



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA
AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

**ESTUDO DA INTERAÇÃO ENTRE *AEDES AEGYPTI*
E *ACANTHAMOEBA POLYPHAGA***

ÉDER MORAES SAUCEDO
Farmacêutico

PORTO ALEGRE – RS - BRASIL
Abril, 2011

ÉDER MORAES SAUCEDO

**ESTUDO DA INTERAÇÃO ENTRE *Aedes Aegypti*
E *Acanthamoeba polyphaga***

Dissertação de Mestrado apresentado ao programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Onilda Santos da Silva

PORTO ALEGRE – RS - BRASIL
Abril, 2011

CIP - Catalogação na Publicação

Moraes Saucedo, Eder
ESTUDO DA INTERAÇÃO ENTRE AEDES AEGYPTI E
ACANTHAMOEBA POLYPHAGA / Eder Moraes Saucedo. --
2011.
`79 f.

Orientadora: Onilda Santos da Silva.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia
Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2011.

1. aegypti. 2. Acanthamoeba polyphaga. 3.
endossimbiontes. I. Santos da Silva, Onilda, orient.
II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

“Fracassos? Não sei do que falas, em cada experiência descobro um dos motivos pelo qual a lâmpada não funciona. Agora sei mais de mil maneiras de como não fazer a lâmpada.”

Thomas Edison

AGRADECIMENTOS

Primeiramente quero agradecer a Deus, por ter me guiado e conduzido até aqui. Dando-me vontade e inspiração a cada dia, para buscar a ser melhor e poder dar o melhor de mim.

Agradeço aos meus amados pais, Astolfo e Doracilda. Por terem me preparado para enfrentar a vida e suas dificuldades. Por todo o incentivo e ajuda incondicionais, seus joelhos no chão não foram em vão. Certamente vocês foram fundamentais para que eu chegasse até aqui, e sempre lhes serei grato por isso.

Aos meus irmãos, Ivan e Alex, por terem partilhado e me ajudando nesta caminhada.

Agradeço e serei eternamente grato à Professora Dr^a. Onilda Santos da Silva, a qual foi uma grande amiga neste tempo que passamos juntos, pela sua dedicação, paciência, carinho, conselhos e extrema competência e rigor nas orientações e suporte científico. Sua ética científica, sua habilidade de ensinar e o seu empenho incansável em aprimorar o conhecimento serviram-me de exemplo profissional a ser seguido.

Agradeço ao pessoal do laboratório de Parasitologia (técnicos, bolsistas, monitores, mestrandos e doutorandos) que muito me ajudaram com matérias e amizade de cada dia buscar resolver os problemas enfrentados.

Agradeço a Prof. Dr. José Carlos Germani, pela confiança e investimento em mim e por ter me dado oportunidade de fazer este mestrado.

Agradeço aos Professores Carlos Eugênio Silva e Marilise Brittes Rott, por suas dicas e orientações, para a realização deste trabalho.

Agradeço ao Laboratório de Histologia Ufrgs em especial a Doutorandas Patrícia Nascimento, Silvia e Ligia, por ter me dado suporte para ter conseguido concretizar este trabalho.

Agradeço aos amigos que de longe me incentivaram e me deram apoio emocional, Pedro Kemerich, Ricardo Unfried, Fernando Dellazzana, Andrei Nascimento, Renata Pereira, Bruno Vizzotto, Roberto Christ Vianna. Muitos vêm, muitos vão, mas o mais importante é que a amizade sincera dura para sempre, não importando a distancia nem o tempo.

Agradeço aos meus tios e em especial ao Tio Luiz Antonio e Tia Noeli, e prima Kamila Rafaela, quais no inicio da minha caminhada aqui em Porto Alegre, me cederam sua casa para morar, serei eternamente grato.

Agradeço a minha noiva Kalini Landarin, por seu amor, paciência e compreensão.

À CAPES pela bolsa e pelo apoio financeiro concedido.

Agradeço em geral a todos que em algum momento participaram desta caminhada.

Muito obrigado.

ESTUDO DA INTERAÇÃO ENTRE *Aedes aegypti* E *ACANTHAMOEBA POLYPHAGA*¹

Autor: Eder Moraes Saucedo
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Onilda Santos da Silva

RESUMO

A interação entre microrganismos endossimbiontes e mosquitos tem sido amplamente estudada. Tais estudos visam encontrar alternativas para o controle biológico de mosquitos vetores. Recentemente foi descrito que *Acanthamoeba polyphaga* é capaz de infectar *Aedes aegypti*, mosquito vetor do vírus da dengue. Visando entender melhor sobre esta interação, estudaram-se aspectos comportamentais e de desenvolvimento de mosquitos alimentados com *A. polyphaga*, em condições de laboratório. Além disso, procurou-se localizar os sítios de infecção destas amebas no interior do corpo dos mosquitos, através de cortes histológicos. Nas condições em que os testes foram feitos, as amebas contribuíram para o aumento de produção de ovos de *Ae. aegypti*. Da mesma forma, não produziram patologias nos insetos, uma vez que não houve morte dos mesmos, durante o desenvolvimento dos bioensaios. Algumas amebas que serviram de alimentação às larvas, escaparam à barreira da membrana peritrófica e à resposta de defesa do mosquito, invadindo outras regiões do corpo das larvas e dos adultos. As amebas são encontradas nas formas de cistos e trofozoítos, indicando que o micro-habitat intestinal e do corpo gorduroso não parecem ser muito lesivos para as mesmas. Os resultados obtidos até a data indicam a importância da continuidade dos estudos. Também é importante estudar outros processos associados à resposta imune dos mosquitos quando as amebas conseguem escapar as barreiras de defesa e invadir outros locais do corpo.

Palavras-chaves: *Aedes aegypti*, *Acanthamoeba polyphaga*, endossimbiontes,

¹Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente. Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS, Brasil (77 páginas). Abril, 2011.

**STUDY OF INTERACTION BETWEEN *AEDES AEGYPTI*
and *ACANTHAMOEBA POLYPHAGA***

Autor: Éder Moraes Saucedo
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Onilda Santos da Silva

ABSTRACT

The interaction between endosymbiont microorganisms and mosquitoes have been widely studied. Such studies have the aim to find alternatives for biological control of mosquitoes. Recently it was reported that *Acanthamoeba polyphaga* is able of infecting *Aedes aegypti* the vector mosquito of dengue viruses. In order to better understand such interaction, we studied some biological aspects and development of mosquitoes that fed on *A. polyphaga*, in laboratory conditions. Furthermore, we tried to clarifying the sites of infection of these amoebae inside the mosquitoes body, using histological sections. In conditions where the tests were done, the amoebas contributed to the increased of egg production of *Ae. aegypti*. Likewise, no pathologies were observed in the insects, since no death was observed, during the development of bioassays. Some amoebas served as food to the larvae escaped the barrier of the peritrophic membrane, as well as the defense response of the mosquito, invading other body regions of larvae and adults. Amoebas are found in the forms of cysts and trophozoites, indicating that the intestinal micro-habitat and body fat did not appear to be especially harmful to them. The results to date indicate the importance of continuing such studies. It is also important to study other processes associated with the immune response of mosquitoes when amoebae escape the defense barriers and invade other body sites.

Keywords: : *Aedes aegypti*, *Acanthamoeba polyphaga*, endosymbionts

¹Master of Science dissertation in Agricultural and Environmental Microbiology, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (77 p). Abril, 2011.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fases evolutivas do <i>Aedes aegypti</i> .	20
Figura 2. Aspectos da morfologia externa do adulto fêmea	22
Figura 3. Ovos <i>Aedes aegypti</i>	25
Figura 4. Larva de quarto estágio <i>Aedes aegypti</i>	26
Figura 5. Aspecto lateral da Pupa	28
Figura 6. Ilustração representando a secção longitudinal de <i>A. aegypti</i>	36
Figura 7. Cisto de <i>Acanthamoeba</i> spp.	42
Figura 8. Trofozoitos de <i>Acanthamoeba polyphaga</i>	43
Figura 9. Placa demonstrativa do experimento	48
Figura 10. Desempenho da oviposição das fêmeas de <i>A. aegypti</i>	52
Figura 11. Larva de <i>A. aegypti</i> quarto estágio, corada com Azul de Toluidina,	54
Figura 12. Larva estágio 4º de <i>A. aegypti</i> corte transversal (a) Intestino médio, (b) Presença de cistos de <i>A. polyphaga</i> no lúmen do intestino da larva.	55
Figura 13. a) Presença de fungos no lúmen do intestino da larva. B) Presença de bactérias no intestino da larva.	56
Figura 14. Trofozoito de <i>A. polyphaga</i> na hemolinfa da região posterior do corpo do mosquito adulto.	57
Figura 15. Mosquito adulto corado com azul de tuleidina a) Presença de vesículas e uma fina camada mucoide acima das células epiteliais. b) Observa-se a presença de <i>A. polyphaga</i> ao lado do Túbulo de Malphige, na hemolinfa.	57
Figura 16. a) Corte longitudinal mosquito adulto <i>A. aegypti</i> com coloração de HE. b) e c) Observa-se a presença de vesículas d) observa-se a formação de uma espessa membrana peritrófica no intestino posterior do mosquito. e) formação de células regenerativas) do intestino médio do mosquito.	58

LISTA DE TABELA

Tabela 1. Medidas das larvas de *A. aegypti* alimentadas com *A. polyphaga* ..53

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AVL- Amebas de vida livre

DENV – Vírus da Dengue

MP – Membrana/matriz peritrófica

µL – microlitro

µm – micrometro

°C – graus Celsius

PBS – Tampão fosfato

UV – Ultra violeta

OsO₄ - Tetróxido de ósmio

HE – Hematoxilina e eosina

CFSE – Kit de proliferação celular

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	v
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	x
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	x
1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 <i>Aedes aegypti</i>	17
2.1.1 Características Biológicas do <i>A. aegypti</i>	18
2.1.1 Morfologia Externa de Mosquitos Adultos	21
2.2 Ovos	23
2.3 Estágio larval morfologia externa	25
2.2 Estágio Pupal.....	26
2.3 Biologia e Morfologia Interna.....	28
2.3.1 Aparelho Digestivo.....	28
2.3.2 Membrana Peritrófica.....	30
2.4 Corpo gorduroso.....	33
2.5 Alimentação de larvas e dos mosquitos adultos	38
2.6 Associação entre microorganismos.....	39
2.7 Amebas de vida livre.....	40
3 MATERIAS E MÉTODOS.....	44
3.1 Cultivo de <i>Acanthamoeba</i>	44
3.2 Preparação da colônia de <i>A. aegypti</i>	44
3.3 Grupos de larvas <i>A. aegypti</i> com alimentação de <i>A. polyphaga</i>	45
3.4 Observação da Oviposição.	45
3.5 Observação de comportamento e desenvolvimento de larvas de <i>A. aegypti</i> alimentadas com <i>A. polyphaga</i>	47
3.6 Cortes histológicos.....	48

3.6.1 Corte em ultramicrótomo com inclusão em Durcupan.....	49
3.6.2 Corte em criostato com emblocamento em Tissue Tek®.	50
4 RESULTADOS.....	51
4.1 Observação da oviposição de <i>A. aegypti</i> após alimentação com <i>A. polyphaga</i>	51
4.2 Observação quanto ao comportamento e desenvolvimento de larvas de <i>A. aegypti</i> alimentadas com <i>A. polyphaga</i>	52
4.3 Localização de <i>A. polyphaga</i> sobreviventes em <i>A. aegypti</i>	53
5 DISCUSSÃO	59
5.1 Desenvol. de <i>A. aegypti</i> após alimentação com <i>A. polyphaga</i>	59
5.2 Observ. de larvas de <i>A. aegypti</i> alimentadas com <i>A. polyphaga</i>	61
5.3 Localização de <i>A. polyphaga</i> sobreviventes em <i>A. aegypti</i>	63
6. CONCLUSÕES.....	67
7. PERSPECTIVAS	68
8. REFERÊNCIAS	69

1. INTRODUÇÃO

Para que os requisitos nutricionais de mosquitos sejam atendidos, os mesmos alimentam-se consumindo materiais orgânicos sejam eles mortos ou vivos. A maior parte da dieta dos estádios larvais é composto de microorganismos heterotróficos (bactérias, fungos ou protozoários) que crescem na superfícies de recipientes ou suspensas no fluido (Merritt *et al.* 1992, Clements 1999).

No entanto, esta relação entre microorganismos e dípteros não é apenas nutricional. Por esta razão tem aumentado o interesse de pesquisadores nos últimos anos, pois sua interatividade pode vir a esclarecer questões como: adaptação dos insetos no meio ambiente, seleção natural, controle biológico bem como a resistência e susceptibilidade a patógenos. Um bom exemplo de interação pode ser observado entre bactérias e artrópodes. Algumas espécies de *Wolbachia* são endosimbiontes e infectam naturalmente mais de 60% de todas as espécies de insetos em todo o mundo (Moreira et al, 2009). Esta interação é de extremo interesse, pois a bactéria tem capacidade de induzir a translocação ou incompatibilidade citoplasmática (IC) em seus hospedeiros (Gould & Schliekelman, 2004, Klasson et al, 2009).

Outro exemplo interessante esta relacionado aos protozoários *Ascogregarina culicis* e *Ascogregarina taiwanensis* que são parasitos

específicos de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*, respectivamente (Beier e Craig, 1985). O parasitismo deste protozoário normalmente não é prejudicial para o hospedeiro natural e seu desenvolvimento, que acontece quase todo dentro do seu hospedeiro está em sincronismo com o mesmo. Suas características de desenvolvimento têm fornecido um modelo útil para estudar o desenvolvimento, migração e efeitos recíprocos do parasita no hospedeiro (Chen, 1999).

Em estudos anteriores Rott et al. (2010), avaliaram uma infecção experimental por *Acanthamoeba polyphaga* em *Aedes aegypti*, mosquito responsável pela transmissão do vírus da dengue em várias regiões do mundo. Nos experimentos, os autores ofereceram uma solução contendo trofozoítos de *A. polyphaga* na concentração 1×10^6 como fonte de alimentação inicial a larvas de *A. aegypti* de laboratório. As amebas foram oferecidas a larvas de primeiro instar, sob total condição asséptica. Após aguardar o desenvolvimento larval, pupal e de adultos, estes organismos foram dissecados e analisados para o encontro de *A. polyphaga* nas diferentes regiões do intestino. Os resultados foram muito promissores e indicaram que estas amebas são capazes de infectar e se manter nessa espécie de mosquito. A comprovação foi feita através do re-isolamento destas amebas em larvas, pupas e adultos. Se as amebas oferecidas no laboratório foram ingeridas pelas larvas de *A. aegypti*, e, após se conseguiu o seu re-isolamento, provavelmente na natureza os mosquitos também ingerem as mesmas, fato comprovado através de isolamento de *Acanthamoeba* de larvas de *Aedes* coletadas na natureza.

De que maneira estas amebas se mantêm no organismo do mosquito é ainda desconhecido. Da mesma forma não se sabe se as mesmas interferem no desenvolvimento biológico dos mosquitos.

Se as amebas oferecidas no laboratório foram ingeridas pelas larvas de *A. aegypti*, e, após se conseguiu o seu re-isolamento em larvas, pupas e adultos, provavelmente na natureza os mosquitos também ingerem as mesmas. Por esta razão pretende-se melhor investigar a presença de *A. polyphaga* no organismo de *A. aegypti* para verificar se as mesmas influenciam no desenvolvimento dos mosquitos. É importante também, determinar em que região anatômica do mosquito encontram-se os protozoários, através de cortes histológicos para verificar a existência de cistos ou trofozoítos nos sítios de infecção. Tais estudos podem servir de base para futuros projetos relacionados ao controle biológico de mosquitos vetores.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Aedes aegypti*

Aedes (Stegomyia) aegypti Linnaeus, (1762) é um mosquito que pertence à Ordem Diptera, Família Culicidae, Sub-família Culicinae. Oriundo provavelmente da região etiópica, foi descrito originalmente no Egito, continente Africano (CONSOLI & OLIVEIRA, 1998). *A. aegypti* é hoje considerado de grande importância epidemiológica, por ser no Brasil o principal vetor dos quatro sorotipos do vírus da dengue (DENV1-4) e do vírus da febre amarela (BRAGA & VALLE, 2007, FOLEY et al., 2007; CNS, 2010).

Acompanhando o ser humano na migração pelo mundo, *A. aegypti* se instalou em regiões tropicais onde é proporcionado um ambiente adequado para sua proliferação. Tornou-se uma praga e um enorme problema de saúde pública (MONATH, 1994; CONSOLI & OLIVEIRA, 1998). Devido ao crescimento populacional acelerado e a falta de sistemas eficazes no controle e combate ao mosquito da dengue, esta espécie se prolifera facilmente nas zonas urbanas. Isto ocorre principalmente em locais no qual o acúmulo de água é freqüente e rico em criadouros artificiais gerados pelo aglomerado de residências e acúmulo de lixo (FREIRE et al., 2006; CLARO et al., 2004; CONSOLI & OLIVEIRA, 1998). Raramente se prolifera em ambientes semi-

silvestres ou onde a população humana é menos numerosa (CALDERÓN et al., 2004). Caracteriza-se por estar sempre no peridomicílio ou internamente no domicílio humano. No Brasil, foi introduzido no período colonial, provavelmente, na época do tráfico de escravos (CONSOLI & OLIVEIRA, 1998).

A interação entre o vetor, vírus e homem em um espaço social organizado, influenciou e favoreceu a dispersão do mosquito aumentando sua densidade. Conseqüentemente vem ampliando os casos de dengue nos centros urbanos (TEIXEIRA et al., 2002).

Segundo DONALÍSIO & GLASSER (2002) a influência da temperatura na transmissão do dengue foi largamente investigada, interferindo tanto direta como indiretamente no repasto sanguíneo das fêmeas dos mosquitos, em seu desenvolvimento e no período de incubação extrínseco do vírus. Encontra-se, geralmente, entre as latitudes 35° Norte e 35° Sul, que correspondem à isoterma de inverno de 10°C. Projeções de elevação de 2°C na temperatura para o final do século XXI provavelmente aumentarão a extensão da latitude e altitude da distribuição do dengue no planeta (DONALÍSIO & GLASSER, 2002; GITHEKO et al., 2000; SILVEIRA-NETO et al., 1976).

2.1.1 Características Biológicas do *A. aegypti*

A. aegypti apresenta desenvolvimento holometabólico, passando nos estágios de ovo, larva pupa e adulto (Fig. 1). Os ovos são postos de forma isolada, próximos à superfície da água. O tempo médio entre a postura e a eclosão das larvas, após o contato dos ovos com a água é variável,

dependendo quase sempre das condições do ambiente (SILVA & SILVA, 1999). Como uma forma de resistência os ovos podem ficar mais de um ano viáveis em ambientes ressecados (SILVA & SILVA, 1999 ; LUZ et al., 2008).

RIBACK (2009), descreve que diversos fatores podem apresentar importantes papéis durante o período de desenvolvimento larval tanto de *A. aegypti* quanto de *Aedes albopictus*, outra espécie potencial vetora dos vírus da dengue e febre amarela. Estes fatores são classificados em abióticos (temperatura, precipitação, evaporação, recurso alimentar) e bióticos (predação, parasitismo e competição). A interação destes fatores nos diversos tipos de reservatórios naturais e/ou artificiais pode resultar em alterações em suas condições físicas tais como, presença de matéria orgânica, comunidades de microorganismos e outras comunidades de insetos aquáticos. As alterações também podem variar de acordo com o tamanho, a forma e a localização onde estes reservatórios são encontrados, bem como da estação do ano (BARRERA et al. 2006; CHRISTOPHERS, 1960; HAWLEY, 1988).

De acordo com LELES (2009), os criadouros utilizados por *A. aegypti* estão freqüentemente relacionados a ambientes urbanos. Onde são mais comuns se encontrar recipientes ou materiais, que por consequência acumulam água de chuvas, como: latas, pneus, garrafas, vasos de plantas ou locais de estoque de água para uso humano, como, caixas d'água e cisternas. Estes locais podem contribuir mantendo populações viáveis nas cidades em períodos mais secos do ano (CONSOLI & OLIVEIRA, 1998).

Após a eclosão, as larvas passam por quatro estádios e um período pupal, todos aquáticos, para então chegarem ao estágio adulto saindo do meio

aquático. A longevidade dos adultos foi considerada maior para fêmeas quando comparado a machos, podendo chegar a até mais de 50 dias para as mesmas (SILVA & SILVA, 1999).

Apresentando hábitos diurnos, as atividades como acasalamento e alimentação são feitas durante o dia. Apesar da alimentação básica de machos e fêmeas ser caracterizada por seiva de plantas, as fêmeas necessitam também de repastos sanguíneos para o desenvolvimento dos ovos. Embora, a fêmea tenha hábitos alimentares ecléticos, podendo se alimentar de outros animais tem preferência pelo sangue humano. A mesma fêmea através de refeições complementares pode alimentar-se diversas vezes no mesmo hospedeiro ou de hospedeiros diferentes e muitas vezes desloca-se de uma residência para outra disseminando, por exemplo, o vírus da dengue (WOODBIDGE & EDWARD, 2002; CONSOLI & OLIVEIRA, 1998).

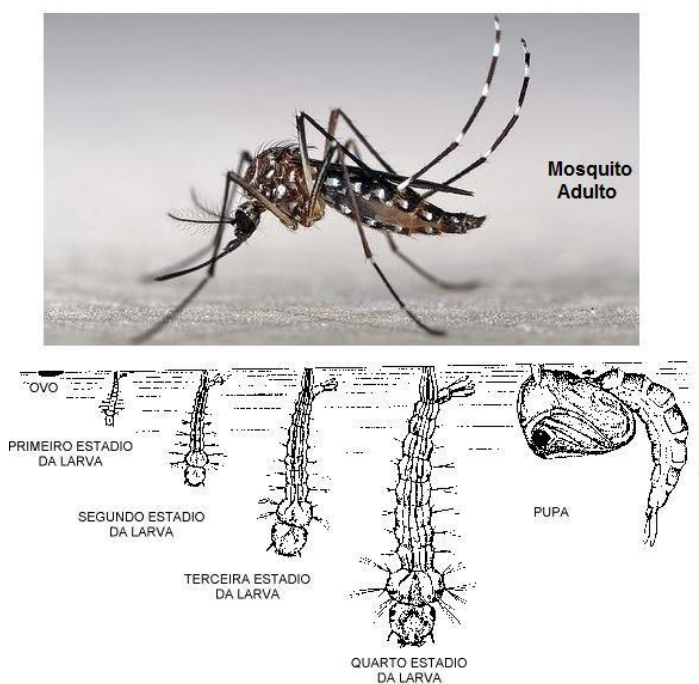


Figura 1. Fases evolutivas do *A. aegypti*. fonte: (Foto adaptada sites: Google e <http://migre.me/4hMrZ>- Marcos T. de Freitas).

2.1.1 Morfologia Externa de Mosquitos Adultos

Medindo entre 3 a 6 mm de comprimento, o corpo dos adultos é nitidamente dividido em cabeça, tórax e abdômen. O tórax, as pernas, asas e abdômen são revestidos de escamas, pretas e brancas, que proporcionam ao inseto um aspecto prateado (Fig. 1) (CONSOLI & OLIVEIRA, 1998).

Da mesma forma que os demais insetos, *A. aegypti* tem seu corpo segmentado e revestido pelo exoesqueleto ou cutícula, formado principalmente por quitina. Tais segmentos endurecidos e as membranas que os unem englobam uma cavidade chamada hemocele, repleta de hemolinfa, líquido que banha os órgãos em geral. As partes endurecidas de cada segmento são chamadas escleritos, e as membranosas de pleura (CONSOLI & OLIVEIRA, 1998).

A cabeça com aspecto esférico é composta por olhos, duas antenas que são longas e compostas de 15 segmentos cada, que são chamados segmentos flagelares que nos machos são mais plumosos e longos do que nas fêmeas (Fig.2). Dessa maneira as antenas das fêmeas são denominadas pilosas e a dos machos plumosas (CONSOLI & OLIVEIRA, 1998).

Entre os olhos e abaixo das duas antenas acha-se o conjunto de órgãos do aparelho bucal denominado clipeo, que no caso dos mosquitos é do tipo picador ou pungitivo. Todo o conjunto de peças bucais é denominado probóscide ou tromba, que por sua vez é ladeada na porção basal pelos palpos maxilares (CONSOLI & OLIVEIRA, 1998).

O tórax, como nos dípteros em geral, é dividido em três partes onde o protórax e o metatórax são pouco desenvolvidos. Enquanto isso, o mesotórax

2.2 Ovos

Os ovos de *A. aegypti* (Fig. 3) são alongados e fusiformes, e medem aproximadamente 1 mm, (FORATINNI, 1962). A "casca" dos ovos dos mosquitos, caracteristicamente impermeável, é conhecida como cório (Fig. 3b). Esta casca é composta de três camadas: a fina membrana vitelina interna, que envolve o núcleo, o citoplasma e o vitelo, o endocório endurecido e grosso, e o exocório fino e transparente que constitui o envoltório externo (CONSOLI & OLIVEIRA, 1998).

A cor dos ovos é pálida no momento da oviposição (Figura 3a), tornando-se escuros após alguns minutos, sendo que os inférteis geralmente não alcançam a tonalidade escura dos férteis (CONSOLI & OLIVEIRA, 1998).

Os ovos são postos de forma isolada ou conjunta em superfícies úmidas próximas à superfície da água límpida represada (CONSOLI & OLIVEIRA, 1998). Entretanto, SILVA (2007) relatou em seus estudos a proliferação de *A. aegypti* em fossas de esgoto sanitário doméstico, podendo ser um indicativo de problema de saúde pública. Destaca assim, que este vetor pode ter se adaptado a um novo ambiente, tolerando água turva e rica em material orgânico em decomposição, e em saís. Tais fossas sanitárias domésticas apresentam uma superfície áspera, com pequenas fendas, que propícia para as fêmeas deste mosquito depositar seus ovos e esses não rolaem (proteção da prole). Também apresentam fundo escuro, ambiente fresco e úmido. Conseqüentemente no início do próximo período chuvoso, os ovos eclodirão, dando segmento ao ciclo da espécie.

Sabe-se que o ovo do mosquito é a forma mais resistente do ciclo biológico, e é também a fase mais importante do desenvolvimento, que possibilita ao mosquito ampla sobrevivência, devido à resistência às adversidades climáticas (SILVIA, 1998). Sua diapausa é induzida de tal forma que eles não eclodem quando em condições ambientais inadequadas para o desenvolvimento bem sucedido até a fase adulta (BECKER et al., 2010). Um exemplo desta adaptação é *A. albopictus*, uma espécie originalmente tropical que no curso de uma adaptação evolutiva relacionada ao clima desenvolveu uma sensibilidade foto-periódica. Assim, quando os dias são menores (inverno), a fêmea põe ovos mais resistentes do que colocaria em dias mais longos (verão). Estes ovos colocados em dias mais curtos estão dormentes e não eclodem até que a temperatura aumente, garantindo assim a sobrevivência da espécie durante o inverno (BECKER et al., 2010). É uma espécie muito bem sucedida porque apresenta uma boa capacidade de adaptação às condições climáticas moderadas e devido ao fato de que os ovos são resistentes à dessecação.

Como aspecto geral, o volume de postura das fêmeas de mosquito oscila de 50 a 500 ovos. Para tanto são escolhidas horas do dia de baixa luminosidade. Provavelmente, a postura de ovos isolados se completa no decorso de múltiplas oviposições em cada uma das quais a fêmea interromperia essa atividade para voar à procura de outros locais igualmente adequados para o desenvolvimento de sua prole. Tal comportamento pode ser considerado como estratégia para a sobrevivência (ROZEMBOON, et al., 1973).

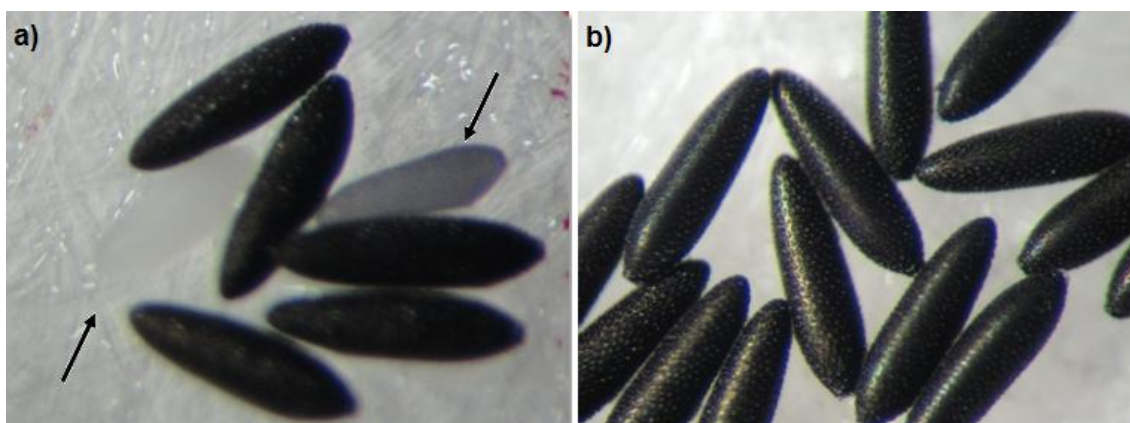


Figura 3. Ovos *Aedes aegypti*, (a) ovos recém postos (setas), (b) ovos melanizados (Fonte: Eder Moraes Saucedo).

2.3 Estágio larval morfologia externa

As larvas de *A. aegypti*, que se desenvolvem na água, têm seu corpo segmentado em cabeça, tórax e abdômen (Fig. 4). O abdômen tem aparência semi-cilíndrica e está dividido em nove segmentos (segmentos I-VIII, similares entre si, e X, diferenciado em lobo anal) (CONSOLI & OLIVEIRA, 1998).

À frente da cabeça encontram-se as escovas orais ou palatais, constituídas de um par de escovas laterais e um de escovas medianas (ventrais). E ainda quase sempre presente uma escova anterior. Tais escovas, quando em movimento, promovem correntes hídricas que trazem para a boca da larva as partículas que serão ingeridas (CONSOLI & OLIVEIRA, 1998).

O segmento X é também conhecido como lobo ou lóbulo anal, pois nele termina o tubo digestivo da larva. Ainda ligado ao segmento VIII acha-se o sifão respiratório, tubo na extremidade do qual se abrem os espiráculos. O sifão tem enorme importância taxonômica, pela sua forma, seu índice e o aspecto e número dos espinhos que formam uma fileira de cada lado da sua

parte pósterobasal (pécten). A base do sifão pode estar provida de uma estrutura quitinizada conhecida como acúleo (CONSOLI & OLIVEIRA, 1998). Uma glândula adjacente ao espiráculo larval segrega substâncias hidrofóbicas para evitar o afluxo de água no sistema respiratório (BECKER et al., 2010).



Figura 4. Larva de quarto estágio *Aedes aegypti* (Fonte: Eder Moraes Saucedo).

2.2 Estágio Pupal

As pupas (Fig. 5) correspondem ao período de transição onde acontece a metamorfose do mosquito, ocorrendo profundas transformações que resultam na formação do adulto. A larva de quarto estágio passa à fase pupal que dura cerca de três dias, a qual não é necessária a alimentação, saindo do meio líquido para o meio terrestre (SILVA, 2007). Entretanto, o período de transição pode ser reduzido ou ampliado, em temperaturas maiores ou menores, respectivamente (BECKER et al., 2010).

Com aspecto de vírgula as pupas, quase sempre se encontram paradas em contacto com a superfície da água, mas quando perturbadas são

bastante móveis. Seu corpo escurece na medida em que se aproxima o momento da emergência do adulto (CONSOLI & OLIVEIRA, 1998).

Divide-se em duas porções: cefalotórax (CT) (cabeça + tórax) e abdômen (dividido em oito segmentos = Segs. I-VIII). Ambos, cefalotórax e abdômen são providos de cerdas. No cefalotórax existem duas estruturas tubulares chamadas trompas respiratórias, onde se abrem os únicos espiráculos da pupa. Para sua locomoção é auxiliada por um par de pás que se localizam no final do abdômen (CONSOLI & OLIVEIRA, 1998).

Ao longo deste estágio, dá-se a eliminação de certos órgãos larvais, bem como a formação de alguns da fase adulta, o que se faz à custa de células embrionárias que permanecem indiferenciadas (SILVA, 2007). Alguns órgãos larvais são histolizados, enquanto o corpo do adulto é formado através do desenvolvimento de discos imaginais (células ou grupos de células que permanecem inativas no corpo das larvas até o estágio de pupa). Em particular, a gordura corporal da larva é transferida para a fase adulta e usada como uma fonte de vitelogenese para a formação do ovo ou como reserva para a hibernação (BECKER et al., 2010).

Após emergir o adulto aumenta a pressão da hemolinfa que faz com que as pernas e asas estiquem. Em seguida, ejeta gotas de líquido para esvaziar o intestino, enquanto o ar é dissipado pelo intestino algumas horas depois. Dentro de alguns minutos, é capaz de voar quando a cutícula mole é esclerotizada. No entanto, entre um dia e um dia e meio são necessários para machos e fêmeas, respectivamente, ajustarem seu metabolismo (GILLETT, 1983 apud BECKER et al., 2010).

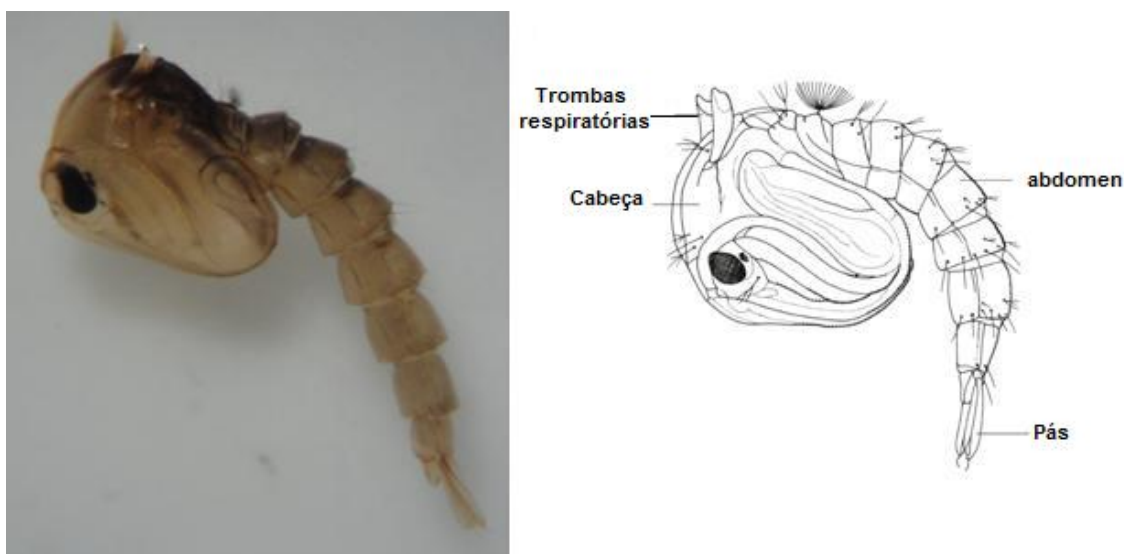


Figura 5. Aspecto lateral da Pupa (Fontes: Eder Moraes Saucedo e BECKER, 2010).

2.3 Biologia e Morfologia Interna

A. aegypti passa por quatro estádios larvais. Em cada estágio, as larvas possuem uma série de características morfológicas específicas. No entanto, há apenas pequenas alterações em órgãos internos como o intestino (CLEMENTS, 1992). A estrutura e a função do intestino variam de acordo com estágio do desenvolvimento (HAKIM et al., 2010). De acordo com PINHEIRO et al., (2008), estudos com diversas ordens de insetos, mostram a importância do intestino na absorção dos alimentos, da troca iônica e osmótica, entrada de inseticidas, vírus e toxinas, e a liberação de neuro-hormônios que regulam a atividade de vários outros processos fisiológicos (CLEMENTS, 1992).

2.3.1 Aparelho Digestivo

A região anterior do canal alimentar contém dois êmbolos de sucção que servem para a ingestão do alimento: a bomba cibarial e a bomba

faringiana, muscular, que é responsável pela pressão negativa gerada para a ingestão de alimentos. O esôfago consiste em um tubo estreito que termina no esfíncter "cardíaco". Logo após o esfíncter existem dois pequenos divertículos dorsais e um grande divertículo ventral (papo), todos revestidos por uma fina cutícula que os torna impermeáveis (CONSOLI & OLIVEIRA, 1998).

O intestino, segundo maior órgão do corpo do inseto, é um importante local de entrada de microrganismos e substâncias tóxicas prejudiciais a eles, bem como alimentação e água (CONSOLI & OLIVEIRA, 1998; HAKIM et al., 2010). Com poucas exceções, praticamente todos os insetos fazem sua alimentação através de um canal alimentar. (WIGGLESWORTH, 1984)

O canal alimentar dos insetos é dividido em três regiões principais: intestino anterior ou estomodeu, o intestino médio ou ventrículo e intestino posterior ou proctodeu. Este órgão é constituído por um epitélio simples ou pseudoestratificado e é suportado por uma membrana basal, músculo estriado e traqueia (CONSOLI & OLIVEIRA, 1998;; CHAPMAN, 1998). Cada compartimento tem uma função específica, o intestino anterior está envolvido nos processos de armazenamento e, algumas vezes na fragmentação de alimentos. O intestino médio produz enzimas e absorve produtos da digestão, sendo o material não digerido eliminado pelo intestino posterior, onde ocorre também absorção de sais e água (CHAPMAN, 1998). Anexas ao intestino anterior acham-se as glândulas salivares, que estão organizadas em dois grupos de três ácinos com aspecto de sacos digitiformes, sendo o ácino mediano menor do que os laterais (CONSOLI & OLIVEIRA, 1998).

O estômago ou intestino médio é altamente elástico e revestido internamente por um epitélio simples e por duas camadas musculares, a circular interna e a longitudinal externa. O epitélio tem borda estriada, adaptado à secreção e absorção, onde neste segmento ocorrem três tipos celulares: células digestivas, células regenerativas e células endócrinas. No intestino médio ocorre a formação da membrana peritrófica, estrutura utilizada para auxiliar na digestão dos insetos (CONSOLI & OLIVEIRA, 1998; CRUZ-LANDIM, 1985, NEVES et al., 2005)

Na parte posterior do estômago existe um poderoso esfíncter, a válvula pilórica, após a qual se ligam os túbulos de Malpighi, cuja estrutura e tamanho se mantêm praticamente intactos desde o último estágio larval, envolvidos na excreção e reabsorção de água. Nas fêmeas, o processo de excreção é ativo, principalmente após o repasto sanguíneo. Segue-se o intestino posterior, composto do íleo, do reto distendido ou ampola retal, onde se encontram as papilas retais (geralmente em número de quatro) e o ânus (CONSOLI & OLIVEIRA, 1998).

2.3.2 Membrana Peritrófica

A matriz ou membrana peritrófica (MP) é uma estrutura mucosa, acelular (WANG & GRANADOS, 1997), que difere do muco dos vertebrados pela incorporação de quitina (3-40%), proteínas e proteoglicanas (20-55%), resultando em uma estrutura protéica reforçada por fibrilas de quitina (PETERS, 1992). Presente na maioria dos insetos, envolvendo o bolo alimentar separando-o do epitélio do intestino médio (JACOBS-LORENA & OO, 1996;

KRAMER et al., 1995; LEHANE, 1997). Esta composição fornece a sua estrutura uma semi-permeabilidade e elasticidade (LEHANE, 1997).

A maioria dos insetos possui membrana peritrófica tanto no estágio larval quanto no adulto, embora em alguns casos esta seja encontrada em apenas um dos dois estágios (ALVARENGA, 2005). A membrana peritrófica presente nos insetos é dividida em duas classes: MP tipo I e MP tipo II, de acordo com o local de sua síntese (PETERS, 1992).

A Membrana peritrófica do Tipo I, é o tipo mais comum em insetos. É produzida em insetos adultos hematófagos. Seus componentes são secretados pelas células ao longo do epitélio intestinal, ou por partes específicas do mesmo (região anterior ou posterior), geralmente em resposta à alimentação (que provoca sua distensão) e envolvem o bolo alimentar ao longo de todo o intestino médio (TELLAN, 1996; LEHANE, 1997; TERRA, 2001).

A MP do tipo II é secretada como um tubo contínuo, a partir de um pequeno órgão altamente especializado chamado de cárdio situado na junção do intestino anterior com o médio (TELLAN, 1996; JACOBS-LORENA & OO, 1996). As mais bem caracterizadas MP do tipo II são de larvas de dípteros muscóides (PETERS, 1992; TELLMAN & EISEMANN, 2000), mas também na fase adulta de moscas e mosquitos não hematófagos, e outros insetos (JACOB-LORENA & OO, 1996; TERRA, 2001). Nas larvas a MP é simples, enquanto que nos adultos são produzidas várias MPs tubulares, cada uma proveniente de uma região específica do cárdia (PETERS, 1992).

Em muitas espécies há produção de diferentes tipos de MP em diferentes estágios do ciclo. As larvas de mosquitos hematófagos, por exemplo,

produzem MP do tipo II, enquanto as fêmeas adultas produzem MP do tipo I (LEHANE, 1997). Pode haver diferenças na composição bioquímica da MP, mesmo quando o mesmo tipo de MP está presente nos diferentes estágios (TELLAN, 1996) sugerindo que a MP tem sofrido pressão evolutiva para se adequar ao tipo de alimentação (LEHANE, 1997).

As principais funções atribuídas a esta membrana são: a) proteção mecânica (WIGGLESWORTH, 1984; PETERS, 1992); b) Barreira física contra microrganismos, atuando como uma barreira para os organismos potencialmente invasores ingeridos com o alimento ou como alimento (JACOBS-LORENA e OO, 1996; MOLL et al., 2001; PETERS, 1992); c) Uma barreira permeável e seletiva para enzimas digestivas e produtos de digestão (TELLAM, 1996); d) Atua no mecanismo de reciclagem de enzimas digestivas, fenômeno conhecido como circulação ecto-endoperitrófica (TERRA & FERREIRA, 1994, TERRA, 2001); e) Serve também como defesa antioxidante, uma vez que a membrana peritrófica é capaz de proteger o epitélio da oxidação (FELTON & SUMMERS, 1995, ALVARENGA, 2005). F) Em alguns insetos pode ter uma função de proteção contra ataques químicos de agentes potencialmente tóxicos (LEHANE, 1997; PETERS, 1992).

ARAÚJO (2009) descreve que é a partir da formação da membrana peritrófica, que o inseto passa a ser protegido de danos mecânicos, ações de patógenos e toxinas. Sendo um obstáculo físico dos insetos que funciona como um filtro, podendo impedir a entrada de microrganismos e parasitos pela via digestiva. Todavia, uma vez que o patógeno vence esta barreira e consegue

invadir a hemocele do inseto, desencadeia a defesa hemocitária, que segundo BULET *et al.*, (1999) seria a resposta imunológica propriamente dita.

MOLL *et al.*, (2001) descrevem a evidência de que na fase de pupa, a MP pode ser importante para a esterilização do intestino médio do mosquito adulto. Pelo envelopamento do mecônio, as membranas poderiam sequestrar microorganismos ingeridos durante o estágio larval. Assim, estes organismos, junto com o mecônio, seriam evacuados após a emergência do adulto. O que nos faz acreditar que quando Rott *et al.*, (2010) re-isolou *A. polyphaga* dos mosquitos adultos, eles não estavam somente parasitando o seu intestino mas também outras partes do seu corpo.

2.4 Corpo gorduroso

O excesso de alimento ingerido (proteínas, carboidratos e lipídios) pelos insetos durante a fase larval fica armazenado em um tecido denominado corpo gorduroso, que serve como local de armazenamento de reservas, que são utilizadas durante a metamorfose, no vôo e na reprodução. Considerado um órgão amorfo, formado por um conjunto de células constituídas de camadas e/ou lóbulos. Caracteriza-se por ser uma massa celular que preenche os espaços existentes ao redor dos órgãos na cavidade celomática dos insetos, (CONSOLI & OLIVEIRA, 1998; CLEMENTS, 1992). Desta forma mantêm reservas necessárias para a metamorfose, considerada fase de reorganização e reconstrução mediada por hormônios, quando então o inseto permanece sem se alimentar (CONTE, 1994; CRUZ-LANDIM, 2004).

Tendo origem embrionária de uma parte do mesoderma somático, o corpo gorduroso estendendo-se por todo o comprimento do inseto, está presente principalmente durante todo o período larval e pupal. Durante esse período as células separam-se e na maioria das vezes se rompem, persistindo poucas até os primeiros dias da fase adulta (Fig. 6). As características do corpo gorduroso do adulto surgem durante a metamorfose (FERREIRA, 2010)

O corpo gorduroso é o principal órgão do metabolismo intermediário, responsável pela síntese e fornecimento da maioria dos componentes da hemolinfa. As células do corpo gorduroso estão fracamente aderidas umas as outras e, dessa forma, tem um grande contato com a hemolinfa, o que possibilita maiores trocas metabólicas entre ambos (CHAPMAN, 1998).

Como descrito por MARTINS (2008), 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. Acredita-se que as porções periféricas e viscerais do corpo gorduroso têm funções diferentes: a porção periférica é responsável pela atividade biosintética, enquanto a porção perivisceral é especializada em armazenamento (HAUNERLAND et al., 1990, WANG & HAUNERLAND, 1992).

CARDOSO (2009) descreve que há quatro tipos celulares diferentes: os trofócitos, os micetócitos, as células de urato e os enócitos. Em muitas ordens de insetos somente encontra-se os trofócitos (CHAPMAN, 1998). Por exemplo, em *A. aegypti*, após a ingestão de sangue, os trofócitos sofrem

diversas mudanças morfológicas, tais como: aumento e ativação de nucléolo, proliferação dos ribossomos e do retículo endoplasmático rugoso, desenvolvimento do complexo de Golgi e aumento das invaginações da membrana plasmática (RAIKHEL & LEA, 1983).

O corpo gorduroso está em um local estratégico, pois se encontram em contato direto com a hemolinfa, o que facilita o intercâmbio de substâncias com os demais órgãos (CHAPMAN, 1998). O tamanho relativamente grande e a posição do órgão no interior da cavidade do corpo do mosquito, o torna um tecido poderoso capaz de secretar substâncias que podem rapidamente atingir concentrações eficazes contra organismos invasores (MARTINS & PIMENTA, 2008).

Estudos recentes sugerem que o corpo gorduroso de insetos está envolvido na produção de componentes do sistema imunitário, os quais desempenham um papel importante na síntese e liberação de vários peptídeos antibacterianos (GILLESPIE et al., 1997). TZOU et al. (2002), e HETRU et al. (2003) em estudos com *Drosophila melanogaster* (Meigen), descreveram que o corpo gorduroso é responsável pela secreção de vários fatores humorais com atividades antimicrobianas. KLOWDEN et al. (1987) demonstraram que o corpo gorduroso também pode atuar como órgão endócrino, influenciando o comportamento dos insetos.

Adicionalmente, há evidências de que o corpo gorduroso atua no metabolismo de substâncias tóxicas absorvidas pelo inseto (KAFEL et al., 2003; YANG et al., 2007), uma vez que já foi detectada atividade de enzimas

envolvidas nesse processo, tais como glutathione-S-transferase, nesse tecido larval em outros insetos (WU & LU, 2008).

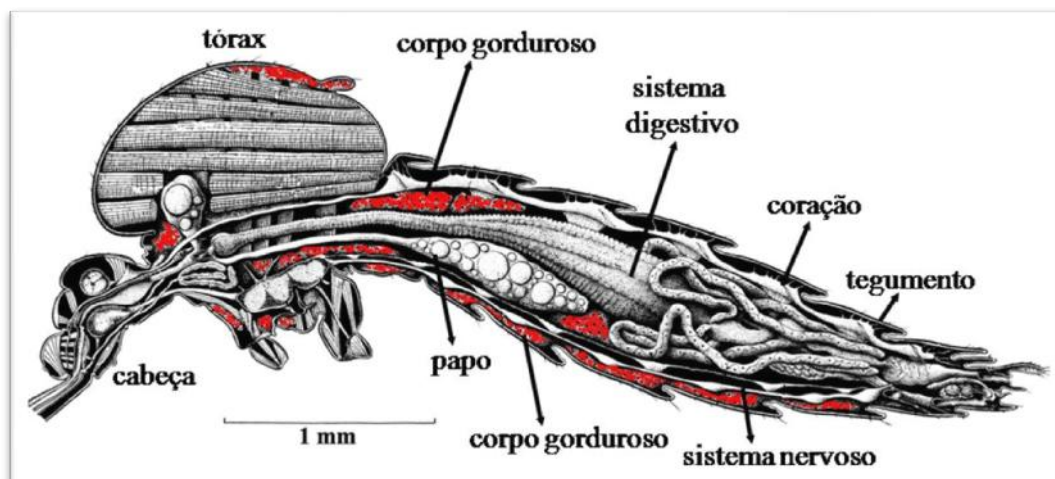


Figura 6. Ilustração representando a secção longitudinal mostrando a distribuição do corpo gorduroso (em vermelho) em relação aos demais órgãos/sistemas de *A. aegypti* (modificado por MARTINS, 2008 de JOBLIN & LEWIS, 1987).

Outros estudos têm demonstrado que o corpo gorduroso de adultos de *A. aegypti* são percursos de sínteses de vitelogenese (RAIKHEL & LEA 1983; SNIGIREVSKAYA et al., 1997), e que o intestino médio poderia ser um local de fator de inibição para a procura de hospedeiros quando as fêmeas estivessem no ciclo gonotrófico (KLOWDEN et al., 1987).

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, o cárdia e o intestino (TZOU et al., 2002). Além disso, o corpo gorduroso está presente na desintoxicação pela produção do álcool desidrogenase (SONDERGAARD, 1993).

A resposta imune tem um papel importantíssimo, porém, pouco estudado na misteriosa relação existente entre os artrópodes vetores e os patógenos que eles transmitem. MARTINS (2008) descreve que uma resposta imune adequada pode reduzir ou restringir a capacidade vetorial de certos hospedeiros invertebrados. O esclarecimento 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 reação do antígeno-anticorpo não existe. Porém, possuem mecanismos de defesa inatos, como a produção de peptídeos antimicrobianos e a melanização, efetivos quanto à destruição de organismos invasores (TZOU et al., 2002, CHRISTOPHIDES et al., 2004).

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. 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; TZOU et al., 2002).

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_-(1,4) da parede bacteriana, e possuem atividade quitinolítica contra fungos (HULTMARK, 1996, VILMOS & KURUCZ, 1998). 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 *Musca domestica* e *Drosophila melanogaster*, as lisozimas têm um importante papel como enzimas digestivas do intestino médio, atuando nos microorganismos ingeridos (HULTMARK, 1996).

2.5 Alimentação de larvas e dos mosquitos adultos

A maioria das larvas de *A. aegypti* passa parte do tempo alimentando-se de partículas de matéria orgânicas de animais ou vegetais, bactérias, fungos e protozoários existentes na água, mas ao mesmo tempo não toleram elevadas concentrações de matéria orgânica. O processo pelo qual se alimentam é denominado “filtrante”, embora possam triturar ou morder elementos submersos, raspar superfícies de objetos e engolir corpos mais volumosos. Possuem características de não selecionarem alimentos, o que facilita a ação de larvicidas por via oral (FORATTINI, 1962).

No estágio adulto machos e fêmeas alimentam-se de néctar de fluídos açucarados de flores e frutos, pois o metabolismo energético é

dependente desta ingestão de carboidratos. O acúmulo de glicogênio e triglicerídeos é determinante para o potencial de atividade e longevidade (NAYAR & SAUERMAAN, 1973). Somente as fêmeas são hematófagas, sendo sugadoras rápidas e persistentes, o que favorece a transmissão de agentes infecciosos. O sangue é a fonte de proteínas que se fazem necessárias em sua alimentação para a produção e desenvolvimento dos ovos. Podendo também contribuir para aumentar a longevidade das fêmeas (NAYAR & SAUERMAAN, 1975; CONSOLI, 1982).

As fontes de energia transformada incluem o alimento ingerido que contém carboidratos complexos, gorduras e proteínas que são discriminadas no trato alimentar de componentes mais simples e absorvidos através da parede do intestino para a hemolinfa (KLOWDEN, 2007).

2.6 Associação entre microorganismos

Atualmente, vários microorganismos estão sendo investigados quanto a sua potencial atividade contra dípteros transmissores de doenças. A atenção deve-se ao fato de que estes insetos são continuamente expostos a microorganismos no meio ambiente. A aquisição natural desta microflora pode ser através da transmissão vertical, da alimentação das larvas no ambiente aquático ou úmido, ou pela ingestão de sucos vegetais por adultos. Esta microflora, em alguns casos, pode modular a capacidade vetorial de insetos inibindo ou estimulando o desenvolvimento de agentes patogênicos através de mecanismos muitas vezes desconhecidos (Campbel et al. 2004; Azambuja et

al. 2005; Dong et al. 2009). Um bom exemplo é a associação de algumas espécies de *Wolbachia* uma bactéria endossimbionte de dípteros vetores (Hoti et al., 2003; Rajan, 2005). Esta bactéria pode ser considerada como um endossimbionte, mas em algumas espécies de insetos muitas vezes provoca efeitos como feminização de machos, indução partenogenética, resultando no desenvolvimento de ovos inférteis, morte de embriões machos em fêmeas infectadas, e incompatibilidade citoplasmática (Werren, 1997; 2008; Bourtzis et al., 2003). Também vem sendo considerada como um promissor organismo para o controle de vetores (Dobson, 2003; Rascon et al. 2003).

Temos o exemplo também dos protozoários *Ascogregarina culicis* e *Ascogregarina taiwanensis* que são parasitos-hospedeiro específico de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*, respectivamente (Beier e Craig, 1985). *Ascogregarina* sp. normalmente não é prejudicial para o hospedeiro natural e seu desenvolvimento que acontece quase todo dentro do seu hospedeiro está em sincronismo direto com o desenvolvimento biológico do mesmo. Sendo que suas características de desenvolvimento têm fornecido um modelo útil para estudar o desenvolvimento, migração e efeitos recíprocos do parasita no hospedeiro (Chen, 1999).

2.7 Amebas de vida livre.

As amebas de vida livre (AVL) fazem parte de um grupo de protozoários amplamente dispersos na natureza e podem ser encontradas em criadouros de mosquitos.

Acanthamoeba é o gênero mais comum dentre as amebas de vida livre, as quais ocasionalmente se comportam como parasitos facultativos ou oportunistas de seres humanos ou animais domésticos o que confere importância clínica e ecológica (SHUSTER & VISVESVARA, 2004), (WALOCHNIK et al., 2002; KHAN, 2003; MARCIANO-CABRAL & CABRAL, 2003).

Acanthamoeba engloba pelo menos 25 espécies de AVL distribuídas ao redor do mundo (BOOTON et al., 2005). Estas, têm sido isoladas a partir de uma grande variedade de habitats naturais como solo, ar, água salgada, doce, e reservatórios, filtros de ar condicionados, sistemas de esgoto e também na orofaringe de indivíduos saudáveis, entre outros locais (MARCIANO-CABRAL & CABRAL, 2003; CARLESSO et al., 2009; KHAN, 2006, CAUMO et al., 2009).

As espécies do gênero *Acanthamoeba* apresentam no seu ciclo de vida uma fase trofozoítica, que se alimenta e se reproduz e uma forma de resistência cística (KHAN, 2006; VISVESVARA et al., 2007), observada quando as condições são desfavoráveis, como a falta de nutrientes, alterações de pH ou de temperatura e dessecação. Os trofozoítos de *Acanthamoeba* spp. apresentam tamanho entre 20 a 40 μm , possuem um núcleo com um grande cariossoma central rodeado por um halo claro, o citoplasma do trofozoíto é abundante e apresenta-se granuloso com movimentos polidirecionais através da emissão de pseudópodos globosos e hialinos, de onde surgem numerosas projeções filiformes conhecidas como acantopódios (Fig. 8). É evidente também a presença de vacúolos pulsáteis contraindo-se e ajudando na regulação osmótica. Os cistos de *Acanthamoeba* spp. apresentam diâmetro

entre 15 a 25 μm e são uninucleados. São facilmente caracterizados pela parede dupla provida de poros chamados ostíolos (Fig. 7).



Figura 7. Cisto de *Acanthamoeba* spp..(Fonte: <http://migre.me/4i8AX>)

A parede externa ou ectocisto é ondulada e a mais interna ou endocisto pode apresentar-se poligonal, esférica ou estrelada. Os dois envoltórios são separados entre si, mas se unem nos ostíolos (PAGE, 1967; GIAZZI, 1996; SILVA, 2001). Os cistos são resistentes a detergentes, cloro e antibióticos, porém são destruídos pela autoclavagem ou com tratamento por Freon ou óxido de metileno (TURNER et al., 2000; MARCIANO-CABRAL & CABRAL, 2003)

Essas bactérias endossimbiontes geralmente são capazes de sobreviver ao encistamento da ameba, protegendo microrganismos de agentes antimicrobianos e de adversas condições do ambiente, podendo contribuir para o aumento da sua virulência (GREUB & RAOULT, 2004). Esta adaptação faz da ameba um veículo de bactérias e vírus patogênicos (MOLMERET et al., 2005; THOMAS et al., 2006; RÓDIO et al., 2008).

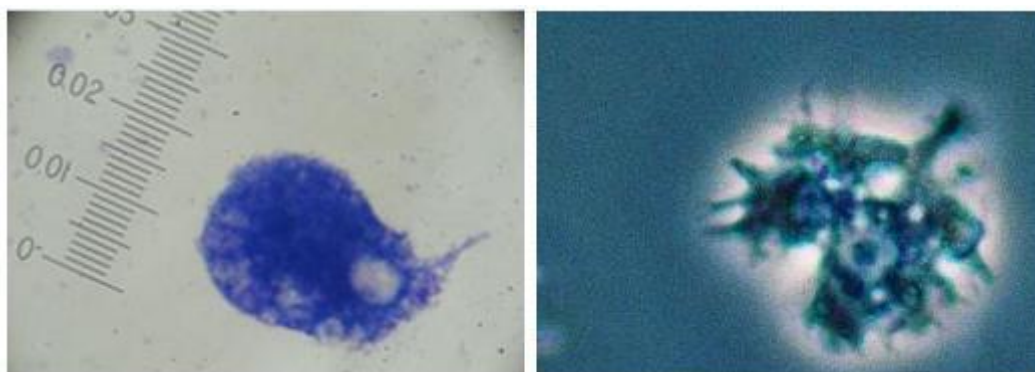


Figura 8. a) Trofozoitos de *Acanthamoeba polyphaga*, corada com Azul de toluidina (Fonte: Eder M. Saucedo b) Trofozoíto característico do gênero *Acanthamoeba*.(Fonte: Karin Caumo)

A associação entre bactérias endossimbiontes e *Acanthamoeba* spp. pode ser transitória (bactérias intracelulares facultativas) ou estável (bactérias intracelulares obrigatórias) (HORN & WAGNER, 2004). Entretanto, estas não têm a habilidade de sobreviver e não podem ser cultivadas fora de suas amebas hospedeiras. Tais interações poderiam ser de relevância em estudos com mosquitos, pois estas amebas podem ser capazes de proteger as bactérias endossimbiontes e liberá-las sobre certas condições.

3 MATERIAS E MÉTODOS

3.1 Cultivo de *Acanthamoeba*

O estudo foi realizado com trofozoítos de *A. polyphaga* (ATCC30872), isolada de água doce e mantidos no Setor de Parasitologia da UFRGS.

Os isolados de *A. polyphaga* foram cultivados axênicamente em meio PYG composto de (peptona proteose 0,75% (w / v), extrato de levedura de 0,75% (w / v) e glicose a 1,5% (w / v)), a 30 °C. Para os bioensaios, as culturas axênicas contendo 10^6 - 10^7 trofozoítos/mL foram centrifugadas por cinco min. a 3500 RPM. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado duas vezes com tampão fosfato (PBS), pH 7.0 . O precipitado de amebas foi diluído em solução salina para obter uma concentração de 1×10^6 trofozoítos / mL.

3.2 Preparação da colônia de *A. aegypti*

A população de *A. aegypti* utilizada para este trabalho foi estabelecida no Setor de Parasitologia da UFRGS a partir de ovos da linhagem Rockefeller, livres de vírus patogênicos, cedidos por pesquisadores do Laboratório de Imunoparasitologia UNISUL-SC.

Para a obtenção das larvas utilizou-se uma bacia branca (20 x 10 x 7 cm) previamente esterilizada com luz UV por 2 horas. Nesta foram adicionados 700 mL de água destilada, onde se colocaram os ovos de *Ae. aegypti*.

Aguardou-se a eclosão dos mesmos, e as larvas de primeiro instar foram então separadas nos seus grupos específicos para o desenvolvimento dos trabalhos.

Todos os períodos entre larvas e pupas, os insetos foram mantidos em estufa biológica marca Tecnal[®], a temperatura $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ / 80% de umidade / fotofase de 12 horas, claro-escuro.

3.3 Grupos de larvas *A. aegypti* com alimentação de *A. polyphaga*.

Para realização dos experimentos separamos larvas de primeiro instar em três Grupos distintos, variando a quantidade de alimento dependendo do experimento:

Grupo A – Larvas alimentadas com trofozoítos de *A. polyphaga*, após período de 24 horas foram alimentados com ração para filhote de gatos (Whiskas[®]) macerados.

Grupo B – Larvas alimentadas normalmente com ração para filhote de gatos (Whiskas[®]) macerados.

Grupo C – As larvas permaneceram em jejum por 24 horas e somente após receberam ração para filhote de gatos (Whiskas[®]) macerados.

3.4 Observação da Oviposição.

Para a observação de comportamento e contagem dos ovos foram usados somente os **Grupos A e C. Grupo A** – Separados \pm 50 larvas em

recipiente de vidro contendo 20 mL de água destilada autoclavada alimentado com 1 mL de trofozoítos de *A. polyphoga*, após período de 24 horas foram alimentados com aproximadamente 15 mg de ração para filhote de gatos (Whiskas®) macerados. **Grupo C** – Separados \pm 50 larvas em recipiente de vidro contendo 20 mL de água destilada autoclavada. Permaneceram em jejum por 24 horas e somente após, receberam aproximadamente 15 mg de ração para filhote de gatos (Whiskas®) macerados.

Quando as larvas chegavam ao estágio pupal, eram separados para um recipiente de vidro com água destilada até o estágio adulto. No estágio adulto, foram separados novamente em seus respectivos grupos, contendo cada um 10 fêmeas e 10 machos de *A. aegypti* (n=20 por grupo). Sendo transferidos para duas gaiolas entomológicas com dimensões de 30cm x 30cm x 30cm. Estas possuem as laterais cobertas por tela tipo *voile*, e são providas, em um dos lados, por uma manga para manipulação. Além disso, possuem uma placa de vidro, na parte superior, para facilitar a visualização. Os adultos foram mantidos em temperatura ambiente que variou entre 27°C \pm 2°C / fotofase de 12 horas, claro-escuro.

Para a alimentação básica, uma solução de sacarose a 10% foi oferecida aos mosquitos adultos, em uma placa de petri contendo algodão. Em adição, as fêmeas exerceram repasto sanguíneo duas vezes por semana em cobaia humana (o autor), para o desenvolvimento dos ovos.

Para a oviposição das fêmeas, um recipiente contendo água e papel filtro foi colocado nas gaiolas. Os papéis filtro contendo os ovos foram retirados

diariamente das gaiolas durante 30 dias, a contar da primeira observação da presença de ovos para os dois grupos. Os ovos foram então contados e guardados. Assim, pode-se observar se haveria diferença no número de ovos postos por cada grupo de fêmeas.

3.5 Observação de comportamento e desenvolvimento de larvas de *A. aegypti* alimentadas com *A. polyphaga*.

Utilizou-se uma Placa de cultura celular de 24 poços conforme Figura 9. Cada poço continha 2 mL de água destilada autoclavada, e 10 larvas. Sendo utilizado um total de 110 larvas (n= 110) para cada grupo, totalizando 330 larvas.

Grupo A – Larvas alimentadas com 100 µL de trofozoítos de *A. polyphaga*. Após período de 24 horas foram alimentados com aproximadamente 5mg de ração para filhote de gatos (Whiskas®) macerados.

Grupo B – Larvas Alimentadas normalmente com aproximadamente 5mg de ração para filhote de gatos (Whiskas®) macerados.

Grupo C – Permaneceram em jejum por 24 horas e somente após receberam aproximadamente 5mg de ração para filhote de gatos (Whiskas®) macerados.

As larvas permaneceram na placa até o desenvolvimento de larvas de quarto estágio. Após as mesmas foram levadas a geladeira para diminuição dos movimentos e posterior medição, com auxílio de um paquímetro. Os dados

foram processados no programa BioEstat 5.0 (AYRES et al., 2007). Os resultados foram analisados através de análise de variância (ANOVA) de um fator e os resultados significativos foram avaliados pelo *post-hoc* de Tukey, com nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

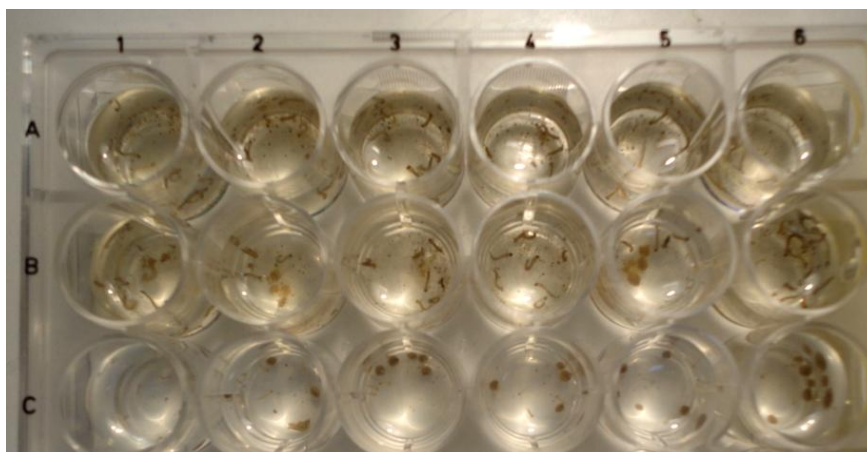


Figura 9. Placa demonstrando experimento para observação de comportamento e desenvolvimento de larvas de *A. aegypti* alimentadas com *A. polyphaga*. (Fonte: Eder Moraes Saucedo).

3.6 Cortes histológicos

Para os cortes histológicos foram utilizados os **Grupos A e C**.

Grupo A – Separados \pm 50 larvas em recipiente de vidro contendo 20 mL de água destilada autoclavada alimentado com 1 mL de trofozoítos de *A. polyphaga*, após período de 24 horas foram alimentados com aproximadamente 15 mg de ração para filhote de gatos (Whiskas®) macerados. **Grupo C** – Separados \pm 50 larvas em recipiente de vidro contendo 20 mL de água destilada autoclavada alimentado. Permaneceram em jejum por 24 horas e somente após receberam aproximadamente 15 mg de ração para filhote de gatos (Whiskas®) macerados.

3.6.1 Corte em ultramicrotomo com inclusão em Durcupan.

Conforme as larvas de terceiro e quarto estadio se desenvolviam eram selecionadas para estes ensaios. As mesmas foram fixadas durante 12 horas em temperatura ambiente em solução fixadora contendo glutaraldeído 2,5% (Sigma Chemicals Co., EUA) e paraformaldeído 2% (Synth, Brasil) em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4 (PBS). Em seguida, foram lavadas quatro vezes (15 min + 15 min + 30 min + 30 min) em PBS 0,1 M, pH 7,4 e pós-fixado em 1% OsO₄ (Sigma Chemicals Co., EUA) em PBS por 24 h, em temperatura ambiente. As larvas foram então lavadas três vezes por 15 min em PBS 0,1 M e desidratadas em uma série gradual de álcool duas vezes de 5 min em álcool 50%; duas vezes de 10 min em álcool 70%; duas vezes de 20 min em álcool 96%; mais duas vezes de 20 min em álcool absoluto 100%. Após a desidratação foram mergulhadas em óxido de propileno (Electron Microscopy Sciences, EUA) por 5 min. Logo após foi feita uma mistura v/v de óxido de propileno e resina e colocado as larvas por 10 min. e colocados em resina (Durcupan, ACMFluka, Suíça). Em seguida foram mantidas sob vácuo por 24 horas e colocadas em blocos de resina para polimerização por 48 horas a 60 ° C. As larvas foram seccionadas longitudinalmente através de um ultramicrotomo (Leica EM UC6), e os cortes semifinos (1 µm) foram corados com azul de toluidina (Merck, Alemanha), diluído em solução tetraborato de sódio a 1% (Ecibra, Brasil). Imagens das larvas foram capturadas e digitalizadas utilizando microscópio com câmera acoplada.

3.6.2 Corte em criostato com emblocamento em Tissue Tek®.

Conforme o desenvolvendo tanto as larvas quanto as pupas e os adultos foram sendo selecionados e fixados durante 12 horas em temperatura ambiente em solução fixadora contendo glutaraldeído 2,5% (Sigma Chemicals Co., EUA) e paraformaldeído 2% (Synth, Brasil) em (PBS). Após foram colocadas em solução de sacarose 15% por 12 horas e, em seguida, em solução de sacarose 30% por 48 horas. As amostras foram seccionadas a 20 micrômetros de espessura em micrótomo (Leica SM 200R) e recolhidos em lâminas gelatinizadas. Após foram coradas pela coloração de Hematoxilina e eosina.

4 RESULTADOS

4.1 Observação da oviposição de *A. aegypti* após alimentação com *A. polyphaga*

No grupo de larvas alimentadas com *A. polyphaga* as fêmeas iniciaram a oviposição a partir do quarto dia, após o primeiro repasto sanguíneo. O grupo que não se alimentou de amebas, iniciou a oviposição um dia após (Fig. 10).

O número médio de ovos por fêmea por dia (o/f/d), durante os 30 dias de observação para o grupo alimentado foi de $11,75 \pm 3,63$ (o/f/d), com um total de 3.345 ovos contados.

Para o grupo que não recebeu amebas na alimentação o número médio de ovos foi de $8,7 \pm 3,32$ (o/f/d). O número total de ovos contados no grupo foi de 2.544.

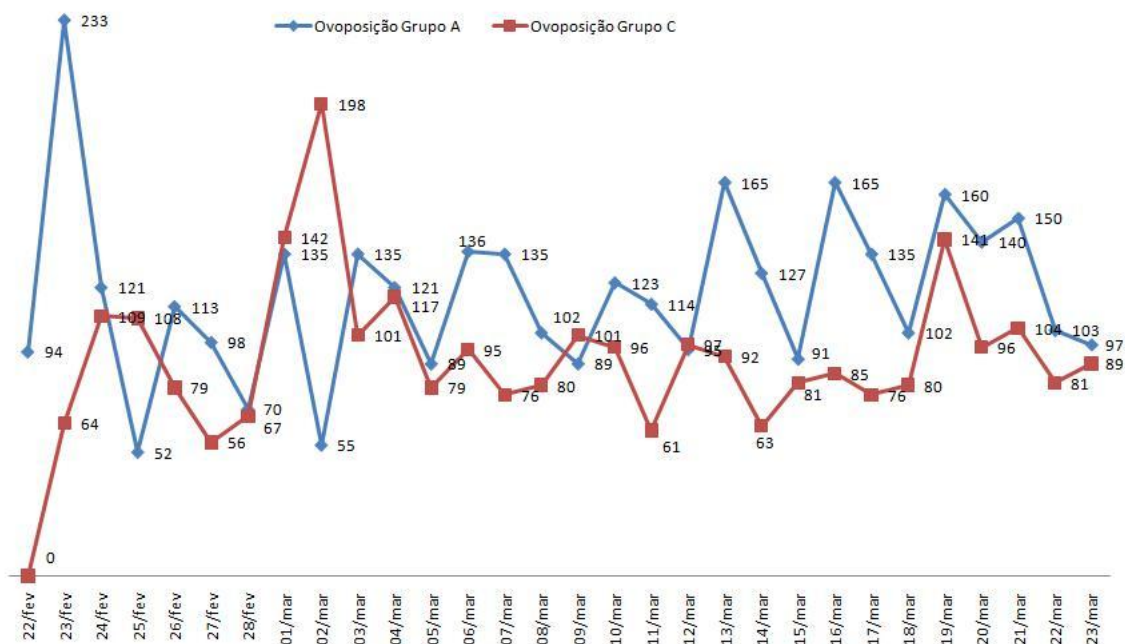


Figura 10. Desempenho da oviposição das fêmeas de *A. aegypti* durante 30 dias.

4.2 Observação quanto ao comportamento e desenvolvimento de larvas de *A. aegypti* alimentadas com *A. polyphaga*.

Com relação ao Grupo A, não se observou diferenças de comportamento entre larvas, quando comparado com o Grupo B e C. Ambos apresentaram mobilidade normal, bem como movimentação das escovas, além de contrações rápidas no corpo, reagindo ligeiramente, quando tocadas com agulhas histológicas. A adição de *A. polyphaga* na alimentação dos mosquitos não ocasionou morte de larvas, pupas ou adultos durante os experimentos. Porém pôde-se observar um crescimento um pouco maior no tamanho das larvas nos grupos A e B (Tabela 1), principalmente nas larvas, em relação ao Grupo C. A ANOVA não demonstrou diferença entre os grupos A e B). Entretanto, o grupo C apresentou diferença significativa em relação aos grupos A e B ($p < 0,01$; $F = 144,3$; $GL + 30$).

	A	B	C
1	4,88	5,50	3,69
2	5,50	5,86	2,83
3	5,49	5,34	4,02
4	5,61	5,63	3,38
5	5,54	5,11	2,79
6	5,78	5,59	4,46
7	5,52	4,78	4,74
8	5,60	5,30	5,45
9	6,34	5,77	4,22
10	5,65	4,81	3,48
11	5,67	5,78	5,55
Média Geral	5,60	5,41	4,06

Tabela 1 - Média das medidas das larvas de *A. aegypti* alimentadas com *A. polyphaga*.

4.3 Localização de *A. polyphaga* sobreviventes em *A. aegypti*

Através de cortes histológicos utilizando-se azul de toluidina, pode-se observar que algumas amebas sobreviveram ao processo alimentar das larvas.

O maior número de amebas foi encontrado no lúmen do intestino médio. Neste local foi possível visualizar cistos com formas estreladas e ovais, e o ectocisto segue mais ou menos o contorno do endocisto, características de *Acanthamoeba* sp. (Fig. 11, 12) conforme descrito por KHAN, (2006). Além disso, pôde-se observar no intestino médio das larvas uma variedade de outros microorganismos, em especial bactérias e fungos, provavelmente oriundos da alimentação artificial, mas representando importantes fontes de alimentação para as amebas (Fig. 13).

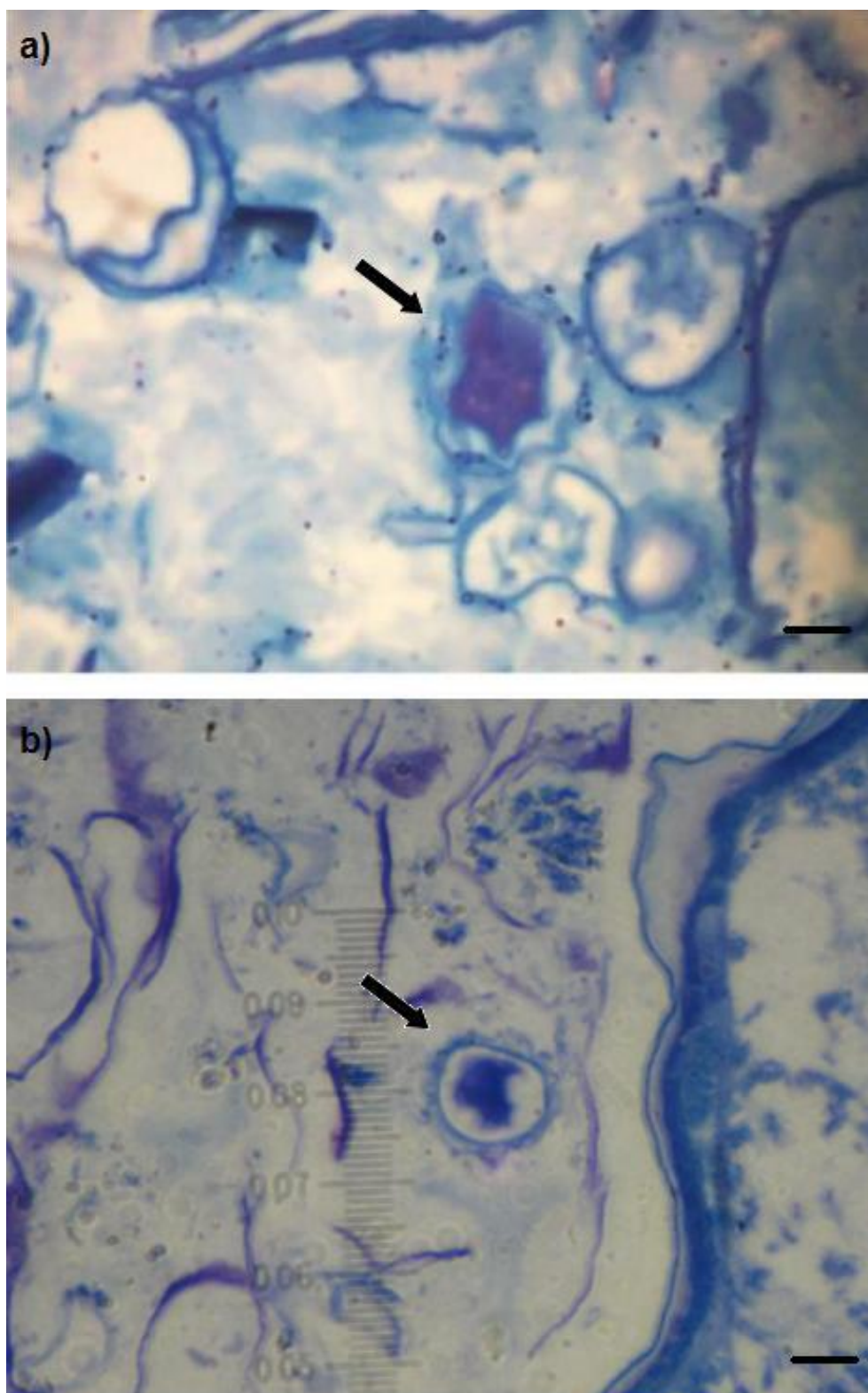


Figura 11. Larva de quarto estágio, corada com Azul de Toluidina, observa-se a presença de *A. polyphaga* (setas) no lúmen do intestino do *A. aegypti*. 1000x. Barra = 10 μ m.

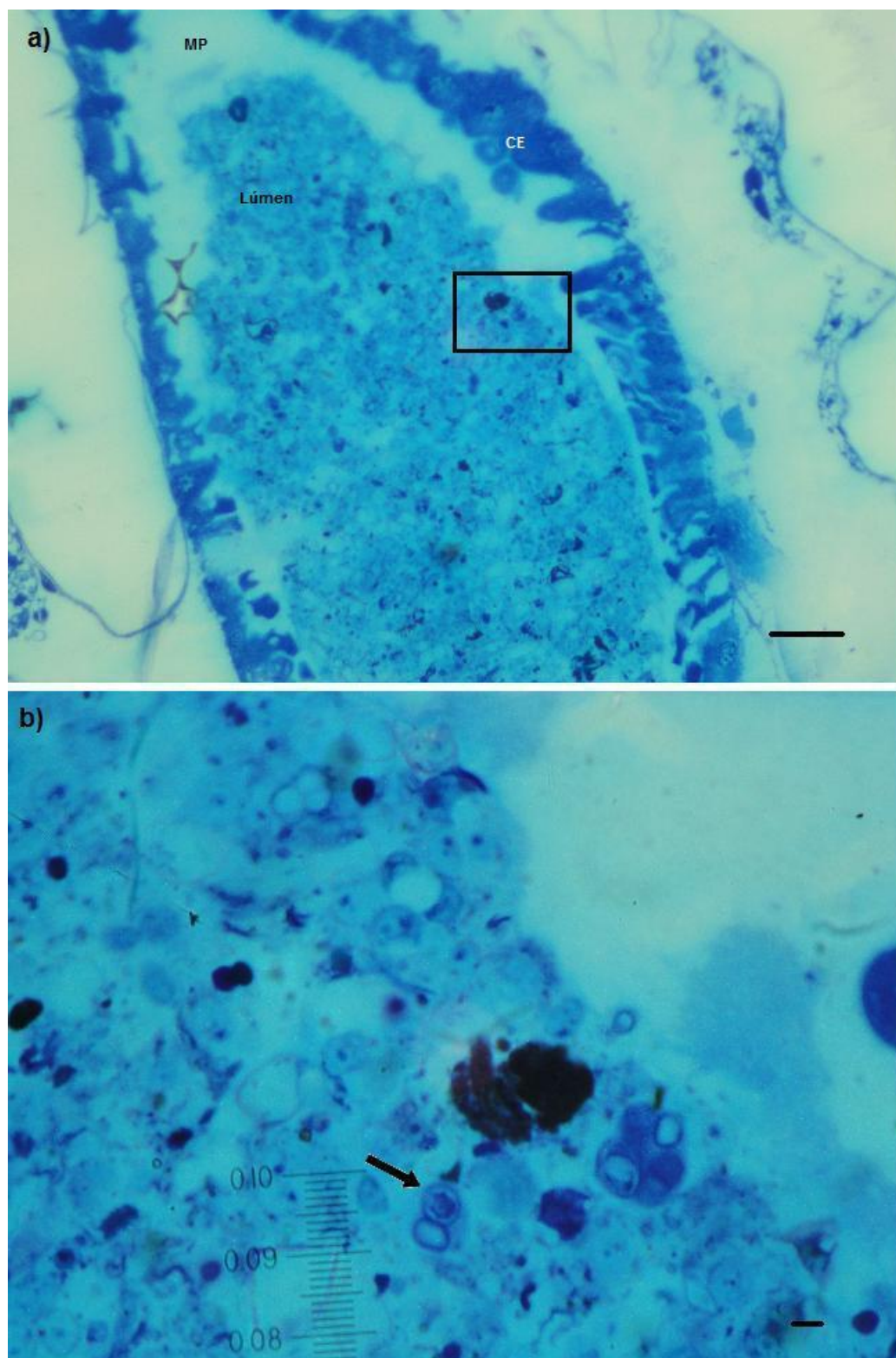


Figura 12. Larva estágio 4º de *A. aegypti* corte transversal (a) Intestino médio, pode-se observar a presença de membrana peritrófica (MP), células epiteliais (CE), 200x. Escala barra = 25 µm (b) Presença de cistos de *A. polyphaga* no lúmen do intestino da larva (seta). 1000 x. Escala Bar: 5 µm.

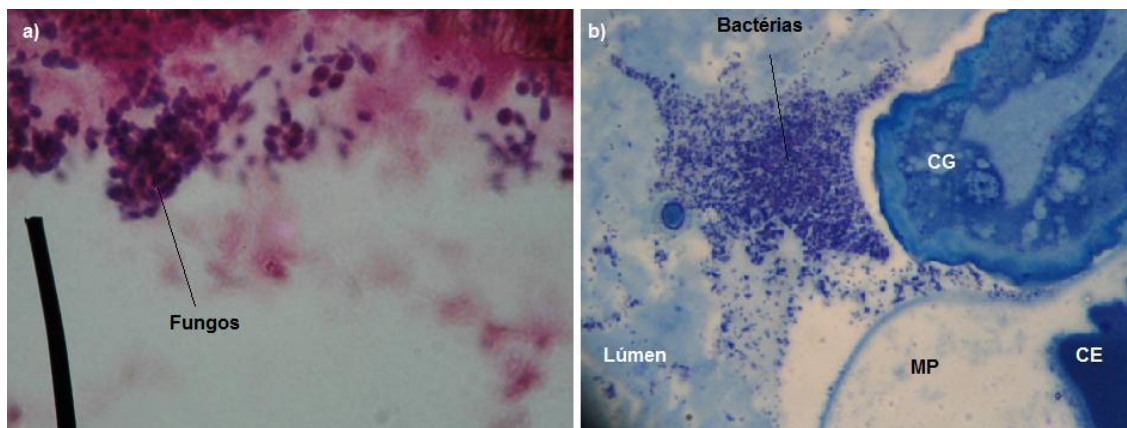


Figura 13. a) Presença de fungos no lúmen do intestino da larva. B) Presença de bactérias no intestino da larva. Corpo gorduroso (CG), células epiteliais (CE), membrana peritrófica (MP). Nota-se a membrana peritrófica protegendo as células do intestino. Aumento 1000x.

Também foi possível observar trofozoítos no corpo gorduroso das larvas, utilizando-se o Kit fluorescente de proliferação de células CellTrace™ CFSE (dados não fotografados).

Nos adultos pode-se observar trofozoítos no corpo gorduroso e na hemolinfa da região posterior do corpo do inseto (Figs. 14 e 15) Tanto nas larvas quando nos adultos *A. aegypti* observou-se a presença de formação de vesículas na parede do intestino. (Fig. 16)

Pela técnica de HE com cortes feitos em criostato, não foi possível caracterizar qualquer presença de amebas em larvas e adultos.



Figura 14. Trofozoito de *A. polyphaga* na hemolinfa da região posterior do corpo do mosquito adulto. Aumento de 1000x Barra = 5 μ m

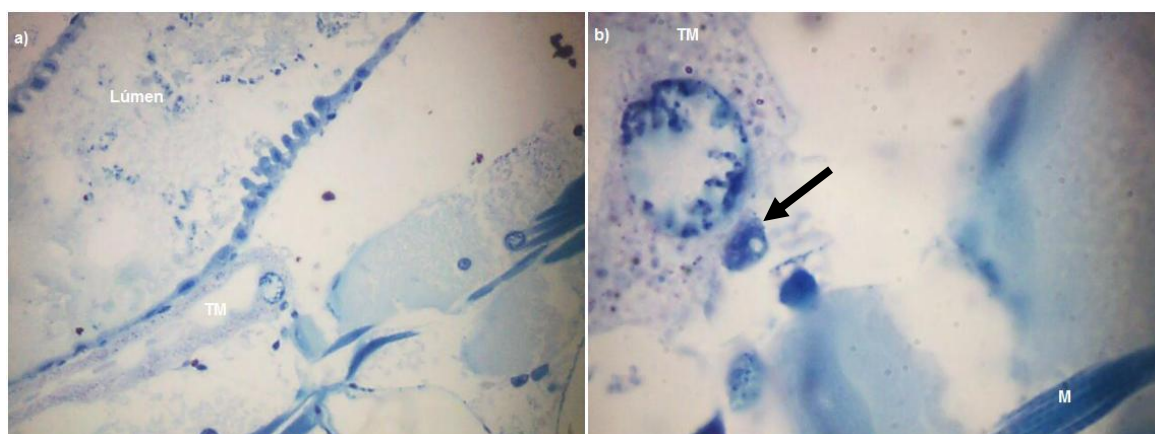


Figura 15. Mosquito adulto corado com azul de tudeidina a) Presença de vesículas e uma fina camada mucoide acima das células epiteliais. Aumento de 100x b) Possível presença de *A. polyphaga* (seta) ao lado do Túbulo de Malphige (TM), na hemolinfa. Músculo (M). Aumento de 1000x

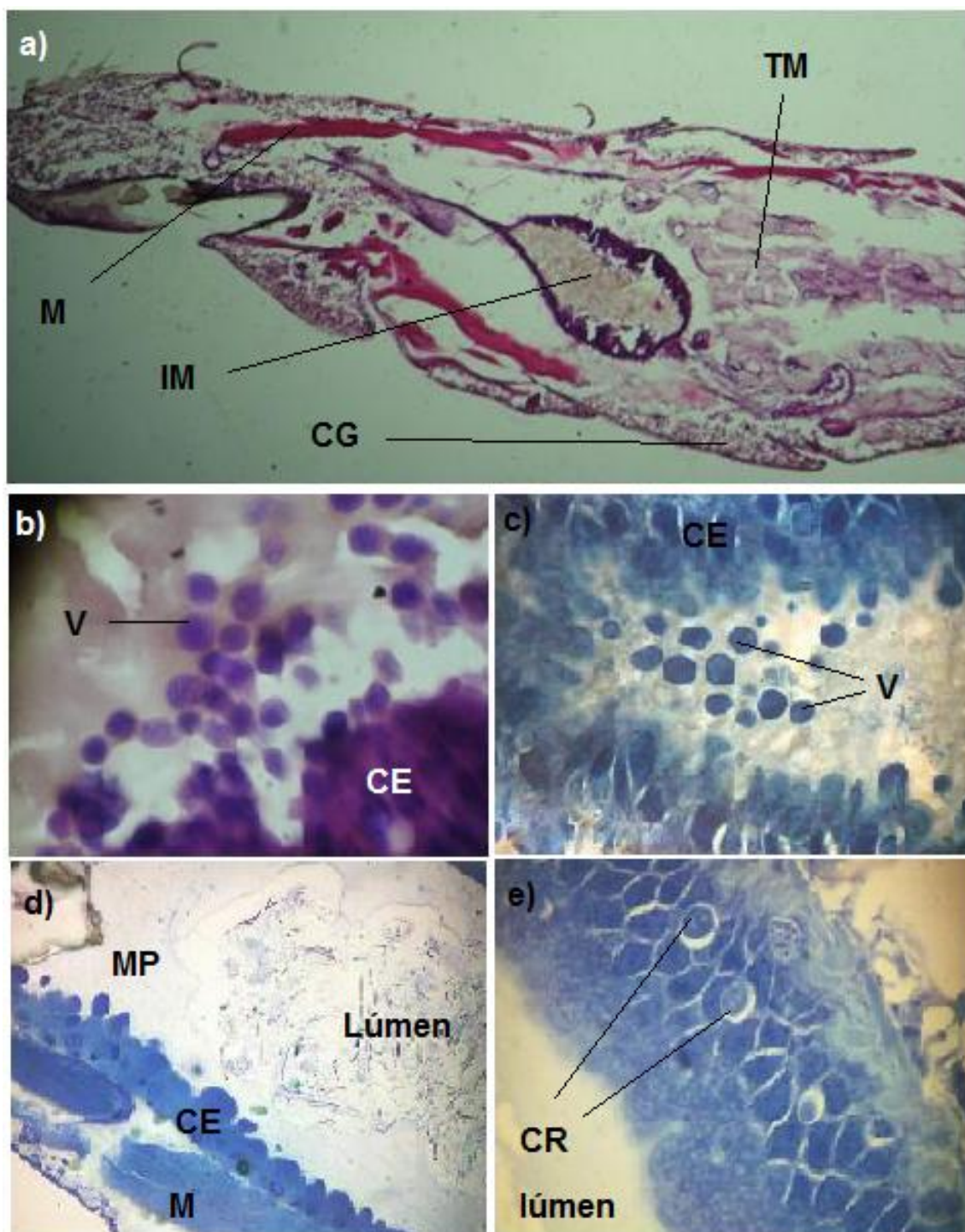


Figura 16. a) Corte longitudinal de adulto de *A. aegypti* com coloração de HE. 100x. Túbulos de Malpighi (TM), músculos (M), Intestino médio (IM), corpo gorduroso (CG), b e c) Observa-se a presença de vesículas (V). d) observa-se a formação de uma espessa membrana peritrófica (MP) no intestino posterior do mosquito. Células epiteliais (CE) Aumento de 400x e) formação de células regenerativas (CR) do intestino médio do mosquito. Aumento 1000x .

5 DISCUSSÃO

5.1 Desenvolvimento de *A. aegypti* após alimentação com *A.*

polyphaga

Os resultados mostraram pela primeira vez que fêmeas de *A. aegypti* alimentadas com *A. polyphaga* tiveram uma maior atividade de oviposição, sendo uma diferença de 801 ovos.

O espaço entre os dias para a oviposição após os repastos sanguíneos não diferem de resultados já encontrados por outros pesquisadores. Assim, parece que *A. polyphaga* não interferiu no início de oviposição das fêmeas. Os resultados apresentados por XUE & BARNARD (1997), em experimento com *A. albopictus*, demonstraram o terceiro dia como o de início da oviposição no ciclo gonotrófico das fêmeas, após alimentação sanguínea. Outros pesquisadores indicaram uma variação de 3 a 13 dias entre a alimentação sanguínea e a oviposição de *A. fluviatillis* (CONSOLI & WILLIAMS, 1978). GOMES *et al.*, (2006) relata que, provavelmente, estas variações são características intrínsecas de cada espécie. O tempo requerido entre a alimentação sangüínea e a deposição de ovos relaciona-se com fatores

que dependem de controle endógeno no inseto, como a assimilação de aminoácidos essenciais que favorecem a maturação dos ovos. Desta forma pode-se sugerir que a *A. polyphaga* possa ter servido como algum tipo de alimento em geral, ao grupo alimentado, pois o grupo controle teve uma resposta mais lenta (um dia) no ciclo gonotrófico.

Como preservação da espécie fêmeas de *A. aegypti* têm preferência em depositar seus ovos nas bordas de recipientes que tendem a armazenar água parada (CONSOLI & OLIVEIRA, 1998). Entretanto, verificou-se que as fêmeas tiveram não somente preferência em depositar seus ovos no papel filtro, mas também, em escala menor, observamos a deposição de ovos direto na superfície da água. Dados já observados por GOMES *et al.*, (2006) evidenciam que estes tem uma capacidade de eclosão mais rápida do que são colocados no papel filtro. Desta forma, Poderia se deduzir que no ambiente esta particularidade, provavelmente, pode assegurar ao inseto vetor uma rápida colonização de criadouros disponíveis, mantendo no período de estiagem uma população flutuante. Este fator também é uma característica importante para o não comprometimento da espécie (REITER *et al.*, 1991; SILVA *et al.*, 1998).

5.2 Observação de larvas de *A. aegypti* alimentadas com *A. polyphaga*.

Não foram observadas mudanças de comportamento entre os grupos. Entretanto, as larvas alimentadas com amebas (Grupo A) tiveram um desenvolvimento maior do que aquelas não alimentadas com amebas (Grupo C) sendo a significância ($p < 0,01$). Provavelmente um aporte alimentar maior, proporciona melhoria no desenvolvimento destes insetos. MERRITT *et al.*, (1992), destacaram que tanto a qualidade do ambiente quanto a quantidade de alimento disponível para as larvas servem como interferentes na sobrevivência, no desenvolvimento e na emergência do adulto. Assim, pode trazer benefícios ou malefícios para o mosquito adulto e conseqüentemente sua capacidade vetorial. Com este argumento poderíamos entender melhor sobre a distribuição espacial e temporal dos recursos alimentares disponíveis para larvas de mosquitos em seus habitats naturais. Acredita-se que as amebas proporcionem benefícios para o desenvolvimento dos mosquitos, suprimindo alguma falta na sua cadeia metabólica. Pois não houve diferença significativa nos desenvolvimentos entre os Grupos A e B, demonstrando que a *A. polyphaga* parece servir como um nutriente para larvas de *A. aegypti* contribuindo para seu desenvolvimento.

Ainda não há estudos sobre a interação entre amebas e mosquitos. Entretanto vários estudos têm referido a importância da interação entre mosquitos e bactérias. SARDINHA *et al.*, (2009) relatam esta interação e indicam que as bactérias intestinais de *A. aegypti* são essenciais para a fase

larval do mosquito, sendo que sua ausência determina a interrupção do ciclo de vida do inseto.

Outra observação que merece discussão é que as larvas de *A. aegypti*, alimentadas com *A. polyphaga* não demonstraram diferenciação na mobilidade no meio líquido, quando comparadas com o grupo controle. Conforme BARRETO *et al.*, (2006) tal comportamento indicaria que as mesmas estariam saudáveis.

MOSER *et al.*, (2001) descrevem estudos realizados com larvas de *Culex nigripalpus* infectadas por um baculovirus. Os autores observaram que as mesmas se tornaram letárgicas após 72 horas de infecção. Em outro experimento larvas de *A. aegypti* e *Culex quinquefasciatus* se tornaram letárgicas após meia hora de exposição ao *Bacillus thuringiensis*. Esses trabalhos evidenciam que a redução da mobilidade larval é o primeiro sinal da atividade larvicida (RUIZ *et al.*, 2004).

Observou-se também que a ingestão de *A. polyphaga* pelos mosquitos não ocasionou morte larval, pupal ou de adultos durante os experimentos. MERRITT *et al.*, (1992) destaca que larvas de mosquito, juntamente com outros invertebrados aquáticos, têm evoluído adaptações morfológicas que permitem a flexibilidade comportamental para se alimentar de diversos recursos. Ou seja, pode-se pensar que os mosquitos tenham se adaptado para poder se alimentar de amebas de vida livre e que, de alguma forma, não venham a causar sua morte.

5.3 Localização de *A. polyphaga* sobreviventes em *A. aegypti*.

No presente trabalho pode-se verificar que *A. polyphaga* pode ser encontrada tanto em larvas, quanto em adultos de *A. aegypti* confirmando assim, o estudo iniciado por ROTT *et al.*, (2010). Confirma-se também o escape das amebas através da membrana peritrófica, uma vez que foram encontrados trofozoitos em locais distintos do intestino médio, como no corpo gorduroso de larvas e adultos e na hemolinfa de adultos. MONCAYO *et al.* (2005) descreveram que a membrana peritrófica larval em mosquitos é muito robusta e serve para prevenir ou reduzir a invasão de agentes patogênicos. Pelo envelopamento da membrana estes agentes seriam expelidos junto com as fezes, diminuindo assim, a chance de desenvolvimento dos mesmos no intestino do mosquito.

DIMOPOULOS *et al.*, (1997) demonstraram que certas espécies de mosquitos produzem uma resposta de defesa quando inoculadas com bactérias ou protozoários. VILLANUEVA *et al.*, (2003) estudando sobre a susceptibilidade de *Ascogregarina* spp. em *Aedes* spp., concluíram que, em dose comparável e condições de exposição, a densidade de gametocitos de *Ascogregarina culicis* em *A. aegypti* foi geralmente duas a três vezes maior do que as densidades de *A. taiwanensis* encontrados em *A. albopictus*. A razão para esta redução não é conhecida, mas é relatado que os insetos resistem a infecções intestinais por descamação (excreção) de células do intestino médio para o lúmen do trato digestivo (TANADA & KAYA, 1993). Em nosso estudo também se pode observar uma diminuição de cistos e trofozoitos de *A.*

polyphaga no intestino, ou outras partes do mosquito. Tal resposta fisiológica poderia ser uma adaptação dos mosquitos para se protegerem de invasores.

Nos cortes histológicos foi possível observar a formação membrana peritrófica nos dois grupos estudados. SNODGRASS (1935) afirma que em Diptera esta membrana é secretada por células especializadas da porção final da região anterior do mesêntero. Em adição, BEERNTSEN *et al.* (2000) e ARRUDA *et al.* (2003) descrevem que a membrana peritrófica pode ser considerada um mecanismo de defesa da larva e do mosquito, funcionando como um filtro semipermeável para as enzimas digestivas visto que, uma das principais funções desta membrana é a proteção das células epiteliais, contra a ação mecânica do alimento. Mas pode também, agir como uma barreira para invasão de microorganismos ingeridos e patógenos. KLOWDEN (2007) fala sobre o sistema excretor mantém o ambiente interno do inseto, separando e eliminando resíduos metabólicos e outras substâncias tóxicas dos compartimentos do corpo. Como esses resíduos são freqüentemente dissolvidos em água, processos de excreção também estão estreitamente associados na osmorregulação e na manutenção do equilíbrio hídrico.

Tanto as larvas quando os adultos *A. aegypti* estudados, apresentaram uma formação de vesículas na parede do intestino. Tais observações já foram feitas por SNODGRASS (1935). Este descreve que as células digestivas do intestino dos insetos em geral participam ativamente nos processos de secreção e absorção. E o processo de degeneração dessas células ocorre através do acúmulo de material granular na porção apical da célula e da liberação desse material na luz intestinal do inseto. Na região apical

das células de todo o intestino de larvas de *A. aegypti*, foi observado uma fina borda em escova, provavelmente com função de absorção de nutrientes, como já foi demonstrado por LEVY *et al.*, (2004) em larvas de Lepidoptera.

BARKER & BROWN, (1994) falam sobre a interação entre amebas e bactérias, e compara a *Acanthamoeba* a um “cavalo de tróia”, que carrega as bactérias e as mantém vivas no seu citoplasma em situações normais e de estresse. MORALES *et al.*, (2005) em estudo com *Ascogregarina* sp. destacam que além de contribuir com certas patologias a seus hospedeiros, ela também pode desempenhar um papel na manutenção de arbovírus. SANDSTRÖM *et al.*, (2010) mostraram que *Vibrio cholerae* cresceu e sobreviveu durante duas semanas no interior da *A. polyphaga*. Resultando na interação entre esses microorganismos, destacando o papel da *A. polyphaga* como hospedeira do vibrião. Já outros trabalhos mostram que espécies de *Acanthamoeba* têm bactérias gram-negativas de diferentes origens como endossimbiontes. Assim, as amebas de vida livre podem vir a desempenhar papel importante como vetores ou hospedeiros de bactérias patogênicas, tais como *Campylobacter jejuni* (AXELSSON-OLSSON *et al.*, 2005), *Francisella tularensis* (ABD *et al.*, 2003), *Helicobacter pylori* (WINIECKA-KRUSNELL *et al.*, 2002), *Legionella pneumophila* (ZUSMAN *et al.*, 2004), *Salmonella typhimurium* (GAZE *et al.*, 2003) e *Shigella dysenteriae* (SAEED *et al.*, 2009) entre outros. Possivelmente, *Acanthamoeba* spp. podem vir a ser mantenedoras das bactérias dentro do mosquito ou uma forma de escape para que consigam permanecer no intestino e assim colaborem para o desenvolvimento de *A. aegypti*.

Mais estudos precisam ser desenvolvidos, para se entender a interação entre mosquito e protozoário. Em especial o papel das amebas como carreadoras de organismos como bactérias, fungos, vírus e produtos tóxicos.

Estes microrganismos associados aos insetos podem ter papéis importantes para a nutrição, reprodução, desenvolvimento, comportamento e resistência a colonização de patógenos (DILON & DILLON, 2004). Vários estudos relacionados às bactérias intestinais já foram realizados em mosquitos criados em laboratórios e de campo (DEMAIO et al, 1996; PUMPUNI et al, 1996; STRAIF et al, 1998; GONZALEZ-CERON et al, 2003; PIDIYAR et al, 2004; FAVIA et al, 2007; RANI et al, 2009). No entanto, pouco se sabe sobre o papel e distribuição da microbiota em diferentes compartimentos do trato digestivo dos mosquitos.

6. CONCLUSÕES

- Nas condições em que os testes foram feitos, *A. polyphaga* contribuí para o aumento de produção de ovos de *A. aegypti*. E não produziram patologias nos insetos.

- Algumas amebas que serviram de alimentação às larvas, conseguiram escapar à barreira da membrana peritrófica e da resposta de defesa do mosquito, invadindo outras regiões do corpo das larvas e dos adultos de *A. aegypti*.

- *A. polyphaga* é encontrada na forma de cistos e trofozoítos, indicando que o micro-habitat intestinal e do corpo gorduroso não são danosos para as mesmas.

7. PERSPECTIVAS

Uma melhor avaliação sobre a alimentação das larvas com estas amebas e a possível resposta na saúde dos mosquitos precisa ser feita. Se a adição de amebas na alimentação dos mosquitos pode promover um aumento na prole, então é necessário entender melhor estes parâmetros. Na natureza estes insetos sabem qual alimento é mais rico em nutrientes para o seu desenvolvimento. Se as amebas não são nocivas aos mosquitos, e se os mesmos têm preferência por se alimentar das mesmas, então se poderia pensar na utilização das mesmas para o controle biológico dos mosquitos.

Também é importante estudar sobre processos associados à resposta imune dos mosquitos quando as amebas conseguem escapar as barreiras de defesa e invadir outros locais do corpo, que não a região do intestino médio.

8. REFERÊNCIAS

ABD, H.; JOHANSSON, T.; GOLOVLIOV, I.; SANDSTRÖM, G., FORSMAN, M. Survival and growth of *Francisella tularensis* in *Acanthamoeba castellanii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 600–606. 2003.

ALVARENGA, P.H. *Estudo dos mecanismos de ligação de heme à matriz peritrófica de Aedes aegypti*. Tese (Doutorado). Rio de Janeiro: Universidade do Rio de Janeiro, 2005.

ARAÚJO, H.R.C. DE. *Ultra-estrutura dos hemócitos de Aedes aegypti (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae)*. Dissertação (Mestrado). Recife, 2009.

ARRUDA W.; OLIVEIRA G.M.C.; SILVA I.G. Toxicidade do extrato etanólico de *Magonia pubescens* sobre larvas de *Aedes aegypti*. *Rev Soc Bras Med Trop* 36 : p.17-25, 2003.

AXELSSON-OLSSON, D.; WALDENSTROM, J.; BROMAN, T.; OLSEN, B. AND HOLMBERG, M. Protozoan *Acanthamoeba polyphaga* as a potential reservoir for *Campylobacter jejuni*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(2), p. 987–992, 2005.

AYRES M, AYRES JRM, AYRES DL, SANTOS AAS. *Bioestat 5.0*. Sociedade Civil Mamirauá. Pará, 2007.

AZAMBUJA P, GARCIA ES, RATCLIFFE NA.. Gut microbiota and parasite transmission by insect vectors. *Trends Parasitol.* 21:568-72. 2005

BARRERA, R.; AMADOR, M.; CLARK, G. G. Ecological factors influencing *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) productivity in artificial containers in Salinas. *Journal of Medical Entomology* 43, Puerto Rico, p. 484-492, 2006.

BARKER, J.; BROWN, M.R.W. Trojan Horses of the microbial world: protozoa and the survival of bacterial pathogens in the environment. *Microbiology*, 140, p. 1253-1259, 1994.

BECKER N.; PETRIC, D.; ZGOMBA, M.; BOASEÂ, C.; DAHL, C.; MADONÂ, M.; KAISER, A. Mosquitoes and Their Control. *Springer-Verlag Berlin Heidelberg*, 2 ed, 2010.

BOOTON, G.C.; VISVESVARA, G.S.; BYERS, T.J.; KELLY, D.J.; Fuerst P.A. Identification and distribution of *Acanthamoeba* species genotypes associated with nonkeratitis infections. *Journal of Clinical Microbiology*, Parkville, v. 43, p. 1689-1693, abril 2005.

BOURTZIS K, BRAIG HR, KARR TL. Cytoplasmic incompatibility. In: Bourtzis, K., Miller, T.A. (Eds.), *Insect Symbiosis*. DRP Press, Boca Raton, 217-246. 2003.

BRAGA, I.A.; D. VALLE. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. *Epidemiologia e Serviços de Saúde* 16, p. 279-293, 2007.

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

CALDERÓN, O.; TROYO, A.; SOLANO, M.E. Diversidad larval de mosquitos (Diptera: culicidae) en contenedores artificiales procedents de una comunidad urbana de San Jose Costa Rica. *Parasitologia Latinoamericana*, v. 59, p. 132-136, 2004.

CAMPBELL CL, MUMMEY DL, SCHMIDTMANN ET, WILSON WC. Culture-Independent Analysis of Midgut Microbiota in the Arbovirus Vector *Culicoides sonorensis* (Diptera: Ceratopogonidae). *J Med Entomol.* 41:340-349. 2004.

CARLESSO, A.M.; ARTUSO, G.L.; CAUMO, K.; ROTT, M.B. Potentially pathogenic *Acanthamoeba* isolated from a hospital in Brazil. *Curr Microbiol* 60(3) p. 185–190, 2009.

CAUMO, K.; FRASSON, A.P.; PENS, C.; PANATIERI, L.F.; FRASON, A.P.G.; ROTT, M.B. Potentially pathogenic *Acanthamoeba* in swimming pools: a survey in the southern Brazilian city of Porto Alegre. *Ann Trop Med Parasitol* 103, p. 477–485, 2009.

CHAPMAN, R.F. *The insects: Structure and function*. Cambridge: Universities Press. 4 ed., p. 770, 1998.

CHRISTOPHIDES G.K.; VLACHOU D.; KAFATOS F.C. Comparative and functional genomics of the innate immune system in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Immunol Rev.*, p. 127-45, 2004.

CHRISTOPHERS, R. *The yellow fever mosquito: its life history, bionomics and structure*. Cambridge University Press, London, United Kingdom. p. 739, 1960.

CLARO, L. B. L.; TOMASSINI, H. C. B.; ROSA, M. L. G. Prevenção e controle do dengue: uma revisão de estudos sobre conhecimentos, crenças e práticas da população. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v. 20, n. 6, p. 1447-1457, 2004.

CLAVERIE J.M.; ABERGEL C. Mimivirus and its viroplasm. *Annu Rev Genet.* 43, p. 49-66, 2009.

CLEMENTS, A.N. The Biology of mosquitoes. New York: Cambridge University Press, 1 ed, 1992.

CLEMENTS, A.N. The Biology of Mosquitoes. Chapman and Hall; London, U.K: 2 ed. 1999.

CONTE, H. *Morfologia do corpo gorduroso em larvas de Diatraea saccharalis (Lepidóptera: Pyralidae) não parasitadas e parasitadas pelo Cotesia flavipes (Hymenoptera: Braconidae)*. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) – Instituto de Biociências. Rio Claro: UNESP, p. 77, 1994.

CONSOLI, R.A.G.B.; OLIVEIRA, R.L.L. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Rio de Janeiro. Fiocruz; 2 ed. 1998.

CONSOLI R.; WILLIAMS P. Laboratory observation on of *Aedes fluviatilis* (Lutz) (Diptera: Culicidae). *Bulletin of Entomological Research* 68, p. 123-136, 1978.

CRUZ-LANDIM, C. Biologia do desenvolvimento em abelhas. Depto. Biologia, Instituto de Biociências, UNESP, 2004.

DEMAIO, J.; PUMPUNI C.B.; KENT M.; BEIER J.C. The midgut bacterial flora of wild *Aedes triseriatus*, *Culex pipiens* and *Psorophora columbiae* mosquitoes. *Am J Trop Med Hyg*, p. 219-223, 1996.

DILLON, R.J.; DILLON, V.M. The gut bacteria of insects: Nonpathogenic interactions. *Annu. Rev. Entomol.* 49, p. 71–92, 2004.

DIMOPOULOS G.; RICHMAN A.; MÜLLER H.M.; KAFATOS F.C. Molecular immune responses of the mosquito *Anopheles gambiae* to bacteria and malaria parasites. *Proc Natl Acad Sci* 94(21), p. 11508-13, out. 1997.

DOBSON, S.L. Reversing *Wolbachia*-based population replacement. *Trends Parasitol.* 19: 128–133. 2003.

DONALÍSIO, M.R.; GLASSER, C.M. Vigilância Entomológica e controle de vetores do Dengue. *Revista Brasileira de Epidemiologia* 5(3), 2002.

DONG Y, MANFREDINI F, DIMOPOULOS G. Implication of the mosquito midgut microbiota in the defense against malaria parasites. *PLoS Pathog.* 5:423-433, 2009.

FAVIA, G.; RICCI, I.; DAMIANI, C.; RADDADI, N.; CROTTI, E.; MARZORATI, M.; RIZZI, A.; URSO, R.; BRUSETTI, L.; BORIN, S.; MORA, D.; SCUPPA, P.; PASQUALINI, L.; CLEMENTI, E.; GENCHI, M.; CORONA, S.; NEGRI, I.; GRANDI, G.; ALMA, A.; KRAMER, L.; ESPOSITO, F.; BANDI, C.; SACCHI, L.; DAFFONCHIO, D. Bacteria of the genus *Asaia* stably associate with *Anopheles stephensi*, an Asian malarial mosquito vector. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104: p. 9047-9051, 2007.

FELTON, G.W.; SUMMERS, C.B. Antioxidante systems in insects. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 29: p. 187-197, 1995.

FERREIRA, R.A.C. Análise morfológica e histoquímica do corpo gorduroso e dos túbulos de malpighi de operárias adultas de *Scaptotrigona postica* (latreille, 1807) (Hymenoptera, Apidae) tratadas com fipronil e ácido bórico. Dissertação, Rio Claro, 2010.

FOLEY, D.H.; RUEDA, L.M.; WILKERSON, R.C. Insight into global mosquito biogeography from country species records. *J Med Entomol* 44: p. 554-567, 2007.

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

FREIRE, D. C. B.; BRITO-FILHA, C. R. C.; CARVALHO-ZILSE, G. A. Efeito dos óleos vegetais de andiroba (*Carapa sp.*) e Copaiba (*Copaifera sp.*) sobre forideo, pragas de colmeias, (Diptera:Phoridae) na Amazonia Central. *Acta Amazon.*, v. 36, n 3, p. 365-368, 2006.

GAZE, W.H.; BURROUGHS, N.; GALLAGHER, M.P.; WELLINGTON, E.M. Interactions between *Salmonella typhimurium* and *Acanthamoeba polyphaga*, and observation of a new mode of intracellular growth within contractile vacuoles. *Microb. Ecol.* 46, p. 358–369, 2003.

GAJDATSY, A.D.; KOSMIN, A.; BARRETT, G.D. Coexistent adenoviral keratoconjunctivitis and *Acanthamoeba keratitis*. *Clin Experiment Ophthalmol*, 28: p. 434–436, 2000.

GILLESPIE, J.P.; KANOST, M.R.; TRENCZEK, T. Biological mediators of insect immunity. *Ann Rev Entomol*, 42: p. 611-43, 1997.

GILLETT, J.D. Abdominal pulses in newly emerged mosquitoes *Aedes aegypti*. *Mosq News* 43: p. 359–361, 1983.

GITHEKO, A.K.; LINDSAY, E.W.; CONFALONIERI, E.U.; PATZ, J.A. Climate change and vector-borne diseases: a regional analysis. *Bull World Health Organ*, 78(9): p. 1136-1147, 2000.

GOMES, A.S.; SCIAVICO, C.J.S; EIRAS, A.E. Periodicidade de oviposição de fêmeas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) em laboratório e campo. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 39(4): p. 327-332, jul-ago, 2006.

GREUB, G.; RAOULT, D. Microorganisms resistant to free-living amoebae. *Clinical Microbiology Reviews, Washington*, v. 17, p. 413-433, apr. 2004.

HAUNERLAND, N. H.; NAIR, K. K.; BOWERS, W. S. Fat body heterogeneity during development of *Heliothis zea*. *Insect Biochemistry* 20: p. 829–837, 1990.

HAKIM, R.S.; BALDWIN, K.; SMAGGHE, G. Regulation of Midgut Growth, Development, and Metamorphosis. *Annu. Rev. Entomol.* v. 55 p.593–608. 2010.

HAWLEY, W.A.. The biology of *Aedes albopictus*. *Journal of the American Mosquito Control Association* 4 (suppl): p. 1-40, 1988.

HETRU, C.; TROXLER, L.; HOFFMANN, J.A. *Drosophila melanogaster* antimicrobial defense. *J Infec Dis.*187(2): p. 327-34, 2003.

HORN, M.; COLLINGRO, A.; SCHMITZ-ESSER, S.; BEIER, C.L.; PURKHOLD, U.; FARTMANN, B.; BRANDT, P.; NYAKATURA, G.J.; DROEGE, M.; FRISHMAN, D.; RATTEI, T.; MEWES, H.-W. & WAGNER, M. Illuminating the evolutionary history of chlamydiae. *Science*, **304**: p. 728–730, 2004.

HOTI SL, SRIDHAR A, DAS PK. Presence of *Wolbachia* endosymbionts in microfilariae of *Wuchereria bancrofti* (Spirurida: Onchocercidae) from different geographical regions in India. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 98:1017-9. 2003.

HULTMARK D. Insect lysozymes. In: Lysozymes: Model enzymes in biochemistry and biology. Jollès P, editor. Birkhäuser Verlag Basel, 1996.

LELES, R.N. Efeito de fungos entomopatogênicos na mortalidade de adultos, oviposição e eclosão de larvas de *Aedes aegypti*. Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical). Goiânia: Univ. Federal de Goiás, 2009.

LEVY, S.M.; FALLEIROS, A.M.F; MOSCARDI, F.; GREGÓRIO, E.A.; TOLEDO, L .A. Morphological study of the hindgut in larvae of *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae). *Neotrop Entomol* 33: p. 427-431, 2004.

JACOBS-LORENA, M.E; OO, M.M. The peritrophic matrix of insects, In: *The Biology of Disease Vectors*, 1st edition. Edited by Beaty, B.J. and Marquardt, W.C.; Colorado: University Press of Colorado, p. 318-332, 1996.

KAFEL, A.; BEDNARSKA, K.; AUGUSTYNIAK, M.; WITAS, I.; SZULINSKA, E. Activity of glutathione S-transferase in *Spodoptera exigua* larvae exposed to cadmium and zinc in two subsequent generations. *Environ. Int.* v. 28, n. 3, p. 683-686, 2003.

KHAN, N.A. Pathogenesis of *Acanthamoeba* infections. *Microbial Pathogenesis*, v. 34, p. 277-285, 2003

KHAN, N.A. *Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health. Federation of European *Microbiological Societies*. *Microbiological Review*, v. 30, p. 564-595, 2006.

KLOWDEN, M.J.; DAVIS, E.E.; BOWEN, M.F.. Role of the fat body in the regulation of host-seeking behaviour in the mosquito *Aedes aegypti*. *J Insect Physiol.*, 33(9): p. 643-6, 1987.

KRAMER, K. J.; HOPKINS, T. L.; SCHAEFER, J., Applications of solids NMR to the analysis of insect sclerotized structures. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 25, n. 10, p. 1067-1080, 1995.

LEHANE, M.J. Peritrophic matrix structure and function. *Ann. Rev. Entomol.* 42, 525–550. 1997.

LUZ, C.; TAI, M.H.H.; SANTOS, A.H.; SILVA, H.H.G. Impacto of moisture on survival of *Aedes aegypti* eggs and ovicidal activity of *Metarhizium anisopliae* under laboratory conditions. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 103: p. 214-215, 2008.

MARCIANO-CABRAL, F.; CABRAL, G. A. *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans *Clin. Microbiol. Rev.* 16, p. 273-307, 2003.

MARTINS, G. F. 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. Tese. Belo Horizonte, 2008.

MARTINS, G. F.; PIMENTA, P.F.P. Structural Changes in Fat Body of *Aedes aegypti* Caused by Aging and Blood Feeding, *Journal Of Medical Entomology*, v. 45, n. 6, nov., 2008.

MATTANA, A.; SERRA, C.; MARIOTTI, E.; DELOGU, G.; FIORI, P.L.; CAPPUCINELLI, P. *Acanthamoeba castellanii* promotion of in vitro survival and transmission of coxsackie b3 viruses. *Eukaryotic Cell, Washington*, v. 5, p. 665-671, Abril, 2006.

MERRITT, R.W.; DADD, R.H.; WALKER, E.D. Feeding behavior, natural food, and nutritional relationships of larval mosquitoes. *Annu Rev Entomol.*, v. 37, p. 349–376, 1992.

MOLMERET, M.; HORN, M.; WAGNER, M.; SANTIC, M.; KWAIK, Y.A. Amoebae as training grounds for intracellular bacterial pathogens. *Applied Environmental Microbiology*, Washington, v. 71, p. 20-28, jan. 2005.

MOLL, R.M.; ROMOSER, W.S.; MODRAKOWSKI, M.C.; MONCAYO, A.C.; LERDTHUSNEE, K. Meconial peritrophic membranes and the fate of midgut bacteria during mosquito (Diptera: Culicidae) metamorphosis. *J Med Entomol* v. 38, p. 29-32, 2001.

MONATH, T.P. Dengue - the Risk to Developed and Developing-Countries. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 91, p. 2395–2400, 1994.

MOSER, B.A.; BECNEL, J.J.; WHITE, S.E.; AFONSO, C.; KUTISH, G. Morphological and molecular evidence that *Culex nigripalpus* baculovirus is an unusual member of the family Baculoviridae. *J Gener Virol* v. 82, p. 283-297, 2001.

NEVES, D. et al. Parasitologia Humana 11^a ed. Atheneu, São Paulo, 2005.
PAGE, F.C. 1967. Re-Definition of the Genus *Acanthamoeba* with Descriptions of Three Species. *J. Protozool.*, 14 (4): p. 709-724.

PETERS, W. Peritrophic membranes. In: Bradshaw, S.D.; Burggren, W.; Heller, H.C.; Ishii, S.; Langer, H.; Neuweiler, G.; Randall, D.J. (Eds.), *Zoophysiology*. Springer-Verlag, Berlin, 1992.

PIDIYAR, V.J.; KAZNOWSKI, A.; BADRI NARAYAN, N.; PATOLE, M.S.; SHOUCHE, Y.S. *Aeromonas culicicola* sp. nov., from the midgut of *Culex quinquefasciatus*. *Int J Syst Evol Microbiol.*, v. 52, p. 1723-1728, 2002.

PINHEIRO, D.O.; QUAGIO-GRASSIOTTO, I.; GREGÓRIO, E.A. Morphological regional differences of epithelial cells along the midgut in *Diatraea saccharalis* Frabricius (Lepidoptera: Crambidae) larvae. *Neotrop. Entomol.* V. 37. P. 413-419. 2008

RAIKHEL, A.S.; LEA, A.O. Previtellogenic development and synthesis in the fat body of a mosquito: an ultrastructural and immunocytochemical study. *Tissue Cell.*; v. 15, p. 281-300, 1983.

RAJAN TV. The eye does not see what the mind does not know: the bacterium in the worm. *Perspect Biol Med.* 48:31-41. 2005.

RANI, A.; SHARMA, A.; RAJAGOPAL, R.; ADAK, T.; BHATNAGAR, R.K.; Bacterial diversity analysis of larvae and adult midgut microflora using culture-dependent and culture-independent methods in lab-reared and field-collected *Anopheles stephensi*-an Asian malarial vector. *BMC Microbiology* v. 9, p. 96 2009.

RASGON JL, STYER LM, SCOTT TW. *Wolbachia*-induced mortality as a mechanism to modulate pathogen transmission by vector arthropods. *J. Med. Entomol.* 40, 125–132. 2003.

REITER, P.; AMADOR, M.A.; COLON, N. Enhancement of the CDC ovitrap with hay infusions for daily monitoring of *Aedes aegypti* populations. *Journal of the American Mosquito Control Association* 7: 52-55, 1991.

RIBACK, T.I.S. *Estratégias adaptativas de Aedes aegypti e Aedes albopictus em resposta a temperatura e qualidade de criadouros*. Tese – Instituto de Biociências de Botucatu. São Paulo: Universidade Estadual Paulista, 2009.

RÓDIO, C.; DA ROCHA VIANNA, D.; KOWALSKI, K.P.; PANATIERI, L.F.; VON POSER, G.; ROTT, M.B. In vitro evaluation of the amebicidal activity of *Pterocaulon polystachyum* (Asteraceae) against trophozoites of *Acanthamoeba castellanii*. *Parasitol Res.* v. 104, p. 191-4, 2008.

ROTT, M.B.; CAUMO, K.; SAUTER, I.P.; ECKERT, J.; ROSA, L.; SILVA O.S. Susceptibility of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) to *Acanthamoeba polyphaga* (Sarcomastigophora: Acanthamoebidae). *Parasitol Res.* v. 107, p. 195–198, 2010.

ROZEMBOOM, L. E.L.; ROSEN, L. & IKED, J. Observations on ovoposition by *Aedes* (S) *Albopictus* Skuse and *A.* (S) *pynesiensis* Marks in nature. *J. Med Entomol.*, v. 10, p. 397-9, 1973.

RUMELT, S.; COHEN, I.; REHANY, U. Spontaneous corneal graft ulcerative perforation due to mixed *Acanthamoeba* and herpes simplex keratitis: a clinicopathologic study. *Cornea*, v. 19, p. 240-242, 2000.

RUIZ, M.L.; SEGURA, C.; TRUJILLO, J.; ORDUZ, S. In vivo binding of the Cry11bB toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *Medellin* to the midgut of mosquito larvae (Diptera: Culicidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 99, p. 73-79, 2004.

SAEED, A.; ABD, H.; EDVINSSON, B.; SANDSTRÖM, G. *Acanthamoeba castellanii* an environmental host for *Shigella dysenteriae* and *Shigella sonnei*. *Arch. Microbiol.* v. 191, p. 83–88, 2009.

SARDINHA, D.C.C; LEMOS, F.J.A.; GUSMÃO, D.S. Influência de bactérias intestinais de *Aedes aegypti* na seleção de sítios de oviposição e alimentação. CONFLICT - CONGRESSO FLUMINENSE DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA. RESUMO ON LINE <http://migre.me/4iDRM>. 2009.

SCHUSTER, F.L.; VISVESVARA, G.S. Opportunistic amoeba: challenges in prophylaxis and treatment. *Drug Resistance Updates*, v. 7, p.41-51, 2004.

SILVA, H.H.G.; SILVA, I.G.; LIRA, K.S. Metodologia de criação, manutenção de adultos e estocagem de ovos de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) em laboratório. *Revista de Patologia Tropical*, v. 27, p. 53-63, 1998.

SILVA, E. *Reprodução de Aedes aegypti em fossas de esgotamento sanitário no bairro dos pioneiros, zona urbana de pimenta Bueno*. Dissertação – Rondônia, Amazônia Ocidental. UnB – Brasília, 2007.

SILVA, H. H. G. DA. Período de quiescência dos ovos e ciclo de vida de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae) em condições de laboratório. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 31(1), p. 113-114, jan-fev, 1998.

SILVA, H.H.G.; SILVA, I.G. Influência do período de quiescência dos ovos sobre o ciclo de vida de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae) em condições de laboratório. *Rev Soc Bras Med Trop.*, v. 32, p. 349-355, 1999.

SILVA, M.A. *Isolamento e identificação de amebas de vida livre potencialmente patogênicas em amostras de poeira de hospitais da cidade de Presidente Prudente*. Dissertação (mestrado). Facul. Ciênc. Farmac. Univ. Est. São Paulo, 2001.

SILVEIRA-NETO, S.; NAKANO, O.; BARBIN, D.; VILLA-NOVA, N. Manual de ecologia dos insetos. São Paulo, *Agronômica Ceres*, p. 419. 1976.

SONDERGAARD L. Homology between the mammalian liver and the *Drosophila* fat body. *Trends Genet.*;v. 9(6): p. 193, 1993.

SNODGRASS R. E., Principles of insect morphology. McGraw-Hill Book Co., Inc., New York & London: 1-667. **1935**.

TANADA, Y.; KAYA, H.K.; Insect Pathology. *Academic Press*, New York. 1993.

TELLAM, R.L. The peritrophic matrix, In: *Biology of Insect Midgut*, 1st edition. Edited by Lehane, M.J. and Billingsley, P.F; London: Chapman & Hall, pp. 86-114. 1996.

THOMAS V, HERRERA-RIMANN K, BLANC DS, GREUB G. Biodiversity of Amoebae-Resisting Bacteria in a Hospital Water Network. *Appl Environ Microbiol* 72: 2428-2438. 2006.

TERRA, W.R. The origins and functions of the insect peritrophic membrane and peritrophic gel. *Arch. Insect. Biochem. Physiol.* **47(2)**, 47-61. 2001.

TERRA, R. E FERREIRA, C. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comp. Biochem. Physiol.* **109 B**: 1-62. 1994.

TEIXEIRA, M.G.; BARRETO M.L.; COSTA, M.C.N.; FERREIRA, L.D.; VASCONCELOS, P.F.; CAIRNCROSS, S. Dynamics of dengue virus circulation: a silent epidemic in a complex urban area. *Trop Med Int Health.* (9):757-62. 2002

- TU, E.Y.; JOSLIN, C.E.; NIJM, L.M.; FEDER, R.S.; JAIN, S.; SHOFF, M.E.; Polymicrobial Keratitis: *Acanthamoeba* and Infectious Crystalline Keratopathy. *American Journal Of Ophthalmology*. VOL 148; NUMBER 1, pages 13-19.e2. 2009.
- TURNER, N.A.; HARRIS, A.D.; LLOYD, D. Observation Microbial differentiation and changes in susceptibility to antimicrobial agents. *J. Appl. Microbiol.*, 89 (5): 751. 2000.
- 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.*;5:102-10. 2002.
- VILLANUEVA, F.R.; BECNEL, J.J.; BUTLER, JF. Susceptibility of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* larvae to *Ascogregarina culicis* and *Ascogregarina taiwanensis* (Apicomplexa: Lecudinidae) from Florida. *Journal of Invertebrate Pathology* 84 47–53. 2003.
- VILMOS, P.; KURUCZ, E. Insect immunity: evolutionary roots of the mammalian innate immune system. *Immunol Let.*;62:59-66. 1998.
- VISVESVARA, G.S.; MOURA, H.; SCHUSTER, F.L. Pathogenic and opportunistic freeliving amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* v. 50,p.1–26, 2007.
- WALOCHNIK, J.; DUCHENE, M.; SEIFERT, K.; OBWALLER, A.; HOTTKOWITZ, T.; WIEDERMANN, G.; EIBL, H.; ASPOCK, H. Cytotoxic activities of alkylphosphocholines against clinical isolates of *Acanthamoeba* spp. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 46, n. 3. P. 695-701, 2002.
- WANG, Z.; HAUNERLAND, N.H. Ultrastructural study of storage protein granules in fat body of the corn earworm *Heliothis zea*. *J Insect Physiol.* ;37(5):353-63. 1991.
- WANG, P. E GRANADOS, R. R. An intestinal mucin is the target substrate for a baculovirus enhancing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 6977-6982. 1997.
- WIGGLESWORTH, V.B *Insect physiology*. 8 ed.; Champman and Hall; London, Vol. p.191. 1984.
- WERREN JH. Biology of *Wolbachia*. *Annu Rev Entomol.* 42:587-609. 1997.
- WINIECKA-KRUSNELL, J., K. WREIBER, A. VON EULER, L. ENGSTRAND, AND E.LINDER. Free-living amoebae promote growth and survival of *Helicobacter pylori*. **Scand. J. Infect. Dis.** 34:253–256. 2002.
- WOODBRIDGE A.F.; EDWARD D.W. Mosquitoes (Culicidae), *Medical and Veterinary entomology*, pg. 203 – 262. 2002.

WU M.C.; LU K.H. Juvenile hormone induction of glutathione S-transferase activity in the larval fat body of the common cutworm, *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). *Arch Insect Biochem Physiol.* 68(4):232-40. 2008.

YANG, J.; MCCART, C.; WOODS, D.J.; TERHZA, S.; GREENWOOD, K.G.; French-CONSTANT, R.H., DOW, J.A. A *Drosophila* systems approach to xenobiotic metabolism. *Physiol. Genomics*, v.30, n.3, p.223-231. 2007.

XUE, R.; BARNARD, D.R. Diel patterns of pupation, emergence, and oviposition in a laboratory population of *Aedes albopictus*. *Journal of the American Mosquito Control Association* 13: 205-207, 1997.

ZACHARY D, HOFFMANN D. Lysozyme is stored in the granules of certain haemocyte types in *Locusta*. *J Insect Physiol.*30(5):405-11. 1984.

ZAUBERMAN N, MUTSAFI Y, HALEVY DB, SHIMONI E, KLEIN E, XIAO C, SUN S, MINSKY A. Distinct DNA exit and packaging portals in the virus *Acanthamoeba polyphaga* mimivirus. *PLoS Biol.* 13(5):e114. 2008.

ZUSMAN, T., FELDMAN, M., HALPERIN, E., SEGAL, G. Characterization of the *icmH* and *icmF* genes required for *Legionella pneumophila* intracellular growth, genes that are present in many bacteria associated with eukaryotic cells. *Infect. Immun.* 72, 3398–3409. 2004.