrupados, como nos Anoplura e Hemiptera. Quando estão agrupados, eles formam um órgão chamado de micetoma, como é o caso de *Pediculus humanus* (Anoplura), ou bacterioma, como é o caso dos Aphidae. Foi determinado que em um bacterioma possam conter aproximadamente 10^7 simbiotes (Eberle & McLean 1982, Philippe 1982, Fukatsu & Ishikawa 1992, Braendle et al. 2003, Wilkinson et al. 2003).

Os urócitos ou células de urato são considerados células em processo de degeneração. Eles atuam como auxiliares do sistema excretor, contribuindo com a diminuição dos níveis de ácido úrico da hemolinfa, armazenando estas excretas e os seus derivados sob a forma de

cristais (Haunerland & Shirk 1995, Šobotník et al. 2006). Nas abelhas as células de urato são facilmente discerníveis das demais células do corpo gorduroso, mesmo ao simples exame com estereoscópio, por apresentarem cor branca. Essa cor é devido aos depósitos de uratos no citoplasma dessas células. Urócitos possuem um núcleo de formato irregular e picnótico e um vasto citoplasma com granulações que não se coram por hematoxilina e eosina (Cruz-Landim 1984). Em *Prorhinotermes simplex* (Isoptera: Rhinotermitidae) os urócitos são menores que os trofócitos e possuem o citoplasma pobre em organelas e glicogênio. Apesar da escassez de organelas, o citoplasma é rico em grânulos esféricos que correspondem aos depósitos de ácido úrico ou sais de urato (Šobotník et al. 2006).

Os enócitos são células de origem ectodérmica, derivadas de células da epiderme durante a embriogênese. Essa pode ser considerada a principal diferença em relação às demais células do corpo gorduroso, que são de origem mesodérmica. Mesmo com a sua origem distinta, os enócitos são considerados na maioria dos trabalhos, como sendo células pertencentes ao corpo gorduroso. Isso porque eles formam juntamente com as demais a massa celular que o compõe (Stoppie et al. 1981, Johnson & Batterworth 1985, Dean et al. 1985, Paes de Oliveira 2002, Zara & Caetano 2004, Roma et al. 2005, Rollo & Camargo-Mathias 2006, Roma et al. 2006, Ruvolo & Cruz-Landim 1993). Os enócitos serão discutidos mais detalhadamente no item 1.5 dessa revisão.

1.4. Modificações no corpo gorduroso dos insetos durante o período pós-embriônico

Alguns estudos mostram que as células do corpo gorduroso dos insetos não se multiplicam após a eclosão, supostamente pelo fato delas serem altamente especializadas. Por exemplo, em *A. mellifera* (Hymenoptera) foi mostrado que não ocorre proliferação das células do corpo gorduroso no período compreendido entre o segundo e o quarto instar larval. Apesar de não se dividirem, a dimensão das células mais do que dobra. Esta hipertrofia sofrida pelo órgão, deve-se principalmente ao acúmulo de material de reserva no interior dos trofócitos. Esse aumento de reservas durante a fase larval, sugere que o corpo gorduroso é um tecido importante durante a metamorfose. Neste sentido, as reservas se acumulam no corpo gorduroso das larvas para posteriormente serem disponibilizadas para a pupa. Passada a metamorfose de *A. mellifera*, o corpo gorduroso do adulto é menos desenvolvido em comparação com o da larva, e, somente a porção parietal está bem representada e mais desenvolvida na região abdominal do dorso (Cruz-Landim 1975).

A configuração do corpo gorduroso é dinâmica e varia de acordo com a fase de desenvolvimento dos insetos. Na pupação, o corpo gorduroso se desorganiza e posteriormente se reconstitui. Pouco antes da metamorfose de *C. ethlius* (Lepidoptera), as células do corpo gorduroso perdem a adesão entre elas e começam a se soltar umas das outras. O corpo gorduroso da pupa é formado por uma massa de células soltas. Dois dias antes de o adulto emergir, algumas células se reagrupam, formando nódulos em torno das traquéias. Um dia antes da emergência, quase todo o corpo gorduroso já está reorganizado (Larsen, 1976).

Durante a metamorfose de *H. zea* (Lepidoptera) a porção parietal do corpo gorduroso deixa de ser distinguida como um tecido isolado, passando a fragmentado, restando algumas células, que são posteriormente degradadas. Ao contrário da porção parietal, a perivisceral se expande rapidamente na pupa, circundando o sistema digestivo (Wang & Haunerland 1992).

Os trofócitos e os enócitos são os tipos celulares encontrados no corpo gorduroso dos Diptera, sendo que os enócitos estão em menor número, espalhados entre os trofócitos (Stoppie et al. 1981, Dean et al. 1985, Johnson & Batterworth 1985, Raikhel et al. 1997). Apesar dos enócitos e trofócitos estarem fisicamente próximos, em *Sarcophaga bullata* (Diptera; Brachycera) eles estão separados por uma lâmina basal e não foi observado comunicação entre os seus citoplasmas (Stoppie et al. 1981).

Antes, durante e após o ciclo gonotrófico dos Diptera o corpo gorduroso se desenvolve e a ultra-estrutura dos trofócitos se modifica. Essas observações advêm principalmente dos estudos ultra-estruturais dos trofócitos de *Calliphora erythrocephala* e *S. bullata* (Diptera; Brachycera). Nesses estudos foi possível distinguir diferentes fases pelas quais o corpo gorduroso passa. Uma fase de crescimento e diferenciação; outra de produção ou síntese, a qual gradualmente é sucedida por uma fase de regressão do aparato sintético; e outra fase de preparação para um novo ciclo ovariano ou gonotrófico. A fase de crescimento e diferenciação abrange os primeiros dias da idade adulta, período em que não há deposição de vitelo nos ovócitos. Nessa fase, os trofócitos possuem abundância de grânulos protéicos, de glicogênio, e gotículas de lipídio, porém, o RER e mitocôndrias são escassos. O crescimento e a diferenciação dos trofócitos são caracterizados pela produção de ribossomos e pela dilatação da cisterna do RER. Além disso, ocorre a formação do complexo de Golgi e lisossomos, e também o aumento das gotículas de lipídio. No término da maturação ovariana, o corpo gorduroso experimenta uma fase de regressão, onde a produção de proteínas diminui através da reorganização do aparato sintético dos trofócitos (Thomsen & Thomsen 1974, Stoppie et al. 1981).

Apesar da maioria dos trabalhos investigarem o corpo gorduroso das fêmeas dos insetos, Sohal (1973) estudou o corpo gorduroso em machos de *Musca domestica* (Diptera;

Brachycera). Em indivíduos com quatro dias de idade, os trofócitos apresentam invaginações na membrana citoplasmática e o núcleo apresenta um nucléolo proeminente. O citoplasma é rico em RER, que consiste de cisternas estreitas e isoladas. Assim como nas fêmeas dos dípteros, nos machos de *M. domestica*, os trofócitos experimentam um aumento das gotículas de lipídio e a redução do glicogênio citoplasmático durante o envelhecimento. Diferente dos trofócitos, os enócitos apresentam retículo endoplasmático liso (REL) desenvolvido e gotículas de lipídio e glicogênio escassos.

Dobras e invaginações também são observadas na membrana citoplasmática dos trofócitos de fêmeas de *Periplaneta americana* (Blattaria) após a alimentação. No citoplasma dos trofócitos existem muitos grânulos elétron-densos semelhantes a grânulos de glicogênio, mitocôndrias e complexo de Golgi. As mitocôndrias são alongadas e se concentram na periferia das células. Em alguns indivíduos, estruturas ovais semelhantes à mitocôndrias em processo de degeneração formam aglomerados que lembram endossomos. Em fêmeas privadas de alimentação por três-sete dias, os trofócitos apresentam escassez de glicogênio e RER pouco desenvolvido. Em fêmeas privadas de alimento por 13-30 dias, o RER também é pouco desenvolvido e são observados corpúsculos dotados de membrana com conteúdo muito variado. Essas estruturas assemelham-se a endossomos em estágio avançado de digestão (Walker 1965).

Ainda em *P. americana*, a falta de alimento e água ocasiona o aumento da quantidade de sais de urato por unidade de peso. Esta mudança pode estar relacionada com o metabolismo de reservas pelo corpo gorduroso, o que provavelmente aumenta a quantidade de urato no tecido (Tucker 1977).

1.5. O corpo gorduroso do *A. aegypti* e seu desenvolvimento ao longo da vida adulta

Em 1987, Joblin & Lewis publicaram o livro *Anatomical drawings of biting flies* que contém várias ilustrações representando aspectos anatômicos de alguns insetos vetores. Uma dessas ilustrações mostra uma visão geral dos órgãos internos de *A. aegypti*, incluindo o corpo gorduroso que foi esquematizado como um órgão distribuído principalmente abaixo do tegumento ao longo de todo o abdome (Figura 1).

Um dos primeiros trabalhos sobre o corpo gorduroso do *A. aegypti* foi o trabalho de Wigglesworth (1942), que caracterizou o corpo gorduroso de larvas de quarto instar de *A. aegypti* sob diferentes condições alimentares. Foi mostrado por métodos histoquímicos, que o

conteúdo de lipídios e açúcares dos trofócitos é muito maior em larvas alimentadas do que em larvas não alimentadas de *A. aegypti*.

As modificações ultra-estruturais ocorridas nos trofócitos ao longo da vida adulta foram extensivamente estudadas nas fêmeas de *A. aegypti*. Os próximos parágrafos relatam os principais trabalhos envolvendo essas modificações.

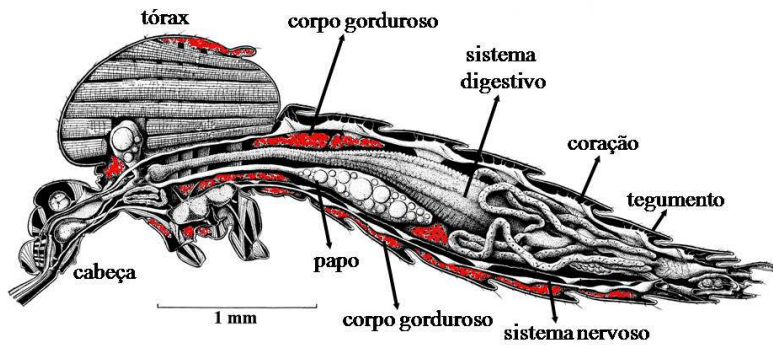


Figura 1. Ilustração representando a secção longitudinal mostrando a distribuição do corpo gorduroso (em vermelho) em relação aos demais órgãos/sistemas de *A. aegypti* (modificado de Joblin & Lewis 1987).

Logo após a emergência, os trofócitos apresentam um núcleo grande e centralizado. O citoplasma é preenchido por mitocôndrias agrupadas, grânulos protéicos, gotículas de lipídio, glicogênio em conformação alfa e ribossomos livres (Behan & Hagedorn 1978, Tadkowsky & Jones 1979).

Durante o processo de ovogênese, o corpo gorduroso está envolvido com síntese de vitelogenina, que é liberada na hemolinfa e posteriormente se acumula nos ovócitos. Nessa fase, os trofócitos são caracterizados pela abundância de RER, complexo de Golgi e vesículas secretoras. As vesículas secretoras contêm os precursores do vitelo, como por exemplo, vitelogenina e carboxipeptidase (Raikhel & Lea 1983, Raikhel 1986a, b, Snigirevskaya et al. 1997).

No início da fase adulta se inicia a pré-vitelogênese, que termina entre 60-72h após a emergência, no caso das fêmeas que recebam a alimentação sangüínea. A partir de então, se inicia a fase vitelogênica e a atividade dos trofócitos pode ser dividida em duas subfases: a de síntese de vitelogenina e a de término da vitelogênese (Raikhel 1986a, b).

Durante a fase de síntese, correspondente às primeiras 24h decorridas da alimentação sangüínea, os trofócitos apresentam o maior conteúdo de vitelogenina no citoplasma em

relação aos outros períodos. Seus citoplasmas contêm as organelas complexo de Golgi, RER e vesículas de secreção desenvolvidas. Após estas 24h, a atividade de síntese protéica dos trofócitos diminui até as 36-42h, caracterizando a subfase de terminação. A área correspondente às reservas de glicogênio e lipídio aumenta e a endocitose das proteínas do vitelo pelos ovários cessa. A partir dessa fase se inicia a coriogênese (Tadkowski & Jones 1979, Raikhel & Lea 1983, Snigirevskaya et al. 1997).

Um dos principais mecanismos de controle síntese de vitelogenina pelos trofócitos é a degradação do aparato sintético. Isso ocorre pela autofagia subsequente ao aumento da quantidade de lisossomos. A desintegração do RER dos trofócitos ocorre 36h após a alimentação sangüínea. Por outro lado, os dictiossomos ainda estão preservados e os grânulos de glicogênio e os ribossomos estão mais abundantes do que nas fêmeas de 24h. Outra característica comum dessa subfase é o aumento dos autofagossomos. A autofagia corresponde ao processo de remodelagem dos trofócitos e parece ser organela-específica para o RER, o complexo de Golgi e as vesículas de secreção. Essa reciclagem do RER envolve dois passos: o seqüestro do RER por estruturas membranosas derivadas do próprio RER e outro pela posterior fusão deste sistema com os lisossomos (Tadkowski & Jones 1979, Raikhel 1986a, b, Snigirevskaya et al. 1997).

Quarenta e oito horas após a alimentação sangüínea, a remodelagem dos trofócitos prossegue com a redução da quantidade de RER. Ribossomos livres e mitocôndrias predominam na região perinuclear e dictiossomos não são mais observados. Os lisossomos estão abundantes e os grânulos de proteínas, raros (Tadkowski & Jones 1979).

Sessenta e cinco horas após a alimentação sangüínea, quando os ovos já estão completamente desenvolvidos, os trofócitos apresentam RER escasso. Ribossomos, glicogênio e mitocôndria predominam ainda mais no citoplasma em relação aos períodos anteriores, especialmente em volta do núcleo. O restante do citoplasma é preenchido por mitocôndrias, partículas de glicogênio, lisossomos e estruturas vacuolares elétron-densas (Tadkowski & Jones 1979).

Na subfase de terminação, os endossomos podem ser divididos em dois grupos: (1) endossomos iniciais, delimitados por um sistema duplo de membrana, e (2) endossomos tardios, circundados por sistema simples de membrana. A cisterna do RER, do complexo de Golgi, as mitocôndrias e as vesículas de secreção podem ser facilmente identificadas no interior dos endossomos iniciais. Remanescentes das organelas também podem ser observados como um material fibroso no interior dos endossomos tardios (Snigirevskaya et al. 1997).

As alterações dos trofócitos ao longo da vida adulta do *A. aegypti* não se restringem à síntese e degradação de organelas, mas também incluem o conteúdo do DNA nuclear. Em

larvas de quarto estágio e em adultos recém-emergidos, os trofócitos são diplóides. Porém, nos adultos com três dias de idade, o conteúdo de DNA está duplicado ou triplicado. Quarenta e oito horas após a alimentação sangüínea, a ploidia dos trofócitos também aumenta e isso está correlacionado com o aumento do título do hormônio juvenil. Acredita-se que o aumento de ploidia seja um importante mecanismo que resulta no aumento de atividade de síntese no corpo gorduroso para atender a demanda ovariana pelos componentes do vitelo (Dittmann et al. 1989).

1.6. Os enócitos

Os enócitos foram descritos pela primeira vez há mais de 140 anos atrás em larvas de diferentes espécies de insetos por Landois (1865). Posteriormente Koschevnikov (1900) reportou a presença dessas células em *A. mellifera* (Hymenoptera) e *Bombyx mori* (Lepidoptera), supostamente como células glandulares, secretoras de componentes da cutícula. Até o presente momento, os enócitos são considerados células enigmáticas, cuja função não está bem esclarecida para a maioria das Ordens de insetos, sendo um dos tipos celulares menos estudados nestes organismos (Gould et al. 2001).

Os enócitos têm atraído o interesse dos fisiologistas de invertebrados devido ao grande tamanho e ultraestrutura incomum. Diferente dos trofócitos, o citoplasma dos enócitos é pobre em gotículas lipídicas e glicogênio. Porém, existem muitos elementos do REL, sugerindo que nelas ocorre intenso processo de síntese de lipídios (Dean et al. 1985, Wigglesworth 1988, Haunerland & Shirk 1995). Além disso, os enócitos compartilham com as células esteroidogênicas e hepáticas dos vertebrados, respectivamente, os REL e RER abundantes e densamente agrupados (Gould et al. 2001).

Os enócitos têm sido bastante estudados nos himenópteros através de uma abordagem histoquímica. São exemplos dessa abordagem os trabalhos de Zara & Caetano (2004), Roma et al. (2005; 2008), Rollo & Camargo-Mathias (2006), que estudaram o corpo gorduroso de larvas e adultos de algumas espécies de formigas. Nestes insetos os enócitos estão espalhados entre as demais células do órgão, possuindo um formato oval e com um núcleo centralizado. Histoquimicamente, os enócitos possuem citoplasma homogêneo para proteínas e com inclusões lipídicas. Em *A. mellifera* os enócitos são semelhantes aos encontrados nas formigas e estão presentes entre as demais células do órgão ou logo abaixo da epiderme, dependendo da idade (Ruvolo & Cruz-Landim 1993).

Em *D. melanogaster*, os enócitos se originam a partir de células do ectoderma e se localizam na porção subepidérmica-lateral do embrião. Nas larvas eles formam grupos de células aderidos na epiderme da lateral de cada segmento corpóreo (Hartenstein et al. 1992, Elstob et al. 2001, Gould et al. 2001). O número de enócitos não é fixo por segmento corpóreo, podendo variar entre quatro e nove, com uma média de seis células por grupo. Após a eclosão, os enócitos experimentam um crescimento extensivo sem divisão celular (Bodenstein 1950 citado por Gould et al. 2001).

A localização dos enócitos pode variar dependendo do organismo ou da fase em que ele se encontra. No insetos hemimetábolos como os da Ordem Blattaria e Hemiptera, os enócitos se localizam próximos à epiderme, separados pela lâmina basal das demais células do corpo gorduroso (Wigglesworth 1933, Fan et al. 2003). Em *A. aegypti*, os enócitos dos adultos são encontrados na superfície e entre os trofócitos do corpo gorduroso abdominal. Ainda em *Aedes*, os enócitos são células mononucleadas, com um nucléolo proeminente e cromatina condensada localizada preferencialmente na periferia do núcleo. Como nos insetos de maneira geral, aqui os enócitos possuem o citoplasma rico em REL, e, além disso, apresentam vários canálculos, que representam invaginações da membrana citoplasmática (Tadkowski et al. 1977).

Os enócitos também estão presentes nos Diplopoda. Acredita-se que eles apresentam grande capacidade de absorver substâncias da hemolinfa, uma vez que na membrana citoplasmática existem muitas invaginações. Outra característica compartilhada com os enócitos dos insetos é a presença de REL desenvolvido, sugerindo mais uma vez o envolvimento destas células no metabolismo de lipídios. Em *Rhinocricus padbergi* (Spirobolida) os enócitos circundam os ovários, sob a forma de filetes de células e encontram-se envolvidas por espessa membrana basal de aspecto fibroso. O citoplasma é heterogêneo com ribossomos e polirissomos abundantes e vesículas fortemente elétron-densas. Também as mitocôndrias são abundantes e o complexo de Golgi é desenvolvido, sugerindo a síntese de proteínas para exportação (Fontanetti et al. 2004).

Muitos estudos sugerem que os enócitos produzem lipídios relacionadas com a impermeabilização dos insetos. Em *Rhodnius prolixus* (Heteroptera) os enócitos ocorrem isolados das demais células do corpo gorduroso e se associam às células da epiderme através de prolongamentos. Esses prolongamentos interligam os citoplasmas dessas células, e através deles, foi observado transporte de lipídios, que se acredita serem componentes cuticulares (Wigglesworth 1988). Em larvas de *C. ethlius* (Lepidoptera), os enócitos se encontram próximos das glândulas de cera, sugerindo participação dos enócitos na síntese de precursores das secreções glandulares (Jackson & Locke 1989). Finalmente, foi demonstrado em *Blattella*

germanica (Blattaria) que os enócitos são capazes de produzir hidrocarbonetos cuticulares (Fan et al. 2003).

Estudos de microscopia eletrônica e bioquímica sugerem que, além da glândula protorácica, os enócitos de *Tenebrio molitor* (Coleoptera) são capazes de sintetizar *in vitro* β -ecdsona a partir de (4- 14 C) colesterol (Romer et al. 1974). Experimentos com enócitos de *Schistocerca gregaria* (Orthoptera) também demonstraram *in vitro* que eles são capazes de sintetizar parafina a partir de hidrocarbonetos marcados com 14 C (Diehl 1973, 1975).

Os enócitos também estão envolvidos com a manutenção da homeostasia nos insetos. Foi demonstrado alto nível de expressão da NADPH citocromo P450 redutase nos enócitos de *Anopheles gambiae*, (Diptera), sugerindo a participação destas células no metabolismo de inseticidas em linhagens inseticida-resistentes (Lycett et al. 2006).

Os enócitos larvais de *Drosophila melanogaster* (Diptera; Brachycera) atuam no controle do crescimento, da alimentação larval, do metabolismo e do armazenamento de lipídios. Quando os enócitos são eliminados nas larvas L1, essas crescem menos e seus respectivos adultos falham ao emergir, quando comparadas com larvas normais. Além disso, larvas sem enócitos apresentam comportamento alimentar aberrante, abandonam o substrato alimentar e reduzem a movimentação das mandíbulas. Em consequência disso, a quantidade de alimento ingerido pelas larvas é reduzida. Diante de a privação alimentar os enócitos armazenam lipídios sob a forma de gotículas, semelhante aos hepatócitos de mamíferos no mesmo contexto alimentar (Gutierrez et al. 2007).

Cinquenta e um genes são expressos exclusivamente nos enócitos de *D. melanogaster*, sendo que 22 (40%) deles codificam homólogos de genes humanos relacionados com o metabolismo de lipídios. Além destes genes foram identificados outros relacionados com a absorção de lipídios complexados à lipoforina na hemolinfa, via receptores LPR1 e LPR2. Além desses, genes para a citocromo P450 oxidase, reguladores da diferenciação dos hepatócitos nos mamíferos, também estão presentes (Gutierrez et al. 2007).

Os resultados de Gutierrez et al. (2007) também sugerem que em *D. melanogaster*, as funções do fígado dos mamíferos de estocar glicogênio e processar lipídios parecem estar divididas entre os trofócitos e os enócitos. Fazendo uma analogia entre o eixo tecido adiposo-fígado nos mamíferos, estes autores demonstraram que a mobilização de lipídios dos trofócitos durante o jejum larval culmina com o acúmulo de gotículas lipídicas nos enócitos. Esse mecanismo mantém os níveis de lipídios baixos na hemolinfa e se assemelha à mobilização que ocorre do tecido adiposo para o fígado durante a esteatose humana (acúmulo de lipídios no fígado). Essa comparação constitui um importante modelo para o entendimento das doenças que desencadeiam a esteatose.

Além de participarem do metabolismo de lipídios, foi demonstrado por Bates & Whittington (2007), que os enócitos participam da morfogênese dos neurônios durante a embriogênese de *D. melanogaster*. Embriões submetidos à ablação dos enócitos, tiveram o processo de crescimento neuronal prejudicado, resultante da orientação incorreta dos axônios. A participação dos enócitos neste processo se deve à secreção do peptídeo semaforina 2a (Sema2a), que, dependendo da espécie, pode estimular ou inibir a expansão dos axônios de neurônios em invertebrados e vertebrados. No caso de *D. melanogaster*, a secreção de Sema2a inibe a formação axonal na região de contato dos enócitos com os neurônios, constituindo uma barreira repulsiva, a qual previne a má formação dos axônios sensoriais.

1.7. O corpo gorduroso e a resposta imune

As primeiras barreiras utilizadas para impedir a entrada de microorganismos nos insetos são as barreiras externas, as quais são compostas por estruturas revestidas pela cutícula e pelo córion, no caso do embrião. Nos adultos, essas estruturas são representadas pelo tegumento, o sistema digestivo e as traquéias, os quais compõem as duas principais rotas de infecção (Chapman 1998).

A resposta imune tem um papel crítico, porém, pouco estudado na complexa relação existente entre os artrópodes vetores e os patógenos que eles transmitem. Uma forte resposta imune pode reduzir ou restringir a capacidade vetorial de certos hospedeiros invertebrados. O entendimento da maneira pela qual determinado parasita escapa dessa resposta pode contribuir para os estudos do bloqueio de sua transmissão através dos seus vetores naturais. Na resposta imune dos insetos, o mecanismo de complementaridade do antígeno-anticorpo não existe. Porém, eles possuem mecanismos de defesa inatos, como por exemplo a produção de peptídeos antimicrobianos e a melanização, efetivos quanto à destruição de organismos invasores (Tzo et al. 2002, Christophides et al. 2004).

O principal tecido responsável pela resposta imune é a hemolinfa que consiste de hemócitos e plasma. Entretanto, a resposta imune nos insetos é múltipla e a habilidade de resposta aos organismos invasores não é restrita à hemolinfa. Nesse sentido, outros tecidos atuam como imuno-competentes, como por exemplo, o corpo gorduroso, a cárdia e o intestino (Tzo et al. 2002).

O corpo gorduroso cumpre um importante papel na produção de peptídeos contra fungos e bactérias. Entretanto, é em *D. melanogaster* que esse mecanismo é mais bem compreendido. Como essa espécie vive a maior parte do tempo da sua vida em ambientes fermentativos e em

putrefação, isso a torna susceptível ao ataque de uma gama de microorganismos (Hetru et al. 2003, Tzou et al. 2002). Além disso, a dieta de *D. melanogaster* é rica em derivados da fermentação alcoólica, sendo intensa a participação do corpo gorduroso na desintoxicação pela produção da álcool desidrogenase. Nesse sentido, mais uma vez, o corpo gorduroso pode ser considerado análogo ao fígado dos mamíferos, pois além de servir de fonte de metabólitos circulantes, ele participa da desintoxicação e da produção de peptídeos antimicrobianos (Sondergaard 1993).

Apesar dos hemócitos também produzirem peptídeos antimicrobianos, a contribuição deles é pouco significativa devido ao seu número reduzido em comparação às células do corpo gorduroso. Pelo fato de ser um órgão relativamente desenvolvido e sua localização na hemocele fazem com que o corpo gorduroso seja o principal tecido secretor de peptídeos antimicrobianos. Essas características possibilitam esses peptídeos alcançarem uma concentração efetiva relativamente rápida na hemolinfa. Exemplos desses peptídeos são as defensinas, cecropinas, diptericina, atacinas, drosocinas, drosomicinas e metinocovinas, que têm sido isoladas, caracterizadas e os seus respectivos genes clonados a partir de *D. melanogaster* desafiadas com bactérias e fungos (Dimopoulos 2003).

O corpo gorduroso também produz fatores envolvidos com a coagulação e a melanização. Essas duas ocorrem nos locais de injúria, resultante da ativação das respectivas cascatas. Porém, esses dois processos ainda são pouco conhecidos. Estudos com artrópodes indicam que essas cascatas são ativadas por componentes dos microorganismos, como lipofossacarídeos e peptidoglicanos com resíduos de β -1,3-glicano. Essas substâncias ativam vias proteolíticas que envolvem serino proteases. Essas proteases estão bem representadas no genoma de *D. melanogaster* e *A. aegypti* e são superexpressas no corpo gorduroso diante da infecção microbiana (Hoffman & Reichhart 1997, Gorman & Paskewitz 2001, Tzo et al. 2002, Hetru et al. 2003). Por outro lado, a coagulação e a melanização podem ser mediadas por serpinas, cuja função é neutralizar as serino-proteases. As serpinas podem ter diferentes origens. Em *Manduca sexta* (Lepidoptera) elas são expressas em níveis altos no corpo gorduroso e em menor quantidade nos hemócitos (Kanost 1999).

A melanização é precedida pela ativação da fenoloxidase da hemolinfa, que catalisa a conversão de dopamina em melanina, a qual é tóxica para os microorganismos. A formação de fenoloxidase se dá a partir da pro-fenoloxidase. Na presença de oxigênio, ocorre a formação da fenoloxidase, levando à formação de espécies reativas de oxigênio, que podem também atuar na resposta imune. Após a ativação da cascata de melanização e coagulação, entram em cena dois importantes mecanismos de defesa proporcionados pelos hemócitos. Esses mecanismos são a fagocitose, no caso de patógenos pequenos, e a encapsulação, no caso de

patógenos grandes. Nesse caso, os peptídeos antimicrobianos também são secretados a fim de opsonizarem os invasores (Vilmos & Kurucz 1998, Barillas-Murry et al 2000, Tzo et al. 2002).

Alguns mecanismos pelos quais os organismos estranhos são reconhecidos na hemolinfa dos insetos já foram decifrados. Em *D. melanogaster* a injúria desencadeia uma cascata proteolítica que culmina com a quebra da proteína *Spatzle* da hemocele que se liga aos receptores do tipo *Toll* na superfície das células do corpo gorduroso. Essa ligação é responsável pela via de sinalização intracelular que culmina com a produção dos peptídeos antimicrobianos. Os microorganismos invasores também podem ser reconhecidos por lectinas da hemolinfa. Essas, por sua vez, são capazes de se ligar aos carboidratos da superfície da parede bacteriana, atuando como opsoninas. As lectinas também são produzidas no corpo gorduroso diante da injúria do tegumento, durante a embriogênese e a metamorfose das larvas de *S. peregrina* (Diptera) (Takahashi et al. 1986, Hoffman & Reichhart 1997, Hetru et al. 2003).

Outra forma que os insetos utilizam para bloquear a invasão por microorganismos é a manutenção de um microambiente hostil no intestino médio, através de um pH baixo e pela secreção de lisozimas. As lisozimas hidrolisam os peptideoglicanos nos resíduos glicosídicos β -(1,4) da parede bacteriana, e possuem atividade quitinolítica contra fungos (Hultmark 1996, Vilmos & Kurucz 1998). Em *Hyalophora cecropia* (Lepidoptera), as lisozimas compõem um dos três mais abundantes peptídeos antimicrobianos, junto com a cecropina e as atacinas. Assim como os peptídeos antimicrobianos, as lisozimas estão presentes nos hemócitos sob a forma de grânulos intracitoplasmáticos e também têm o corpo gorduroso como uma de suas fontes (Zachary & Hoffmann 1984). Há evidências que as lisozimas agem em sinergismo com a cecropina, mas diferente dessa, as lisozimas são expressas constitutivamente no corpo gorduroso. Em *M. domestica* e *D. melanogaster* (Diptera), as lisozimas têm um importante papel como enzimas digestivas do intestino médio, atuando nos microorganismos ingeridos (Hultmark 1996).

1.8. O cultivo primário do corpo gorduroso

O interesse de se desenvolver o cultivo primário de células ou tecidos provenientes de insetos vetores justifica-se pelo fato de que esses animais são importantes transmissores de arboviroses em homens e animais domésticos. Semelhante ao que acontece com os vetores, existe um grande interesse no cultivo de células ou tecidos de insetos de importância agrícola.

O dano causado por esses insetos e a resistência a inseticidas estimula o desenvolvimento de culturas celulares para produção de vírus em larga escala. Além disso, o cultivo de células de vetores pode ser aplicado em estudos morfogênicos, na virologia, patologia, bioquímica, genética e outros campos da biologia e medicina (Leake 1997, Hernández-Crespo et al. 2000, Sudeep et al. 2005).

Nos últimos anos os estudos com cultivo celular de insetos estão concentrados em linhagens celulares dos Lepidoptera, devido à facilidade de obtenção das células. Isso se deve ao fato de serem animais relativamente grandes, o que torna fácil a obtenção de material biológico e ao seu potencial para ser aplicado na biotecnologia e na agricultura. Linhagens celulares de lepidópteros foram inicialmente estabelecidas para produção de vírus entomopatogênicos como biopesticidas para o controle de pragas agrícolas. Com o desenvolvimento do sistema de expressão através da infecção por baculovírus, a cultura de células desses insetos também se tornou interessante para expressão heteróloga de proteínas de eucariotos, facilitando a obtenção e o isolamento das mesmas (Sudeep et al. 2005).

A literatura é vasta em trabalhos considerando o cultivo primário do corpo gorduroso dos lepidópteros na fase larval. Considerando esse órgão como um dos mais desenvolvidos dos insetos, isso maximiza a obtenção de uma quantidade satisfatória de células para o estabelecimento do cultivo. De maneira geral, quando transferidas para o meio de cultura, as células dos corpos gordurosos larvais de mariposas são capazes de migrar para o substrato. A maioria dessas células morrem antes do primeiro mês em cultivo, enquanto outras se multiplicam, possibilitando o subcultivo. Geralmente, dois tipos celulares são observados, sendo um deles semelhante aos macrófagos, e outro com formato oval, semelhante aos trofócitos. Nas células de *Mamestra brassicae* (Noctuidae) foram feitos ensaios para a atividade de várias enzimas, como por exemplo, a esterase, e foi mostrado que essas células conservam-nas. No caso de *Spilosoma imparilis* (Arctiidae), na 32ª passagem foi possível obter uma linhagem celular derivada do cultivo primário do corpo gorduroso e em todas as espécies de mariposas, as linhagens celulares puderam ser infectadas por diferentes vírus entomopatogênicos (Mitsubishi 1983, 1984, Inoue & Mitsubishi 1985, Mitsubishi & Inoue 1988, Zhang et al. 2006).

Quando cultivado, o corpo gorduroso larval de *B. mori* (Lepidoptera) apresenta células ovaladas semelhante aos trofócitos, com gotículas de lipídio no citoplasma. Após a digestão da lâmina basal, essas células são capazes de se reagregarem, regenerando a lâmina basal. Esse estudo mostrou que mesmo *in vitro*, essas células são capazes de sintetizar certas proteínas de reserva que são secretadas na hemolinfa durante três meses. Essas duas proteínas chamadas de SP1 e SP2 constituem duas das principais proteínas de reserva larvais nessa

espécie, e são ricas em resíduos de metionina e fenilalanina, e tirosina, respectivamente (Kishimoto et al. 1999).

Além dos estudos com cultivo do corpo gorduroso dos lepidópteros, existem alguns trabalhos considerando o cultivo primário desse órgão em outros insetos. Easton & Horwath (1994) estudaram o corpo gorduroso larval e pré-pupal de *T. molitor* (Coleoptera) e descreveram morfológicamente as células em cultivo primário. Nesse estudo foi demonstrado que as células do corpo gorduroso preservam as características morfológicas, histoquímicas e funcionais originais por mais de dois meses, o que constitui um pré-requisito para o uso desse órgão em estudos *in vitro*. Também nesse experimento os trofócitos retiveram a capacidade de sintetizar uma proteína anticongelante.

Resultados semelhantes foram obtidos com o cultivo primário do corpo gorduroso dos adultos de *P. americana* (Blattaria), onde foi possível cultivar os três tipos celulares do corpo gorduroso: trofócitos, urócitos e micetócitos. Nesse caso o cultivo pôde ser mantido por seis meses. A partir do segundo mês, os trofócitos originam células de aparência menos diferenciada (definidas como *adipocytes-like*). Os urócitos perecem e a quantidade de células grandes reduz, havendo a seleção de células menores que passam a se multiplicar. Supostamente os trofócitos e os micetócitos são os únicos capazes de multiplicar, mas curiosamente, os micetócitos não apresentam simbiontes no citoplasma. No caso dos trofócitos, as suas características funcionais como a capacidade de estocar lipídios e glicogênio são mantidas ao longo do cultivo primário (Philippe 1982).

Através do cultivo primário do corpo gorduroso foi possível conhecer vários aspectos da fisiologia dos insetos, principalmente relacionados à reprodução. Existem trabalhos com os corpos gordurosos de *Locusta* (Orthoptera) e *Periplaneta* (Blattaria) mostrando que ele é capaz de responder ao hormônio juvenil produzindo e secretando vitelogenina na ausência de ecdisterona. Em *M. sexta* (Lepidoptera), o hormônio juvenil é capaz de estimular a produção de esterase no corpo gorduroso (Marks 1980). O cultivo primário do corpo gorduroso de *A. aegypti* também foi usado para se estudar as proteínas produzidas por esse órgão. Nesses casos foram usados corpos gordurosos inteiros e aderidos ao tegumento abdominal incubados *in vitro* (Deitsch et al. 1995, Raikhel et al. 1997, Sun et al. 2000).

O cultivo primário do corpo gorduroso de pupas e de fêmeas vitelogênicas de *A. aegypti* mostrou que, além de produzir os componentes do vitelo, ele também produz lipoforinas de baixa e alta densidade. As lipoforinas transportam os lipídios absorvidos no intestino médio para o restante do corpo, e os lipídios produzidos no corpo gorduroso para os outros órgãos. A produção de lipoforinas é alta em ambas as etapas do desenvolvimento do mosquito, porém atinge o pico de produção 18h após a alimentação sanguínea (Sun et al. 2000).

A descoberta de que o corpo gorduroso é capaz de responder ao hormônio ecdisona, através da síntese de vitelogenina e lipoforinas representou um grande avanço nos estudos de interação corpo gorduroso-ovário em *A. aegypti*. Mais tarde foi possível estudar a endocitose de vitelogenina e as outras proteínas do vitelo, como a carboxipeptidase e a tiolprotease, através de receptores ovarianos. Acredita-se que aplicação do cultivo primário será útil nos estudos da regulação da expressão gênica à medida que mais genes expressos especificamente no corpo gorduroso estiverem clonados (Deitsch et al. 1995, Raikhel et al. 1997, Sun et al. 2000).

Existem poucos trabalhos na literatura considerando o cultivo primário dos enócitos. Em ambos os trabalhos, foram fornecidos precursores radioativos diluídos em meio de cultivo. Mostrou-se que os enócitos são capazes de metabolizá-los, produzindo e secretando novos produtos para o meio. Pode-se citar o trabalho de Romer et al. (1974), que estudou os enócitos de larvas de *T. molitor* (Coleoptera) e Diehl (1973, 1975) que estudou os enócitos de *S. gregaria* (Orthoptera), mostrando, respectivamente, a atuação dessas células no metabolismo de esteróides e de parafina. Recentemente, Fan et al. (2003) estudaram a síntese de hidrocarbonetos da epiderme a partir de enócitos de *B. germanica* (Blattaria).

1.9. O transcriptoma do corpo gorduroso

Um transcriptoma pode ser definido como uma coleção de genes transcritos em um organismo, tecido ou célula em um determinado momento ou sob determinada condição. As informações contidas nos transcriptomas têm sido úteis para diferentes propósitos, como a descrição de novos genes, o desenvolvimento de microarranjos e de algoritmos que permitem a busca de genes em genomas, e têm facilitado a clonagem de genes. Apesar das dificuldades existentes na geração dos transcriptomas, essa abordagem molecular constitui uma ferramenta importante para o estudo de genes e o seus padrões de expressão (Oliveira 2007).

Para gerar um transcriptoma, não é necessário obter seqüências inteiras, bastando seqüenciar uma determinada região de cada cDNA. A seqüência parcial de um cDNA é denominada de EST (do inglês **Expressed Sequence Tag** - etiquetas de seqüências de expressão). Uma das formas de se obter ESTs é através da clonagem, da transcrição reversa dos RNAs mensageiros [RNAm(s)] e do seqüenciamento das extremidades dos respectivos cDNAs. Esse método requer a obtenção de uma biblioteca de cDNA não normalizada, permitindo estimar as quantidades relativas dos transcritos. De posse das ESTs e através de

algoritmos é possível descobrir se existe similaridade ou identidade com outras seqüências de genes ou de proteínas depositadas em banco de dados (Schuler 1997, Oliveira 2007).

A associação entre a abundância de transcritos e a função de determinada estrutura biológica torna possível inferir sobre as condições fisiológicas de um órgão, tecido ou até mesmo o organismo inteiro, quando os respectivos perfis da expressão gênica são revelados (Pevsner 2003). Apesar de recente, o estudo dos transcriptomas tem sido usado como ferramenta para o entendimento fisiológico e dos atributos funcionais de determinados órgãos de insetos vetores.

As interações parasito-hospedeiro representam adaptações coevolutivas complexas. A compatibilidade dessas relações é dependente da capacidade do hospedeiro reconhecer e responder ao parasito para enfraquecê-lo, ou do parasito escapar do sistema imune do hospedeiro. Essas interações dinâmicas são inquestionavelmente manifestadas nos transcriptomas. Acredita-se que a decodificação da expressão gênica da relação parasito-hospedeiro poderá levar ao desenvolvimento de estratégias no bloqueio da transmissão dos mesmos pelos vetores (Bartholomay et al. 2004).

Serão discutidos a seguir alguns trabalhos que descreveram o transcriptoma de insetos inteiros e/ou de órgãos específicos. No futuro, transcriptomas órgãos-específicos serão responsáveis pelo melhor entendimento do funcionamento dos organismos vetores e poderão ser úteis para a montagem de um “quebra-cabeça”, onde cada peça, ou transcriptoma, contribuirá para o melhor entendimento da biologia desses animais (Bartholomay et al. 2004).

O genoma do *A. aegypti* é composto por aproximadamente 1376Mpb (Mega pares de bases) organizados em três pares de cromossomos autossomais. Em 2007 o seqüenciamento do genoma do *A. aegypti* foi publicado, constituindo o terceiro genoma de Diptera, precedido pelo de *D. melanogaster* e *A. gambiae*. Curiosamente, cerca de 47% de todo o genoma de *A. aegypti* consiste de seqüências correspondentes a elementos transponíveis (transposons). Apesar disso, acredita-se que a maior parte delas sejam degeneradas ou não funcionais (Nene et al. 2007).

Também foi feita a identificação dos genes expressos no genoma de *A. aegypti*, considerando as diferentes fases de vida. Dos 15.419 genes identificados como codificantes, 12.350 (80%) são transcritos nos adultos. Um número bem maior de genes (38) do sistema imune é encontrado em larvas em comparação com adultos (19). Isso poderia ser explicado pelo fato das formas imaturas estarem em contato com a microbiota aquática (Nene et al. 2007).

A estratégia de seqüenciar os cDNAs de transcritos obtidos do corpo inteiro também foi usada em fêmeas adultas de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera; Psychodidae) infectadas por

Leishmania infantum e *L. mexicana*. Essa estratégia gerou um grande banco de dados sobre os RNAm(s) presentes em flebotomíneos infectados. Comparando-se esse banco de transcritos com os de *D. melanogaster* e *A. gambiae*, foram encontrados 44,7% e 45,9% de similaridade, respectivamente (Dillon et al. 2006).

Outra análise comparativa revelou que a similaridade entre o transcriptoma de *Aedes* e *D. melanogaster* é de 58% e com *A. gambiae* é de 67%. Do total de genes que provavelmente codificam para proteínas, 28% está envolvido com gustação e olfação, 12% são membros da família de genes para componentes cuticulares e 8% corresponde à família da citocromo P450. Esse resultado representa uma expansão da representatividade desses genes no genoma de *A. aegypti* em comparação com os outros dois genomas. Isso poderia ser responsável por um sistema de olfato e de desintoxicação mais elaborado, contribuindo para uma maior capacidade de sobreviver dessa espécie diante das ameaças representadas pelos inseticidas em comparação com outros mosquitos (Nene et al. 2007).

A geração de transcriptomas de vetores está concentrada nos estudos das glândulas salivares e do intestino médio. Essa concentração é considerada estratégica no contexto hospedeiro-parasito, pelo fato destes órgãos estarem diretamente ligados à colonização, reprodução e inoculação dos parasitos. No caso da glândula salivar, os trabalhos estão centrados na descrição das proteínas salivares capazes de ativar a resposta imune dos vertebrados, bloquear a hemostase e até mesmo atuarem como coadjuvantes no processo de infecção (Valenzuela et al. 2002, 2003, Calvo et al. 2004, Ribeiro et al. 2004, Arcà et al., Anderson et al., Oliveira et al. e Kato et al. 2006). No caso do intestino médio, os trabalhos estão focados nos transcritos que codificam proteínas relacionadas com a resposta imune do hospedeiro invertebrado, no processo de digestão sangüínea e na formação da matriz peritrófica (Ramalho-Ortigão et al. e Warr et al. 2007).

O transcriptoma do intestino médio de *Phlebotomus papatasi* (Psychodidae) possibilitou investigar a dinâmica da expressão gênica dos intestinos médios de flebotomíneos alimentados com açúcar, com sangue infectado e não infectado por *L. major*. Nesse trabalho foi mostrado que a presença do parasita diminui a expressão de genes que codificam peritrofinas, proteínas das microvilosidades e quimiotripsina. Essa diminuição poderia facilitar a adesão do parasita à parede intestinal e protegê-lo da digestão proteolítica (Ramalho-Ortigão et al. 2007).

O estudo do transcriptoma das glândulas salivares (sialomas) dos anofelinos (*A. darlingi*, *A. gambiae* and *A. stephensi*) e de culicíneos (*A. aegypti*, *A. albopictus* e *Culex quinquefasciatus*) representou um grande avanço para o entendimento do funcionamento das mesmas e da constituição das suas respectivas salivas. A análise comparativa entre os diferentes sialomas possibilitou inferir sobre a filogenia, a estrutura das diferentes populações

geográficas desses organismos, além de identificar genes relacionados com a capacidade vetorial e a preferência de cada espécie pelos respectivos hospedeiros (Valenzuela et al. 2002, 2003, Calvo et al. 2004, Ribeiro et al. 2004, Arcà et al. 2006).

O perfil da expressão gênica das glândulas salivares de flebotômíneos (*P. aiasi*, *P. duboscqi*, *P. argentipes* e *P. perniciosus*) também tem sido estudado devido à importância de suas proteínas anti-hemostáticas e por essas proteínas estarem relacionadas com a infecção do vertebrado por espécies de *Leishmania* (Anderson et al., Oliveira et al. e Kato et al. 2006).

Os transcriptomas dos órgãos imuno-competentes já foram descritos para alguns insetos. Os primeiros transcriptomas gerados a partir de hemócitos foram, simultaneamente, os dos mosquitos *A. aegypti* e *Armigeres subalbatus*. Isso significou um grande passo para o entendimento da relação mosquito-parasito porque foram feitos com mosquitos inoculados com bactérias (Bartholomay et al. 2004).

A primeira descrição do transcriptoma do corpo gorduroso de mosquito foi realizada por Feitosa et al. (2006), considerando fêmeas de *A. aegypti* em período de intensa vitelogênese. A maioria dos transcritos analisados (41%) corresponde a genes comprometidos com a síntese de proteínas. A quantidade de transcritos relacionados com a vitelogênese foi cerca de 15% do total. Surpreendentemente, só foram encontrados três genes de resposta imune correspondentes aos genes de lectinas, defensina e cecropina.

O transcriptoma do corpo gorduroso das larvas de *Antheraea mylitta* (Lepidoptera) desafiadas com *Escherichia coli*, revelou um amplo arsenal de transcritos (31%) que correspondem às proteínas da resposta imune humoral. Este arsenal inclui atacina, cecropina, hemolina, serpina, lisozima, entre outras. (Gandhe et al. 2006). A comparação do transcriptoma de *M. sexta* desafiadas e não desafiadas, revelou a expressão diferenciada de vários componentes da imunidade diante da presença de bactérias. Entre eles, peptídeos antimicrobianos, fatores da cascata de melanização, serino proteases e lectinas (Zhu et al. 2003).

Apesar de existirem algumas análises de expressão gênica do corpo gorduroso de diferentes fases do desenvolvimento dos insetos, pouco é sabido sobre quais desses transcritos realmente são traduzidos. Uma análise do proteoma do corpo gorduroso de larvas de *B. mori* (Lepidoptera) desafiadas com lipopolissacarídeos confirmou a produção de proteínas da resposta imune pelo órgão. Entre elas, atacinas, serino proteases e dois novos peptídeos não identificados (Wang et al. 2004).

Os afídeos da espécie *Acyrtosiphon pisum* abrigam proteobactérias do gênero *Buchnera* em seus bacteriócitos. Esses endosimbiontes são responsáveis pela produção de aminoácidos essenciais e vitaminas B, enriquecedores da dieta desses animais. Os estudos do genoma desse

procarioto e do transcriptoma dos bacteriócitos revelaram que ao longo do tempo houve transferência horizontal massiva de genes para o afídeo, restando no simbiote os genes envolvidos com a produção de nutrientes. O transcriptoma dos bacteriócitos foi o primeiro considerando células do corpo gorduroso isoladamente. Como esperado, os genes altamente expressos nessas células correspondem aos do metabolismo de aminoácidos, seguido pelos de transporte (a maioria transporte de aminoácidos) e de lisozimas. Paradoxalmente, as lisozimas correspondem aos transcritos mais expressos nos bacteriócitos, mas o significado disso é obscuro (Nakabachi et al. 2005).

Como discutido acima, os órgãos mais bem caracterizados em termos da expressão gênica nos insetos são a glândula salivar e o intestino médio (Valenzuela et al. 2003, Calvo et al. 2004, Ribeiro et al. 2004, Arcà et al. e Kato et al. 2006, Ramalho-Ortigão et al. 2007). Porém, diante de uma infecção, os eventos que acontecem na hemolinfa são tão importantes quanto os que acontecem nesses dois órgãos, pois como discutido anteriormente, a resposta imune é capaz de inibir o desenvolvimento dos parasitos na hemocele, impedindo sua transmissão. Neste sentido, a resposta imune da cavidade corpórea constitui um potencial para o bloqueio dos parasitos no meio termo da jornada intestino médio-glândula salivar (Tzo et al. 2002, Christophides et al. 2004). Considerando o potencial do transcriptoma para a inferência da função de estruturas biológicas, foi lançada mão da biblioteca de cDNA para se descrever pela primeira vez o transcriptoma dos enócitos de *A. aegypti*.

2. Objetivos

2.1. Testar a hipótese de que o corpo gorduroso de *A. aegypti* é capaz de se reorganizar do ponto de vista ultra-estrutural, histoquímico e morfométrico de acordo com a idade e com o tipo de alimentação.

2.2. Testar a hipótese de que é possível manter os enócitos pupais de *A. aegypti* em cultivo primário.

2.3. Testar a hipótese de que os enócitos pupais de *A. aegypti* expressam transcritos relacionados com os processos de desintoxicação, síntese de lipídios e imunidade inata.

3. Métodos

3.1. Mosquitos

Para a realização dos estudos morfológicos e do cultivo primário, fêmeas do *A. aegypti* foram obtidas de colônias mantidas no Laboratório de Entomologia Médica (LEM) do Instituto René Rachou (Fiocruz-MG). Originalmente, essas colônias foram formadas a partir de mosquitos coletados na cidade de Campos dos Goitacazes, estado do Rio de Janeiro. Quatro grupos de fêmeas foram utilizados: (a) fêmeas pós-emergidas, com um dia de idade; (b) fêmeas com 18 dias de idade alimentadas com solução de açúcar 10%; (c) fêmeas com 18 dias de idade, 18 horas após o alimentação sangüínea e (d) fêmeas com 18 dias de idade, quatro dias (96h) após o alimentação sangüínea. No caso do último grupo, as fêmeas foram alimentadas com açúcar até um dia antes da alimentação sangüínea, sendo alimentadas em camundongo anestesiado no 14º e 17º dias de idade e mantidas com açúcar até o 18º dia de vida. Somente foram usadas fêmeas ingurgitadas e que no quarto dia após a alimentação sangüínea estavam com o intestino médio completamente esvaziado.

Para a construção da biblioteca de cDNA, os enócitos foram obtidos de pupas fêmeas da linhagem MOYO R de *A. aegypti*. A linhagem **Moyo-in-Dry** (MOYO) foi originalmente coletada na Vila Shauri Moyo, Mombasa (Quênia) em 1974. A sublinhagem MOYO R (R de **refractory** ou resistente) apresenta taxa de infecção por *Plasmodium gallinaceum* em torno de 8% (Thathy et al. 1994). Essa sublinhagem também apresenta resistência à infecção pelo vírus dengue 2, com uma taxa de infecção em torno de 19% (Schneider et al. 2007). A sublinhagem MOYO R é mantida no laboratório do Dr. Dave Severson da Universidade de Notre Dame (IN-EUA).

3.2. Morfologia

3.2.1. Dissecção do corpo gorduroso de fêmeas adultas de *A. aegypti*.

Os mosquitos foram lavados com água e uma gota de detergente em tubos de centrífuga (Falcon) e chacoalhados, para a retirada do excesso de escamas na superfície do corpo. Em seguida, os mosquitos foram lavados em água corrente com o auxílio de uma peneira e mantidos mergulhados em PBSx1 (tampão fosfato) sobre o gelo até a dissecção. Depois de

colocados sobre uma lâmina de vidro sob o microscópio estereoscópio, as asas e as pernas foram retiradas. Com o auxílio de estiletos, o tórax e a cabeça foram retirados e o abdome foi aberto longitudinalmente em uma das pleuras laterais (entre os tergitos e esternitos). Este último procedimento foi feito com o auxílio de estilete ou microtesoura (Roboz), e com bastante cuidado, para que o corpo gorduroso fosse preservado juntamente com a carcaça.

3.2.2. Histologia

Após a abertura da cavidade abdominal, os órgãos viscerais (sistema digestivo e reprodutor) foram retirados e o fixador gotejado sobre o corpo gorduroso. Os corpos gordurosos aderidos ao tegumento foram fixados em solução fixadora contendo glutaraldeído 2,5%, sacarose 7% e tampão cacodilato 0,1M pH 7,2 por duas horas. Em seguida as amostras foram lavadas duas vezes em PBS, desidratadas em solução alcoólica crescente, infiltradas em solução etanol/historesina Leica (1:1) por 40min e em historesina pura sem endurecedor por no mínimo uma hora. Após a infiltração, as amostras foram embebidas em historesina com endurecedor em cápsulas de plástico, ao abrigo do ar e à temperatura ambiente por no mínimo 40min, de acordo com protocolo do fabricante.

Blocos de resina polimerizada contendo as amostras foram seccionados (1-2 μ m) com o auxílio de um micrótomo e navalhas de vidro. As secções foram coradas com azul de toluidina-borato de sódio 1%. As lâminas foram montadas com Entellan[®], observadas e fotografadas em microscópio óptico.

3.2.3. Histoquímica

Quatro métodos histoquímicos foram usados: (a) mercúrio de bromofenol para evidenciar proteínas totais; (b) teste do PAS (Periodic Acid-Shiff) para evidenciar polissacarídeos neutros; (c) Reação de Feulgen para evidenciar DNA, seguida da contracoloração pelo verde rápido (fast green) 0,1% e (d) impregnação por tetróxido de ósmio 2% em tampão cacodilato pH 7,2 para evidenciar lipídios. Com exceção do mercúrio-bromofenol, feito nas secções histológicas (7-10 μ m), os métodos histoquímicos foram realizados em bloco, ou seja, no órgão inteiro antes da desidratação (adaptado de Behmer et al. 1976, Martins & Serrão 2002, 2004).

3.2.4. Microscopia eletrônica de varredura

Após fixação e lavagem em PBSx1, os corpos gordurosos foram pós-fixados em solução de tetróxido de ósmio 1% e ferricianeto de potássio 0,8% (Pimenta & De Souza 1983) por uma hora à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. As amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de acetona (30-100%). Em seguida, as amostras foram submetidas à secagem rápida através do aparelho de ponto crítico, montadas em suportes apropriados e metalizadas com ouro, a fim de serem observadas e registradas no MEV JEOL JSM 5600.

3.2.5. Microscopia eletrônica de transmissão

Pequenos pedaços do corpo gorduroso aderidos ao tegumento foram pós-fixados e desidratados como descrito para a MEV, e em seguida, foram mergulhados e mantidos em solução de acetona/Epon (1:1) durante a noite e posteriormente em Epon (Ted Pella) por 24h, seguido da polimerização por 48h a 58°C. Após a polimerização, foram obtidas secções semifinas (700nm) e ultrafinas (70-90nm) no ultramicrotomo com o auxílio de navalha de diamante. As secções semifinas foram coradas com azul de toluidina 1% sobre placa aquecida. As secções ultrafinas foram coletadas em grades de cobre (300 mesh), contrastadas por 30min em acetato de uranila aquosa, lavadas com água destilada, contrastadas por 10min em citrato de chumbo e novamente lavadas. O material foi observado e fotografado com o auxílio do MET Zeiss EM 109.

3.2.6. Morfometria e análise estatística

As diferentes populações celulares do corpo gorduroso foram contadas e os diâmetros nucleares foram medidos nas secções histológicas em seis indivíduos nos três diferentes grupos de fêmeas de *A. aegypti* (item 3.1) com o auxílio do Programa Zeiss KS 300®. Os valores médios dos diâmetros nucleares foram comparados através da análise de variância (ANOVA) e do Teste de Tukey para comparações múltiplas, com o nível de significância de 5%.

3.3. Cultivo primário

3.3.1. Obtenção dos enócitos

Pupas com dois dias de idade foram lavadas em água estéril com detergente, imersas em solução de Hipoclorito de Sódio 1% por 5min, transferidas para a solução de Etanol 70% por mais 5 min, lavadas três vezes em água estéril, transferidas para o fluxo laminar e mantidas em PBS até a dissecação. A partir daqui todo o processo de dissecação foi realizado dentro do fluxo laminar e com o material esterilizado em autoclave a fim de evitar contaminação (adaptado de Lynn 2002).

As pupas foram dissecadas sobre lâminas em presença de meio de cultura IPL41 com antibiótico. O tórax e a cabeça foram separados do abdome com estiletes e pinças. Com o auxílio de estiletes, o abdome foi comprimido na região da cauda em direção à região próxima do tórax, para expulsar os órgãos viscerais juntamente com o corpo gorduroso. Diferente dos trofócitos, os enócitos são grandes, estão agrupados e não possuem gotículas lipídicas no citoplasma que brilham com a iluminação do estereoscópio, facilitando a separação das células. Os enócitos foram gentilmente coletados com o auxílio de micropipetas de 1-10 μ L.

Em nossos experimentos, foi utilizado o meio de cultura IPL41 (Sigma) suplementado com concentrado lipídico 0,1% (Gibco), concentrado de levedura 4% (Yeastolate - Gibco), ácido plurônico 1% (Gibco), triptose 1%, gentamicina 0,025% (Sigma), tetraciclina 0,025%, Fungizon (anfotericina B) 0,05% (Gibco) e estreptomincina/penicilina 0,025% (Sigma).

Após serem coletados, os enócitos foram inicialmente mantidos em meio de cultura em microtubos de centrífuga previamente tratados com Sigmacote[®] (Sigma). Células correspondentes a cinco indivíduos/microtubos (aproximadamente 100 células) foram centrifugadas no modo **pulse** até 5000rpm, lavadas e centrifugadas mais duas vezes com PBSx1. Após centrifugadas, as células foram ressuspensas em 10 μ L de IPL41. Os enócitos foram transferidos para lamínulas previamente tratadas com poli-L-lisina (Sigma) e mantidas em placas de seis poços (**wells**) à temperatura ambiente por uma hora, para permitir a adesão dos enócitos à lamínula; após, foram transferidos e mantidos em estufa a 28°C. Três vezes por semana 5 μ L de IPL41 foram adicionados em cada poço.

3.3.2. Viabilidade celular

Células mantidas em cultivo primário por 57 dias foram incubadas por uma hora com o corante laranja de acridina (**acridine orange** - Sigma) 0,001% em meio de cultura (adaptado de Warr 2004), e posteriormente lavadas duas vezes com meio de cultura. Lamínulas com células aderidas foram montadas com glicerol, e posteriormente, analisadas no microscópio de epifluorescência. O número de células provenientes de três poços (aproximadamente 300 células no total) com núcleo fluorescente foram contadas e comparadas com o número total de células.

Para análise morfológica de rotina, células foram fixadas com solução de etanol/ácido acético (3:1), lavadas com PBS por três vezes, coradas com Giemsa 0,01% por 12h, lavadas novamente com PBS, desidratadas em solução crescente de etanol, montadas com Entellan e fotografadas no microscópio óptico.

3.3.3. Microscopia laser confocal (MLC) - Marcação do citoesqueleto

Os enócitos foram fixados em paraformaldeído 4% em PBS, pH 7,2 por 30min. Após a fixação, as células foram lavadas três vezes em PBSx1 e incubadas com faloidina conjugada com FITC (Isotiocianato de fluoresceína - **Fluorescein Isothiocyanate**) (**Phalloidin-FITC** - Molecular Probes) 1:100 em PBS/Triton (1%) por duas horas. As lamínulas foram montadas com MOWIOL e analisadas no MLC Zeiss LSM 510 para visualização do citoesqueleto.

3.3.4. Microscopia eletrônica de varredura

Enócitos com dois dias em cultivo primário e aderidos em lamínulas foram fixados e pós-fixados como descrito no item 3.2.2. As lamínulas foram cortadas com auxílio de uma caneta de diamante e processadas para MEV como descrito no item 3.2.4.

3.3.5. Microscopia eletrônica de transmissão

Enócitos com dois dias em cultivo primário foram fixados e processados para MET como descrito no item 3.2.5. Após a fixação as células foram raspadas com auxílio de um microrrodo e transferidas para microtubos de centrifuga, sendo que em cada fase dessa preparação as células foram centrifugadas através de pequenos spins. A fim de preservá-las, as células foram incluídas com Epon em microtubos de centrifuga de 500 μ L.

3.4. Transcriptoma

3.4.1. Obtenção dos enócitos e extração de RNA

Pupas foram dissecadas dois dias após iniciarem a pupação como descrito no item 3.3.1, em presença de PBS. Após serem coletados, os enócitos foram centrifugados e mantidos em RNALater (Invitrogen) a -70°C até o momento da extração de RNA. Foram utilizadas cerca de 2500 células para a construção da biblioteca. O RNAm total foi extraído através do kit de extração MicroFastTrack (Invitrogen).

As células foram lisadas em 1mL de tampão de lise com 20 μ L de inibidor de RNAase do kit Micro-FastTrack (Invitrogen) por 30min a 45°C de acordo com manual do fabricante. Após extração do RNA a solução foi centrifugada por 25min, 10°C, em velocidade máxima e o sedimento (**pellet**) ressuscitado em 4 μ L do tampão de eluição (Invitrogen).

3.4.2. Obtenção da biblioteca de cDNA

O sedimento foi coletado e o RNAm (cerca de 400ng) retrotranscrito utilizando-se o kit SMART cDNA[®] (Clontech) e a enzima H-reverse transcriptase do kit Superscript II RNase (Invitrogen) e o iniciador (**primer**) CDS III/3' PCR (Clontech) por uma hora a 42°C para obtenção da fita molde. A síntese da fita complementar foi feita através de produtos da PCR utilizando o protocolo do kit SMART III (Clontech) com os respectivos iniciadores senso e o antisenso. O produto de amplificação possui dois sítios de clivagem, o **Sfi** I A e B, nas extremidades do cDNA. A amplificação da dupla fita do cDNA foi realizada em termo-ciclador utilizando o kit Advantage 2 PCR mix (Clontech) em dois tubos (tubo 1 e tubo 2) contendo alíquotas de 100 μ L da solução com o cDNA de cada tubo. A utilização de dois tubos

possibilita repetir o experimento diante da perda de um deles. As condições de amplificação foram as seguintes: 95°C por dois minutos; 26 ciclos a 95°C por 10s e 68°C por quatro minutos. Depois dos 10 primeiros ciclos alíquotas de 5µL dos produtos da PCR foram retiradas do tubo dois a cada dois ciclos de amplificação e mantidas no gelo. As alíquotas de 5µL foram submetidas à corrida no gel de agarose 1% com marcadores de peso molecular de 100-2000pb (pares de bases) como controle. O melhor ciclo foi aquele cujo produto de amplificação foi visto como um arraste no gel.

O produto da amplificação foi tratado imediatamente com proteinase K (0,8µg/µL) por 20min a 45°C. O cDNA foi purificado em mini-colunas Microcon YM-100 (Millipore-Amicon) através da adição de 500µL de água ultra-pura e posterior centrifugação a 1000rpm por 5-8min. Este procedimento foi repetido mais duas vezes para eluição do cDNA na coluna, tomando-se o cuidado para não deixar a coluna secar. Completou-se o volume da solução contendo cDNA coletado (5-9µL) para 79µL com água ultra-pura, seguido da digestão com a enzima *Sfi* I por duas horas a 50°C. O produto da digestão foi fracionado em colunas ChromaSpin 100 (Clontech).

Durante a passagem da solução pelas colunas de fracionamento, cada gota foi coletada separadamente em microtubos, totalizando 24 tubos, sendo uma gota por tubo (cada gota contém aproximadamente 40µL). Três µL de cada gota foram corridos em gel de agarose 1% por 40min a 80V, para avaliarmos o tamanho dos fragmentos obtidos em cada fração. As frações foram classificadas como contendo fragmentos pequenos, médios e grandes, sendo descartadas as frações contendo os menores fragmentos, que geralmente correspondente a RNA degradado. As frações contendo fragmentos de tamanhos aproximados foram reunidas em três frações: pequena, média e grande. As três frações foram purificadas novamente em mini-colunas Microcon YM-100 (Millipore-Amicon) e centrifugadas como descrito acima (Valenzuela et al. 2002).

Alíquotas de 4µL de cada amostra de cDNA foram submetidas ao processo de inserção no vetor fago *Lambda TriplEx2* (Clontech) a 16°C durante à noite (12h). O produto da ligação foi empacotado através do kit *Gigapack Gold III* (Stratagene) por uma hora e 45min à temperatura ambiente. Após a montagem, 20µL de clorofórmio foi adicionado em cada uma das bibliotecas (pequena, média e grande) a fim de prevenir a proliferação de bactérias e as bibliotecas foram mantidas a 4°C.

As bibliotecas foram plaqueadas através da infecção de *Escherichia coli* XL1 MRF' *cells* (Clontech) na fase logarítmica, cultivadas previamente *overnight* em meio LB. Dois µL de cada biblioteca foram adicionados a 500µL de *E. coli* XL1 em solução de MgSO₄ 10nm, na

densidade ótica de 0,5 em 600nm. Em seguida foram incubadas por 15min a 37°C e plaqueadas em meio LB com ágar e crescidas a 37°C **overnight**. Amostras das placas-de-lise (**plaques**) de cor branca foram coletadas com o auxílio de palitos de madeira esterilizados e diluídas em 100µL de água ultrapura contidas em placas de 96 poços. Quatro µL de algumas dessas amostras foram utilizados para análise através da PCR com iniciadores que se anelam com o vetor para verificarmos o tamanho dos insertos. Após a PCR, as amostras foram visualizadas em gel de agarose com Brometo de Etídeo 0,001%. Foram utilizados o iniciador PT2F1 (5'- AAGTACTCTAGCAATTGTGAGC-3') o qual flanqueia na região **upstream** ou extremidade 5' do cDNA e o iniciador PT2R1 (5'-CTCTTCGCTATTACGCCAGCTG-3'), que se posiciona na região **downstream** (extremidade 3') do cDNA. Pelo menos oito amostras das bibliotecas com fragmentos pequenos, médios e grandes foram avaliadas, para confirmação dos respectivos tamanhos dos fragmentos (Fig. 2) (Valenzuela et al. 2002).

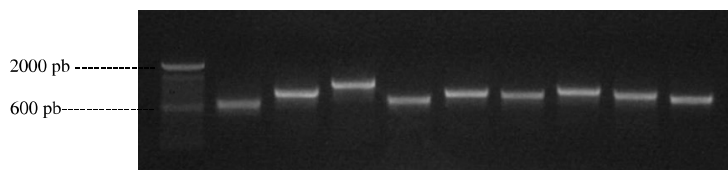


Figura 2: Gel de agarose corado por brometo de etídeo mostrando diferentes bandas correspondentes aos produtos da amplificação de cDNAs provenientes da biblioteca de fragmentos grandes. A primeira coluna da esquerda corresponde ao peso molecular (bp - pares de bases).

3.4.3. Seqüenciamento e análise da biblioteca de cDNA

Foram coletadas aproximadamente 230 alíquotas de cada uma das três bibliotecas. Alíquotas de 5µL de cada poço foram usadas como molde para a reação de PCR para amplificação randômica do cDNA pelos iniciadores PT2F1 e PT2R1. O reagente Gotaq[®] (Promega) foi utilizado para as PCRs e os produtos serviram como molde para a reação de seqüenciamento. Após as PCRs, uma etapa de purificação foi feita através do sistema de filtragem Millipore (Vacuum Genomics Plate PCR Purify Millipore Plates). Após a limpeza, 5µL de cada produto das PCRs foram usados para a reação de seqüenciamento juntamente com BigDye[®] (Applied Biosystem). O iniciador PT2F3 (5'-TCTCGGGAAGCGGCCATTGT-3') que foi usado durante o seqüenciamento anela-se na

região **upstream** do inserto e **downstream** do iniciador PT2F1 (Valenzuela et al. 2002). O produto da reação de seqüenciamento foi precipitado com etanol e as amostras secas foram imediatamente ressuspensas com 25µl de formamida ultra-pura (Sigma) e seqüenciadas no seqüenciador de DNA ABI3730XL (Applied Biosystem).

As seqüências em formato FASTA foram analisadas e editadas com o auxílio do Programa **Seqman**[™] (DNASTar) e os **contigs** resultantes (>80 nucleotídeos) foram comparados com banco de dados de *A. aegypti* do **VectorBase** (www.vectorbase.org) manualmente através da ferramenta **Blastn**, considerando os valores de E (**Expected value**) >5. Os resultados foram submetidos ao banco de dados do **Gene Ontology** [GO, www.geneontology.org (**Molecular Function**)], **InterPro** (www.ebi.ac.uk/interpro) e também foram utilizados artigos científicos para se atribuir funções às proteínas preditas correspondentes aos transcritos.

Todas as **ESTs** foram depositadas no banco de dados **dbEST** do **NCBI** (<http://www.ncbi.nlm.gov/dbEST/>) recebendo número de acesso no intervalo FE425950-FE426452.

4. Resultados

4.1. Estudo comparativo do corpo gorduroso de fêmeas de *A. aegypti* de diferentes idades e em distintas condições alimentares

4.1.1. Microscopia eletrônica de varredura

As análises no MEV mostram que o corpo gorduroso abdominal de *A. aegypti* é um órgão amorfo, localizado logo abaixo do tegumento e pode ser dividido em dorsal, ventral e lateral, de acordo com a localização. Em geral, o corpo gorduroso apresenta várias expansões ou lóbulos, que se projetam do tegumento em direção aos órgãos viscerais e sistema nervoso (Figuras 3-4).

Nas fêmeas recém-emergidas, a porção lateral do corpo gorduroso é proeminente, composta por vários lóbulos cilíndricos em paralelo, refletindo a segmentação corpórea do inseto. Diferente dos lóbulos laterais, os lóbulos dorsais e ventrais são poucos desenvolvidos e menos organizados (Fig. 3a).

Os lóbulos do corpo gorduroso são delimitados por uma delicada lâmina basal, que apresenta a superfície sinuosa devido às células do corpo gorduroso contidas logo abaixo dela (Figs. 3b). Durante a dissecação e o processamento do corpo gorduroso, a lâmina basal de alguns lóbulos foi perdida expondo o interior do órgão, possibilitando visualizar células. Essas células são globulares e formam uma camada multiextratificada entre a lâmina basal e o tegumento (Fig. 3c).

Em fêmeas com 18 dias de idade e alimentadas com açúcar (referidas nesse trabalho como fêmeas alimentadas com açúcar), o corpo gorduroso está mais desenvolvido do que nas demais fêmeas. A porção lateral do corpo gorduroso mantém o arranjo paralelo e é mais desenvolvida que as porções ventral e dorsal. A membrana basal se torna menos irregular, mas alguns lóbulos apresentam irregularidades na superfície, incluindo protuberâncias celulares. Várias traquéias são vistas no corpo gorduroso deste grupo e algumas penetram no órgão (Figs. 4a-c).

Após a alimentação sangüínea, o corpo gorduroso se torna achatado, e a configuração paralela dos lóbulos se torna evidente em ambas as porções do órgão (Fig. 4-5a). O achatamento do corpo gorduroso é maior nas fêmeas de quatro dias ou com 96h após a alimentação sangüínea (referidas nesse trabalho como fêmeas alimentadas com sangue) em comparação às fêmeas de 18h. Nesse grupo de 18h, ainda é possível observar a presença das

proeminências das células na membrana basal do corpo gorduroso. Quatro dias após a alimentação sangüínea, a lâmina basal está repleta de dobras (Figs. 6a-c).

Figura 3. Micrografia eletrônica de varredura do corpo gorduroso de fêmeas de *A. aegypti* recém-emergidas.

a) Micrografia mostrando a face interna do abdome. Notar os lóbulos (lb) do corpo gorduroso de diferentes tamanhos adjacentes ao tegumento (T). Os lóbulos laterais (ll) apresentam uma organização paralela. Seta - lóbulo pouco desenvolvido; c - coração; d - região dorsal; p - pleura; v - região ventral. Barra = 200 μ m.

b) Detalhe do lóbulo do corpo gorduroso. Notar as irregularidades da superfície da lâmina basal (b) refletindo o formato globular das células (c) no interior do corpo gorduroso. t - traquéia. Barra = 40 μ m.

c) Micrografia mostrando o interior de um lóbulo do corpo gorduroso, cuja lâmina basal está ausente, com células (c) de diferentes tamanhos. Barra = 10 μ m.

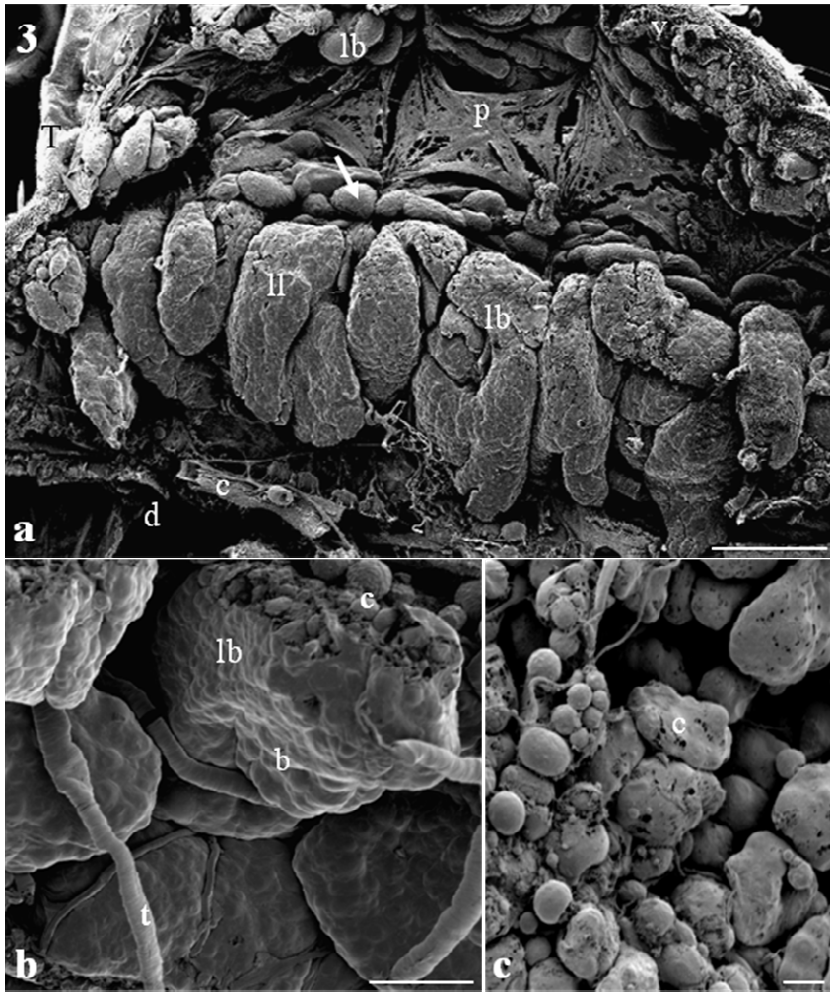
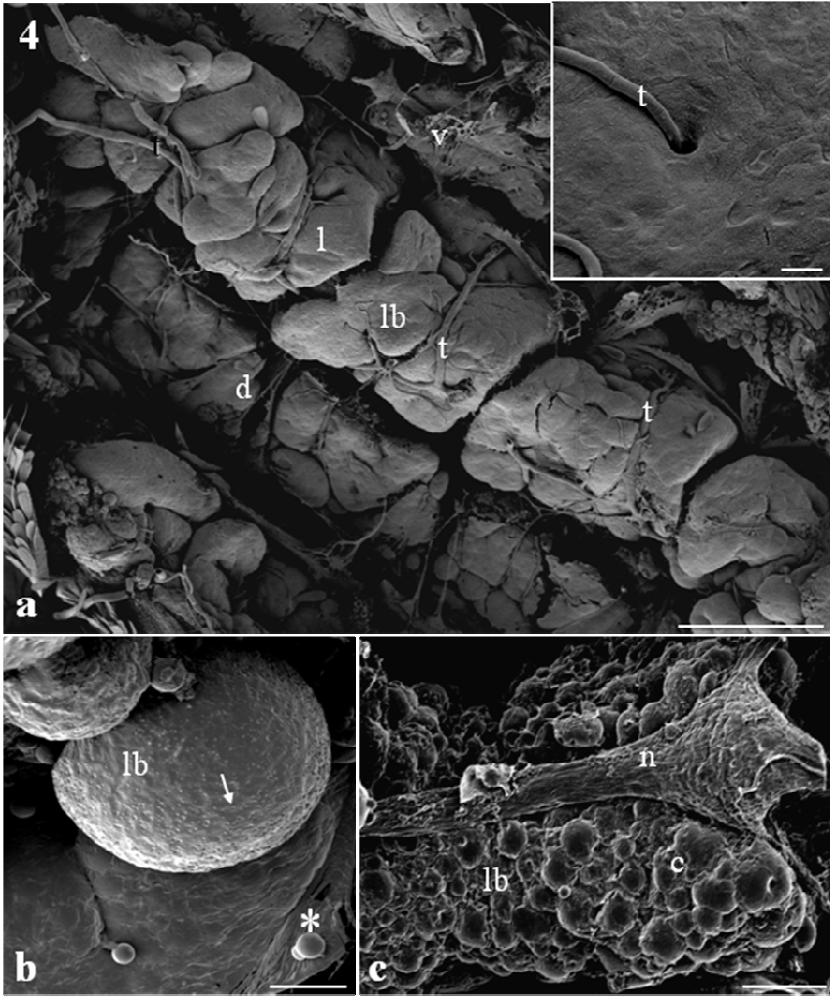


Figura 4. Micrografia eletrônica de varredura do corpo gorduroso de fêmeas de *A. aegypti* com 18 dias de idade alimentadas com açúcar.

a) Interior do abdome mostrando a distribuição do corpo gorduroso ao longo da superfície interna da parede do corpo. Notar os lóbulos (lb) de diferentes tamanhos e formas. d - região dorsal; t - traquéia; v - região ventral. Barra = 300 μ m. Detalhe: traquéia (t) penetrando no órgão. Barra = 10 μ m.

b) Detalhe de um lóbulo (lb) cuja lâmina basal apresenta uma superfície irregular com depressões (seta) na superfície e com algumas células aderidas (*). Barra = 30 μ m.

c) Detalhe de dois lóbulos (lb) adjacentes ao sistema nervoso ventral (n). c - célula do corpo gorduroso. Barra = 30 μ m.



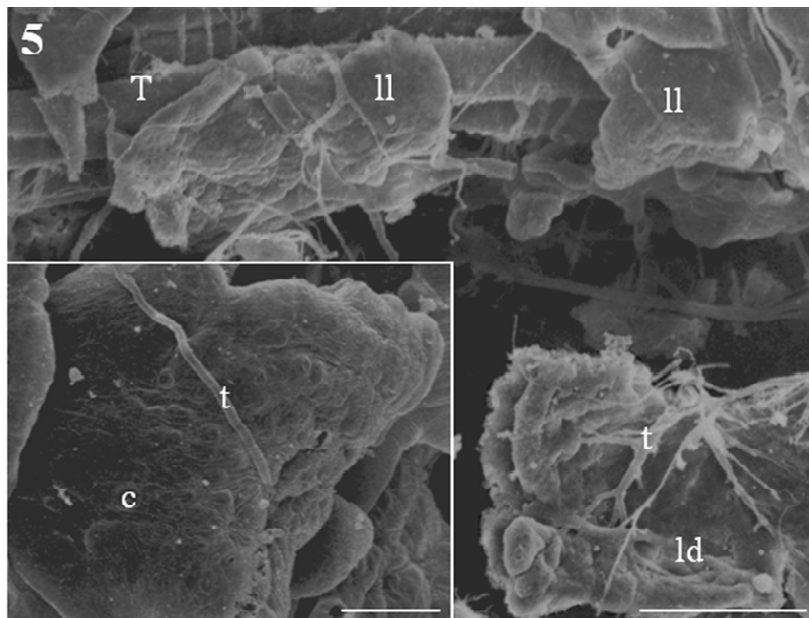


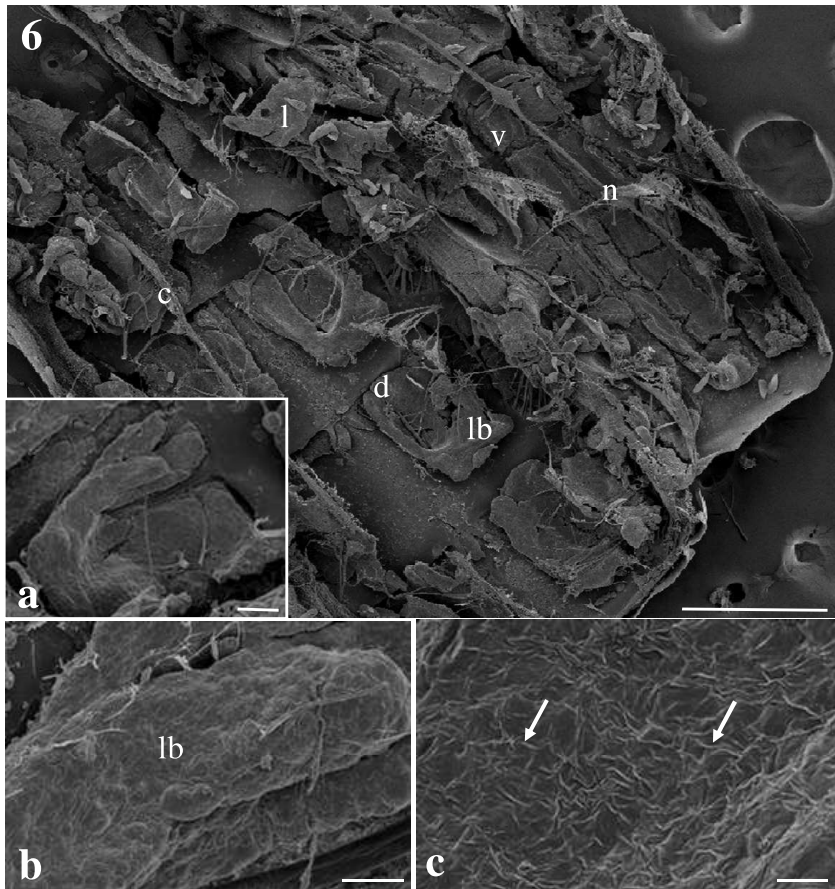
Figura 5. Micrografia eletrônica de varredura do corpo gorduroso de fêmeas de *A. aegypti* 18h após a alimentação sangüínea. Observe a distribuição de lóbulos laterais (ll) espaçados. Em detalhe, um lóbulo lateral com protuberâncias que correspondem às células (c) abaixo da lâmina basal. ld - lóbulo dorsal; T - tegumento; t - traquéia. Barra = 100 μ m e 25 μ m (detalhe).

Figura 6. Micrografia eletrônica de varredura do corpo gorduroso de fêmeas de *A. aegypti* quatro dias após a alimentação sangüínea.

a) Interior do abdome mostrando os lóbulos achatados (lb) do corpo gorduroso. d - região dorsal; c - coração; n- sistema nervoso; v - região ventral. Barra = 200 μ m. Detalhe: lóbulo com aspecto achatado. Barra = 60 μ m.

b) Detalhe de um lóbulo lateral (l) com a superfície enrugada. Barra = 30 μ m.

c) Detalhe da lâmina basal recobrimdo o corpo gorduroso. Observar a superfície enrugada da lamina basal, que também apresenta dobras (setas). Barra = 10 μ m.



4.1.2. Histologia e histoquímica

As observações histológicas mostram que o corpo gorduroso do *A. aegypti* é formado por um conjunto de células localizadas abaixo do tegumento, de espessuras variadas ao longo da cavidade abdominal. O corpo gorduroso pode ser observado separado das vísceras pelos músculos intersegmentares, ou pode estar diretamente em contato com os túbulos de Malpighi e/ou com componentes do sistema digestivo (Figs. 7a-c).

Os trofócitos e os enócitos são os dois tipos celulares reconhecidos no corpo gorduroso (Figs. 7c-d). A porcentagem de enócitos presentes no corpo gorduroso é em média 8%, sendo independente da idade ou da condição alimentar. Os trofócitos apresentam formato globular, núcleo pleomórfico e o citoplasma preenchido principalmente por gotículas de lipídio. Os enócitos possuem o núcleo grande e centralizado, enquanto o citoplasma é homogêneo (ou seja sem granulações) em comparação com os trofócitos. Em geral, os enócitos se localizam próximos uns dos outros, posicionando-se principalmente na periferia do corpo gorduroso, mas alguns poucos podem ser vistos no interior do órgão. Ambos os tipos celulares apresentam um nucléolo desenvolvido, contudo, os enócitos podem apresentar prolongamentos celulares (Fig. 7d).

As técnicas histoquímicas mostram os enócitos distintos dos trofócitos. No corpo gorduroso das fêmeas recém-emergidas e em fêmeas com quatro dias após a alimentação sanguínea, a técnica do PAS, específica para carboidratos, cora fortemente os trofócitos (Fig. 7e). Contudo, nas fêmeas alimentadas com açúcar, os trofócitos são fracamente positivos. Por outro lado, os enócitos são negativos para a técnica do PAS (Fig. 7e).

A coloração pelo azul de bromofenol, específica para proteínas totais, mostra vários grânulos protéicos no citoplasma dos trofócitos das fêmeas recém-emergidas. Esses grânulos apresentam uma coloração mais intensa da periferia para o centro (Fig. 8a). Nas fêmeas alimentadas com açúcar e com sangue, os trofócitos apresentam poucos grânulos positivos para proteínas e estes são bem menores que os observados após a emergência (Fig. 8b). Em ambos os grupos estudados, os enócitos se coram uniforme e fortemente para proteínas, dificultando a distinção morfológica entre o núcleo e o citoplasma (Figs. 8a-b).

A impregnação por ósmio, específica para lipídios, mostra que os trofócitos de *A. aegypti* apresentam um citoplasma rico em gotículas lipídicas. Nas fêmeas recém-emergidas e alimentadas com sangue (dados não mostrados) as gotículas são morfológicamente esféricas e menores em comparação com as observadas nas fêmeas alimentadas com açúcar (Figs. 8c-d). A técnica não mostra a presença de gotículas lipídicas nos enócitos, porém

essas células se coram uniforme e intensamente pela impregnação por ósmio, semelhante ao observado para proteínas (Figs. 8c-d).

Figura 7. Secções histológicas mostrando alguns aspectos gerais e outros detalhados do corpo gorduroso de fêmea de *Aedes aegypti* recém-emergida.

a) Secção longitudinal do abdome mostrando a distribuição do corpo gorduroso (cg) abaixo do tegumento (tg) abdominal. e - epitélio do intestino médio; h - hemocele; m - músculo intersegmentar; tm - túbulos de Malpighi. Barra = 1mm.

b) Porção abdominal do corpo gorduroso (cg) em contato ou separado dos órgãos viscerais através dos músculos intersegmentares (m). tg - tegumento; tm - túbulos de Malpighi. Barra = 200µm.

c) Porção abdominal do corpo gorduroso mostrando estruturas intracitoplasmáticas nos trofócitos (t) que não se coram pelo azul de toluidina e os enócitos (e). Os enócitos se localizam principalmente na periferia do corpo gorduroso. m - músculo; T - traquéia. Barra = 100µm.

d) Trofócitos (t) e os enócitos (e) corados pela reação de Feulgen e contracorados pelo verde rápido. Os enócitos apresentam núcleo (N) central e prolongamentos (*). O nucléolo (seta) pode ser facilmente observado em ambos os tipos celulares. Barra = 30µm.

e) Lóbulo do corpo gorduroso mostrando trofócitos (t) PAS-positivos e enócitos (e) PAS-negativos. l - estrutura PAS-negativa correspondente a gotículas de lipídio; T - traquéia. Barra = 30µm.

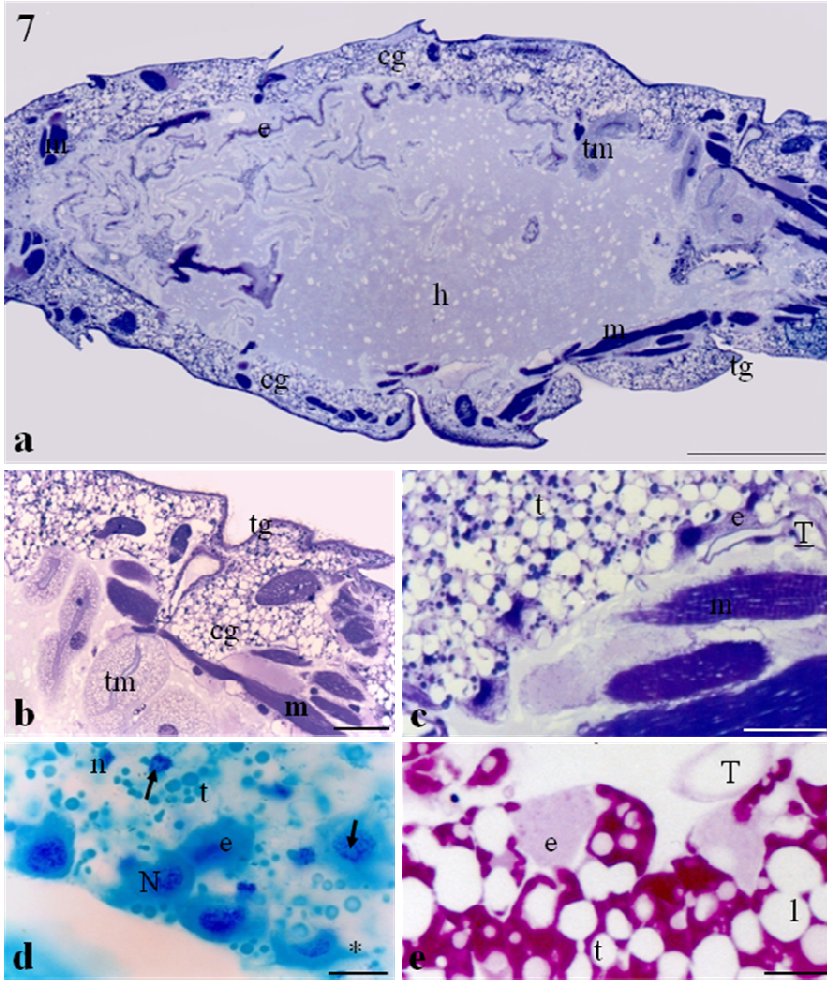


Figura 8. Secções histológicas mostrando detalhes do corpo gorduroso de fêmeas de *A. aegypti* submetido à coloração por azul de bromofenol e à impregnação por ósmio.

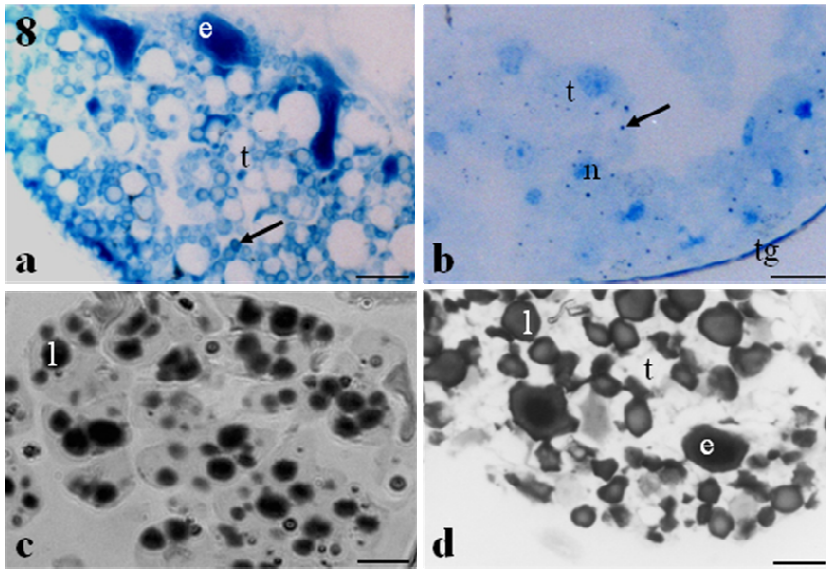
Figuras 8a-c. Detalhes do corpo gorduroso abdominal de fêmeas de *A. aegypti* recém-emergidas.

a) Trofócitos (t) com grânulos protéicos (setas) com diferentes tonalidades de coloração pelo azul de bromofenol. Note que os enócitos (e) são uniforme e fortemente corados pela técnica, sendo difícil distinguir o núcleo do citoplasma. Barra = 40µm.

b) Trofócitos (t) com pequenos grânulos protéicos (seta). tg- tegumento; n- núcleo do trofócito. Barra = 60µm.

c) Trofócitos com inclusões osmiofílicas que correspondem às gotículas de lipídio (l). Barra = 40µm.

Figura 8d. Detalhes do corpo gorduroso abdominal de fêmeas de *A. aegypti* alimentadas com açúcar, submetido à impregnação por ósmio. Notar os trofócitos (t) com gotículas de lipídio (l) desenvolvidas e os enócitos (e) com o citoplasma uniformemente marcado por ósmio. Barra = 40µm.



4.1.3. Microscopia eletrônica de transmissão

Nas fêmeas recém-emergidas, os trofócitos apresentam o citoplasma preenchido por gotículas lipídicas, grânulos de proteínas, partículas de glicogênio e ribossomos. O núcleo é polimórfico, apresenta um nucléolo evidente, e está acomodado entre as inclusões citoplasmáticas. As mitocôndrias são vistas principalmente em torno do núcleo, próximas às gotículas de lipídio ou abaixo da membrana citoplasmática. O RER e o complexo de Golgi também são vistos nessa fase (Figs. 9a-c).

Em todos três grupos de fêmeas estudadas, os enócitos são células elétron-densas com a membrana citoplasmática possuindo várias dobras ou invaginações. O citoplasma dos enócitos é rico em mitocôndrias e o núcleo apresenta cromatina condensada concentrada principalmente na periferia nuclear. No citoplasma dessas células existem regiões onde se concentram sistemas de membranas intracelulares bem desenvolvidos, semelhantes ao retículo endoplasmático liso (REL) (Figs. 9d-e, 10f).

Nas fêmeas alimentadas com açúcar, o citoplasma dos trofócitos é quase todo preenchido por gotículas de lipídio, as organelas são pouco desenvolvidas, as mitocôndrias apresentam um perfil dilatado com as cristas reduzidas, o glicogênio e os ribossomos estão escassos. O núcleo e o nucléolo estão bem desenvolvidos, porém, o núcleo tem a forma bem irregular ou “espremido” entre as gotículas de lipídio (Figs. 9f, 10a).

Nas fêmeas alimentadas com sangue, os trofócitos possuem um citoplasma rico em glicogênio e as gotículas de lipídio são menores que as encontradas nos trofócitos das fêmeas alimentadas com açúcar. Entretanto, aqui as gotículas de lipídio estão mais desenvolvidas que nas fêmeas recém-emergidas. Em comparação com os outros dois grupos, o citoplasma das fêmeas alimentadas com sangue é rico em mitocôndrias dilatadas com cristas desenvolvidas. Corpos elétron-densos, semelhantes a lisossomos e contendo material fibroso, são comuns nos trofócitos desse grupo de fêmeas (Fig. 10c-d).

Em ambas as fêmeas alimentadas, a membrana citoplasmática dos enócitos é repleta de invaginações, principalmente as da região voltada para a hemolinfa. Porém, as invaginações estão mais desenvolvidas nas fêmeas alimentadas com sangue, que nas fêmeas recém-emergidas (Fig. 10e).

Figura 9. Micrografia eletrônica de transmissão do corpo gorduroso de fêmeas de *Aedes aegypti*.

Figuras 9a-e. Corpo gorduroso de fêmeas recém-emergidas.

a) Micrografia dos trofócitos com o citoplasma contendo gotículas lipídicas (L) e grânulos de proteína (p). A ponta da seta indica a lâmina basal e as setas indicam regiões do citoplasma com organelas e ribossomos agrupados. * - nucléolo; N - núcleo do trofócito. Barra = 5 μ m.

b) Detalhe do citoplasma do trofócito com o retículo endoplasmático rugoso (RER) e a membrana do envoltório nuclear (en) com ribossomos aderidos na sua face externa (seta). c - cromatina condensada; g - grânulo de glicogênio; N - núcleo. Barra = 250nm.

c) Região citoplasmática do trofócito onde o complexo de Golgi (G) e mitocôndria (m) podem ser vistos. Duas diferentes regiões podem ser distinguidas: uma preenchida por ribossomos (r) e outra por grânulos de glicogênio (g) em formato de roseta. L - gotícula de lipídio. Barra = 0,3 μ m.

d) Região de contato (*) entre dois enócitos (e) com invaginações na membrana citoplasmática (setas). Barra = 0,5 μ m. Detalhe: visão geral de um enócito com um citoplasma bastante elétron-denso e com várias invaginações (regiões elétron-lúcidas) na membrana citoplasmática (setas). N - núcleo do enócito. Barra = 2 μ m.

e) Região de contato entre um trofócito (t) e um enócito (e) sem a presença de estrutura de adesão entre eles. Seta - envelope nuclear do enócito com ribossomos aderidos; * - membrana citoplasmática do trofócito; c - cromatina condensada; g - grânulo de glicogênio; m - mitocôndria; N - núcleo do enócito; e - enócito; t - trofócito. Barra = 0,3 μ m.

Figura 9f. Corpo gorduroso de fêmea alimentada com açúcar. Notar o citoplasma dos trofócitos preenchido basicamente por gotículas de lipídio (L). Notar a escassez de organelas e grânulos de glicogênio. Barra = 4 μ m.

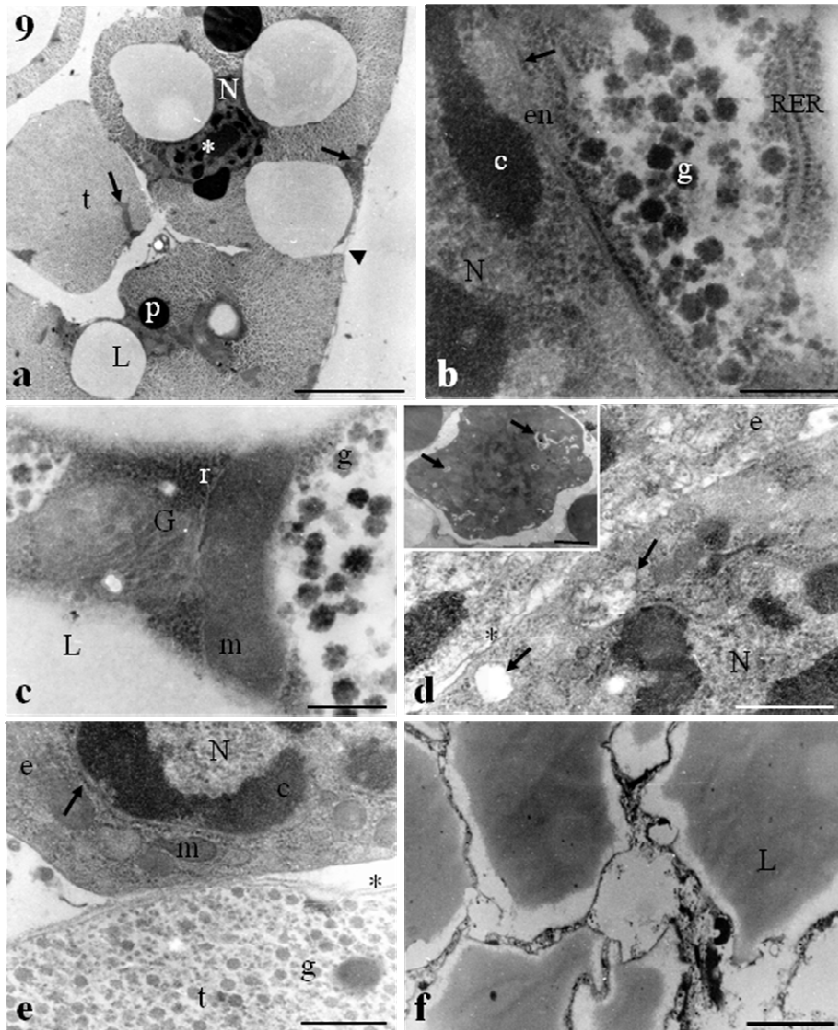


Figura 10. Micrografia eletrônica de transmissão do corpo gorduroso de fêmeas de *Aedes aegypti*.

Figuras 10a-b. Corpo gorduroso de fêmeas alimentadas com açúcar.

a) Núcleo do trofócito (N) acomodado entre as gotículas de lipídio (L) e com um nucléolo desenvolvido (*). L - gotícula de lipídio; m - mitocôndria. Barra = 1 μ m.

b) citoplasma do trofócito com mitocôndrias (m) próximas à gotícula de lipídio (L) e com cristas reduzidas e com um retículo endoplasmático rugoso (RER) pouco desenvolvido. Notar a presença de um grânulo protéico (seta) também pouco desenvolvido. g - grânulo de glicogênio. Barra = 0,5 μ m.

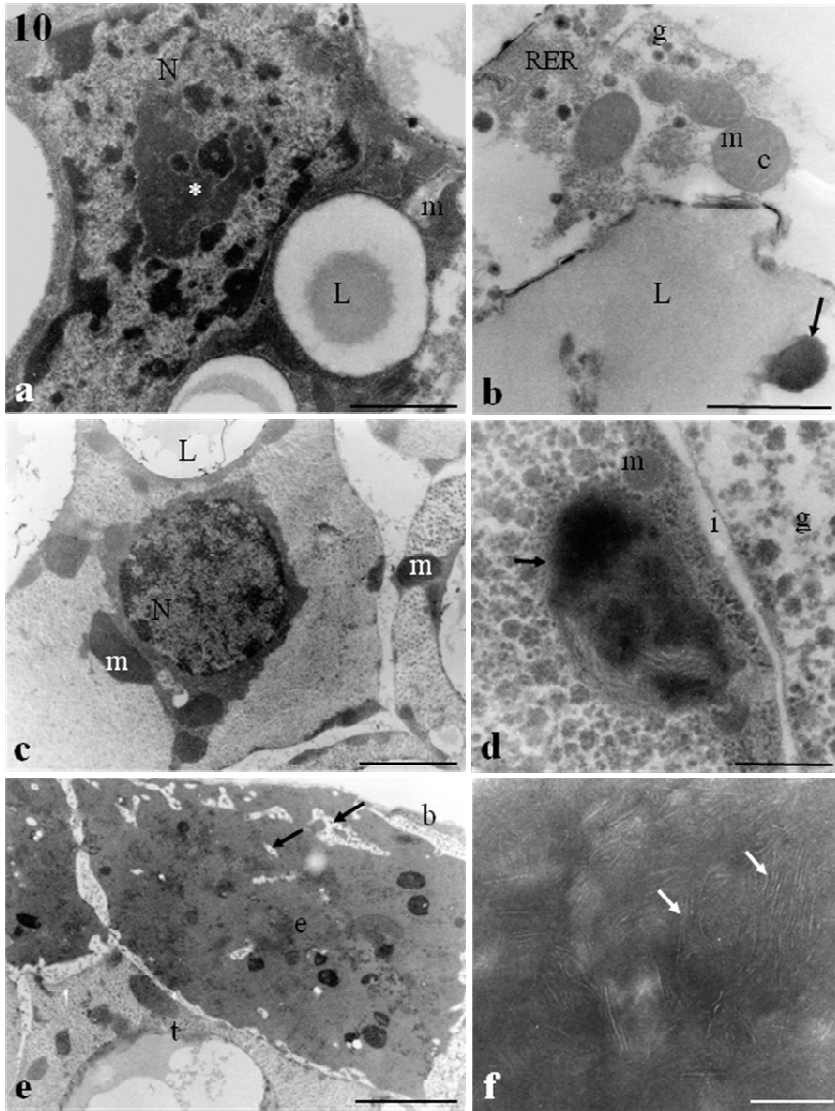
Figuras 10c-f. Corpo gorduroso de fêmeas quatro dias após a alimentação sangüínea.

c) Trofócito com um núcleo esférico (N). Notar que as mitocôndrias (m) estão concentradas em torno do núcleo ou próximas à membrana citoplasmática. L - gotícula de lipídio. Barra = 2 μ m.

d) Detalhe de um trofócito apresentando estruturas elétron-densas semelhantes a lisossomos (seta) contendo material fibroso no seu interior. Provavelmente essa estrutura representa um endossomo envolvido com a reciclagem de organelas. g - grânulo de glicogênio; i - espaço intercelular. Barra = 0,5 μ m.

e) Enócitos (e) na periferia do corpo gorduroso e com várias invaginações na membrana citoplasmática (setas) na interface com a hemolinfa. b - lâmina basal; t - trofócito. Barra = 3 μ m.

f) Detalhe mostrando o retículo endoplasmático liso no citoplasma do enócito. Setas - cisternas do retículo endoplasmático liso. Barra = 100nm.



4.1.4. Morfometria

As medições do diâmetro do núcleo dos trofócitos e dos enócitos das fêmeas de *A. aegypti* estão representadas na Tabela 1.

Nas fêmeas recém-emergidas, o diâmetro nuclear dos trofócitos é menor que nos outros dois grupos ($p < 0,001$), sendo maior nas fêmeas alimentadas com açúcar em relação às fêmeas alimentadas com sangue ($p < 0,01$) (Tab. 1).

O diâmetro nuclear dos enócitos não se difere significativamente nas fêmeas recém-emergidas em comparação com as fêmeas alimentadas com açúcar ($p > 0,05$), enquanto que o diâmetro nuclear dos enócitos de fêmeas recém-emergidas é maior que o de fêmeas alimentadas com sangue ($p < 0,005$). Nas fêmeas alimentadas com açúcar, o núcleo dos enócitos também é maior que das fêmeas alimentadas com sangue ($p < 0,01$) (Tab. 1).

Tabela1: Diâmetro nuclear dos trofócitos e enócitos dos diferentes grupos de fêmeas de *A. aegypti* estudados. De acordo com o teste de Tukey: $a < c < b$; $d = e > f$. n - número ou quantidade.

Diâmetro nuclear (μm) (média \pm desvio padrão)	Fêmeas (n = 6)		
	Recém-emergidas	18 dias de idade	
		Alimentadas com açúcar	Quatro dias após a alimentação sanguínea
Trofócitos	13,55 \pm 2,23 ^a (n = 241)	17,06 \pm 2,93 ^b (n = 249)	15,65 \pm 2,49 ^c (n = 229)
Enócitos	20,42 \pm 2,53 ^d (n = 40)	19,16 \pm 3,12 ^e (n = 30)	14,51 \pm 2,17 ^f (n = 22)

4.2. O cultivo primário dos enócitos

Dois dias após iniciado o cultivo primário, os enócitos consistem grupos de 3-9 células envolvidas por uma lâmina basal (Fig. 11a). Algumas vezes a lâmina basal foi parcial ou totalmente perdida durante a purificação das células, possibilitando visualizar suas superfícies, ou até mesmo que os enócitos ficassem isolados (Figs. 11b-c).

Os enócitos apresentam uma superfície celular apical com poucas irregularidades e às vezes com alguns restos celulares aderidos (Fig. 11c). Entretanto, os enócitos apresentam na região basal várias expansões delicadas, os lamelipódios, que formam o contorno celular (Figs. 11b-c). Além dos lamelipódios, os enócitos possuem filopódios como especializações da membrana citoplasmática, os quais são também evidenciados após a marcação por faloidina-FITC (Figs 12a).

Os enócitos apresentam um núcleo central com um nucléolo bem desenvolvido. Tanto nas análises no microscópio confocal quanto nas secções semifinas, o citoplasma dos enócitos apresentam regiões semelhantes à vesículas que não se coram por nenhuma das técnicas empregadas (Figs. 12b-c). Ao MET essas estruturas apresentam diferentes tamanhos e são providas de membrana (Fig. 12d). Os enócitos também possuem o envoltório nuclear repleto de polirribossomos e um citoplasma quase todo preenchido pelo REL (Figs. 12d-e).

Enócitos com 57 dias em cultivo primário foram incubados com laranja de acridina a fim de se investigar a viabilidade celular. Foram analisadas aproximadamente 300 células provenientes de três poços. A porcentagem de células viáveis foi de 85% (dados não apresentados). A morfologia das mesmas também foi verificada através do microscópio invertido de contraste de fase e da coloração por Giemsa. Nessa fase do cultivo primário, os enócitos ainda são células ovais, agrupadas e com o núcleo centralizado, semelhante aos enócitos observados no início do cultivo primário. Porém, algumas células apresentam o citoplasma com estruturas grandes semelhantes a vacúolos (Figs. 13a-b).

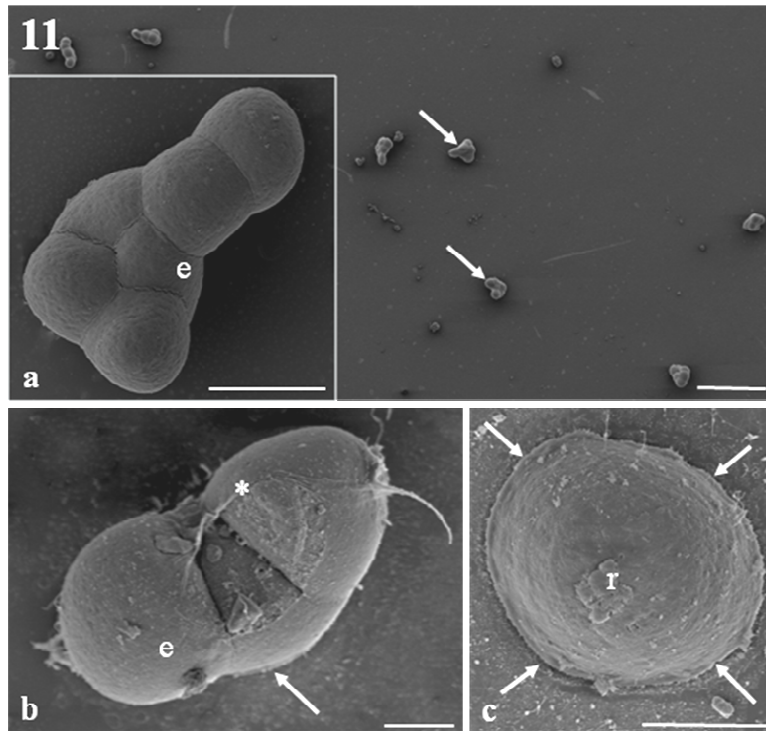


Figura 11. Micrografia eletrônica de varredura dos enócitos pupais de *A. aegypti* dois dias em cultivo primário.

- a) Grupos de enócitos (setas) aderidos ao substrato. Barra = 400 μ m. O detalhe mostra um grupo de enócitos ovais (e) recobertos pela lâmina basal. Barra = 50 μ m.
- b) Três enócitos (e) agrupados. Nessa preparação a lâmina basal (*) foi fraturada, expondo a superfície celular. A seta mostra o lamelipódio na região basal das células. Barra = 20 μ m.
- c) Enócito isolado e desprovido da lâmina basal. Notar a presença do lamelipódio (setas). r – resto celular. Barra = 20 μ m.

Figura 12. Enócitos pupais de *A. aegypti* dois dias em cultivo primário.

Figuras 12a-b. Marcação do citoesqueleto por faloidina-FITC e posterior análise no MLC.

a) Região basal dos enócitos (e) onde é possível observar vários filopódios (f) estendidos sob o substrato. Barra = 20 μ m. O detalhe mostra um filopódio (f). Barra = 2 μ m.

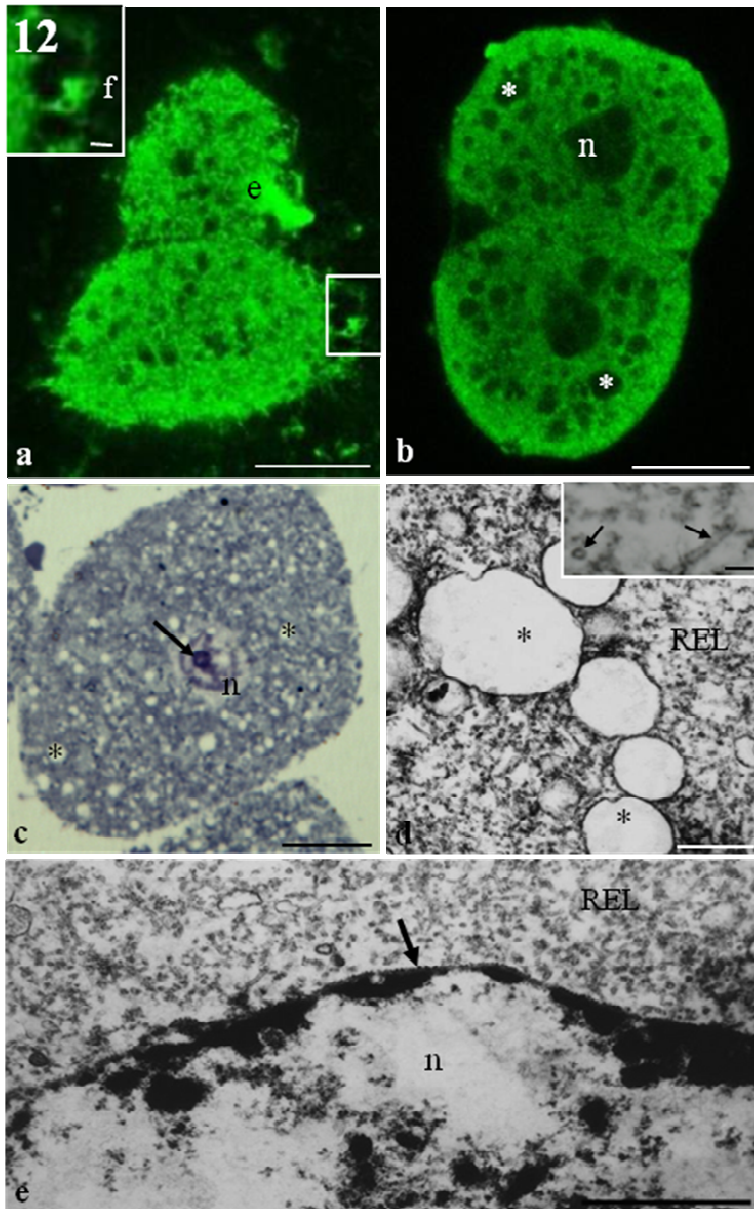
b) Região mediana. Notar a presença de estruturas semelhantes à vesículas (*) no interior do citoplasma. n - núcleo. Barra = 20 μ m.

Figura 12c. Secção semi-fina corada pelo azul de toluidina. Note a presença do núcleo centralizado (n) com um nucléolo desenvolvido (seta). O citoplasma apresenta regiões semelhantes à vesículas (*) que não se coram. Barra = 20 μ m.

Figuras 12d-e. Micrografia eletrônica transmissão dos enócitos.

d) Citoplasma com estruturas semelhantes às vesículas e que estão próximas do sistema tubular formado pelo REL. Barra = 0,3 μ m. O detalhe mostra as cisternas (setas) do REL. Barra = 66nm.

e) Região intermediária entre o núcleo (n) e o citoplasma mostrando o REL que preenche quase todo o citoplasma. Notar os poliribossomos (seta) associados ao envoltório nuclear. Barra = 1 μ m.



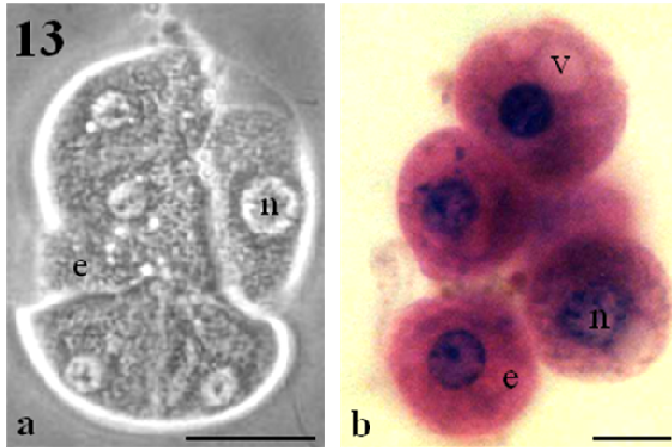


Figura 13. Enócitos pupais de *A. aegypti* em cultivo primário por 57 dias.

Figura 13a. Grupo de enócitos (e) observado no microscópio invertido de fase antes da marcação por laranja de acridina. Barra = 50 μ m.

Figura 13b. Morfologia dos enócitos (e) corados por Giemsa. Notar que algumas células possuem estruturas semelhantes a vacúolos. Essas provavelmente correspondem às células não viáveis. n - núcleo do enócito; v - vacúolo. Barra = 30 μ m.

4.6. Transcriptoma

Aproximadamente 2.500 enócitos de pupas de *A. aegypti* foram necessários para a construção da biblioteca de cDNA, sendo esta quantidade necessária para a obtenção de bibliotecas obtidas a partir de células de glândulas salivares de flebotomíneos (Ramalho-Ortigão - comunicação pessoal). Após o seqüenciamento unidirecional de 687 amostras aleatórias obtidas a partir das três bibliotecas (com fragmentos de cDNA pequenos, médios e grandes), as seqüências foram editadas manualmente e agrupadas em 314 **contigs**, dos quais 236 são **singletons** (**contigs** formados por uma única seqüência) (Tab. 3, Anexo 1).

A distribuição relativa dos transcritos encontrados nos enócitos de *A. aegypti* está indicada na Figura 14. O total de transcritos (22,50%) que reflete a função dos enócitos está distribuído da seguinte forma: 8,01% deles codificam a enzima citocromo P450 (P450); 4,19% codificam outros tipos de proteínas associadas a processos de desintoxicação, como por exemplo, a álcool desidrogenase (três transcritos) e a catalase (dois transcritos); 8,39% codificam outras proteínas do metabolismo de lipídios, como a sintase de ácido graxo e a elongase e 1,91% codificam proteínas da imunidade inata como lisozimas (seis transcritos) e serino-proteases (dois transcritos) (Fig. 14; Tab. 2; Tab. 3, Anexo 1).

Dos transcritos expressos constitutivamente, aproximadamente 18% deles codificam proteínas ribossomais; 8,39% codificam proteínas do metabolismo nuclear (topoisomerasas, fatores de transcrição e nucleases), sendo as proteínas com o domínio **zinc finger** (“dedo de zinco”) uma das que prevalece nessa categoria (14 **ESTs**); 8,97% codificam proteínas envolvidas com o processamento e degradação de proteínas, incluindo oito transcritos para proteínas do proteossomo, além de proteínas lisossomais, catepsinas e ubiquitinas; 4,00% codificam proteínas com papel no metabolismo energético (por exemplo, NADH desidrogenase e citocromo C oxidase, ambas envolvidas na cadeia respiratória); 3,05% codificam proteínas participantes do processo de transporte; 4,77% codificam proteínas da sinalização celular e 1,91% codificam proteínas relacionadas com o tráfego de vesículas. Pouco mais de 19% das **ESTs** correspondem a domínios conservados ou hipotéticos, porém possuem similaridade com genes desconhecidos (Fig. 14; Tab. 3).

Proteínas cujas funções prováveis diferem das categorias listadas acima foram agrupadas na categoria Miscelâneo que corresponde a 7,44% de todas as **ESTs**. Transcritos sem similaridade com outros produtos gênicos correspondem a 1,91% do total. Entretanto, esses últimos apresentam similaridade com seqüências depositadas como **supercontigs** de *A. aegypti* (Fig. 14; Tab. 3).

Transcritos correspondentes à citocromo P450 são altamente expressos nos enócitos de *A. aegypti*. Foram identificados 42 transcritos (8,01% do total) que correspondem a pelo menos três proteínas prováveis e outra proteína hipotética com domínio para P450 (Tab. 2).

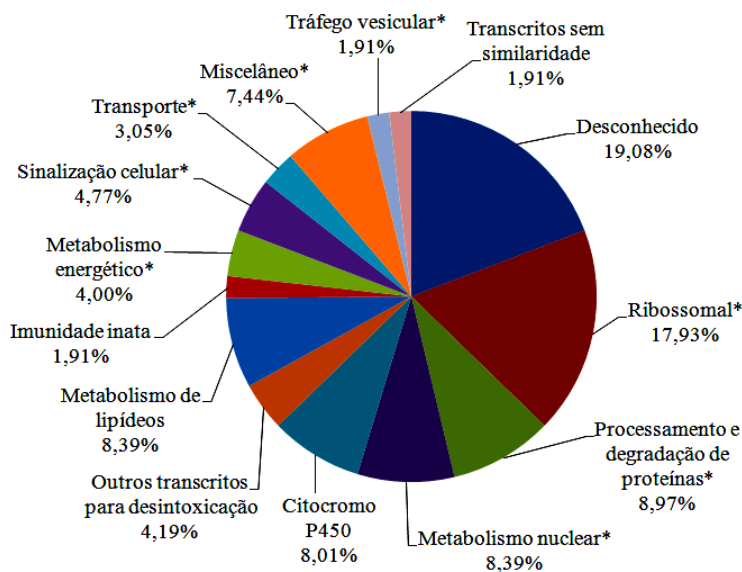


Figura 14. Distribuição relativa dos transcritos obtidos da biblioteca de cDNA dos enócitos pupais de *A. aegypti*. A função dos transcritos é inferida a partir dos dados do Interpro, GO e da literatura. Essa inferência considera a presença de pelo menos um domínio associado a alguma função predita para a proteína correspondente ao transcrito. * - transcritos correspondentes a genes constitutivos.

Além da P450, foram identificados outros 23 transcritos correspondentes às proteínas de desintoxicação. Entre elas, enzimas com atividade de álcool desidrogenase, como quinona oxireductase (10 ESTs), glicose desidrogenase e desidrogenase de cadeia curta. Além desses, também foram encontradas três ESTs para catalase (Tab. 2).

Foram identificados 25 transcritos que codificam proteínas relacionadas com a síntese de lipídios. Entre elas, a ácido graxo sintase, que foi a mais representativa desse grupo (10 ESTs), seguida da elongase (nove ESTs) e da estradiol 17 β -desidrogenase (três ESTs). Dos transcritos relativos à imunidade inata, o mais abundante corresponde a lisozima P (seis ESTs). Também foram encontrados outros transcritos envolvidos com o reconhecimento de patógenos e a ativação da resposta imune, como o *Spatzle* 1A e serino protease (Tab. 2).

Tabela 2 - Relação dos transcritos relativos à desintoxicação, ao metabolismo de lipídios e à imunidade inata encontrados nos enócitos pupais de *A. aegypti*.

Número de acesso (GenBank)	Proteína	Número de ESTs	Domínio
Genes de desintoxicação/metabolismo de lipídios			
AAEL006824	citocromo P450	28	
AAEL004054	citocromo P450	12	
AAEL009124	citocromo P450	1	
AAEL009699	proteína hipotética	1	citocromo P450
Outros genes de desintoxicação			
AAEL010668	quinona oxidoreductase	10	álcool desidrogenase
AAEL013407	catalase	3	
AAEL003349	NADPH-citocromo P450 reductase	1	
AAEL010017	citocromo b5	1	
AAEL004027	glicose desidrogenase	1	álcool oxidase
AAEL011314	epóxido hidrolase	1	
AAEL008159	desidrogenase de cadeias curtas	1	álcool desidrogenase
AAEL009436	proteína hipotética conservada	1	carreador de metal pesado
AAEL001134	metilmalonato semialdeído desidrogenase	1	aldeído desidrogenase
AAEL010777	tioredoxina putativa	1	
AAEL008136	proteína hipotética	1	heme oxigenase
Outros genes de metabolismo de lipídios			
AAEL002204	ácido graxo sintase	10	
AAEL013542	elongase, putativa	5	
AAEL008219	elongase, putativa	4	
AAEL007023	estradiol 17 β -desidrogenase	3	ácido graxo sintase
AAEL008144	AMP dependente ligase	2	
AAEL012698	ATP ligante, subfamília A, membro 3, putativa	2	ATPase
AAEL009214	inibidor de ligante de diazepam, putativa	2	proteína ligante do acil-coA
AAEL013574	apolipoproteína D, putativa	2	
AAEL003125	acil-coa desidrogenase	1	

AAEL008789	apolipoforina-III, putativa	1	
AAEL010405	alquildihidroxi acetonafofato sintase	1	
AAEL004341	alfa-esterase	1	
AAEL009634	esteróide desidrogenase	1	
AAEL007283	acetil-coa sintase	1	
AAEL005997	alergeno, putativo	1	ligante citosólico de ácido graxo
AAEL011676	AMP coA ligase dependente	1	
AAEL009038	prolilcarboxipeptidase, putativa	1	
AAEL003611	estearoil-coA dessaturase	1	
AAEL002533	proteína hipotética	1	proteína de esterilidade do macho
AAEL000615	proteína hipotética	1	proteína <i>tubby</i>
AAEL004278	proteína hipotética	1	dessaturase de ácido graxo
AAEL004120	Niemann-pick tipo C-2, putativa	1	
Genes de imunidade			
AAEL015404	lisozima P, putativa	6	
AAEL005753	serino protease	2	
AAEL013434	Spatzle 1A	1	
AAEL008473	proteína de veneno rica em cisteína, putativa	1	proteína relacionada à patogênese

Número de acesso: corresponde aos genes previamente identificados no genoma de *A. aegypti*.

Proteína: indica a proteína provável correspondente ao transcrito.

Número de ESTs: número de seqüências correspondente ao *contig*.

Domínio: indica a presença de pelo menos um domínio associado a uma função predita.

5. Discussão

5.1. Estudo comparativo do corpo gorduroso de fêmeas de *A. aegypti* com diferentes idades e condições alimentares

5.1.1. Microscopia Eletrônica de Varredura

A maioria dos estudos feitos até o momento com corpo gorduroso de *Aedes* envolveu a MET (Raikhel & Lea 1983, Raikhel 1986a, 1986b, Snigirevskaya et al. 1997). O presente trabalho constitui a primeira descrição da microanatomia do corpo gorduroso de *A. aegypti* utilizando a MEV. Em nossa análise, é possível identificar somente o corpo gorduroso parietal nas fêmeas adultas de *A. aegypti*. Na fase adulta de *A. aegypti* o corpo gorduroso perivisceral não está presente, diferente do anteriormente observado nas larvas desse inseto, assim como em lepidópteros (Wigglesworth 1942, Wang and Haunerland 1992, Haunerland & Shirk 1995) e também em adultos de *P. papatasi* (Psycodidae) (Martins et al. - dados não publicados). Essa observação sugere que em *A. aegypti* o corpo gorduroso perivisceral se restringe ao estágio larval, e provavelmente desaparece durante o processo de metamorfose.

O corpo gorduroso do *A. aegypti* é formado por lóbulos constituídos de células, as quais não estão em contato direto com a hemolinfa, pois o órgão é recoberto por uma lâmina basal, similar ao descrito em *P. striata* e *P. villosa* (Hymenoptera; Formicidae) (Thiele and Camargo-Mathias 2003, Zara & Caetano 2004). Considerando o corpo gorduroso como a principal fonte de componentes da hemolinfa, a sua configuração lobular colabora para aumentar a área de contato entre o órgão e a hemolinfa, facilitando o intercâmbio entre essas duas estruturas.

O corpo gorduroso se desenvolve durante o envelhecimento das fêmeas de *A. aegypti* alimentadas com açúcar. Essa hipertrofia pode ser explicada pelo acúmulo de lipídios associado com a dieta rica em açúcar. A lipogênese é considerada importante para o acúmulo de reservas energéticas que são utilizadas posteriormente durante o ciclo reprodutivo que sucede a alimentação sangüínea. Outra hipótese é que diante da dieta farta em açúcar e da ociosidade nas gaiolas onde os animais são mantidos, o acúmulo das reservas energéticas aumenta ainda mais nas fêmeas de *A. aegypti*, como sugerido anteriormente por Ziegler & Ibrahim (2001).

Após a alimentação sangüínea ocorre a expansão da cavidade corpórea decorrente do enchimento do intestino médio pelo sangue. Ambos os eventos podem explicar o estiramento

do corpo gorduroso e a compressão dos seus lóbulos 18h após a alimentação sangüínea. Nesse período ainda é possível observar as protuberâncias na lâmina basal, correspondentes às células do órgão.

Quatro dias após a alimentação sangüínea, a lâmina basal está enrugada, com várias dobras. Nessa etapa ocorre o esvaziamento completo do intestino médio decorrente do fim da digestão sangüínea. Mesmo após o esvaziamento do intestino médio, a deformação do corpo gorduroso poderia ser causada pela hipertrofia ovariana decorrida do desenvolvimento dos ovos, o que também ocasionaria a compressão do corpo gorduroso contra a parede do corpo.

Durante o ciclo gonotrófico, ocorre o esvaziamento do corpo gorduroso que exporta nutrientes, particularmente lipídios, para atender o desenvolvimento dos ovos (Ziegler & Ibrahim 2001). Esse esvaziamento pode aumentar ainda mais o achatamento e o enrugamento dos lóbulos em comparação ao período de 18h após a alimentação sangüínea. A flexibilidade ou capacidade de reorganização do corpo gorduroso após a alimentação sangüínea provavelmente aumenta o espaço preenchido pelo intestino cheio, maximizando a ingestão de sangue e a subsequente hipertrofia ovariana.

5.1.2. Histologia convencional e histoquímica

A composição celular do corpo gorduroso das fêmeas adultas *A. aegypti* é parecida com a do corpo gorduroso da larva (Wigglesworth, 1942), sendo encontrados os trofócitos e os enócitos. O tipo celular mais abundante no corpo gorduroso de *A. aegypti* consiste do trofócito. Trata-se da mesma composição descrita para outras espécies de Diptera (Sohal 1973, Tobe et al. 1973, Stoppie et al. 1981, Johnson & Butterworth 1985).

Os trofócitos do *A. aegypti*, assim como outros já estudados, apresentam o citoplasma basicamente preenchido por reservas de lipídios, polissacarídeos e proteínas (Behan & Hagedorn 1978, Raikhel & Lea 1983, Raikhel 1986a, 1986b, Snigirevskaya et al. 1997). Os enócitos variam quanto à forma nos adultos, possuem um núcleo centralizado e um citoplasma denso e homogêneo para os diferentes métodos de coloração. Em comparação com os trofócitos, os enócitos não considerados células de reserva energética, pois, em geral, não apresentam as inclusões citoplasmáticas encontradas nos trofócitos (Sohal 1973, Tobe et al. 1973, Stoppie et al. 1981, Dean et al. 1985).

Histoquimicamente, os trofócitos do *A. aegypti* são PAS-positivos, semelhantes aos resultados que mostram essa propriedade dos trofócitos em outros insetos. Esse resultado exemplifica a razão pela qual os trofócitos são considerados o principal reservatório de

polissacarídeos intracelulares nos insetos (Ruvolo & Cruz-Landim 1993, Chapman 1998, Zara & Caetano 2004, Roma et al. 2005, Rollo & Camargo-Mathias 2006, Roma et al. 2006).

Nas fêmeas alimentadas com açúcar, as gotículas de lipídio dos trofócitos aumentam em comparação com as fêmeas alimentadas com sangue, que por sua vez estão mais desenvolvidas que nas recém-emergidas. Isso sugere que o acúmulo de reservas lipídicas ocorre diante da oferta de alimento em abundância, seja somente açúcar ou a combinação dessa com sangue (Raikhel & Lea 1983, Ziegler & Ibrahim 2001).

Apesar da origem ectodérmica, a localização dos enócitos depende da espécie e da sua fase de desenvolvimento. Em insetos pertencentes às Ordens mais basais, como por exemplo, *R. prolixus* (Heteroptera) e *B. germanica* (Blattaria), os enócitos se localizam próximos do local de sua origem embrionária, ou seja, logo abaixo e fisicamente associados à epiderme (Wigglesworth 1988, Fan et al. 2003). Já em *C. ethlius* (Lepidoptera), os enócitos não possuem essa associação direta com as células da epiderme, porém, eles formam grupos localizados próximos das glândulas de cera. Essa associação levantou a hipótese de que essas células participam do fornecimento de componentes secretores dessas glândulas (Locke 1969, Larsen 1976). Nos himenópteros de maneira geral, os enócitos estão espalhados pelas demais células do corpo gorduroso (Ruvolo & Cruz-Landim 1993, Zara & Caetano 2004, Roma et al. 2005, Rollo & Camargo-Mathias 2006). Diferente desses insetos, nos adultos de *A. aegypti*, os enócitos não apresentam associação com células epidérmicas e nem estão tão espalhados pelo órgão. Nos mosquitos adultos, eles se localizam principalmente na periferia do corpo gorduroso, próximos uns dos outros, como observado para outros Diptera (Stoppie et al. 1981, Dean et al. 1985, Johnson & Batterworth 1985).

Do ponto de vista histoquímico, os enócitos do *A. aegypti* são PAS-negativos, porém, são fortemente positivos para proteínas e lipídios em todos os grupos estudados. Essas propriedades histoquímicas têm sido associadas à produção e secreção de proteínas em formigas e abelhas, entretanto essa função ainda não foi confirmada. Além disso, essa positividade para proteínas poderia representar a presença de proteínas relacionadas com o metabolismo desses lipídios no citoplasma dessas células (Paes de Oliveira 2002, Zara & Caetano 2004, Rollo & Camargo-Mathias 2006).

A impregnação por ósmio revelou que os enócitos apresentam o citoplasma rico em substâncias lipídicas, semelhante ao observado na coloração para proteínas. Em todos os grupos analisados, o citoplasma é uniforme e intensamente corado por essa técnica. Essa característica também foi descrita para outros insetos e acredita-se estar correlacionada à intensa síntese e secreção de lipídios pelos enócitos (Wigglesworth 1988, Fan et al. 2003, Roma et al. 2006, Gutierrez et al. 2007).

5.1.3. Microscopia eletrônica de transmissão

Nas fêmeas de *A. aegypti* recém-emergidas, os trofócitos se assemelham aos das fêmeas pré-vitelogênicas de outros Díptera. Os trofócitos são caracterizados pela abundância de gotículas lipídicas, partículas de glicogênio, RER, complexo de Golgi, mitocôndrias e grânulos de proteínas grandes e esféricos. A abundância de grânulos protéicos desenvolvidos após a emergência é atribuída aos resquícios de proteínas armazenadas no corpo gorduroso antes da metamorfose. Esse estoque é considerado estratégico diante da escassez alimentar que os insetos se submetem durante a metamorfose (Thomsen & Thomsen 1974, Tobe & Davey 1974, Cruz-Landim 1975, Stoppie et al. 1981). Os grânulos protéicos estão abundantes nos trofócitos das fêmeas recém-emergidas, enquanto nas envelhecidas/submetidas às diferentes dietas, eles estão escassos. A escassez ou até mesmo o desaparecimento desses grânulos sugere que as proteínas presentes nos grânulos são consumidas durante o envelhecimento. No caso das fêmeas alimentadas com açúcar, a dieta pobre em proteínas poderia culminar com o consumo das mesmas. Nas fêmeas que se alimentaram com sangue, essas reservas provavelmente são mobilizadas para os ovários para atender a demanda protéica dos ovos (Tobe et al. 1973, Thomsen & Thomsen 1974, Stoppie et al. 1981).

Uma das mudanças mais significativas nos trofócitos das fêmeas de *A. aegypti* alimentadas com açúcar é o desenvolvimento das gotículas de lipídio, semelhante ao observado durante o envelhecimento dos machos de *M. domestica* (Diptera) (Sohal 1973). Nesse caso as gotículas preenchem quase todo o citoplasma dos trofócitos restando poucas organelas, que estão menos desenvolvidas nas demais fêmeas. Essas observações corroboram os resultados de Ziegler & Ibrahim (2001) que mostram o acúmulo de lipídios durante o envelhecimento das fêmeas à custa da alimentação à base de açúcar. Além disso, as gotículas lipídicas estão mais desenvolvidas nas fêmeas após a alimentação sangüínea, o que também é atribuído à lipogênese (Ziegler & Ibrahim 2001).

Durante a vitelogênese, a atividade dos trofócitos pode ser dividida em duas subfases: a de síntese de vitelogenina, e a de término da vitelogênese (iniciada 24h após a alimentação sangüínea) (Raikhel 1986a, b). Na subfase de término da vitelogênese, os endossomos são comuns e aparecem como estruturas elétron-densas. Essas organelas podem conter um material fibroso no interior que são remanescentes das organelas da síntese, resultantes da autofagia (Snigirevskaya et al. 1997). Essas estruturas também são observadas nos trofócitos quatro dias após a alimentação sangüínea. O processo de degradação de organelas pela autofagia é o principal responsável pela reciclagem do aparato sintético dos trofócitos de *A.*

aegypti e prepara o corpo gorduroso para um novo ciclo gonotrófico (Tadkowsiki & Jones 1979, Raikhel & Lea 1983, Raikhel 1986a, b).

Algumas características são compartilhadas entre os enócitos dos adultos de *A. aegypti* com outros insetos. Entre elas, o REL desenvolvido, profundas invaginações na membrana citoplasmática e o citoplasma elétron-denso (Sohal 1973, Stoppie et al. 1981, Wigglesworth 1988, Fan et al. 2003). Essa presença do REL desenvolvido tem sido associada ao metabolismo de lipídios pelos enócitos (Locke 1969, Tobe & Davey 1974, Jackson & Locke 1989, Fan et al. 2003).

Diferentemente dos trofócitos, os enócitos não apresentam uma reorganização acentuada decorrente da alimentação com açúcar ou com sangue, exceto pelas invaginações que estão mais desenvolvidas nesses dois casos. Isso poderia ser explicado pelo fato de serem os trofócitos as células responsáveis pelo estoque de nutrientes e pela produção dos componentes do vitelo, estando mais sujeitos à reorganização diante do fornecimento de nutrientes pela alimentação. Considerando que a existência de invaginações na membrana citoplasmática dos enócitos aumenta a superfície celular, esse fato facilitaria a secreção e/ou a captação de compostos da hemolinfa. Além disso, a localização periférica associada ao desenvolvimento dessas invaginações pode ser um indício de que o intercâmbio enócito-hemolinfa aumenta nas fêmeas alimentadas em comparação com as recém-emergidas, facilitando o metabolismo de lipídios após a alimentação (Locke 1969, Wigglesworth 1988, Jackson & Locke 1989).

5.1.4. Morfometria

O diâmetro nuclear dos trofócitos aumenta durante o desenvolvimento dos adultos, principalmente durante o ciclo gonotrófico de *A. aegypti* (Raikhel & Lea 1983). Estudos envolvendo as modificações nucleares durante o desenvolvimento larval de *D. melanogaster* demonstram que a amplificação de DNA é responsável pelo aumento do tamanho nuclear dessas células (Butterworth & Rasch, 1986; Butterworth et al., 1988). O mesmo processo de amplificação acontece até o terceiro dia que sucede a alimentação sangüínea nos adultos de *A. aegypti* (Dittman et al. 1989). Também foi mostrado em *Rhodnius* que durante o envelhecimento de ninfas de quarto estágio, o conteúdo de DNA do núcleo dos trofócitos pode aumentar em até oito vezes (Wigglesworth 1967).

De acordo com os nossos resultados, o diâmetro nuclear dos trofócitos no *A. aegypti* varia de acordo com a dieta, sendo que nas fêmeas alimentadas com açúcar o diâmetro é maior que nas alimentadas com sangue. A atividade de síntese protéica dos trofócitos de *A.*

aegypti está correlacionada com o desenvolvimento nuclear (Dittman et al. 1989). Considerando esse fato, pode-se inferir que a diminuição do diâmetro nuclear quatro dias após a alimentação sangüínea poderia ser o resultado da diminuição da atividade metabólica dos trofócitos a partir do quarto dia, o que coincide com o fim da ovogênese (Snigirevskaya et al. 1997, Raikhel 1986b, Raikhel & Lea 1983). Além disso, o aumento do diâmetro nuclear dos trofócitos nas fêmeas alimentadas com açúcar sugere que a atividade de síntese dessas células aumenta durante o processo de lipogênese em comparação com as fêmeas recém-emergidas (Ziegler & Ibrahim 2001).

O diâmetro nuclear dos enócitos de *A. aegypti* também varia dependendo da idade e da dieta. O diâmetro nuclear dos enócitos não se difere significativamente nas fêmeas recém-emergidas em relação às alimentadas com açúcar. Porém, nesses dois casos o diâmetro nuclear é maior em comparação com as fêmeas que realizaram a alimentação sangüínea. Em larvas da mariposa *C. ethlius* a amplificação do DNA é também responsável pelo desenvolvimento do núcleo dos enócitos e este aumento é acompanhado pelo aumento da atividade de síntese de RNAm durante as sucessivas ecdises (Locke 1969). Considerando que a atividade de síntese protéica pode estar correlacionada com o desenvolvimento nuclear dos enócitos, é razoável propor que o aumento do diâmetro nuclear dos enócitos de *A. aegypti* possa refletir no aumento da atividade de síntese protéica. Nesse sentido, a atividade sintética das células seria menor nos animais analisados quatro dias após o alimentação sangüínea. Assumindo que os enócitos dos adultos de *A. aegypti* estão engajados com o metabolismo de lipídios (Gutierrez et al. 2007), o mesmo estaria reduzido no final do ciclo gonotrófico em relação aos demais grupos. Além disso, se considerarmos o envolvimento dessas células na secreção de compostos cuticulares (Wigglesworth 1988, Ruvolo & Cruz-Landim 1993, Fan et al. 2003) essa atividade estaria concentrada nas fêmeas recém-emergidas. Porém, um estudo mais aprofundado é necessário para validar essas hipóteses.

Concluindo, o corpo gorduroso dos adultos *A. aegypti* é composto por dois tipos celulares, os trofócitos e os enócitos que apresentam morfologias, padrões de coloração e aspectos subcelulares diferenciados. Além disso, a remodelação celular está envolvida com as modificações funcionais dos trofócitos e depende do tipo de alimentação e da idade do mosquito.

5.5. O cultivo primário dos enócitos

As tentativas de obtenção de enócitos do corpo gorduroso de larvas e de adultos *A. aegypti* não foram tão bem sucedidas quanto à de pupas. Uma das razões para isso é que nos

estágios larvais, apesar de estarem agrupados, os enócitos são menores que os pupais, dificultando sua purificação em relação às outras células. Outra razão é que a larva é pouco resistente ao tratamento de limpeza da superfície com hipoclorito de sódio e álcool, morrendo antes da dissecação. Já no caso dos adultos, os enócitos não formam grupos bem definidos (isto é, agrupados por uma membrana basal) e não estão soltos no corpo gorduroso como nas pupas, tornando difícil o isolamento. Dessa forma, a coleta das células foi maximizada com o mínimo de contaminação. Além disso, é sabido que a utilização de células de organismos imaturos é mais adequada para o cultivo pela maior capacidade de sobreviverem fora dos seus organismos por serem mais jovens (Mitsuhashi 1983, 1984, Inoue & Mitsuhashi 1985, Mitsuhashi & Inoue 1988, Zhang et al. 2006 Sudeep et al. 2005).

Através da coleta dos enócitos por pipetagem, pode ser obtido um sistema de cultivo primário livre de contaminação por outras células. A separação dos enócitos e trofócitos é possível graças às diferenças morfológicas entre eles. Os enócitos estão agrupados, são maiores, apresentam coloração mais clara e o citoplasma é desprovido de inclusões lipídicas visíveis e que nos trofócitos brilham diante da luz do estereoscópio.

Os enócitos pupais de *A. aegypti* se localizam abaixo do tegumento da lateral de cada segmento do corpo. Nessa fase eles estão organizados em grupos de três a nove células. O mesmo padrão de organização foi descrito para as larvas de *D. melanogaster* (Hartenstein et al. 1992, Elstob et al. 2001; Gould et al. 2001). Nos adultos de *A. aegypti*, apesar de estarem próximos, os enócitos são células separadas umas das outras, espalhadas entre os trofócitos na periferia dos lóbulos do corpo gorduroso (Tadkowski et al. 1977). A localização dos enócitos sugere que durante a transição pupa-adulto, os enócitos se separam e migram das proximidades da epiderme para a periferia do corpo gorduroso.

Os enócitos facilmente se aderem ao substrato de vidro e já no segundo dia em cultivo primário são capazes de emitir prolongamentos celulares (filopódios e lamelipódios), auxiliares no processo de adesão celular (Mitchison & Cramer 1996). Em geral, os enócitos cultivados formam grupos de células ovais, recobertas por uma lâmina basal, semelhante aos estágios imaturos de *C. ethlius* (Lepidoptera) (Jackson & Locke 1989) e dos Formicidae (Thiele & Camargo-Mathias 2003, Rollo & Camargo-Mathias 2006).

Mesmo se tratando de células obtidas de animais jovens, os enócitos pupais de *A. aegypti* podem ser considerados células altamente diferenciadas devido à presença de um complexo sistema formado pelo REL que preenche quase todo o citoplasma (Locke 1969, Jackson & Locke 1989). Além disso, nas análises rotineiras, não foi observada divisão dos enócitos, nem quando incubados com alguns fatores de crescimento (dados não apresentados). A não proliferação dos enócitos também foi observada em larvas de *D. melanogaster*, onde se

notou que eles apenas aumentam de volume a cada estágio larval (Bodenstein 1950 citado por Gould et al. 2001). Supostamente, os enócitos pupais seriam produzidos *de novo* a partir de células dos discos imaginais durante a metamorfose de *D. melanogaster*. Entretanto, essa hipótese ainda não foi testada para outros insetos (Elstob et al. 2001, Gould et al. 2001).

O citoplasma dos enócitos é preenchido por uma rede de cisternas tubulares que foi inicialmente descrita como REL tubular (Locke 1969, Larsen 1976). A presença do REL tem sido associada à produção e secreção de lipídios nas larvas de *C. ethlius* (Lepidoptera) (Locke 1969) e em adultos de *T. molitor* (Coleoptera) (Romer et al. 1974), *Schistocerca* (Orthoptera) (Diehl 1973, 1975) e *Blattella* (Blattaria) (Fan et al. 2003). Devido à presença do REL e pelo metabolismo de ecdisteróides em *T. molitor*, esses trabalhos propõem que os enócitos são análogos às células esteroidogênicas dos mamíferos.

Além do REL, predominam no citoplasma dos enócitos do *A. aegypti* estruturas semelhantes a vesículas. Duas hipóteses poderiam explicar a presença delas. Uma delas é que essas estruturas seriam gotículas de lipídio que são abundantemente encontradas nos enócitos larvais de *D. melanogaster* privadas de alimento (Gutierrez et al. 2007) e nos enócitos de larvas e adultos de algumas espécies de formigas (Camargo-Mathias & Caetano, 1996; Roma et al. 2008). Outra hipótese é que essas estruturas correspondem a um sistema de canaliculos seccionados transversalmente. Esses canaliculos são formados em decorrência de invaginações da membrana citoplasmática que se adentram profundamente no citoplasma, cujas extremidades se fundem e formam microcavidades. Essas microcavidades, chamadas de espaços linfais, contêm linfa, que é descrita para os insetos como hemolinfa com composição diferente da hemocele. Esses espaços linfais aumentariam a superfície celular facilitando o processo secreção de componentes da hemolinfa pelos enócitos (Locke 2003). Entretanto, um estudo ultra-estrutural usando substâncias marcadoras da superfície necessita ser feito para comprovar a presença destas microcavidades nos enócitos de *A. aegypti*.

No presente estudo foi realizado com sucesso o estabelecimento do cultivo primário dos enócitos de *A. aegypti*. Essas células retêm uma capacidade relativamente alta de sobreviver *in vitro*. Essa característica proporciona um sistema que poderá ser útil para se estudar em detalhes o papel das enócitos em diferentes processos nesse mosquito, como por exemplo, a participação no metabolismo de lipídio e o possível envolvimento no processo de infecção por patógenos, como por exemplo, o vírus dengue.

5.6. Transcriptoma

Considerando que os trofócitos têm sido bastante estudados, no presente trabalho optou-se por estudar o perfil transcricional dos enócitos, cujas informações são relativamente escassas. A partir do momento que se conseguiu purificar e estabelecer o cultivo primário dessas células, foi possível iniciar os estudos morfológicos e moleculares específicos. Nos tópicos seguintes serão discutidos aspectos relacionados com os transcritos que codificam proteínas dos processos de desintoxicação, síntese de lipídios e resposta imune inata produzidos pelos enócitos pupais de *A. aegypti*. Entretanto, outras categorias de transcritos merecem ser previamente discutidas.

Dos 15.419 genes identificados no genoma de *A. aegypti* como codificantes, pelo menos 12.350 (80%) são transcritos nos adultos (Nene et al. 2007). Desse total de transcritos 295 são expressos nos enócitos pupais de *A. aegypti*, representando 2,38% do total de genes considerados como codificantes para os adultos. Desses transcritos, aproximadamente 18% codificam proteínas ribossomais, o que está dentro dos valores encontrados em outros transcriptomas órgãos-específicos. Cerca de 19% das ESTs correspondem a transcritos que possuem similaridade com genes que codificam proteínas com domínios desconhecidos (conservados ou hipotéticos), o que também está de acordo com a porcentagem de transcritos da mesma categoria encontrados em estudos com vetores (Feitosa et al. 2006, Ramalho-Ortigão et al. 2007). Dos transcritos expressos constitutivamente nos enócitos, também merecem destaque aqueles correspondentes às proteínas com domínio *zinc finger* ou “dedo de zinco” (14 ESTs, cerca de 2,5%, incluídas na categoria Metabolismo Nuclear, Tab. 3). Esses transcritos são abundantemente encontrados nos adultos de *A. aegypti* e têm sido associados ao metabolismo nuclear. Foi proposto que os seus respectivos genes teriam sido originados de inserções no genoma em consequência da atividade de replicação de transposons ou de retrovírus pela sua alta representatividade no genoma de *A. aegypti* (Nene et al. 2007).

Transcritos sem similaridade com outros produtos gênicos correspondem a 1,91% do total. Entretanto, esses últimos apresentam similaridade com seqüências depositadas como *supercontigs*, o que pode ser um indício de que essa pequena fração constitua transcritos correspondentes a novos genes e que até o momento não foram identificados no transcriptoma dos adultos de *A. aegypti*.

Feitosa et al. (2006) estudaram pela primeira vez o transcriptoma do corpo gorduroso vitelogenético de fêmeas de *A. aegypti*. Somente 0,57% dos transcritos do órgão correspondem a citocromo P450, enquanto que nos enócitos essa porcentagem foi de 8%. Outra diferença importante foi que 40,46% dos transcritos correspondem a genes da síntese protéica, a maior

parte deles para proteínas ribossomais. Essa porcentagem é muito superior à encontrada nos enócitos (26,9%) [incluindo transcritos para as categorias Proteínas Ribossomais (17,93%) e Processamento e degradação de proteínas (8,97%)] e sugere que a síntese de proteínas, incluindo aquelas relacionadas à vitelogenese, estão concentradas nos trofócitos, enquanto que as proteínas relacionadas aos processos de desintoxicação estão concentradas nos enócitos.

5.6.1. Genes de desintoxicação

A citocromo P450 é identificada entre os transcritos mais abundantes expressos nos enócitos de *A. aegypti*. Citocromo P450 é um nome geral para uma família de hemoproteínas encontrada em diversos organismos, incluindo arqueobactérias e bactérias (Danielson 2002). Em um único genoma podem existir até 450 genes para P450 (Omura 1999), enquanto que nos insetos, mais de 660 genes para P450 já foram caracterizados a partir de genomas seqüenciados e de outros estudos relacionados com mecanismos de resistência a inseticidas (Li et al. 2007).

Nos mamíferos, a P450 é comumente encontrada nos microsossomos e no REL dos hepatócitos e nas mitocôndrias das células esteroidogênicas. Nesses organismos, diferentes formas da P450 participam do metabolismo de diferentes moléculas como esteróis e vários lipídios, incluindo eicosanóides, vitamina D3 e retinóide (Simpson 1997, Omura 1999).

A expressão de P450 é tecido-específica nos insetos, indicando a sua diversidade funcional (Simpson 1997, Omura 1999). Nesses organismos, a P450 está envolvida com uma variedade de rotas metabólicas do desenvolvimento, alimentação, resistência a inseticidas e tolerância às toxinas das plantas. Além disso, a P450 é responsável pela síntese e degradação de hormônios, como 20-hidroxiecdisona e hormônio juvenil, e de feromônios (Scott 1999, Scott & Wen 2001, Gilbert 2004).

A expressão da P450 é relativamente alta nos enócitos de *A. aegypti*, correspondendo a oito por cento do total de transcritos, incluindo pelo menos quatro diferentes transcritos para P450. Provavelmente a P450 expressa nos enócitos também participe no metabolismo de esteróides, como demonstrado nos enócitos isolados de larvas de *T. molitor* (Coleoptera) que sintetizam α e β -ecdisona a partir de 4-¹⁴C-colesterol *in vitro* (Romer et al. 1974). Entretanto, essa associação entre a P450 com o metabolismo de ecdisona ainda não foi confirmada para os insetos.

Gutierrez et al. (2007) propuseram que as funções do fígado dos mamíferos de estocar glicogênio e processar lipídios provavelmente estão divididas entre os trofócitos e os enócitos de *D. melanogaster*. Porém, a analogia entre os enócitos e o fígado vai além do metabolismo

de lipídios e inclui o metabolismo de xenobióticos através da expressão de diferentes genes relacionados com a desintoxicação, como por exemplo, a P450.

O aumento da expressão da P450 é considerado a forma mais comum de resistência a inseticidas (Scott 1999, Scott & Wen 2001), estando presente em algumas linhagens de *D. melanogaster* (Sundseth et al. 1990) e em *A. gambiae* (Müller et al. 2007). Cerca de oito por cento das proteínas expressas em *A. aegypti* são membros da família P450. Uma comparação entre os dípteros mostrou que essa porcentagem representa uma expansão da expressão de P450 em comparação à *D. melanogaster* e *A. gambiae*. Supõe-se essa expansão poderia ser responsável por um sistema de desintoxicação mais elaborado em *A. aegypti*, contribuindo para aumentar a resistência a inseticidas em comparação aos demais mosquitos (Nene et al. 2007).

Além da P450, foram identificados outros 23 transcritos nos enócitos do *A. aegypti* que codificam proteínas de desintoxicação, como por exemplo, as enzimas com atividade de álcool desidrogenase e a catalase que confere proteção contra o estresse oxidativo. Ambas as enzimas são expressas nos enócitos de *D. melanogaster* (Gutierrez et al. 2007). Além dessas enzimas, também são encontradas a NADPH citocromo P450 redutase (CPR) e a citocromo b5. A CPR está envolvida com o metabolismo de inseticidas e é altamente expressa nos enócitos de linhagens inseticida-resistentes de *A. gambiae* (Lycett et al. 2006). A CPR e citocromo b5 são importantes doadores de elétrons que regulam a ligação da P450 ao seu substrato (Scott 1999, Scott & Wen 2001) (Tab. 2). O envolvimento dessas enzimas nos processos de desintoxicação necessita ser estudado em detalhes nos enócitos de *A. aegypti*.

5.6.3. Metabolismo de lipídios

Alguns trabalhos têm sugerido a participação dos enócitos no metabolismo de lipídios pela presença do REL desenvolvido. De acordo com esses trabalhos, os enócitos supostamente produzem e exportam hidrocarbonetos para o tegumento através da associação e/ou proximidade física entre eles e as células da epiderme (Wigglesworth 1988, Fan et al. 2003), ou sintetizando parafina (Diehl 1975). Esse suposto processamento de lipídios foi demonstrado em *D. melanogaster* por Gutierrez et al. (2007) que identificaram 51 genes expressos exclusivamente nos enócitos larvais dessa espécie.

A expressão das enzimas do metabolismo lipídico é compartilhada entre os enócitos de *A. gambiae* e *A. aegypti*. Além dos transcritos para a P450, foram identificados outros transcritos correspondentes a 23 diferentes genes relacionados com o metabolismo de lipídios nos enócitos de *A. aegypti*. Se considerarmos a fração correspondente a P450, o total de

transcritos para síntese lipídica é de 16,40% (8,01% para P450 mais 8,39% para síntese de lipídios). Desses genes incluídos na fração dos 8,39%, os que correspondem a ácido graxo sintase são os mais representativos, seguido da elongase e da estradiol 17 β -desidrogenase (Tab. 2). O metabolismo de componentes lipídicos nos insetos depende da atividade dessas enzimas. Foi mostrado que em *Gryllus bimaculatus* (Grillidae; Orthoptera) a síntese de lipídios pelo corpo gorduroso depende da atividade da ácido graxo sintase (Lorenz & Anand 2004). Em *D. melanogaster*, a atividade da elongase é responsável pela síntese de ácidos graxos de cadeias muito longas e também de feromônios (Chertemps et al. 2005, 2007). Em mamíferos, a atividade da enzima estradiol 17 β -desidrogenase está concentrada nos microsossomos dos hepatócitos e é responsável pela inativação de andrógenos e estrógenos (Deyashiki et al. 1995).

A presença de transcritos que codificam enzimas do metabolismo de lipídios corrobora nossos dados ultra-estruturais, se considerarmos que a presença do REL desenvolvido pode ser associada ao metabolismo de lipídios pelos enócitos (Wigglesworth 1988; Jackson & Locke 1989; Fan et al. 2003).

5.6.4. Imunidade inata

O tamanho relativamente grande do corpo gorduroso faz com que ele seja um poderoso sistema capaz de secretar peptídeos antimicrobianos e que esses alcancem uma concentração efetiva contra os patógenos que porventura invadam a hemolinfa. Entretanto, para que essa resposta imune aconteça é necessário o reconhecimento dos invasores através de proteínas de reconhecimento. O reconhecimento resulta na secreção de peptídeos antimicrobianos (Hetru et al. 2003, Barrillas-Murry et al. 2005).

Nossos resultados mostram que os enócitos de *A. aegypti* expressam constitutivamente RNAm(s) que codificam alguns fatores relacionados à imunidade inata, como lisozimas e fatores responsáveis pelo reconhecimento de patógenos como *Spatzle* 1A e serino protease.

Em *D. melanogaster*, a resposta imune é iniciada diante da clivagem proteolítica da proteína *Spatzle* que posteriormente se liga e ativa os receptores do tipo Toll nas células do corpo gorduroso. A clivagem de *Spatzle* ocorre na hemocele através da ação de serino proteases. A sua interação com o Toll ativa a via responsável pela produção de peptídeos antimicrobianos no corpo gorduroso. Essa interação faz com que a proteína citoplasmática *cactus/I κ B* seja clivada e ocorra a translocação do fator de transcrição Dif/NF- κ B para o núcleo, que ativa a expressão de peptídeos antimicrobianos como a drosomicina (Barillas-Mury et al. 2000, Zasloff 2002, Christophides et al. 2004).

Outra forma que os insetos utilizam para bloquear a invasão por microorganismos é a secreção de lisozimas por diferentes órgãos, como o intestino médio, traquéias e corpo gorduroso. Os enócitos de *A. aegypti* também expressam genes para lisozimas. Elas constituem os transcritos mais abundantes dos enócitos na categoria imunidade inata e são responsáveis por um importante mecanismo contra patógenos porque participam da digestão da parede bacteriana e fúngica (Hultmark 1996, Vilmos & Kurucz 1998).

Foi mostrado anteriormente que os enócitos compartilham o REL desenvolvido com as células esteroidogênicas dos mamíferos (Dean et al. 1985, Wigglesworth 1988, Haunerland & Shirk 1995). Essas características morfológicas juntamente com a sua localização periférica no corpo gorduroso dos adultos de *A. aegypti* sugerem a existência de um mecanismo facilitador da desintoxicação, bem como para a absorção e secreção de lipídios (Gutierrez et al. 2007). A localização periférica pode também facilitar o rápido reconhecimento de patógenos, com a ativação da resposta imune inata culminando com a expressão e secreção de moléculas de defesa (Barillas-Mury et al. 2000, Zasloff 2002, Christophides et al. 2004).

Cerca de pouco mais de 2% dos transcritos do corpo gorduroso dos adultos de *A. aegypti* correspondem às proteínas relacionadas com o sistema imune, como cecropinas, defensinas e lectinas (Feitosa et al. 2006). Porém, nesse trabalho não é possível saber quais das células expressam esses genes no corpo gorduroso. Também não são identificados nenhum desses transcritos nos enócitos e vice-versa. Considerando a pequena fração de enócitos (8%) diante dos trofócitos no corpo gorduroso de *A. aegypti*, a chance dos seus transcritos serem clonados ou seqüenciados é menor em comparação com os transcritos dos trofócitos. É plausível supor que ambas as células do corpo gorduroso participam da imunidade humoral, pois em cada transcriptoma foram encontrados genes da imunidade expressos diferencialmente. Além do mais, pode-se inferir que ambos os sistemas expressam constitutivamente RNAm(s) relacionados com a imunidade, pelo fato de em ambos os casos se tratar de animais não infectados.

Até hoje os enócitos têm sido considerados células enigmáticas para a maioria dos insetos (Gould et al. 2001) e a geração do transcriptoma dos enócitos abriu novas perspectivas para entendermos as funções dessas células em *A. aegypti*. De acordo com nossos resultados, a função dos enócitos pode ser definida como desintoxicação e o metabolismo de lipídios (Wigglesworth 1988, Jackson & Locke 1989, Fan et al. 2003), e secundariamente, como células imuno-competentes.

Considerando que esses dados representam a primeira análise do transcriptoma de enócitos em invertebrados, eles fornecem a base para futuras investigações a respeito da

resistência dos insetos aos xenobióticos e a respeito das interações entre os mosquitos e os patógenos que eles transmitem.

6. Considerações finais

Pela primeira vez, o corpo gorduroso de *A. aegypti* foi estudado considerando os aspectos histológicos, histoquímicos e ultra-estruturais relacionados com diferentes tipos de dieta. Também foi realizado de maneira inédita o cultivo primário e a investigação dos produtos da expressão gênica dos enócitos, validando a hipótese de que esses devem participar da manutenção da homeostasia, do metabolismo de lipídios e da imunidade inata em *A. aegypti*. Nesse sentido, o presente trabalho representa uma contribuição importante para o entendimento da fisiologia do *A. aegypti*, considerando que foi realizado um amplo estudo do seu corpo gorduroso, envolvendo desde aspectos morfológicos a aspectos moleculares.

Estudos anteriores revelaram que o corpo gorduroso dos insetos é um órgão bastante maleável, sofrendo transformações desde o período larval, passando pela remodelagem e reconstrução durante a metamorfose. No caso de *A. aegypti*, o corpo gorduroso é capaz de alterar a sua ultra-estrutura em função da idade, da demanda ovariana pelos componentes do vitelo, ou em função do acúmulo de lipídios diante da dieta à base de açúcar (Raikhel & Lea 1983, Snigirevskaya et al. 1997, Ziegler & Ibrahim 2001). Nossas análises morfológicas confirmam essa plasticidade do corpo gorduroso, cuja microanatomia apresenta várias diferenças dependendo da idade e da dieta. No nível celular, essas diferenças são notáveis principalmente quanto ao conteúdo citoplasmático dos trofócitos, no que diz respeito às reservas nutricionais e à organização de organelas.

O *A. aegypti* apresenta importância epidemiológica por ser o principal vetor envolvido na transmissão da dengue e da febre amarela urbana, sendo também capaz de ser infectado por outros tipos de vírus, filárias de nematódeos e pelo *P. gallinaceum* da malária aviária (Consoli & Lourenço-de-Oliveira 1994). Nos experimentos envolvendo cultivo primário, foi possível purificar e manter com sucesso os enócitos de *A. aegypti*. Considerando a importância do estabelecimento do cultivo primário para o entendimento das funções celulares, o cultivo dos enócitos poderá ser usado para estudos de fisiologia, ou até mesmo para estudos envolvendo infecção dessas células pelo vírus Dengue.

Somente em 2007 as suposições de que os enócitos são comprometidos com o metabolismo de lipídios saíram do âmbito morfológico para o molecular, quando a participação dos enócitos no metabolismo de lipídios foi confirmada em *D. melanogaster* (Gutierrez et al. 2007). Os nossos resultados corroboram esses dados pelo fato de termos identificado em *A. aegypti* vários genes relacionados com o metabolismo de lipídios.

Estudos bioquímicos e imunocitoquímicos mostraram a produção de ecdisona pelos enócitos de *T. molitor* e uma alta expressão de P450 redutase nos enócitos de *A. gambiae*,

respectivamente (Romer et al. 1974, Lycett 2006). Esses dados juntamente com o fato de termos encontrado transcritos de P450 e de estradiol 17 β -desidrogenase nos enócitos de *A. aegypti* sugerem que a via metabólica relacionada com o metabolismo de esteróides pela P450 e outras enzimas poderia ser compartilhada pelos hepatócitos dos mamíferos e os enócitos de *Aedes*.

Nossos resultados contribuem para o entendimento da fisiologia dos mosquitos, pois agora é sabido quais genes são expressos preferencialmente nos enócitos, abrindo as portas para que no futuro os enócitos possam ser também estudados em linhagens de mosquitos infectados resistentes e susceptíveis ao vírus dengue 2. Isso permitirá confirmar a hipótese de que os enócitos participam ativamente do processo interação de patógenos com os insetos vetores e contribuirá para o entendimento da relação dos enócitos com a competência vetorial de *A. aegypti*.

No presente trabalho foi traçado o perfil da expressão gênica dos enócitos de *A. aegypti*. A expressão de um determinado gene não significa a sua tradução imediata, devido aos processos de regulação pós-transcricionais das células. Entretanto, pode-se assumir que pelo menos uma parte deles é traduzida em pelo menos alguma fase da vida do organismo. Descrever o repertório da expressão gênica foi um grande passo para entendermos o papel dessas células nos mosquitos, porém, para que o transcriptoma seja validado, futuros estudos de proteômica serão necessários.

7. Anexo 1: Tabela 3: Transcritos encontrados nos enócitos de *A. aegypti*. Cada transcrito apresenta um número de acesso no GenBank, incluindo os números das seqüências correspondentes a *A. gambiae* e *D. melanogaster*.

n	Contig	Number of sequences	vs. <i>A. aegypti</i> Liverpool strain transcripts/access number	vs. Liverpool strain genomic supercontigs	E-value	vs. <i>A. gambiae</i>	vs. <i>D. melanogaster</i>	Category	
1	1	32	AAEL008802-RA	conserved hypothetical protein	e-142	AGAP012571		Unknown	
2	2	10			e-143				
3	4	5			4e-69				
4	5	2			5e-53				
5	6	14	AAEL004851-RA	hypothetical protein	1e-99				
6	15	2	AAEL003559-RA	supercont1.114	e-168	AGAP005874	CG2669		
7	24				2e-33				
8	26	1	AAEL004420-RB	supercont1.574	0.003	AGAP005036	CG3857		
9	30		AAEL014039-RB	conserved hypothetical protein	e-129	AGAP000669	CG30415		
10	43		AAEL002325-RA		supercont1.285	2e-34	AGAP007143		CG32210
11	55	3	AAEL002339-RA	supercont1.410	4e-25	AGAP004671	CG4738		
12	58	1	AAEL000352-RA hypothetical protein		8e-15		CG30380		
13	65		AAEL013865-RA conserved hypothetical protein		e-157				
14	83		AAEL004510-RA hypothetical protein		3e-81				
15	97		AAEL002190-RA conserved hypothetical protein		1e-45	AGAP008492	CG4619		
16	101		AAEL013273-RA	hypothetical protein	0.0				
17	102		AAEL012241-RA		supercont1.109				e-118
18	104		AAEL009737-RA	conserved hypothetical protein	e-129	AGAP005448	CG9227		
19	111		AAEL008883-RA		0.0	AGAP006471	CG18809		
20	139		AAEL010308-RA	hypothetical protein	supercont1.247	e-112	AGAP011070		CG18490
21	158		AAEL007833-RA		e-124				
22	164	1	AAEL015617-RA	conserved hypothetical protein	e-106	AGAP007614	CG30173		
23	167		AAEL011010-RA		6e-97	AGAP012515	CG4692		
24	176	AAEL008731-RA hypothetical protein		2e-89					

n	Contig	Number of sequences	vs. <i>A. aegypti</i> Liverpool strain transcripts	vs. Liverpool strain genomic supercontigs	E-value	vs. <i>A. gambiae</i>	vs. <i>D. melanogaster</i>	Category			
25	217	1	AAEL011295-RA	conserved hypothetical protein	supercont1.168	e-120	AGAP008921	Unknown			
26	218		AAEL011042-RA			0.0	AGAP006832				
27	236		AAEL002293-RA			e-113	AGAP011825				
28	253		AAEL001664-RA hypothetical protein			e-106					
29	254		AAEL003160-RA	conserved hypothetical protein		e-105			CG6770		
30	271		AAEL010487-RA			4e-34	AGAP003487		CG4666		
31	280		AAEL005652-	RA hypothetical protein		0.77					
32	298		AAEL004322-RA			supercont1.524	1e-52			CG6448	
33	321		AAEL002058-RA			supercont1.32	0.0		AGAP000504		
34	337		AAEL009278-RA			conserved hypothetical protein	e-122		AGAP004906	CG32832	
35	341		AAEL009274-RA	0.0			AGAP007116		CG1943		
36	346		AAEL002260-RA	e-119			AGAP006517		CG17569		
37	10		8	AAEL003942-RA 60S ribosomal protein L44 L41, putative			e-174		AGAP003538	CG7424	Protein Metabolism/ Ribosomal
38	12		4	AAEL000010-RB ribosomal protein L36, putative			0.0		AGAP002921	CG7622	
39	201	1	AAEL005901-RB 40S ribosomal protein S3a		e-136	AGAP003532	CG2168				
40	13	7	AAEL002832-RA 40S ribosomal protein S26		0.0	AGAP012100	CG10305				
41	17	2	AAEL014562-RA 60S ribosomal protein L12			AGAP010065	CG3195				
42	31		AAEL002534-RA 60S ribosomal protein L10		e-77	AGAP000953	CG17521				
43	279	1	AAEL008188-RA 60S ribosomal protein L6		0.0	AGAP001911	CG11522				
44	34	3			2e-32						
45	36	1		AAEL013272-RA 60S ribosomal protein L37a		9e-95	AGAP009920	CG5827			
46	49	2	AAEL009506-RA 40S ribosomal protein S20	supercont1.725	0.0	AGAP010591	CG15693				
47	63		AAEL007824-RA ribosomal protein S29, putative	supercont1.47	7e-91	AGAP001595	CG8495				
48	68	11	AAEL013583-RA 60S ribosomal protein L23		4e-21	AGAP010252	CG3661				
49	96	1	AAEL012585-RA 60S ribosomal protein L7		e-150	AGAP008916	CG4897				
50	100		AAEL011471-RC 60S ribosomal protein L17		0.0	AGAP001459	CG3203				
51	115		2	AAEL009341-RA ribosomal protein L34, putative			AGAP009324	CG6090			
52	121	1	AAEL012686-RA ribosomal protein S12, putative		8e-51		CG8415				

n	Contig	Number of sequences	vs. <i>A. aegypti</i> Liverpool strain transcripts	vs. Liverpool strain genomic supercontigs	E-value	vs. <i>A. gambiae</i>	vs. <i>D. melanogaster</i>	Category	Comments		
53	130	1	AAEL012733-RA 60S ribosomal protein L19		1e-59	AGAP004422	CG2746	Protein Metabolism/Ribosomal			
54	132		AAEL006860-RA ribosomal protein S28, putative		2e-36	AGAP003412	CG15527				
55	148	3	AAEL009994-RA 60S ribosomal protein L4		e-131	AGAP002306	CG5502				
56	152	2	AAEL000987-RA 60S ribosomal protein L8		0.0	AGAP005802	CG1263				
57	173	1	AAEL013221-RC 60S ribosomal protein L10a			AGAP011298	CG3843				
58	180	1	AAEL006698-RA 60S ribosomal protein L31		e-107	AGAP011896	CG1821				
59	181		AAEL009608-RA 28S ribosomal protein S16, mitochondrial		0.0	AGAP004818	CG8338				
60	189	2	AAEL008481-RB 60S ribosomal protein L18		8e-67	AGAP007580	CG8615				
61	247	1	AAEL011656-RA 40S ribosomal protein S15		1e-27	AGAP001274	CG8332				
62	194		AAEL004175-RA 40S ribosomal protein S17		0.0	AGAP004887	CG3922				
63	210	2	AAEL010756-RA 40S ribosomal protein S19		1e-71	AGAP010933	CG4464				
64	211	1	AAEL014903-RA 40S ribosomal protein S24		2e-44	AGAP005131	CG3751				
65	187	2	AAEL003324-RA acidic ribosomal protein P1, putative		6e-10	AGAP007740	CG4087			Ribosomal protein 60S	
66	230	1	AAEL010573-RB ribosomal protein S25, putative		8e-89	AGAP004462	CG6684				
67	255		AAEL011587-RA ribosomal protein L27, putative		0.0	AGAP011687	CG4759				
68	266		AAEL007771-RA 60S ribosomal protein L22		4e-	AGAP005046	CG7434				
69	296	2	AAEL010821-RA 60S acidic ribosomal protein P0		e-112	AGAP003592	CG7490				
70	320	1	AAEL004325-RA ribosomal protein L5		0.0	AGAP009031	CG17489				
71	326		AAEL005085-RA 60S ribosomal protein L30		e-159	AGAP003816	CG10652				
72	347		AAEL006785-RB 60S ribosomal protein L18a		5e-28	AGAP012284	CG6510				
73	192		AAEL002372-RA ribosomal protein S11		supercont1.55	e-40	AGAP009998				CG8857
74	358	AAEL001037-RA ribosomal RNA methyltransferase			0.0	AGAP003002	CG8939				Spb1, C-terminal- 60S ribosomal biogenesis
75	116	2	AAEL013536-RA ubiquitin (ribosomal protein L40)				CG5271				

n	Contig	Number of sequences	vs. <i>A. aegypti</i> Liverpool strain transcripts	vs. Liverpool strain genomic supercontigs	E-value	vs. <i>A. gambiae</i>	vs. <i>D. melanogaster</i>	Category	Comments	
76	282	1	AAEL006511-RA <i>A. stephensi</i> ubiquitin		0.0	AGAP007927	CG2960	Protein Metabolism/ Ribosomal	Ribosomal protein	
77	122	2	AAEL004151-RC		e-120	AGAP006612	CG10071		Ribosomal L29e protein	
78	367	1	AAEL013103-RA	conserved hypothetical protein	3e-15	AGAP010247	CG31938		Ribosomal RNA- processing protein 40	
79	294		AAEL010843-RA		0.0	AGAP006459	CG17737		Translation initiation factor-directing the ribosome to the proper start site of translation	
80	295		AAEL013533-RA		e-128	AGAP008001	CG5277		Ribosomal protein S8E	
81	41	2	No hits found, but hits <i>Anopheles</i> transcript	supercont1.968	3e-29	AGAP000952	CG9091		Ribosomal protein 60S	
82	46		AAEL012686-RA	supercont1.725	2e-59		CG8415		Ribosomal protein S12/S23	
83	147		AAEL003427-RA			AGAP011424	CG4046		RA ribosomal protein S16	
84	345	1	AAEL009764-RB xaa-pro aminopeptidase		0.0	AGAP001037	CG6291		Protein Metabolism/ Processing	Peptidase M24
85	73	2	AAEL006169-RA cathepsin d			AGAP003277	CG10104			Protein trafficking. They may modulate vesicle budding and uncoating within the Golgi apparatus
86	290		AAEL006389-RA cathepsin l			AGAP012577	CG8947			
87	237		AAEL002833-RA cathepsin l		9e-63	AGAP012577	CG8947			
88	275	1	AAEL011662-RA plasma glutamate carboxypeptidase	supercont1.106	0.28	AGAP001262		Protease-associated PA		
89	92		AAEL010012-RA GTP-binding protein sar1		0.0	AGAP004098	CG7073	Protein trafficking. They may modulate vesicle budding and uncoating within the Golgi apparatus		
90	364	2	AAEL011758-RA peptidyl-prolyl cis-trans isomerase f. ppif			AGAP000462	CG7768	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, cyclophilin type - protein folding by catalyzing the cis-trans isomerization of proline imidic peptide bonds in oligopeptides		
92	47	1	AAEL009770-RA ubiquitin-conjugating enzyme, E2	supercont1.428	e-114	AGAP000495	CG3018	Ubiquitin (protein processing)		
93	300		AAEL000084-RA elongin b		2e-51	AGAP003154	CG4204			
94	270		AAEL013676-RA 26S protease regulatory subunit		0.0	AGAP007243	CG1489	Protein degradation, membrane fusion, microtubule severing, peroxisome biogenesis, signal transduction and the regulation of gene expression		
95	351		AAEL002508-RA 26S protease regulatory subunit 6a			AGAP000616	CG10370	Protein degradation, membrane fusion, microtubule severing, peroxisome biogenesis, signal transduction and the regulation of gene expression		
96	231		AAEL012798-RA lumbrokinase-3(1) precursor, putative	supercont1.566	0.003			Peptidase S1A, chymotrypsin		

n	Contig	Number of sequences	vs. <i>A. aegypti</i> Liverpool strain transcripts	vs. Liverpool strain genomic supercontigs	E-value	vs. <i>A. gambiae</i>	vs. <i>D. melanogaster</i>	Category	InterPro/GO/Literature
97	314	1	AAEL011540-RA metalloproteinase, putative	percont1.894	3e-74	AGAP011475		Protein Metabolism/ Processing	Peptidase
98	202		AAEL011287-RA ubiquitin specific protease	supercont1.793	0.0	AGAP000884	CG15817		Involucrin repeat- insoluble envelope beneath the plasma membrane
99	340		AAEL002225-RA 5-oxopropyl-peptidase, putative		2e-72	AGAP006964	CG32147		Peptidase C15, pyroglutamyl peptidase I
100	308		AAEL008425-RA conserved hypothetical protein		0.0	AGAP000832	CG14899		Der1-like - proteolytic system ER
101	353		AAEL014821-RB	hypothetical protein	8e-48	AGAP001321	CG9471		NmrA-like - negative transcriptional regulator involved in the post-translational modification of the transcription factor AreA
102	260		AAEL013605-RA		e-104	AGAP006738	CG34018		Proteinase inhibitor II, Kazal
103	75	1	AAEL011711-RA nascent polypeptide associated complex alpha subunit		e-132	AGAP006766	CG8759		
104	88		AAEL003594-RA kinectin, putative	supercont1.173					
105	263	4	AAEL005065-RA ptpla domain protein		0.0	AGAP003814	CG6746		Protein tyrosine phosphatase-like protein, PTPLA - post-translational
106	265								
107	125		AAEL007898-RA calmin	supercont1.772	2e-24	AGAP009554	CG33715		Spectrin repeat
108	191		AAEL004071-RA nitrogen fixation protein nifu		0.0	AGAP005813	CG9836		
109	309	1	AAEL005207-RA neprilysin	supercont1.363	2e-77	AGAP009791	CG5905		Peptidase M, neutral zinc metallopeptidases, zinc-binding site - Peptidases
110	327		AAEL003666-RA leukotriene a-4 hydrolase		0.93	AGAP009907	CG10602		Leukotriene A-4 hydrolase/aminopeptidase
111	103		AAEL000795-RA ubiquitin		4e-94				
112	220		AAEL003921-RA <i>A. stephensi</i> ubiquitin, putative		e-133	AGAP002389	CG7215		
113	184		AAEL001887	supercont1.45	e-116	AGAP008988	CG2718		Glutamine synthetase 1, mitochondrial precursor
114	127		AAEL008770-RA proteasome subunit beta type		e-119	AGAP004991			
115	166		AAEL012122-RA 26S proteasome regulatory subunit S3	supercont1.125	2e-99	AGAP009082	CG10484		
116	169		AAEL013236-RA proteasome subunit beta type		e-173	AGAP010718	CG12323		
117	225		2	AAEL002401-RA proteasome subunit beta type		e-176	AGAP008837	CG17301	
118	232			AAEL014555-RA Ump1p protein, putative		0.0	AGAP009647	CG9324	Proteasome maturation factor UMP1
								Protein Metabolism/ Processing	
								Protein Metabolism/ Processing Proteasome Machinery	

n	Contig	Number of sequences	vs. <i>A. aegypti</i> Liverpool strain transcripts	vs. Liverpool strain genomic supercontigs	E-value	vs. <i>A. gambiae</i>	vs. <i>D. melanogaster</i>	Category	Comments
119	256	1	AAEL006061-RA proteasome subunit alpha type		2e-73	AGAP001995	CG5266	Protein Metabolism/ Processing Proteasome Machinery	
120	292	2	AAEL003431-RA proteasome subunit beta type 7,10			AGAP011423	CG12161		
121	342	1	AAEL010087-RA proteasome subunit alpha type		0.0	AGAP004960	CG1736		
122	9	7	AAEL002204-RA fatty acid synthase			AGAP008468	CG17374		Esterase/lipase/thioesterase
123	136	1							
124	197	2			2e-39				
125	313	1	AAEL003125-RA acyl-coa dehydrogenase		0.0	AGAP006780	CG6638		Beta-oxidation in mitochondrion
126	146	3	AAEL007023-RA estradiol 17 beta-dehydrogenase		0.0	AGAP008667	CG3415		Fatty acid synthase
127	262	1	AAEL004341-RA alpha-esterase			AGAP006723	CG9858	Lipid Metabolism	
128	86		AAEL009634-RD steroid dehydrogenase		e-106	AGAP004532	CG1444		Insect alcohol dehydrogenase family
129	205		AAEL007283-RA acetyl-coa synthetase		3e-85	AGAP001473	CG6432		Long chain fatty acid Co-A ligase
130	214	2	AAEL008144-RA AMP dependent ligase			AGAP010870	CG3394		AMP synthase/ long chain fatty acid Co-A ligase, acetyl-CoA synthetase
131	239	1	AAEL005997-RA allergen, putative				CG6783		Cytosolic fatty-acid binding
132	257		AAEL011676-RA amp dependent coa ligase	supercont1.178	0.0	AGAP008557	CG12512		The family of enzymes includes luciferase, long chain fatty acid Co-A ligase, acetyl-CoA synthetase
133	120		AAEL009038-RA prolylcarboxypeptidase, putative			AGAP005914	CG9953		Esterase/lipase/thioesterase
134	315		AAEL003611-RA stearoyl-coa desaturase		1e-26	AGAP003050	CG15531		Fatty acid desaturase
135	370		AAEL000615-RA hypothetical protein		0.0	AGAP000691			Tubby protein - A mutation in the mouse tub gene causes maturity-onset obesity, insulin resistance - weight gain seen in diabetes
136	185		3	AAEL008219-RA	elongase, putative	7e-07	AGAP007264		
137	213					e-127	AGAP007264		
138	117	5	AAEL013542-RA		0.0	AGAP003196	CG16904	GNS1/SUR4 membrane protein	
139	208	1	AAEL002533-RA	conserved hypothetical protein	e-144	AGAP001084	CG4020	Male sterility protein - that converts wax fatty acids to fatty alcohols	
140	336		AAEL004278-RA		3e-09	AGAP010150	CG13279	Fatty acid desaturase	
141	114	2	AAEL012698-RA ATP-binding cassette sub-family A member 3, putative	supercont1.2584	4e-54	AGAP006379	CG1718	Lipid Metabolism/Transport	AAA ATPase

n	Contig	Number of sequences	vs. <i>A. aegypti</i> Liverpool strain transcripts	vs. Liverpool strain genomic supercontigs	E-value	vs. <i>A. gambiae</i>	vs. <i>D. melanogaster</i>	Category	Comments			
142	133	2	AAEL009214-RA diazepam binding inhibitor, putative		e-120	AGAP007460	CG8627	Lipid Metabolism/Transport	Acyl-coA-binding protein			
143	361	1	AAEL008789-RA apolipoprotein-III, putative		0.0			Lipid Metabolism	Catalyses the oxidation of a wide variety of substrates/lipid synthesis peroxisomal			
144	229		AAEL010405-RA alkylidihydroxy acetonephosphate synthase		6e-74	AGAP004358	CG10253					
145	226	2	AAEL013574-RB apolipoprotein D, putative		e-168	AGAP011478			Transport of nutrients/synthesized lipids from the liver to tissues that can store them (adipocytes), metabolize them (muscle, heart, lung), or secrete them			
146	240	16	AAEL006824-RA	cytochrome P450	0.0	AGAP000877	CG3972	Detoxification/Lipid Metabolism				
147	212	1			supercont1.222					2e-49		
148	3	11								0.0		
149	22	1			supercont1.106					4e-82	AGAP001076	CG11715
150	8	11								0.0		
151	207	1	AAEL009124-RA	supercont1.390			CG10240					
152	170		AAEL009699-RA hypothetical protein	supercont1.998	4e-34					Cytochrome P450		
153	81		AAEL003349-RA NADPH cytochrome P450 reductase	supercont1.84	e-116	AGAP000500	CG11567					
154	156		AAEL010017-RA cytochrome b5		e-177	AGAP007121	CG2140					
155	14	2	AAEL010668-RA quinone oxidoreductase	supercont1.363	6e-92	AGAP006478				Detoxification	Alcohol dehydrogenase	
156	145	8			e-106	AGAP006478		Alcohol dehydrogenase GroES-like				
157	193	1	AAEL004027-RA glucose dehydrogenase				CG9509	Alcohol oxidase				
158	261		AAEL011314-RA epoxide hydrolase		0.0	AGAP008684	CG15101	Detoxification capacity for epoxides				
159	375		AAEL008159-RA short-chain dehydrogenase			AGAP011852	CG31546	Insect alcohol dehydrogenase family				
160	51	2	AAEL013407-RA catalase		6e-21	AGAP004904	CG6871					
161	316	1			0.0	AGAP004904	CG6871					
162	362				AAEL009436-RA conserved hypothetical protein	1e-17	AGAP007026				CG17753	Heavy metal transport/detoxification protein
163	137				AAEL001134-RA methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase	e-124	AGAP002499				CG17896	Aldehyde dehydrogenases are a group of enzymes that catalyse the oxidation (dehydrogenation) of aldehydes
164	348				AAEL010777-RA thioredoxin (TRX), putative	e-180	AGAP009584				CG31884	Protein disulphide oxidoreductase
165	143	1	AAEL008136-RA conserved hypothetical protein		0.0	AGAP003975	CG14716	Haem oxygenase				

n	Contig	Number of sequences	vs. <i>A. aegypti</i> Liverpool strain transcripts	vs. Liverpool strain genomic supercontigs	E-value	vs. <i>A. gambiae</i>	vs. <i>D. melanogaster</i>	Category	Comments	
166	11	5	AAEL004855-RA ADP,ATP carrier protein		0.0	AGAP006782		Energy/ Metabolism	Mitochondrial carrier protein/antioxidant	
167	178	1	AAEL013007-RA cytochrome c oxidase, subunit VB, putative			AGAP008724	CG11015			
168	33		AAEL007868-RA ubiquinol-cytochrome c reductase complex 14 kd protein		e-175	AGAP012188	CG17856			
169	20	3	AAEL002737-RA cytochrome c oxidase, subunit VIIC, putative		e-113	AGAP007621	CG2249			
170	343	1	AAEL009507-RA glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase		7e-65	AGAP010739	CG12529		Pentose pathway	
171	227		AAEL005931-RA 6-phosphogluconate dehydrogenase		e-140	AGAP004197	CG3724		Energy	
172	312		AAEL001092-RA udp-glucose pyrophosphatase		0.0	AGAP004158	CG31063		Nucleoside diphosphate pyrophosphatase - glycogen biosynthesis	
173	94		AAEL004829-RA NADH dehydrogenase, putative			AGAP005621	CG6463		ETC complex I subunit	
174	373	1	AAEL010801-RB		conserved hypothetical protein	e-159	AGAP002245		CG30354	Ubiquinol-cytochrome C reductase hinge protein -
175	215	2	AAEL009257-RA			e-130	AGAP007768		CG14028	Cytochrome c oxidase subunit VIc
176	259		AAEL000673-RA		0.0	AGAP011983	CG10424		Carbohydrate kinase	
177	95	1	AAEL007385-RB ferritin subunit 1		e-113	AGAP002465	CG2216			
178	248		AAEL010230-RA NADH:ubiquinone dehydrogenase, putative		supercont1.113	0.0	AGAP009865		CG9306	Complex I LYR protein-believed to be required for iron-sulphur cluster biogenesis
179	19	6	AAEL015404-RA lysozyme P, putative				AGAP007347		CG1165	
180	222	1	AAEL002565-RA titin	supercont1.113	1e-92	AGAP001633	CG32019	Immunity	Immunoglobulin-like domains	
181	199		AAEL004120-RA Niemann-pick type C-2, putative		0.0	AGAP012352	CG11314		Protein and Def2/Der2 allergen (immunoglobulin-like)	
182	105		AAEL014815-RA vacuolar protein sorting-associated protein (vps13)	supercont1.593		AGAP003489	CG15523		Immunoglobulin/major histocompatibility complex	
183	330		AAEL008473-RA cysteine-rich venom protein, putative			AGAP007583	CG16995		Pathogenesis-related proteins	
184	285		AAEL005753-RA serine protease			3e-80				
185	163									
186	150		AAEL013434-RA Spatzle 1A (Spz1A)	supercont1.53	5e-04				Patogen recognition	
187	52		AAEL008629-RA abc transporter		0.0		CG9663		ATPase	
188	56		AAEL013271-RA organic cation transporter	supercont1.47	2e-46	AGAP008335	CG9317	Transport	Major facilitator superfamily/General substrate transporter	

n	Contig	Number of sequences	vs. <i>A. aegypti</i> Liverpool strain transcripts	vs. Liverpool strain genomic supercontigs	E-value	vs. <i>A. gambiae</i>	vs. <i>D. melanogaster</i>	Category	Comments	
189	171	1	AAEL015592-RA structural maintenance of chromosomes smc1	supercont1.612	0.0	AGAP002947	CG6057	Transport	ABC transporter related	
190	70		AAEL000582-RA pickpocket	supercont1.590	e-159		CG9703		Na ⁺ channel, amiloride-sensitive	
191	246		AAEL008786-RA caax prenyl protease ste24	supercont1.137	4e-37	AGAP004470	CG9000		ABC transporter related - which uses the hydrolysis of ATP to energize diverse biological systems	
192	276		AAEL012903-RA sugar transporter	supercont1.151	0.0	AGAP007856			Membrane proteins responsible for the binding and transport of various carbohydrates	
193	365		AAEL013756-RA zinc/iron transporter			AGAP002624	CG4334		Metal ion transmembrane transporter activity	
194	242		AAEL006050-RA nuclear RNA export factor 2 (NXF2), putative	supercont1.42	4e-37	AGAP002004	CG4118		Regulates all receptor-mediated transport between the nucleus and the cytoplasm	
195	278		AAEL008424-RB sodium/shloride dependent amino acid transporter	supercont1.487	4e-37		CG3252		Symporter activity	
196	244		AAEL009080-RA importin 7	supercont1.288	6e-33	AGAP007299	CG7935			
197	195		AAEL001164-RA NADH:ubiquinone dehydrogenase, putative		0.0	AGAP008653	CG3214		Proton-pumping	
198	174		AAEL006482-RA sugar transporter	supercont1.127	4e-60	AGAP001160	CG31100			
199	56		AAEL013271-RA organic cation transporter	supercont1.47	2e-46	AGAP008335	CG9317		Major facilitator superfamily/General substrate transporter	
200	267		AAEL009810-RA sideroflexin 1,2,3	supercont1.200	2e-94	AGAP007119	CG6812		Tricarboxylate/iron carrier - tricarboxylate carrier from rat liver mitochondria	
201	161		AAEL008028-RA Monocarboxylate transporter 1	supercont1.296	e-171	AGAP000040	CG3456			
202	39		AAEL004523-RA SecY protein	supercont1.122	0.0	AGAP009182	CG9539			
203	353		AAEL014821-RB hypothetical protein		8e-48	AGAP001321	CG9471		Nuclear Metabolism	NmrA-like - negative transcriptional regulator involved in the post-translational modification of the transcription factor AreA
204	329		AAEL012661-RA eukaryotic translation initiation factor		0.0	AGAP007668	CG10881			RNA recognition motif - implicated in regulation of alternative splicing
205	200		AAEL011056-RA transcription factor HES-1 (Hairy and enhancer)	supercont1.809	1e-53		CG10446			Basic helix-loop-helix dimerisation region bHLH
206	198		AAEL003505-RA jun	supercont1.1051	0.0	AGAP006386	CG2275			Transcription factor Jun
207	310		AAEL006533-RA Ets domain-containing protein	supercont1.133	1e-98	AGAP009494	CG2914			Sterile alpha motif/pointed - induction or inhibition of gene transcription
208	154		AAEL001764-RA histone-fold protein CHRAC subunit, putative		e-130	AGAP005051	CG13399			Histone-like transcription factor/archaeal histone/DNA topoisomerase
209	335		AAEL012925-RA carbon catabolite repressor protein 125		4e-29	AGAP004405	CG31137			Endonuclease/exonuclease/phosphatase
210	317	AAEL004716-RB chromodomain helicase dna binding protein	supercont1.352	e-141	AGAP008698	CG3733	Histone H5			
211	301	AAEL012200-RA protein kinase C inhibitor, putative157		2e-38	AGAP006353	CG2862	Histidine triad (HIT) protein- nucleotide-binding proteins			

n	Contig	Number of sequences	vs. <i>A. aegypti</i> Liverpool strain transcripts	vs. Liverpool strain genomic supercontigs	E-value	vs. <i>A. gambiae</i>	vs. <i>D. melanogaster</i>	Category	Comments
212	149	2	AAEL003893-RA DNA repair protein xp-e / rad4	supercont1.470	0.0	AGAP003342	CG8153	Nuclear Metabolism	
213	57	3	AAEL012750-RA transcription factor TFIIF-subunit, putative	supercont1.495		AGAP011110	CG8151		
214	325	1	AAEL010826-RA histone-lysine n-methyltransferase		e-133		CG6476		Nuclear protein SET
215	64		AAEL010243-RA abnormal X segregation, putative	supercont1.111		AGAP009776	CG9703		
216	355		AAEL006087-RA conserved hypothetical protein	supercont1.1051	0.0	AGAP002284	CG12202		Tetratricopeptide TPR_1- cell cycle regulation, transcriptional control, mitochondrial and peroxisomal protein transport, neurogenesis and protein folding.
217	44		AAEL003791-RA conserved hypothetical protein	supercont1.77	e-139	AGAP000261	CG7556		Myb, DNA-binding heat shock protein
218	138		AAEL015108-RA conserved hypothetical protein		0.020	AGAP006965	CG8793		ATPase, F1/V1/A1 complex, alpha/beta subunit, nucleotide-binding
219	144		AAEL004068-RA hypothetical protein		0.004				HMG-I and HMG-Y, DNA-binding
220	204		AAEL005725-RA conserved hypothetical protein	supercont1.470	3e-51	AGAP002839	CG3184		WD-40 repeat signal transduction and transcription regulation to cell cycle control and apoptosis
221	77		AAEL007431-RA conserved hypothetical protein		e-105	AGAP005149	CG7637		Nucleolar RNA-binding protein Nop10p
222	249		AAEL008583-RA conserved hypothetical protein	supercont1.96	e-150	AGAP011880	CG8833		DNA-damage-repair proteins
223	380		AAEL007291-RA replication factor A, 14kD-subunit, putative		4e-30				Replication factor A (RPA) associates with the pre-replicative complex at the origin
224	76		AAEL007633-RA dihydropyrimidinase		0.0	AGAP003124	CG1411		D-hydantoinase
225	250		AAEL002933-RA conserved hypothetical protein			AGAP007147			Exosome-associated-DNA double-strand repair
226	293		2	AAEL006885-RA 14-3-3 protein sigma, gamma, zeta, beta/alpha			AGAP007643		CG17870
227	106		1	AAEL000572-RA amp dependent ligase	supercont1.11	e-109	AGAP001763		CG30194
228	50	1	AAEL012039-RA zinc finger protein	supercont1.644	4e-63	AGAP004637	CG2125	Nuclear Metabolism /Zinc finger	
229	241		AAEL012224-RA zinc finger protein		4e-39	AGAP009068			
230	209		AAEL004691-RA ring finger		0.0	AGAP005202	CG16982		
231	28		AAEL002094-RA conserved hypothetical protein	supercont1.550	0.0		CG18265		
232	35	2	AAEL009724-RA hypothetical protein		0.00007			Zinc finger	

N	Contig	Number of sequences	vs. <i>A. aegypti</i> Liverpool strain transcripts	vs. Liverpool strain genomic supercontigs	E-value	vs. <i>A. gambiae</i>	vs. <i>D. melanogaster</i>	Category	Comments	
233	80	1	AAEL008854-RA conserved hypothetical protein		0.0	AGAP007954	CG12099	Nuclear Metabolism /Zinc finger	Zinc finger	
234	99		AAEL002013-RA	hypothetical protein		6e-15				
235	238		AAEL003471-RA		supercont1.744	1e-48	AGAP004764			
236	243		AAEL007869-RA			2e-92				
237	160		AAEL001247-RA conserved hypothetical protein		e-121	AGAP005602	CG15715			
238	252		AAEL000171-RA	hypothetical protein	supercont1.55	2e-78				
239	45		AAEL002115-RA		supercont1.86	3e-64				
240	284		AAEL003147-RA	conserved	supercont1.468	0.0	AGAP003565			
241	42		AAEL007011-RA	hypothetical protein		7e-65	AGAP004256			CG11259
242	352		AAEL007293-RA camp-dependent protein kinase catalytic subunit			e-174	AGAP001384			CG4379
243	333		AAEL001964-RA	protein serine/threonine kinase, putative		0.0	AGAP008051	CG11390	Insect pheromone-binding protein	
244	235		AAEL002017-RA		supercont1.83	4e-98				
245	126		AAEL006406-RC conserved hypothetical protein		supercont1.204	0.013			Pheromone/general odorant binding protein	
246	84		AAEL004791-RA sorting nexin		supercont1.19	2e-94	AGAP002081		Regulator of G protein signalling	
247	175		AAEL007679-RA conserved hypothetical protein					CG13994	Protein phosphatase inhibitor	
248	182		AAEL003020-RA tailless (tll)		supercont1.195	0.0	AGAP000819	CG1378	Nuclear hormone receptor, DNA-bindin	
249	177		AAEL006203-RA Juvenile hormone-inducible protein, putative		supercont1.162					
250	269		AAEL008131-RA cytidylate kinase				AGAP003968	CG6092	Adenylate kinase	
251	323		AAEL009169-RA synaptotagmin, putative		supercont1.51	3e-12	AGAP003725	CG6643	C2- signal transduction or membrane trafficking	
252	221		AAEL010731-RA	conserved hypothetical protein		e-168	AGAP009095	CG3077	Phox-like - cell signalling, vesicular trafficking, protein sorting and lipid modification	
253	304		AAEL007173-RC			6e-08	AGAP004868	CG5174	Tumor protein D52 - signal transduction and cell proliferation	
254	74		AAEL004744-RA ccaat-binding transcription factor subunit a			0.0	AGAP008344	CG10447		
255	142		AAEL007923-RA eukaryotic translation initiation factor 4 gamma				AGAP004750	CG3845		
256	162		AAEL003063-RA semaphorin		supercont1.284	5e-69	AGAP005742	CG6446		
257	59		AAEL003945-RA transcription initiation factor IIF alpha subunit			6e-59	AGAP002779	CG10281		

N	Contig	Number of sequences	vs. <i>A. aegypti</i> Liverpool strain transcripts	vs. Liverpool strain genomic supercontigs	E-value	vs. <i>A. gambiae</i>	vs. <i>D. melanogaster</i>	Category	Comments
258	79	1	AAEL013173-RA calcium/calmodulin-dependent protein kinase type 1	supercont1.65	0.0	AGAP009034	CG17528	Cell Signalling	Doublecortin
259	89		AAEL001930-RA pra1 protein		e-122	AGAP005121	CG10373		Prenylated rab acceptor PRA1
260	129		AAEL010819-RB vacuolar ATP synthase subunit H	e-155	AGAP003588	CG11589			
261	90		AAEL003105-RA supervillin	supercont1.442	4e-76	AGAP007181	CG33232		Gelsolin
262	272	2	AAEL003006-RA 2-deoxyglucose-6-phosphate phosphatase		0.0	AGAP003372	CG15441	Cell Signalling	L-2-haloacid dehalogenase, epoxide hydrolases and phosphatases
263	273		AAEL002160-RA GTP-binding protein			AGAP000672	CG1354		
264	134		AAEL001513-RA wd-repeat protein		0.97	AGAP011562	CG2069		WD-40 repeat/signal transduction, transcription regulation, apoptosis
265	334		AAEL007845-RA rab5		0.0	AGAP007901	CG3664		Regulators of vesicle biogenesis in intracellular traffic
266	338		AAEL007065-RA adp-ribosylation factor, arf		e-113	AGAP012014	CG8385		Vesicle biogenesis in intracellular traffic
267	251		AAEL014052-RC endoplasmic reticulum protein erp29	supercont1.377	3e-50	AGAP000395	CG7225		Protein secretion
268	27		AAEL013614-RB clathrin heavy chain	supercont1.48		AGAP009647	CG9324	Vesicle Trafficking	
269	233		AAEL009829-RA ARL3, putative		0.0	AGAP006688	CG33162		ADP-ribosylation factor - vesicle biogenesis in intracellular traffic
270	303	1	AAEL012313-RA charged multivesicular body protein 5			AGAP005100	CG6259		Snf7
271	328		AAEL007162-RA	supercont1.240		AGAP002685			Autophagy-specific gene 8b
272	299		AAEL009398-RA	conserved hypothetical protein	supercont1.394	e-156	AGAP011727	CG11278	Syntaxin
273	306		AAEL011663-RA		e-149	AGAP001271	CG10228		Membrane targeting/cargo recognition role in vesicular trafficking
274	268		AAEL013661-RA	actin binding protein, putative	supercont1.304	8e-81	AGAP000235	CG4944	Thymosin beta-4
275	203				0.0	AGAP000235			Thymosin beta-4 inhibit actin polymerization
276	288		AAEL011436-RA myosin xv	supercont1.537	2e-23	AGAP005213	CG2174	Miscellaneous /Cytoskeleton	
277	324		AAEL006096-RA gelsolin precursor		0.0	AGAP011369	CG1106		
278	216		AAEL001275-RA cf-hand protein nucb1			AGAP005608	CG32190		
279	85		AAEL014048-RA hypothetical protein	supercont1.285	2e-34	AGAP009925	CG11614	Miscellaneous	Flagellar calcium-binding protein (calflagin)
280	43	2	AAEL008864-RA conserved hypothetical protein	supercont1.85	6e-56	AGAP010432	CG8531		Recoverin
281	93		AAEL004148-RA heat shock protein 70 (hsp70)-interacting protein		0.0	AGAP010188	CG2720		Heat shock protein DnaJ
282	307	1							

N	Contig	Number of sequences	vs. A. aegypti Liverpool strain transcripts	vs. Liverpool strain genomic supercontigs	E-value	vs. A. gambiae	vs. D. melanogaster	Category	Comments	
283	349	1	AAEL010132-RA pray for Elves, putative	supercont1.321	2e-76	AGAP007037		Miscellaneous	Leucine-rich repeat-protein-protein interaction/nervous system protein-protein interaction/immunity/neuronal connectivity	
284	165		AAEL009925-RA amidase		5e-87	AGAP002377	CG7900		Amidase	
285	159		AAEL006472-RA rabconnectin	supercont1.388	e-116	AGAP010490	CG3585		WD-40 repeat _ exocytosis	
286	186	2	AAEL000640-RB alanine-glyoxylate aminotransferase		3e-10	AGAP012404	CG11241		Peroxisomal/Aminotransferase class-III/Liver	
287	206		AAEL001501-RA anamorsin, putative	supercont1.566	2e-24	AGAP008883	CG4180		Anti-apoptotic factor	
288	172	1	AAEL009782-RA brain chitinase and chia		2e-45	AGAP000436	CG3044			
289	305		AAEL004783-RA ornithine decarboxylase antizyme,		0.0	AGAP010131			Ornithine decarboxylase antizyme-polyamine synthesis	
290	110		AAEL011870-RA rap55		e-142	AGAP006935	CG10686		RNA degradation/Proline-rich region	
291	23		AAEL009423-RA cd36 antigen	supercont1.408	0.0	AGAP010133	CG31741		Adhesion molecule	
292	153		AAEL000765-RA hexamerin 2 beta		0.0		CG2559		Arthropod hemocyanin/insect LSP - hexameric storage proteins (hexamerins),	
293	297		AAEL010943-RA conserved hypothetical protein		e-108	AGAP003734			Cellular retinaldehyde-binding/triple function -visual cycle enzymes	
294	98				e-170		Cellular retinaldehyde-binding/triple function			
295	40		AAEL003347	supercont1.84	0.0	AGAP008165	CG10237		Cellular retinaldehyde-binding/triple function	
296	223	AAEL008740	supercont1.345	e-40	AGAP010714	CG10849 (Sc2)	A protein similar to synaptic glycoprotein SC2 from mammals			
297	112	1	AAEL014018-RA	supercont1.83	e-129	AGAP006045	CG4005		WW/Rsp5/WWP	
298	119		AAEL001977-RA	supercont1.306	1e-57	AGAP008047	CG3173		Phosphotransferase system, HPr serine phosphorylation site	
299	123		AAEL010053-RA	supercont1.42	2e-47	AGAP002065	CG13848		Cellular retinaldehyde binding/alpha-tocopherol transport	
300	124		AAEL010368-RB	supercont1.148	9e-20	AGAP006232	CG4289		Peroxisomal membrane anchor protein	
301	135		AAEL002527-RA		1e-62	AGAP000022	CG2791		Alpha amylase, catalytic subdomain	
302	168	1	AAEL002568-RA conserved hypothetical protein		3e-87				EGF-like region	
303	224			AAEL003320-RA	supercont1.1024	3e-38	AGAP004724			Salmonella/Shigella invasin protein C
304	228			AAEL004180-RA	supercont1.311	3e-70	AGAP000106		CG7277	Aerobic ubiquinone biosynthesis pathway
305	356			AAEL001747-RA		0.0				Male sterility
306	258			AAEL000912-RA		0.0	AGAP010788			Male sterility-involved in male gametogenesis
307	66			AAEL003799-RA	supercont1.97		AGAP004092		CG1241	

N	Contig	Number of sequences	vs. <i>A. aegypti</i> Liverpool strain transcripts	vs. Liverpool strain genomic supercontigs	E-value
308	67	1	No hits found: corresponde aos contigs não encontrados no transcriptoma, mas encontrados como supercontigs.	supercont1.382	e-130
309	18	2		supercont1.495	e-138
310	91			supercont1.324	0.0
311	113			supercont1.89	e-179
312	128	1		supercont1.136	e-121
313	155			supercont1.658	0.0
314	371			supercont1.880	e-136

N - número do contig na tabela

Contig - número do contig criado pelo Programa Seqman (DNASTar)

Number of sequences - número de sequências correspondentes ao contig

vs.(versus) *A. aegypti* Liverpool strain transcripts - sequência similar (**best match**) encontrada no genoma de *A. aegypti* e o seu respectivo número de acesso

vs. Liverpool strain genomic supercontigs - supercontig correspondente ao contig cujo alinhamento resultou em valores de E>5. “E” nesse caso foi obtido do alinhamento utilizando o banco de dados de supercontigs de *A. aegypti*

vs. *A. gambiae* - gene correspondente (**best match**) encontrado no genoma de *A. gambiae* e o seu respectivo número de acesso

vs. *D. melanogaster* - gene correspondente (**best match**) encontrado no genoma de *D. melanogaster* e o seu respectivo número de acesso

Category - função inferida a partir da interpretação gerada dos resultados do alinhamento e dos dados contidos na coluna **Comments**

Comments - função inferida a partir de dados do Interpro, GO (função molecular) e da literatura. Essa inferência considera a presença de pelo menos um domínio associado a alguma função predita para a respectiva proteína correspondente ao transcrito.

8. Anexo 2: Artigos aceitos/submetidos para publicação

Martins GF; Pimenta, PFP. Structural changes in fat body of *Aedes aegypti* caused by aging and blood-feeding. *Journal of Medical Entomology*. 2008;45(2).

Martins GF.; Silva LM; Serrão JE; Fortes-Dias CL; Ramalho-Ortigão M; Pimenta PFP. Purification and primary culture of *Aedes aegypti* oenocytes. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*.

Martins GF; Ramalho-Ortigão M; Lobo NF; Severson D; McDowell MA; Pimenta PFP. Insights into the transcriptome of *Aedes aegypti* oenocytes. *Insect Molecular Biology*.

9. Referências bibliográficas

- Anderson JM, Oliveira F, Kamhawi S, Mans BJ, Reynoso D, Seitz AE, et al. Comparative salivary gland transcriptomics of sandfly vectors of visceral leishmaniasis. *BMC Genomics*. 2006;7:52. doi:10.1186/1471-2164-7-52.
- Arcà B, Lombardo F, Francischetti IMB, Pham VM, Mestres-Simon M, Andersen JF, Ribeiro JMC. An insight into the sialome of the adult female mosquito *Aedes albopictus*. *Insect Biochem Mol Biol*. 2007;37:107-27.
- Barrilas-Mury C, Paskewitz S, et al. Immune Responses of Vectors. In: Marquardt WC, editor. *Biology of disease vectors*. Elsevier, 2005.
- Barillas-Murry C, Wikel B, Han YS. Mosquito immune responses and malaria transmission: lessons from insect model systems and implications for vertebrate innate immunity and vaccine development. *Insect Biochem Mol Biol*. 2000;30: 429-42.
- Bartholomay LC, Cho W, 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*. 2004;4114-26.
- Bates KE, Whittington PM. Semaphorin 2a secreted by oenocytes signals through plexin B and plexin A to guide sensory axons in the *Drosophila* embryo. *Dev Biol*. 2007;302(2):522-35.
- Behan M, Hagedorn HH. Ultrastructural changes in the fat body of adult female *Aedes aegypti* in relationship to vitellogenin synthesis. *Cell Tissue Res*. 1978;186(3):499-506.
- Behmer OA, Tolosa EMC, Freitas Neto AG. Manual de técnicas para histologia normal e patológica. São Paulo. EDART – São Paulo Livraria Editora da Universidade de São Paulo; 1976.
- Bodenstein D. The Postembryonic Development of *Drosophila*. In: *Biology of Drosophila*. Demerec M, editors. John Wiley, New York; 1950.
- Braendle C, Miura T, Bickel R, Shingleton AW, Kambhampati S, Stern DL. Developmental origin and evolution of bacteriocytes in the Aphid–*Buchnera* symbiosis. *Plos Biol*. 2003;1(1):70-6.

- Butterworth FM, Rasch EM. Adipose tissue of *Drosophila melanogaster*: VII. Distribution of nuclear DNA amounts along the anterior-posterior axis in the larval fat body. *J Exp Zool.* 1986;158: 77-85.
- Butterworth FM, Emerson L, Rasch EM. Maturation and degeneration of the fat body in the *Drosophila* larva and pupa as revealed by morphometric analysis. *Tissue Cell.* 1988;20(2):255-68.
- Calvo E, Andersen J, Francischetti IM, Capurro ML, Debianchi AG, James AA, et al. The transcriptome of adult female *Anopheles darlingi* salivary glands. *Insect Mol Biol.* 2004;13(1):73-88.
- Camargo-Mathias MI, Caetano FH. Ultrastructural cytochemistry of oenocytes of *Pachycondyla villosa* ants (Hymenoptera: Ponerinae). *Acta Microsc* 1996;5A:6000-3.
- Chapman RF. The insects. Structure and function. Cambridge. Cambridge University; 1998.
- Chertemps T, Duportets L, Labeur C, Ueda R, Takahashi K, Saigo K, et al. A female-biased expressed elongase involved in long-chain hydrocarbon biosynthesis and courtship behavior in *Drosophila melanogaster*. *PNAS.* 2007;104(11):4273-78.
- Chertemps T, Duportets L, Labeur C, Wicker-Thomas C. A new elongase selectively expressed in *Drosophila male* reproductive system. *Biochem Bioph Research Com.* 2005;333:1066-72.
- Christophides GK, Zdobnov E, Barillas-Mury C, Birney E, Blandin S, Blass C, et al. Immunity-related genes and gene families in *Anopheles gambiae*. *Science.* 2002;298:159-65.
- Christophides GK, Vlachou D, Kafatos FC. Comparative and functional genomics of the innate immune system in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Immunol Rev.* 2004;198:127-45.
- Consoli RAGB, Lourenço-de-Oliveira RL. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Rio de Janeiro. Fiocruz; 1994.
- Cruz-Landim C. Estudo do corpo gorduroso de *Apis mellifera adansonii* ao microscópio óptico e eletrônico. Anais do 3º Congresso Brasileiro de Apicultura. Piracicaba - SP. 1975;137-44.

Cruz-Landim C. Histological and cytological studies on the fat body of the queen honeybee abdomen during the active oviposition phase. *Rev Brasil Biol.* 1984;45(3):221-32.

Dean RL, Locke M, Collins JV. Structure of fat body. In: Kerkut GA, Gilbert LI, editors. *Comprehensive Insect physiology biochemistry and pharmacology*, vols 1-13. Oxford. Pergamon Press, 1985.

Deitsch KW, Chen JS, Raikhel AS. Indirect control of yolk protein genes by 20-hydroxyecdysone in the fat body of the mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Molec Biol.* 1995;25(4):449-54.

Deyashiki Y, Ohshima K, Nakanish M, Sato K, Matsuura K, Hara A. Molecular cloning and characterization of mouse estradiol 17 β -dehydrogenase (A-specific), a member of the aldoketoreductase family. *J Biochem Mol Biol.* 1995;270(18):10461-67.

Diehl PA. Paraffin synthesis in the oenocytes of the desert locust. *Nature.* 1973; 243:468-470.

Diehl PA. Synthesis and release of hydrocarbons by the oenocytes of the desert locust *Schistocerca gregaria*. *J Insect Physiol.* 1975;21:1237-46.

Dillon RJ, Ivens AC, Churcher C, Holroyd N, Quail MA, Rogers ME, et al. Analysis of ESTs from *Lutzomyia longipalpis* sand flies and their contribution toward understanding the insect-parasite relationship. *Genomics.* 2006;88:831-40.

Dimopoulos G. Insect immunity and its implication in mosquito-malaria interactions. *Cell Microbiol.* 2003;5(1):3-14.

Dittmann F, Kogan PH, Hagedorn HH. Ploid levels and DNA synthesis in fat body cells of the adult mosquito *Aedes aegypti*: the role of juvenile hormone. *Arch Insect Biochem Physiol.* 1989;12:133-43.

Easton CM, Horwath KL. Characterization of primary cell cultures derived from fat body of the beetle *Tenebrio molitor* and the immunolocalization of a thermal hysteresis protein *in vitro*. *J Insect Physiol.* 1994;40(6):537-47.

Eberle MW, Mclean DL. Initiation and orientation of the symbiont migration in the human body louse *Pediculus humanus* L. *J Insect Physiol.* 1982;28(5):417-22.

Elstob PR, Brodu V, Gould AP. Spalt-dependent switching between two cell fates that are induced by the *Drosophila* EGF receptor. *Development.* 2001;128:723-32.

- Fan Y, Zurek L, Dykstra MJ, Schal C. Hydrocarbon synthesis by enzymatically dissociated oenocytes of the abdominal integument of the german cockroach *Blattella germanica*. *Naturwissenschaften*. 2003;90:121-6.
- Feitosa FM, Calvo E, Merino EF, Durham AM, James AA, De Bianchi AG, et al. A transcriptome analysis of the *Aedes aegypti* vitellogenic fat body. *J Insect Sc*. 2006;6:06. Disponível na rede: insectscience.org/6.06.
- Foratini OP. *Culicidologia médica*. Vol 2. Edusp, São Paulo, 2002.
- Fontanetti CS, Camargo-Mathias MI, Tiritan BM. The fat body in *Rhinocricus padbergi* (Diplopoda Spirobolida). *Iheringia Sér. Zool*. 2004;94(4):351-5.
- Fukatsu T, Ishikawa H. Soldier and male of an eusocial aphid *Colophina arma* lack endosymbiont: implications for physiological and evolutionary interaction between host and symbiont. *J Insect Physiol*. 1992;38(12):1033-42.
- Gandhe AS, Arunkumar KP, John SH, Nagaraju J. Analysis of bacteria-challenged wild silkmoth *Antheraea mylitta* (Lepidoptera) transcriptome reveals potential immune genes. *BMC Genomics*. 2006; 7:184. doi:10.1186/1471-2164-7-184.
- Gilbert, LI. 2004. Halloween genes encode P450 enzymes that mediate steroid hormone biosynthesis in *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Endocrinol*. 215:1-10.
- Gillespie JP, Kanost MR, Trenczek T. Biological mediators of insect immunity *Ann Rev Entomol*. 1997;42:611-43.
- Gorman MJ, Paskewitz SM. Serine proteases as mediators of mosquito immune responses. *Insect Biochem Mol Biol*. 2001;31:257-62.
- Gould AP, Elstob PR, Brodu V. Insect oenocytes: a model system for studying cell-fate specification by Hox genes. *J Anat*. 2001;199:25-33.
- Grzelak K, Kumaran AK. Developmental changes in the larval fat body during metamorphosis in *Galleria mellonella*. *J Insect Physiol*. 1986;32(5):445-53.
- Gutierrez E, Wiggins D, Fielding B, Gould AP. Specialized hepatocyte-like cells regulate *Drosophila* lipid metabolism. *Nature*. 2007;445:275-80.

- Hartenstein AH, Rugendorff A, Tepass U, Hartenstein V. The function of the neurogenic genes during epithelial development in the *Drosophila* embryo. *Development*. 1992;116:1203-20.
- Hauerland NH, Nair KN, Bowers WS. Fat body heterogeneity during development of *Heliothis zea*. *Insect Biochem*. 1990;20:829-37.
- Hauerland NH, Shirk PD. Regional and functional differentiation in the insect fat body. *Ann Rev Entomol*. 1995;40:121-45.
- Hernández-Crespo P, Lopez-Blachere C, Bergoin M, Quiot JM. Establishment of two new orthopteran cell lines. *In Vitro Cell Dev Biol Animal*. 2000;36:559-62.
- Hetru C, Troxler L, Hoffmann JA. *Drosophila melanogaster* antimicrobial defense. *J Infect Dis*. 2003;187(2):S327-34.
- Hoffman J, Reichhart J. *Drosophila* immunity. *Trends Cell Biol*. 1997;7:309-16.
- Holt RA, Subramanian GM, Halpern A, Sutton GG, Charlab R, Nusskern DR, et al. The genome sequence of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Science*. 2002;298:129-49.
- Hultmark D. Insect lysozymes. In: *Lysozymes: Model enzymes in biochemistry and biology*. Jollès P, editor. Birkhäuser Verlag Basel; 1996.
- Inoue H, Mitsuhashi J. Further establishment of continuous cell lines from larval fat bodies of the cabbage armyworm *Mamestra brassicae* (Lepidoptera: Noctuidae). *Appl Entomol Zool*. 1985;20(4):496-8.
- Jackson A, Locke M. The formation of plasma membrane reticular systems in the oenocytes of an insect. *Tissue Cell*. 1989;21:463-73.
- Joblin B, Lewis, DJ. *Anatomical Drawings of biting flies*. British Museum of Natural History, London, in association with the Wellcome Trust. 1987.
- Johnson MB, Butterworth FM. Maturation and aging of adult fat body and oenocytes in *Drosophila* as revealed by light microscopic morphometry. *J Morphol*. 1985;184:51-9.
- Kanost MR. Serine proteinase inhibitors in arthropod immunity. *Dev Comp Immunol*. 1999;23:291-301.

- Kato H, Anderson JM, Kamhawi S, Oliveira F, Lawyer PG, Pham VM, et al. High degree of conservancy among secreted salivary gland proteins from two geographically distant *Phlebotomus dubosqi* sandflies populations (Mali and Kenya). *BMC Genomics*. 2006;7:226. doi:10.1186/1471-2164-7-226.
- Kishimoto A, Nakato H, Izumi S, Tomino S. Biosynthesis of major plasma proteins in the primary culture of fat body cells from the silkworm *Bombyx mori*. *Cell Tissue Res*. 1999;297:329-35.
- Klowden MJ, Davis EE, Bowen MF. Role of the fat body in the regulation of host-seeking behaviour in the mosquito *Aedes aegypti*. *J Insect Physiol*. 1987;33(9):643-6.
- Koschevnikov G. Ueber den fettkörper und die oenocyten der honigbiene (*Apis mellifera*). *Z Anz Bd*. 1900;23:657-61.
- Landois L. Ueber die funktion des fettkörpers. *Zeitschr f Wissensch Zoologie*. 1865;15:371-2.
- Larsen WJ. Cell remodeling in the fat body of an insect. *Tissue Cell*. 1976;8(1):73-92.
- Leake CJ. Establishing primary cell cultures from disease vectors and maintenance of continuous cell lines. In: Crampton JM, Beard CB, Louis C, editors. *Molecular biology of insect disease vectors: a methods manual*. Chapman & Hall; 1997.
- Locke M. The ultrastructure of the oenocytes in the molt/intermolt cycle of an insect. *Tissue Cell*. 1969;1:103-54.
- Locke M. Surface membranes, Golgi complexes, and vacuolar system. *Ann Rev Entomol*. 2003;48:1-27.
- Locke M; Collins JV. The structure and formation of protein granules in the fat body of an insect. *J Cell Biol*. 1965;26:857-84.
- Lorenz MW, Anand AN. Changes in the biochemical composition of fat body stores during adult development of female crickets, *Gryllus bimaculatus*. *Arch Insect Biochem Physiol*. 2004;56:110-9.
- Lovozei AL. Culicídeos (Mosquitos). In: Marcondes CB, editor. *Entomologia médica e veterinária*. Editora Atheneu. São Paulo, 2001.

- Lycett GJ, McLaughlin LA, Ranson H, Hemingway J, Kafatos FC, Loukeris TG, Paine MJJ. *Anopheles gambiae* P450 reductase is highly expressed in oenocytes and in vivo knockdown increases permethrin susceptibility. *Insect Mol Biol.* 2006;15(3):321-7.
- Lynn DE. Methods for maintaining insect cell cultures. *J Insect Sc.* 2002;2(9). Disponível na rede: insectscience.org/2.9.
- Marks EP. Insect tissue culture: an overview 1971-1978. *Ann Rev Entomol.* 1980;25:73-101.
- Marques-Silva S, Oliveira HG, Holtz AM, Sarmiento RA, Serrão JE. Fat body morphology of *Thyrinteina arnobia* (Lepidoptera: Geometridae) Larvae in function of two alimentary sources. *Rev Chilena Ent.* 2003;29:105-10.
- Martins GF, Serrão JE. Notes on ovary structure in four species of adult dragonflies (Anisoptera: Gomphidae Libelulidae). *Not Odonat.* 2002;109-11.
- Martins GF, Serrão JE. A comparative study of the ovaries in some Brazilian bees (Hymenoptera; Apoidea). *Pap Av Zool.* 2004;44(3):45-53.
- Mitchison TJ, Cramer LP. Actin-based cell motility review and cell locomotion. *Cell.* 1996;(84):371-9.
- Mitsuhashi J. A continuous cell line derived from fat bodies of the common armyworm *Leucania separata* (Lepidoptera: Noctuidae). *App Entomol Zool.* 1983;18(4):533-9.
- Mitsuhashi J. Isolation of a continuous cell line from larval fat bodies of an arctiid moth *Spilarctia seriatopunctata* (Insecta Lepidoptera Arctiidae). *Zool Sci.* 1984;1:415-9.
- Mitsuhashi J; Inoue H. Obtainment of a continuous cell line from the larval fat bodies of the mulberry tiger moth *Spilosoma imparilis* (Lepidoptera: Arctiidae). *Appl Entomol Zool.* 1988;23(4):488-90.
- Nakabachi A, Shigenobu S, Sakazume N, Shiraki T, Hayashizaki Y, Carninci P, et al. Transcriptome analysis of the aphid bacteriocyte the symbiotic host cell that harbors an endocellular mutualistic bacterium *Buchnera*. *PNAS.* 2005;102(15):5477-82.
- Nene V, Wortman JR, Lawson D, Haas B, Kodira C, Tu ZJ, et al. Genome sequence of *Aedes aegypti* a major arbovirus vector. *Science.* 2007;316:1718-23.

Oliveira G. The *Schistosoma mansoni* transcriptome: an update. *Exp Parasitol.* 2007;117:229-35.

Oliveira F, Kamhawi S, Seitz AE, Pham VM, Guigal PM, Fischer L, et al. From transcriptome to immunome: Identification of DTH inducing proteins from a *Phlebotomus ariasi* salivary gland cDNA library. *Vaccine.* 2006;24:374-90.

OMS (Organização Mundial da Saúde). Dengue and Dengue haemorrhagic fever. World Health Organization, Geneva. 2002.

Omura T. Forty years of cytochrome P450. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999;266:690-8.

Paes de Oliveira WT. Ultra-estrutura do corpo gorduroso e desenvolvimento do ovário em rainhas e operárias de *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lep. [Tese de Doutorado]. Rio Claro (SP): Universidade Estadual Paulista; 2002.

Paskewitz SM, Christensen BM. Immune responses of vectors. In: Beaty BJ, Marquadt WC, editors. *Biology of disease vectors.* Boulder Colorado: University Press of Colorado; 1996.

Pevsner J. *Bioinformatics and functional genomics.* Wiley Liss; 2003.

Philippe C. Culture of fat body of *Periplaneta americana*: tissue development and establishment of cell lines. *J Insect Physiol.* 1982;38(3):257-65.

Pimenta PFP, De Souza W. *Leishmania mexicana amazonensis* surface charge of amastigote and promastigote forms. *Exp Parasitol.* 1983;56:194-206.

Raikhel AS. Role of lysosomes in regulating of vitellogenin secretion in the mosquito fat body. *J Insect Physiol.* 1986a;32(7):597-604.

Raikhel AS. Lysosomes in the cessation of vitellogenin secretion by the mosquito fat body; selective degradation of Golgi complexes and secretory granules. *Tissue Cell.* 1986b;18(1):125-42.

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

Raikhel AS, Deitsch KW, Sappington TW. Culture and analysis of the insect fat body. In: *Molecular biology of insect disease vectors: a methods manual.* In: Crampton JM, Beard CB, Louis C, editors. Chapman & Hall. 1997;507-22.

- Ramalho-Ortigão M, Kamhawi S, Joshi MB, Reynoso D, Lawyer PG, Dwyer DM, et al. Characterization of a blood activated chitinolytic system in the midgut of the sand fly vectors *Lutzomyia longipalpis* and *Phlebotomus papatasi*. *Insect Mol Biol*. 2005;14(6):703-12.
- Ramalho-Ortigão M, Jochim RC, Anderson JM, Lawyer PG, Pham VM, Kamhawi S, et al. Exploring the midgut transcriptome of *Phlebotomus papatasi*: comparative analysis of expression profiles of sugar-fed blood-fed and *Leishmania major*-infected sandflies. *BMC Genomics*. 2207;8:300. doi:10.1186/1471-2164-8-300.
- Ribeiro JMC, Charlab R, Pham VM, Garfield M, Valenzuela JG. An insight into the salivary transcriptome and proteome of the adult female mosquito *Culex pipiens quinquefasciatus*. *Insect Biochem Mol Biol*. 2004;34:543-63.
- Rollo JP, Camargo-Mathias MI. Morphohistochemical characterization of the perivisceral fat body in royal and worker female castes in different ages of *Atta sexdens rubropilosa* ants (Hymenoptera Formicidae). *Sociobiology*. 2006;47(2):519-30.
- Roma GC, Bueno OC, Camargo-Mathias MI. Comparative study of the fat body in some genera of the Attini Tribe (Hymenoptera: Formicidae). *Sociobiology*. 2005;45(2):449-62.
- Roma GC, Camargo-Mathias MI, Bueno OC. Fat body in some genera of leaf-cutting ants (Hymenoptera: Formicidae). Proteins lipids and polysaccharides detection. *Micron*. 2006;37:234-42.
- Roma GC, Bueno OC, Camargo-Mathias MI. Chemical detection of the proteins and lipids in the fat body cells from workers of Attini ants (Hymenoptera: Formicidae). *Cell Biol Int*. 2008. doi:10.1016/j.cellbi.2007.12.010.
- Romer F, Emmerich H, Nowock J. Biosynthesis of ecdysones in isolated prothoracic glands and oenocytes of *Tenebrio molitor* in vitro. *J Insect Physiol*. 1974;20(10):1975-87.
- Ruvolo MC, Cruz-Landim C. Morphologic and morphometric aspects of oenocytes of *Apis mellifera* queens and workers in different phases of life. *Mem I Oswaldo Cruz*. 1993;88(3):387-95.
- Schneider JR, Mori A, Romero-Severson J, Chadee DD, Severson DW. Investigations of dengue-2 susceptibility and body size among *Aedes aegypti* populations. *Med Vet Entomol*. 2007;21(4):370-6.

- Schuler GD. Pieces of the puzzle: expressed sequence tags and the catalog of human genes. *Mol Med.* 1997;75:694-98.
- Scott JG. 1999. Cytochromes P450 and insecticide resistance. *Insect Biochem Mol Biol.* 29:757-77.
- Scott JG, Wen Z. 2001. Cytochromes P450 of insects: the tip of the iceberg. *Pest Manag Sci.* 57:958-67.
- Simpson AECM. The cytochrome P450 4 (CYP4) family. *Gen Pharmac.* 1997;28(3):351-359.
- Snigirevskaya ES, Hays AR, Raikhel AS. Secretory and internalization pathways of mosquito yolk protein precursors. *Cell Tissue Res.* 1997;290:129-42.
- Šobotník J, Weyda F, Hanus R, Cvač J, Nebesářová J. Fat body of *Prorhinotermes simplex* (Isoptera: Rhinotermitidae): ultrastructure inter-caste differences and lipid composition. *Micron.* 2006;37(7):648-56.
- Sohal RS. Fine structural alterations with age in the fat body of the adult male housefly *Musca domestica*. *Z. Zellforsch.* 1973;140:169-75.
- Sondergaard L. Homology between the mammalian liver and the *Drosophila* fat body. *Trends Genet.* 1993;9(6):193.
- Stoppie P, Briers T, Huybrechts R, De Loof A. Molting hormone juvenile hormone and the ultrastructure of the fat body of adult *Sarcophaga bullata* (Diptera). *Cell Tissue Res.* 1981;221:233-44.
- Sudeep AB, Mourya DT, Mishra AC. Insect cell culture in research: Indian scenario. *Indian J Med Res.* 2005;121:725-38.
- Sun J, Hiraoka T, Dittmer NT, Cho KH, Raikhel AS. Lipophorin as a yolk protein precursor in the mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol.* 2000;30:1161-71.
- Sundseth SS, Nix CE, Waters LC. Isolation of insecticide resistance-related forms of cytochrome P-450 from *Drosophila melanogaster*. *Biochem. J.* 1990;265:213-7.
- Tadkowsky TM, Jones JC. Changes in the fat body and oocysts during starvation and vitellogenesis in a mosquito *Aedes aegypti* (L.). *J Morphol.* 1979;159:185-204.

Tadkowski TM, Jones JC, Firman J. The fine structure of the imaginal oenocytes of *Aedes aegypti*. *Ann Entomol Soc Am*. 1977;70(6):837-40.

Takahashi H, Komano H, Natori S. Expression of the lectin gene in *Sarcophaga peregrina* during normal development and under conditions where the defense mechanism is activated. *J Insect Physiol*. 1986;32(9):771-9.

Thathy V, Severson D, Christensen BM. Reinterpretation of the genetics of susceptibility of *Aedes aegypti* to *Plasmodium gallinaceum*. *J Parasitol*. 1994;80(5):705-12.

Thiele E, Camargo-Mathias MI. Morphology ultramorphology and morphometry of the fat body of virgin females and queens of the ants *Pachycondyla striata* (Hymenoptera: Formicidae). *Sociobiology*. 2003;42(2):243-54.

Thomsen E, Thomsen M. Fine structure of the fat body of the female of *Calliphora erythrocephala* during the first egg-maturation cycle. *Cell Tissue Res*. 1974;152(2):193-217.

Tobe SS, Davey KG. Autoradiographic study of protein synthesis in abdominal tissues of *Glossina austeni*. *Tissue Cell*. 1974;6(2):255-68.

Tobe SS, Davey KG, Huebner E. Nutrient transfer during the reproductive cycle in *Glossina austeni* Newst. I. Histology and histochemistry of the milk gland fat body and oenocytes. *Tissue Cell*. 1973;5:633-50.

Tucker LE. The influence of diet age and state of hydration on Na⁺ K⁺ and urate balance in the fat body of the cockroach *Periplaneta americana*. *J Exp Biol*. 1977;71:67-79.

Tzou P, De Gregório E, Lemaitre B. How *Drosophila* combats microbial infection: a model to study innate immunity and host-pathogen interactions. *Curr Opin Microbiol*. 2002;5:102-10.

Walker PA. The structure of the fat body in normal and starved cockroaches as seen with electron microscope. *J Insect Physiol*. 1965;11:1625-31.

Wang Z, Haunerland NH. Ultrastructural study of storage protein granules in fat body of the corn earworm *Heliothis zea*. *J Insect Physiol*. 1991;37(5):353-63.

Wang Z, Haunerland NH. Fate of differentiated fat body tissues during metamorphosis of *Helicoverpa zea*. *J Insect Physiol*. 1992;38(3):199-213.

- Wang Y, Zhang P, Fujii H, Banno Y, Yamamoto K, Aso Y. Proteomic studies of lipopolysaccharide-induced polypeptides in the silkworm *Bombyx mori*. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2004;68(8):1821-3.
- Warr E, Hurd H. Apoptosis in the fat body tissue of the beetle *Tenebrio molitor* parasitized by *Hymenolepis diminuta*. *J Insect Physiol*. 2004;50:1037-43.
- Warr E, Aguilar R, Dong Y, Mahairaki V, Dimopoulos G. Spatial and sex-specific dissection of the *Anopheles gambiae* midgut transcriptome. *BMC Genomics*. 2007;8:37. doi:10.1186/1471-2164-8-37.
- Wigglesworth V. The physiology of the cuticle and of ecdysis in *Rhodnius prolixus* (Triatomidae Hemiptera); with special reference to the function of the oenocytes and of the dermal glands. *Quart J Micros Sci*. 1933;76:269-318.
- Wigglesworth VB. The storage of protein fat glycogen and uric acid in the body and other tissues of mosquito larvae. *J Exp Biol*. 1942;19:56-77.
- Wigglesworth VB. Polyploidy and nuclear fusion in the fat body of *Rhodnius* (Heteroptera). *J Cell Sci*. 1967;2: 603-616 .
- Wilkinson TL, Fukatsu T, Ishikawa H. Transmission of symbiotic bacteria *Buchnera* to parthenogenetic embryos in the aphid *Acyrtosiphon pisum* (Hemiptera: Aphidoidea). *Arthropod Struct Dev*. 2003;32:241-5.
- Valenzuela JG, Pham VM, Garfield MK, Francischetti IMB, Ribeiro JMC. Toward a description of the sialome of the adult female mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol*. 2002;32:1101-22.
- Valenzuela JG, Francischetti IMB, Pham VM, Garfield MK, Ribeiro JMC. Exploring the salivary gland transcriptome and proteome of the *Anopheles stephensi* mosquito. *Insect Biochem. Mol. Biol*. 2003;33:717-32.
- Vilmos P, Kurucz E. Insect immunity: evolutionary roots of the mammalian innate immune system. *Immunol Lett*. 1998;62:59-66.
- Zachary D, Hoffmann D. Lysozyme is stored in the granules of certain haemocyte types in *Locusta*. *J Insect Physiol*. 1984;30(5):405-11.

Zhang H, Zhang Y, Qin Q, Li X, Miao L, Wang Y, et al. New cell lines from larval fat bodies of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae): Characterization and susceptibility to baculoviruses. *J Invertebr Pathol.* 2006;91:9-12.

Zhu Y, Johnson TJ, Myers AA, Kanost MR. Identification by subtractive suppression hybridization of bacteria-induced genes expressed in *Manduca sexta* fat body. *Insect Biochem Mol Biol.* 2003;33:541-59.

Zara FJ, Caetano FH. Ultrastructure and histochemistry of fat body cells from last instar larval of the *Pachycondyla* (= *Neoponera*) *villosa* (Fabricius) (Formicidae: Ponerinae). *Braz J Biol.* 2004;64(3b):725-35.

Zara FJ, Caetano FH, Cabrera ACG, Jaffé K. Ultrastructure of last larval instar fat body cells of *Pachycondyla* (= *Neoponera*) *villosa* (Formicidae: Ponerinae): cytochemical and chemical analysis. *Anim Biol.* 2003;53(1):1-16.

Zasloff M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature.* 2002;415(24): 389-95.

Ziegler R, Ibrahim MM. Formation of lipid reserves in fat body and eggs of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. *J Insect Physiol.* 2001;47:623-7.