

UFRRJ
INSTITUTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA
ANIMAL

TESE

CORPO GORDUROSO DE *Lutzomyia longipalpis*

(DIPTERA: PSYCHODIDAE: PHLEBOTOMINAE)

JORGE ANTÔNIO CASAGRANDE BRETAS

2016



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL**

CORPO GORDUROSO DE *Lutzomyia longipalpis*

(DIPTERA: PSYCHODIDAE: PHLEBOTOMINAE)

JORGE ANTÔNIO CASAGRANDE BRETAS

*Sob a Orientação da Professora
Dr^a. Jacenir Reis dos Santos Mallet – FIOCRUZ/RJ*

Tese submetida como requisito parcial
para obtenção do grau de **Doutor em
Ciências**, no Programa de Pós-
Graduação em Biologia Animal.

Seropédica, RJ
Agosto de 2016

595.7

B844c

T

Bretas, Jorge Antônio Casagrande,
1980-

Corpo gorduroso de *Lutzomyia longipalpis* (Díptera: Psychodidae: Phlebotominae) / Jorge Antônio Casagrande Bretas - 2016.

55 f.: il.

Orientador: Jacenir Reis dos Santos Mallet.

Tese (doutorado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Biologia Animal.

Bibliografia: f. 45-55.

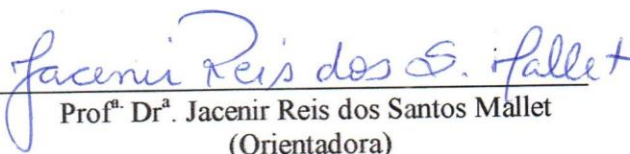
1. Insetos - Teses. 2. Díptero - Morfologia - Teses. 3. *Lutzomyia* - Teses. 4. Flebotomíneo - Teses. 5. Lipídios - Composição - Teses. I. Mallet, Jacenir Reis dos Santos, 1958-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Biologia Animal. III. Título.

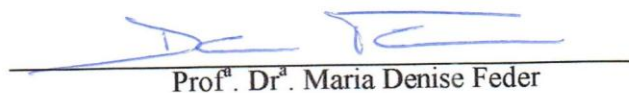
**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL**

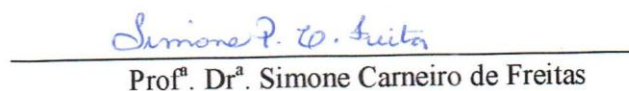
JORGE ANTÔNIO CASAGRANDE BRETAS

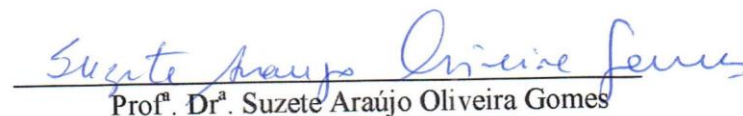
Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, área de Concentração em Biologia Animal.

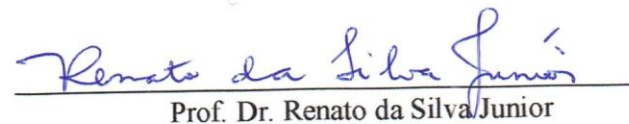
TESE APROVADA EM 29/8/2016.


Prof^ª Dr^ª. Jacenir Reis dos Santos Mallet
(Orientadora)


Prof^ª. Dr^ª. Maria Denise Feder


Prof^ª. Dr^ª. Simone Carneiro de Freitas


Prof^ª. Dr^ª. Suzete Araújo Oliveira Gomes


Prof. Dr. Renato da Silva Junior

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus e a minha família,
pelo carinho e motivação.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela fé e perseverança que tem me dado e por ter colocado em meu caminho pessoas especiais que contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos meus familiares, por tudo o que fizeram por mim ao longo da minha vida, pelo amor incondicional, pelo incentivo na minha busca pelo conhecimento e pela formação do meu caráter.

A minha orientadora Prof^ª. Dr^ª. Jacenir Reis dos Santos Mallet, por ter me aceitado como seu orientando, pela seriedade profissional e ensinamentos transmitidos.

Aos membros da banca examinadora por terem atendido ao convite, dispondo parte de seus tempos para contribuir neste trabalho.

Ao Instituto de Biologia da UFRRJ, por abrir as portas para que eu pudesse realizar este objetivo, e a sua secretaria da pós-graduação, por toda atenção prestada durante o curso.

A CAPES pelo apoio financeiro.

RESUMO

BRETAS, Jorge Antônio Casagrande. **CORPO GORDUROSO DE *Lutzomyia longipalpis* (DIPTERA: PSYCHODIDAE: PHLEBOTOMINAE)**. 2016. P 55 p. Tese (Doutorado em Biologia Animal). Instituto de Biologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 2016.

O corpo gorduroso dos insetos está envolvido em funções de grande importância. Assim, o corpo gorduroso, além de atuar como sítio de reserva e síntese de proteínas, carboidratos e lipídios participa da produção de substâncias com ação no sistema imune, detoxificação, produção dos óvulos, espermatozoides e de feromônios. Contudo, a principal função do corpo gorduroso é a reserva de lipídios. O corpo gorduroso dos insetos normalmente é dividido em duas regiões, o corpo gorduroso visceral, localizado próximo do tubo digestivo, e o corpo gorduroso parietal, localizado próximo da cutícula. Os tipos celulares encontrados no corpo gorduroso dos insetos variam, sendo encontrado apenas um tipo em alguns e mais de dez tipos em outros. Os principais tipos celulares encontrados no corpo gorduroso dos insetos são os trofócitos, urócitos e os oenócitos. A morfologia e a bioquímica do corpo gorduroso de *Lutzomyia longipalpis*, o principal vetor da leishmaniose visceral nas Américas, foi analisado por microscopia de luz, microscopia eletrônica e cromatografia em camada fina de alta performance. Assim, cortes através do abdômen de machos e fêmeas adultas mostraram que o corpo gorduroso é dividido em dois componentes principais, de acordo com a distribuição espacial no corpo do inseto: uma parte parietal que está localizada logo abaixo da cutícula, e outra visceral que está distribuída em lóbulos suspensos e frequentemente associado a traqueias na hemocele. O corpo gorduroso de *L. longipalpis* contém somente um tipo celular, o trofócito, o qual possui grande quantidade de gotículas de lipídios, grânulos de proteína e rosetas de glicogênio em seu citoplasma. A composição lipídica varia de acordo com a condição fisiológica e espécie do inseto. O lipídio neutro estocado mais encontrado no corpo gorduroso de insetos é o triacilglicerol. Além disso, pequenas quantidades de diacilglicerol, esteroides, ácidos graxos livres, carotenoides e monoacilgliceróis são transportadas por lipoforina (maior lipoproteína dos insetos). O diacilglicerol é derivado de triacilgliceróis estocados no corpo gorduroso e constitui a principal forma de ácido graxo que são mobilizadas para os sítios de utilização tal como os músculos de voo, por exemplo. A análise bioquímica dos tergitos abdominais de machos de *L. longipalpis*, através de Cromatografia em camada fina de alta performance, mostrou a presença de diferentes classes de lipídios neutros (mono-, di- e triacilgliceróis, ácidos graxos, colesterol e colesterol esterificado) e fosfolipídios (fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol, lisofosfatidilcolina) no corpo gorduroso. Além disso, a composição lipídica entre os tergitos abdominais variou, sendo a maior quantidade de lipídios extraídos do quarto tergito, o qual possui glândulas produtoras de feromônio. Finalmente, o principal lipídio neutro extraído do corpo gorduroso de *L. longipalpis* foi o triacilglicerol e o principal fosfolipídio foi a fosfatidiletanolamina.

Palavras-chave: corpo gorduroso; composição lipídica; *Lutzomyia longipalpis*; flebotomíneos; ultraestrutura.

ABSTRACT

BRETAS, Jorge Antônio Casagrande. **FAT BODY OF *Lutzomyia longipalpis* SANDFLIES (DIPTERA: PSYCHODIDAE: PHLEBOTOMINAE)**. 2016. 55 p. Tese (Doctor's Degree in Animal Biology). Institute of Biology, Rio de Janeiro Federal Rural University, Seropédica, RJ. 2016.

The fat body of insects is involved in very important functions. Thus, the fat body, besides acting as a reserve site and synthesis of proteins, carbohydrates and lipids participates in the production of substances with action on the immune system, detoxification, production of eggs, sperm and pheromone. However, the main function of the fat body is the reserve of lipids. The fat body of insects is usually divided into two regions, the visceral fat body, located near the digestive tract, and the parietal fat body, located near the cuticle. The cell types found in the fat body of insects vary, being found only one type in some and more than ten kinds in others. The main cell types found in the fat body of insects are trophocytes, urocytes and oenocytes. The morphology and biochemistry of fat body *Lutzomyia longipalpis*, the main vector of visceral leishmaniasis in the Americas, was examined by light microscopy, electron microscopy and high-performance thin layer chromatography. Thus, cuts through the abdomen of adult males and females showed that the fatty body is divided into two main components, in accordance with the spatial distribution in the insect's body: one parietal part which is located just under the cuticle and other visceral which is distributed suspended lobes and often associated with tracheas in hemocele. The fat body of *L. longipalpis* contains only one cell type, trophocyte, which has a large amount of lipid droplets, protein and glycogen granules in their cytoplasm rosettes. The lipid composition varies according to the physiological and insect species. The neutral lipid stored in fat body found more insects is the triacylglycerol. In addition, small amounts of diacylglycerol, steroids, free fatty acids, carotenoids and monoglycerides are carried by lipoforina (major lipoprotein of the insects). The diacylglycerol is derived from triglycerides stored in fat body and is the main form of fatty acid which are recruited to sites of utilization such as flight muscles, for example. Biochemical analysis of the abdominal tergites *L. longipalpis* males, by high-performance thin layer chromatography, showed the presence of different classes of neutral lipid (mono-, di- and triacylglycerols, fatty acids, cholesterol and esterified cholesterol) and phospholipids (phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine, phosphatidylinositol, lysophosphatidylcholine) in the fat body. Furthermore, the lipid composition of the abdominal tergites varied, with the highest amount of lipids extracted from the fourth tergite, which has pheromone producing gland. Finally, the main neutral lipid extracted from the fat body of *L. longipalpis* was the triacylglycerol and the main phospholipid was phosphatidylethanolamine.

Key Words: fat body; lipid composition; *Lutzomyia longipalpis*; sandflies; ultrastructure.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Distribuição dos Gêneros de Flebotomíneos.....	1
Figura 2 Aspecto geral de macho adulto de <i>Lutzomyia longipalpis</i>	2
Figura 3 <i>Lutzomyia longipalpis</i>	3
Figura 4 Glândulas produtoras de feromônios de macho de <i>L. longipalpis</i>	5
Figura 5 Ciclo de transmissão das Leishmanioses.....	6
Figura 6 Esquema simplificado das principais funções do corpo gorduroso.....	9
Figura 7 Desenho esquemático da organização dos dois tipos de corpos gordurosos.....	10
Figura 8 Principais tipos celulares do corpo gorduroso.....	13
Figura 9 Principais lipídios encontrados no corpo gorduroso dos insetos.....	14
Figura 10 Esquema simplificado do transporte de lipídios pela lipoforina nos insetos.....	16
Figura 11 Localização da gruta da Lapinha em Lagoa Santa.....	19
Figura 12 Fluxograma do processamento das amostras pra a microscopia eletrônica de varredura.....	21
Figura 13 Fluxograma do processamento das amostras para microscopia de luz e eletrônica de transmissão.....	22
Figura 14 Fluxograma do processamento das amostras para citotóxica de glicogênio.....	23
Figura 15 Tergitos abdominais de macho de <i>L. longipalpis</i>	24
Figura 16 Fluxograma do processamento das amostras para as análises lipídicas.....	25
Figura 17 Desenho esquemático com a localização dos dois tipos de corpos gordurosos de <i>L. longipalpis</i>	26
Figura 18 Microscopia de luz do corpo gorduroso de <i>L. longipalpis</i>	27
Figura 19 Microscopia de luz de tergitos abdominais de macho marcado com <i>oilred</i> e cristal violeta.....	28
Figura 20 Microscopia de luz do corpo gorduroso de <i>L. longipalpis</i>	29
Figura 21 Microscopia eletrônica de varredura de associação entre traqueia e corpo gorduroso.....	30
Figura 22 Microscopia eletrônica de varredura do corpo gorduroso de <i>L. longipalpis</i>	31
Figura 23 Microscopia eletrônica de varredura de trofócitos.....	32
Figura 24 Microscopia eletrônica de varredura das glândulas produtoras de feromônio.....	33
Figura 25 Microscopia eletrônica de transmissão do corpo gorduroso de <i>L. longipalpis</i>	34
Figura 26 Composição de lipídios neutros dos tergitos abdominais de machos de <i>L. longipalpis</i>	36
Figura 27 Porcentagem do total de lipídios neutros extraídos nos tergitos.....	37
Figura 28 Principais lipídios neutros encontrados no total de lipídios extraídos dos tergitos.....	37
Figura 29 Composição fosfolipídica dos tergitos abdominais de machos de <i>L. longipalpis</i>	38
Figura 30 Porcentagem dos principais fosfolipídios extraídos dos tergitos.....	39

SUMÁRIO

RESUMO	v
ABSTRACT	vi
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Flebotomíneos.....	1
1.2 <i>Lutzomyia longipalpis</i>	3
1.3 Leishmaniose.....	5
1.4 Corpo Gorduroso.....	7
1.4.1 Funções desempenhadas pelo corpo gorduroso	7
1.4.2 Divisão do corpo gorduroso	9
1.4.3 Tipos celulares encontrados no corpo gorduroso.....	11
1.4.3.1 Trofócitos	11
1.4.3.2 Urócitos	11
1.4.3.3 Oenócitos.....	12
1.4.4 Composição lipídica do corpo gorduroso dos insetos.....	13
1.4.5 Transporte de lipídios nos insetos	15
1.5 Justificativa	17
2. OBJETIVOS.....	18
2.1 OBJETIVO GERAL	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
3. MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1 Insetos	19
3.2 Microscopia Eletrônica de Varredura.....	20
3.3 Microscopia de luz e eletrônica de transmissão	21
3.4 Marcação Citoquímica de Glicogênio.....	22
3.5 Análise Lipídica	23
4. RESULTADOS	26
4.1 Microscopia de Luz.....	26
4.2 Microscopia eletrônica de varredura	29
4.3 Microscopia eletrônica de transmissão	33

4.4 Análise lipídica.....	35
5. DISCUSSÃO	40
6. CONCLUSÃO	44
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45

1. INTRODUÇÃO

1.1 Flebotomíneos

A subfamília Phlebotominae pertence à família Psychodidae, a qual é encontrada tanto em regiões tropicais como subtropicais. Assim, no Velho Mundo são encontrados os gêneros *Phlebotomus*, *Sergentomyia* e *Chinius*, já no Novo Mundo, são encontrados os gêneros *Brumptomyia*, *Warileyia* e *Lutzomyia* (Shimabukuro *et al.*, 2011) (figura 1).

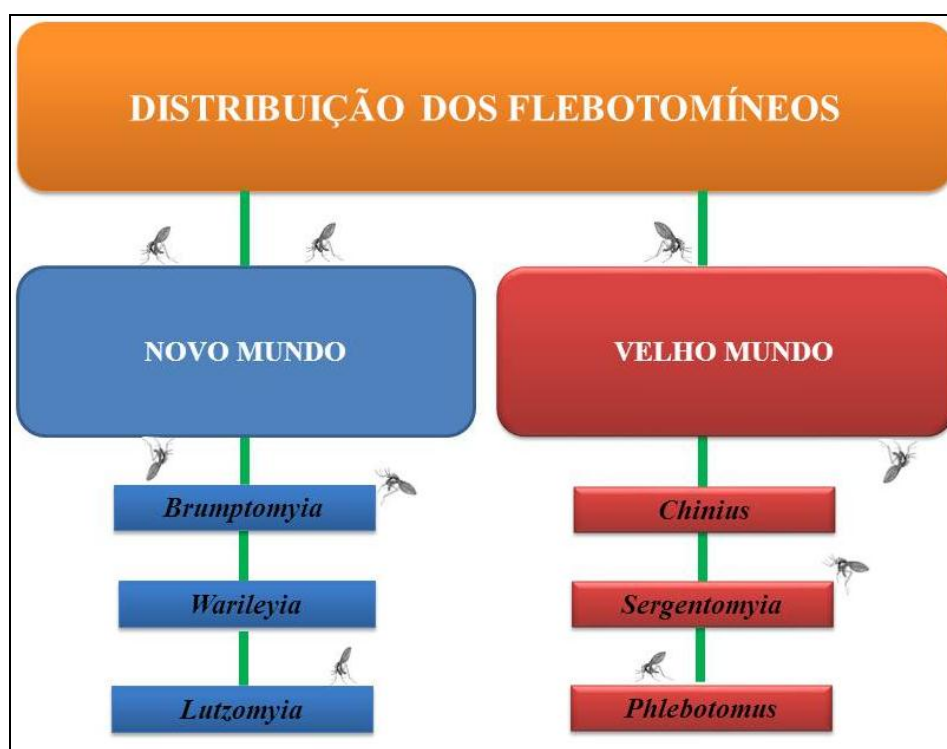


Figura 1: Distribuição dos Gêneros de Flebotomíneos

Os Flebotomíneos são considerados de grande importância à saúde pública em pelo menos 80 países (Desjeux, 1996), pois além de atuarem como vetores das leishmanioses, cutânea e visceral, também podem transmitir outras doenças para o homem e outros animais como arboviroses e bartonelose (Alexander *et al.*, 1995, Tehs, 1988). Neste contexto, o gênero

Phlebotomus se destaca na transmissão das leishmanioses no Velho Mundo e no Novo Mundo este papel é desempenhado pelo gênero *Lutzomyia* (Killick-Kendrick, 1990).

Os flebotomíneos são extremamente pequenos e medem de 1,5 a 2 milímetros de comprimento, sendo conhecidos vulgarmente como “mosquito-palha”, “cangalhinha” ou “asa dura”. Apresentam o corpo revestido por cerdas e escamas (Dostálová e Volf, 2012) e quando em repouso suas asas permanecem em posição eretas e afastadas do corpo (Figura 2).



Figura 2: Aspecto geral de macho adulto de *Lutzomyia longipalpis* (Bretas, 2016).

Os flebotomíneos apresentam metamorfose completa, portanto são insetos holometábolos (ovo, larva, pupa e adulto), com formas larvais completamente diferentes das formas adultas (Forattini, 1973). O ciclo de vida dos membros desta subfamília compreende os estágios de ovo, larva (quatro ínstars), pupa e adulto. O ciclo de vida destes insetos em geral dura de 30 a 90 dias, dependendo da espécie e das condições ambientais (Morales *et al*, 2005; Alexander, 2000). A postura ocorre diretamente no solo, em locais úmidos, sombreados e com bastante matéria orgânica em decomposição. Em condições ambientais favoráveis, a eclosão dos ovos ocorre entre 7 e 17 dias após a postura (Monteiro, 2012). As larvas apresentam aspecto vermiforme, alongado e achatado no sentido dorso-ventral.

As larvas desenvolvem-se em ambientes úmidos e antes de se transformarem em pupas, param de se alimentar e procuram locais menos úmidos, onde se fixam a um substrato. A emergência dos adultos ocorre em média em 15 dias, contudo, os machos geralmente emergem antes das fêmeas (Ferro *et al.*, 1998).

A maioria dos flebotomíneos apresenta hábitos noturnos, no entanto, algumas espécies podem ser ativas durante o dia quando geralmente buscam por parceiros sexuais e alimento. Assim, os insetos adultos alimentam-se de substâncias açucaradas como seivas vegetais e de frutas. Além disso, a hematofagia é uma característica exclusiva das fêmeas em período reprodutivo com objetivo de maturação dos ovos (Alexander, 2000). Estas fêmeas podem se alimentar do sangue de diferentes ordens de vertebrados, inclusive répteis (Dantas-Torres e Brandao-Filho, 2006; Alves, 2008).

1.2 *Lutzomyia longipalpis*

L. longipalpis (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) (figura 3) é o principal vetor da *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* no Novo Mundo, agente causador da Leishmaniose Visceral Americana (LVA) (Young & Duncan, 1994). Este protozoário pode ser encontrado infectando o homem (*Homo sapiens*) e o cão (*Canis familiaris*), embora também tenha sido isolado de animais silvestres como raposas (*Cerdocyon thous* e *Lycalopex vetulus*) e gambás (*Didelphis albiventris* e *Didelphis marsupialis*) (Deane & Deane 1962; Lainson *et al.*, 1990). Apesar de sua importância médica, pouco é conhecido sobre a morfologia e bioquímica de seu corpo gorduroso.

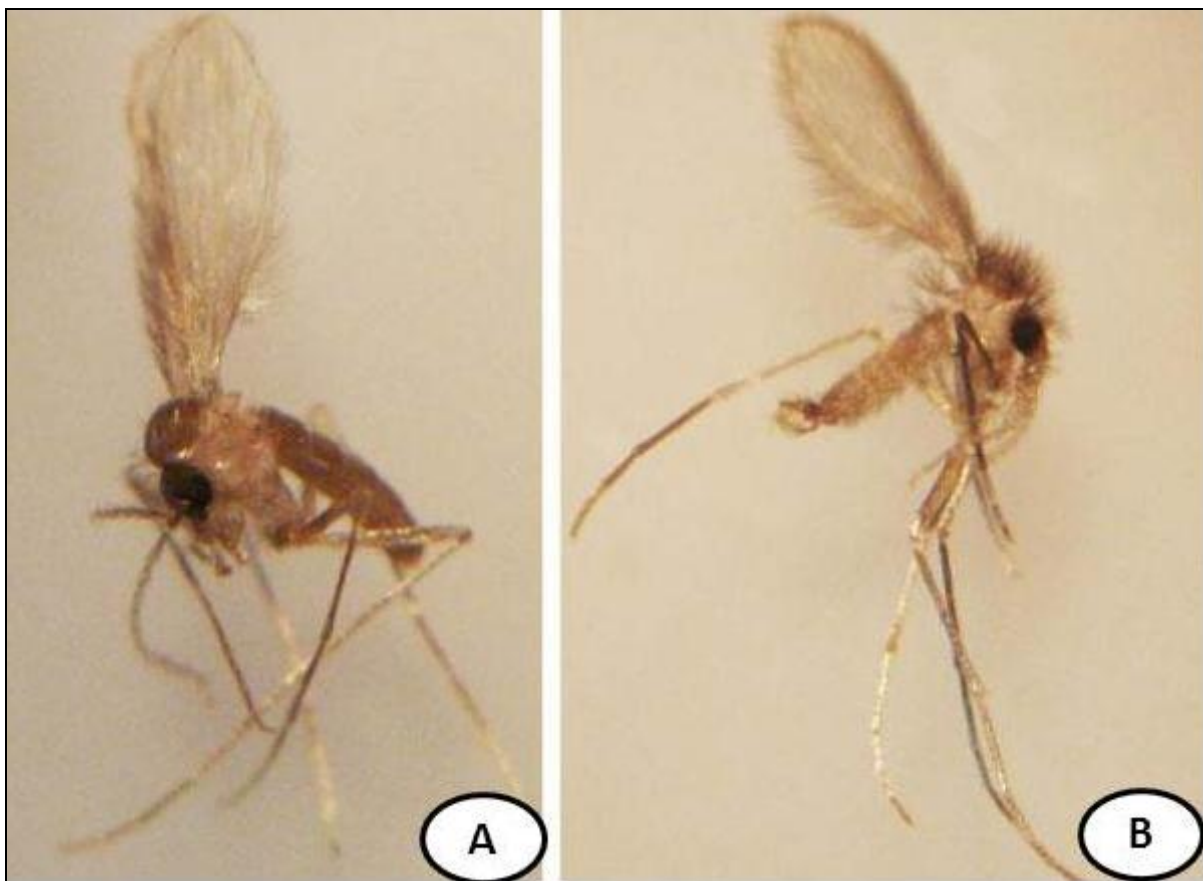


Figura 3: *Lutzomyia longipalpis*. Fêmea (A) e macho (B). Fonte: <http://www.parasitesandvectors.com>

O macho de *L. longipalpis*, além da genitália externa, semelhante a uma mão, a qual é utilizada para segurar a fêmea durante a cópula, possui glândulas de feromônio de agregação e sexual no quarto tergito abdominal (Spiegel *et al*, 2011) (figura 4).

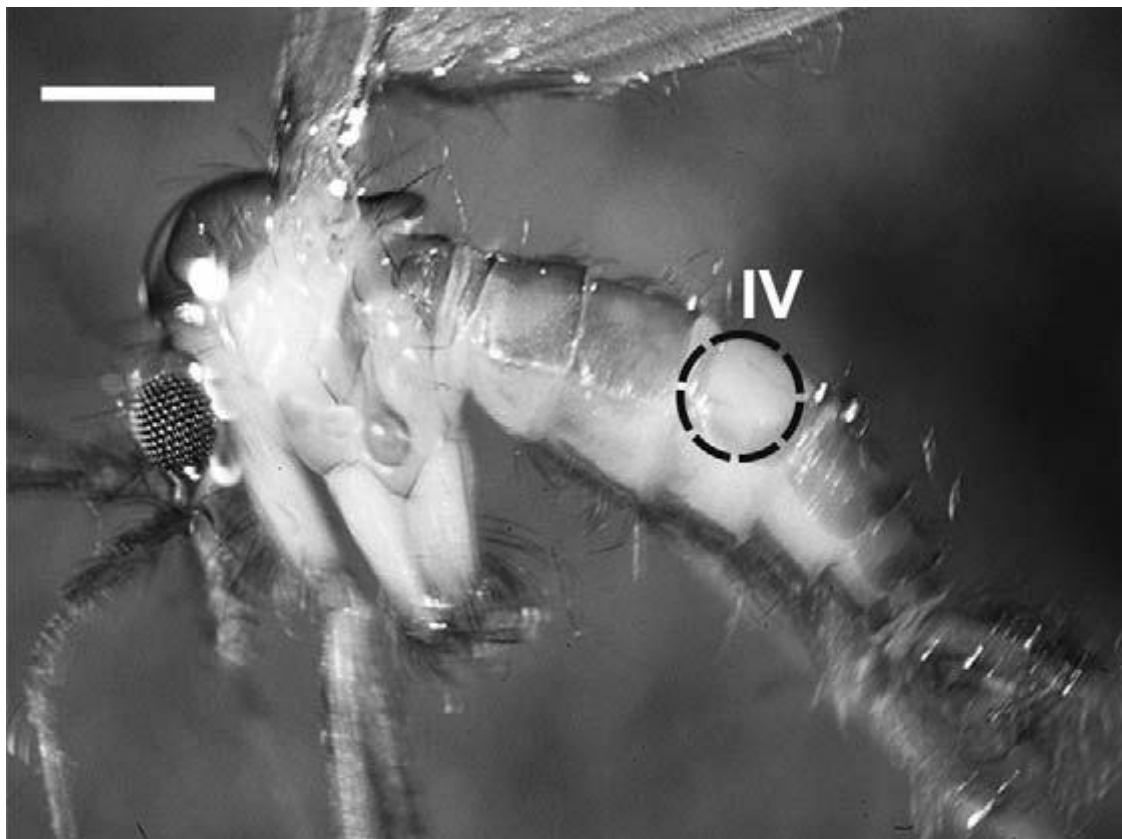


Figura 4: Glândulas produtoras de feromônios de macho de *L. longipalpis*. Estereomicroscopia (Spiegel *et al.*, 2011). Barra 200 μm .

1.3 Leishmaniose

A leishmaniose é uma doença parasitária causada por um protozoário do gênero *Leishmania*. Essa doença é manifestada sob duas formas: a leishmaniose visceral (calazar) e a leishmaniose tegumentar (Diniz *et al.*, 2010). A forma visceral tem como principais alvos os órgãos internos como fígado, medula óssea e baço. Já a forma cutânea é conhecida por causar feridas na pele (Young & Ducan, 1994).

As leishmanioses como protozooses humanas são consideradas graves problemas de saúde pública mundial, pois acometem indistintamente homens, mulheres e crianças, determinando diferentes manifestações clínicas. Sua distribuição envolve as regiões tropical e subtropical da América, África, Ásia, Europa e Oceania. Segundo a Organização Mundial de Saúde, sendo consideradas como umas das seis mais importantes doenças infecciosas, pelo

seu alto coeficiente de detecção, registro de óbitos e capacidade de produzir deformidades, sendo constatada a ocorrência destes agravos em 88 países, dos quais 16 são desenvolvidos. Os dados epidemiológicos mostram que cerca de 399 milhões de pessoas vivem em áreas de risco de leishmaniose cutânea e cerca de 556 milhões estão expostos à leishmaniose visceral (WHO, 2016). A leishmaniose é considerada a segunda protozoose em importância pública, com prevalência de cerca de 1,3 milhões de casos anualmente e mortalidade de aproximadamente 30 mil pessoas (WHO, 2016). No Brasil, o Ministério da Saúde estima que quase 3 mil pessoas são contaminadas pela doença anualmente.

Os reservatórios de leishmânias são, principalmente, mamíferos silvestres pertencentes a diversas ordens tais como: Carnívora, Rodentia, Marsupialia, Edentata, Primata e Artiodactyla, que representam um dos elos da cadeia primária de transmissão, servindo como fonte de infecção para flebotomíneos, e assim mantendo o ciclo silvestre (Lainson & Shaw, 1990) (figura 5).

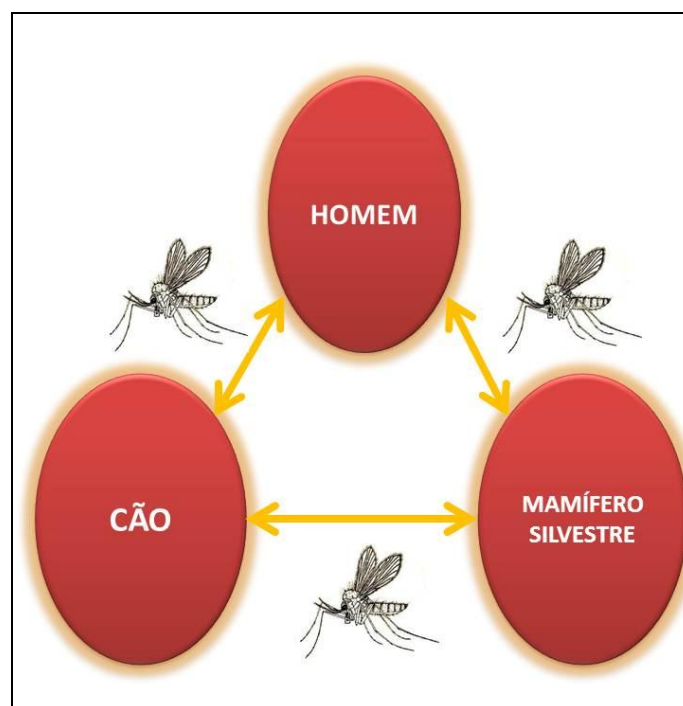


Figura 5: Ciclo de transmissão das Leishmanioses (Bretas, 2016).

A leishmaniose, antes uma doença restrita às áreas de floresta e rurais, vem avançando sobre as áreas urbanas em virtude, principalmente, da urbanização das áreas de floresta onde há os reservatórios, mamíferos, como gambas e tatus, e o vetor, inseto do gênero *Lutzomyia*, um flebotomíneo. Os flebotomíneos representam um grupo com cerca de 900 espécies conhecidas no mundo, das quais cerca de 500 foram descritas da América (Young & Duncan, 1994).

1.4 Corpo Gorduroso

O corpo gorduroso é o maior órgão do metabolismo intermediário (biotransformação do alimento ingerido em estruturas celulares) dos insetos (Slocinska, 2015; Chapman, 1998), além de atuar como centro do metabolismo em geral, mantendo o equilíbrio entre as reservas e requerimento durante as diversas fases da vida do inseto.

1.4.1 Funções desempenhadas pelo corpo gorduroso

O corpo gorduroso atua na biossíntese e acúmulo de reservas, não apenas lipídicas, mas também de carboidratos, proteínas e outros metabólicos (Chapman, 1998). Essas substâncias sintetizadas e estocadas por este órgão participam, por exemplo, de processos como: detoxificação, apoptose, composição de feromônios, composição da lipoforina, estoque de excretas, composição dos espermatozoides, composição de óvulos, resposta imune e composição de parasitos (Raikhel e Lea, 1983; Hoffmann, 2003; McGettigan *et al.*, 2005; Ziegler e Antwerpen, 2006).

O corpo gorduroso também atua em processos de detoxificação (Hu *et al.*, 2016), participando assim, de processos de resistência a inseticidas e outras substâncias letais aos insetos.

Além disso, os processos de apoptose também podem envolver a participação do corpo gorduroso e assim influenciar na resistência à infecção pelo vírus dengue em *Aedes aegypti*.

Deste modo, insetos refratários, resistente à infecção, apresentam mais células induzidas à apoptose (Eng *et al.*, 2016).

Muitos feromônios têm como precursores lipídios oriundos do corpo gorduroso dos insetos (Jurenka *et al.*, 2003; Spiegel *et al.*, 2011). Em *L. longipalpis*, por exemplo, é observada a presença, nas células produtoras de feromônios (agregação e sexual), de várias inclusões lipídicas (Spiegel *et al.*, 2011).

Também é conhecida a participação do corpo gorduroso na síntese da lipoforina, maior lipoproteína transportadora de lipídios nos insetos (Majerowicz *et al.*, 2013; Van Heusden e Law, 1989; Weers *et al.*, 1992; Van Hoof *et al.*, 2003). Assim, além atuar diretamente no estoque de lipídios, este órgão também é responsável pela produção das lipoproteínas transportadoras de lipídios no inseto.

O corpo gorduroso também pode agir como sítio de estoque de excretas. Assim, substâncias oriundas do metabolismo de proteínas, em especial das células do próprio corpo gorduroso, como o ácido úrico, são armazenadas no corpo gorduroso sob a forma de cristais de ácido úrico (Tojo *et al.*, 1978).

Os lipídios são componentes de destaque na composição do sêmen ao contribuírem para com a constituição das membranas dos espermatozoides e com seu metabolismo em geral (DUMSER, 1980). Além disso, o corpo gorduroso se mostra desenvolvido próximo dos testículos de muitos insetos, tal como em *L. longipalpis* (Spiegel *et al.*, 2013) confirmando sua participação na composição dos espermatozoides (Kasinathan *et al.*, 1979).

O corpo gorduroso é responsável pela síntese da principal proteína que constitui o vitelo dos insetos, a vitelogenina (Kunkel e Nordin, 1985).

Os insetos possuem sistema imune inato o qual compreende resposta humoral e celular. Assim, o sistema imune dos insetos tem como base o corpo gorduroso, que produz

moléculas efetoras na hemolinfa e várias classes de células, que são encontradas tanto na hemolinfa como no epitélio (Yakovlev *et al*, 2016).

O corpo gorduroso também pode atuar fornecendo lipídios, transportados por lipoproteínas, e assim, ambos serem utilizados na constituição de novos parasitos como fontes de proteínas e lipídios (Ximenes *et al*, 2015).

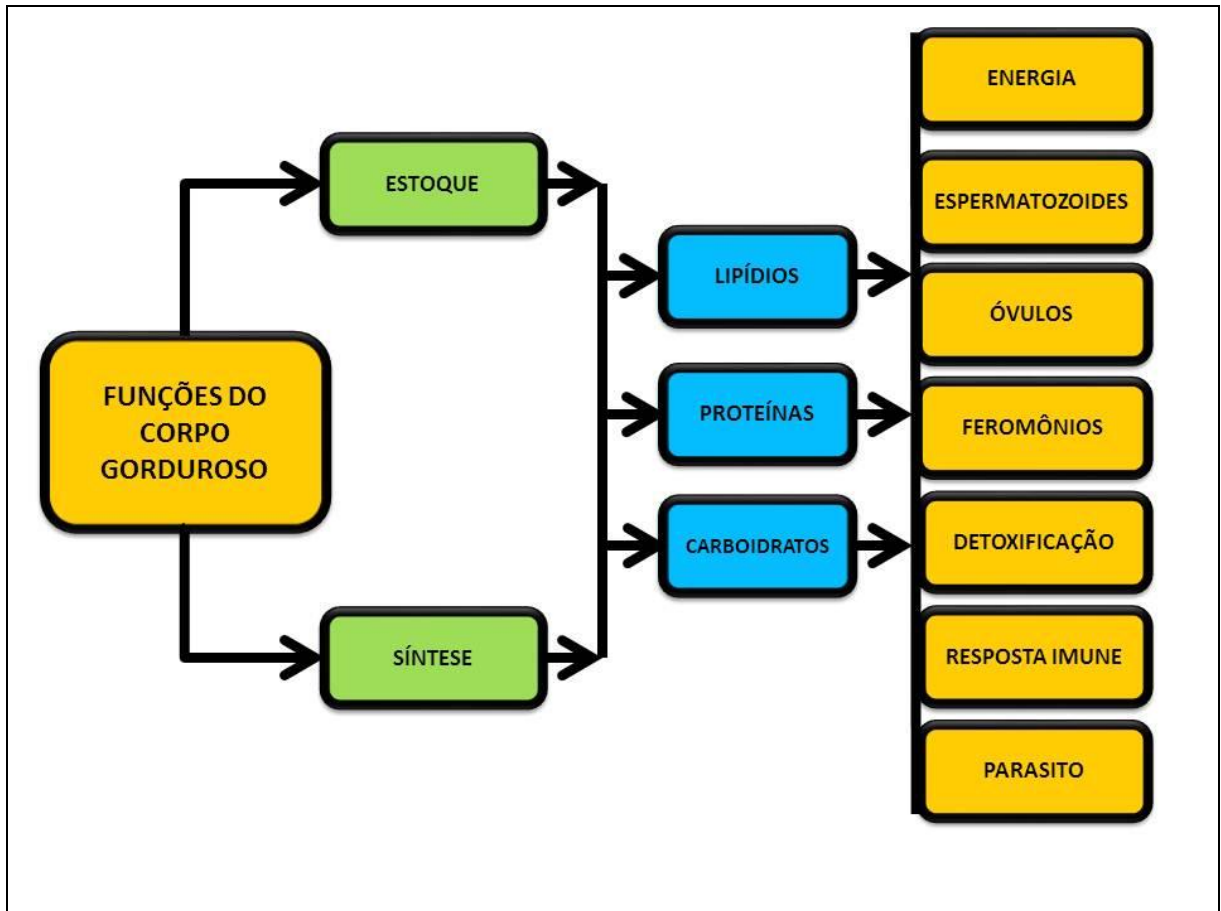


Figura 6 Esquema simplificado das principais funções do corpo gorduroso (Bretas, 2016).

1.4.2 Divisão do corpo gorduroso

A morfologia do corpo gorduroso varia entre os diferentes grupos de insetos, contudo, este frequentemente se mostra organizado em lóbulos ao redor do canal alimentar, constituindo assim o corpo gorduroso visceral e abaixo da cutícula, constituindo o corpo gorduroso parietal (Roma *et al.*, 2006) (figura 7).

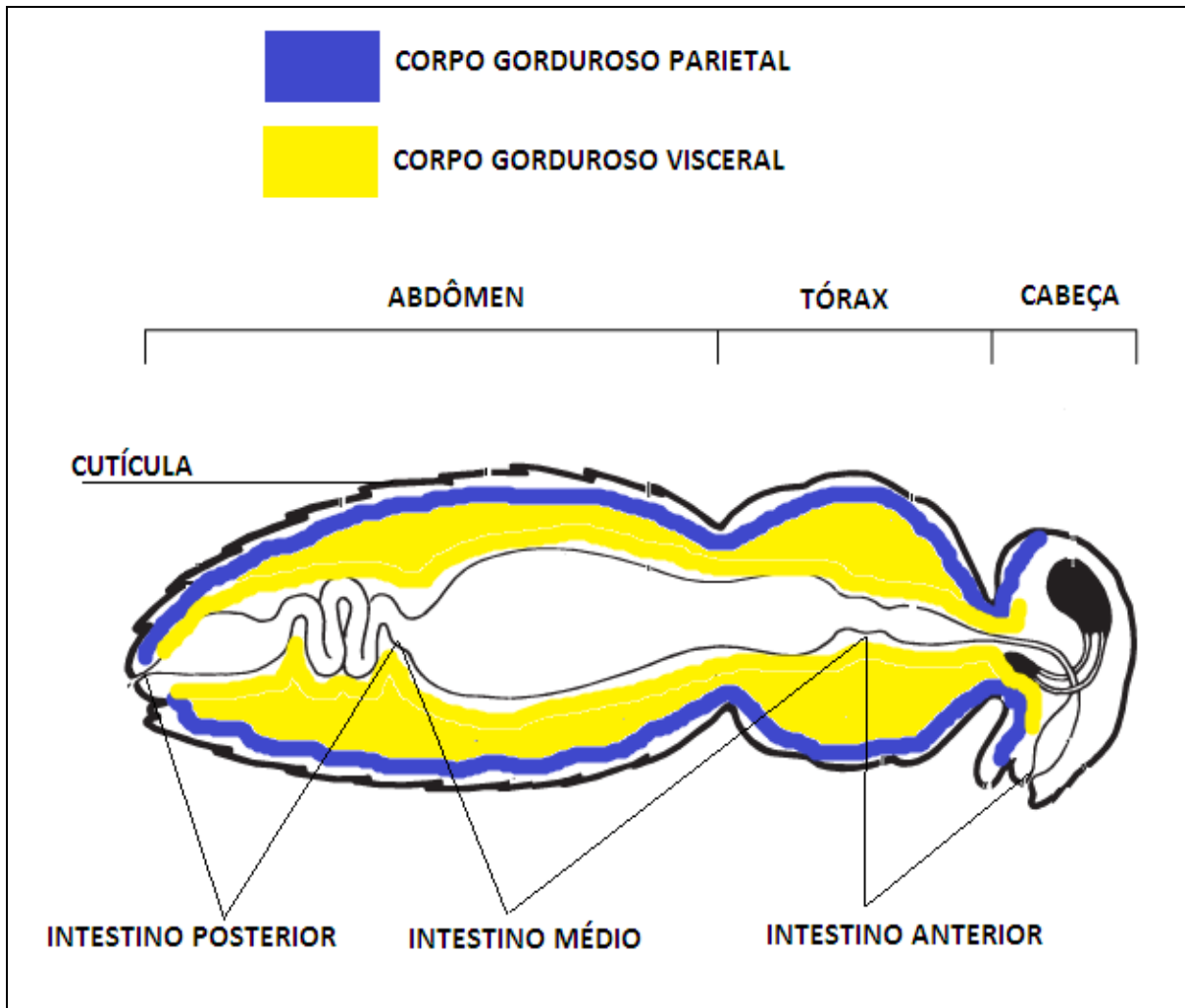


Figura7: Desenho esquemático da organização dos dois tipos de corpos gordurosos (Bretas, 2016).

Em alguns insetos, cada tipo de corpo gorduroso pode se especializar no estoque e síntese de lipídios, proteínas ou carboidratos. Desta maneira, é comum encontrar maior quantidade de determinado elemento de reserva em um tipo de corpo gorduroso (Dean *et al.*, 1985).

1.4.3 Tipos celulares encontrados no corpo gorduroso

Na maioria dos insetos, o corpo gorduroso contém poucos tipos celulares, embora em alguns casos possa ser encontrado mais de dez tipos celulares (Jensen e Borgesen, 2000). No entanto, os tipos celulares mais encontrados no corpo gorduroso dos insetos são:

- Trofócitos
- Urócitos
- Oenócitos

1.4.3.1 Trofócitos

Sem dúvida, o principal tipo celular encontrado no corpo gorduroso é o trofócito, também conhecido como adipócito por apresentarem várias inclusões lipídicas em seu citoplasma. Além de inclusões lipídicas, no citoplasma dos trofócitos, também são encontrados em grande quantidade grânulos de proteínas e rosetas de glicogênio (figura 8A). Aos trofócitos são atribuídas funções como síntese e estoque de proteínas, lipídios e glicogênio (Locke, 2003).

Os trofócitos de alguns insetos, tal como, Díptera, possuem diferenças ultraestruturais e funcionais quando comparado regiões do corpo gorduroso parietal com o visceral. Neste contexto, os trofócitos do corpo gorduroso parietal estariam, sobretudo, relacionados com a síntese e o armazenamento de lipídios, enquanto os do visceral estariam mais voltados para o armazenamento de proteínas (Dean *et al.*, 1985).

1.4.3.2 Urócitos

Outro tipo celular do corpo gorduroso é o urócito o qual exerce a função de estoque de excretas ao armazenar em seu citoplasma cristais de ácido úrico (Costa-Leonardo *et al.*, 2013).

O urócito exerce tem origem da diferenciação do trofócito (Chapman, 1998; Roma *et al.*, 2010). Este tipo celular já foi descrito em insetos como barata, gafanhoto e abelhas. No entanto, em alguns insetos, os urócitos estão presentes somente nos estágios larvares, e sua função fisiológica é substituída pelos túbulos de Malpighi (Furtado *et al.*, 2013; Snodgrass, 1935).

O urócito apresenta inúmeros cristais de ácido úrico em seu citoplasma (figura 8B). O ácido úrico estocado pelos urócitos é oriundo principalmente do metabolismo proteico dos trofócitos e da degradação de ácidos nucleicos resultantes de processos de autofagia (Tojo *et al.*, 1978; Roma *et al.*, 2010).

O excesso de ácido úrico dos urócitos ou da hemolinfa também pode ser excretado por meio dos túbulos de malpighi (Snodgrass, 1935; Costa-Leonardo *et al.*, 2013).

1.4.3.3 Oenócitos

Frequentemente associado ao corpo gorduroso, é encontrado o oenócito, o qual tem origem ectodérmica enquanto as células do corpo gorduroso têm origem mesodérmica (Gillott, 1995).

O oenócito geralmente se apresenta com forma esférica. Além disso, seu citoplasma quando comparado com o do trofócito não apresenta: inclusões lipídicas, grânulos de proteína nem rosetas de glicogênio. Além disso, o citoplasma do oenócito é acidófilo (Furtado *et al.*, 2013; Richardi *et al.* 2015) (figura 8C).

Os oenócitos apresentam importantes funções, tais como contribuir para a formação da cutícula (Fan *et al.*, 2003; Locke, 2003), detoxificação, processamento de lipídios (Martins e Ramalho-Ortigão, 2012) e, em alguns casos, contribuir para a produção de feromônio e suplementação de precursores transportadores lipoproteicos (Jurenka *et al.*, 2003).

Os trofócitos atuam na produção de lipoproteínas (Weers *et al.*, 1992) e sua associação com os oenócitos, no corpo gorduroso, tem sido descrita como crucial para a produção de vitelogenina pelas fêmeas (Jensen e Borgesen, 2000), além de atuar na formação da cutícula (Fan *et al.*, 2003) e produção de feromônio (Jurenka *et al.*, 2003).

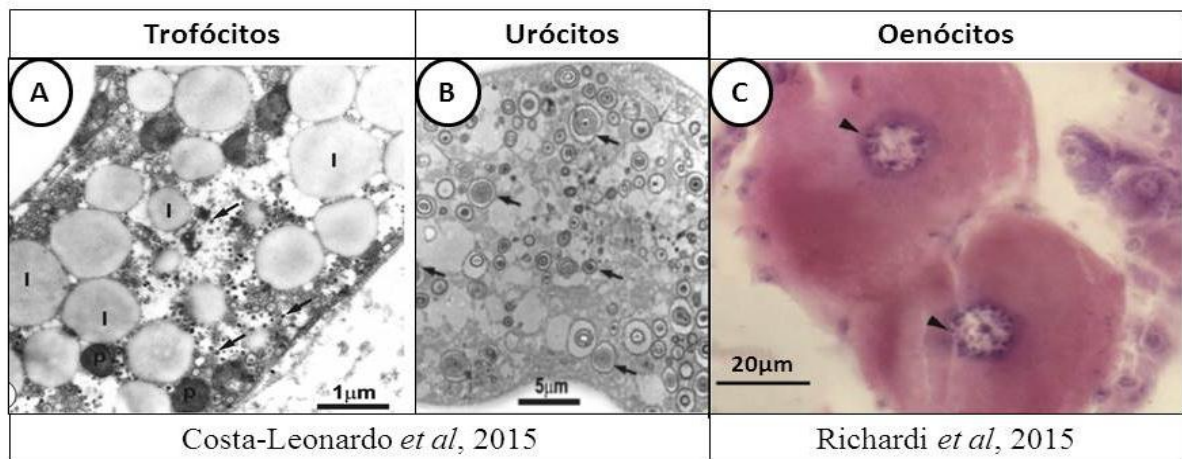


Figura 8: Principais tipos celulares do corpo gorduroso. A) Citoplasma de trofócito de cupim com várias vesículas de lipídios (I), grânulos de proteína (p) e rosetas de glicogênio (seta) (Costa-Leonardo *et al.*, 2013). B) Citoplasma de urócito de cupim com cristais esféricos de ácido úrico (seta) (Costa-Leonardo *et al.*, 2013). C) Oenócitos de *Chironomus sancticaroli*, Diptera, Chironomidae com Citoplasma perinuclear basófilo (cabeça de seta).

1.4.4 Composição lipídica do corpo gorduroso dos insetos

Nos insetos, a maior parte dos lipídios encontrados são os lipídios neutros e os fosfolipídios (figura 9). Os lipídios neutros são utilizados principalmente como reserva enquanto que os fosfolipídios são utilizados na constituição das membranas celulares.

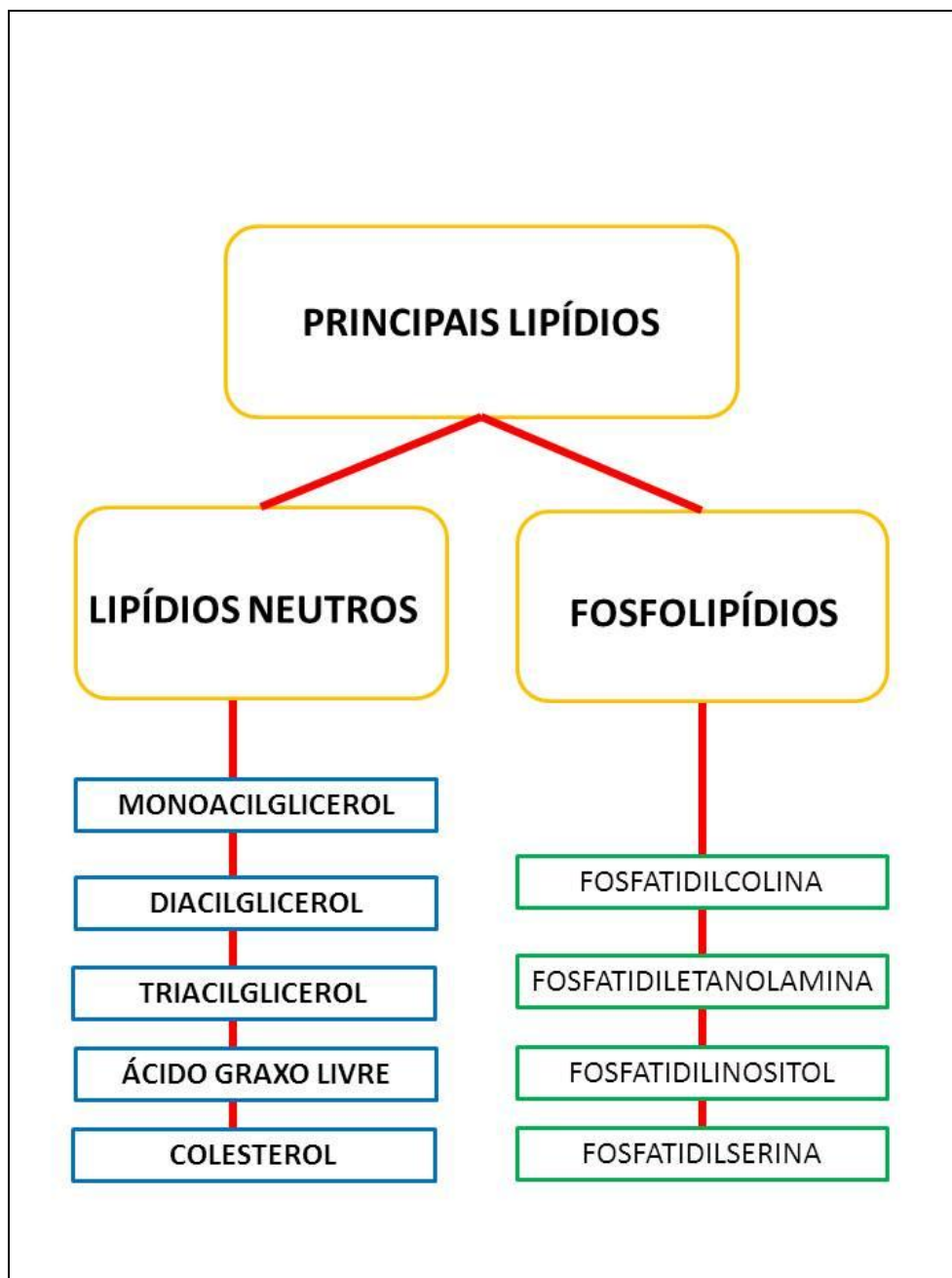


Figura 9: Principais lipídios encontrados no corpo gorduroso dos insetos (Bretas, 2016).

Em alguns insetos, mais de 90% do estoque de lipídios do corpo gorduroso é triacilglicerol, o qual é resultado principalmente da transferência da dieta de gorduras do intestino médio para o corpo gorduroso durante o período de alimentação (Canavoso *et al*, 2001). Contudo, esta quantidade de triacilglicerol é influenciada principalmente pela condição alimentar do inseto.

Os fosfolipídios podem se apresentar em diferentes quantidades dependendo da espécie do animal. Assim, em vertebrados o principal fosfolipídio encontrado é a fosfatidilcolina seguido da fosfatidiletanolamina. Já em dípteros, ocorre o contrário, a fosfatidiletanolamina aparece em maior quantidade seguida da fosfatidilcolina (Fast, 1966).

1.4.5 Transporte de lipídios nos insetos

Após a alimentação, lipídios complexos como os triacilgliceróis são hidrolisados no lúmen do intestino médio e o produto dessa digestão, principalmente ácidos graxos, diacilglicerol e fosfolipídios, são absorvidos pelo epitélio do intestino médio. Posteriormente, esses lipídios, em especial os diacilgliceróis e os fosfolipídios, são transportados pela lipoforina (lipoproteína), até o corpo gorduroso (local de síntese e estoque) ou a sítios de utilização como músculos de voo ou testículos (Figura 10).

Esses ácidos graxos transportados pela lipoforina podem ser utilizados para a síntese de lipídios mais complexos, tal como triacilglicerol, diacilglicerol e fosfolipídios no corpo gorduroso (Tsuchida e Wells, 1988; Turunen, 1993; Canavoso e Wells, 2000; Canavoso *et al.*, 2004).

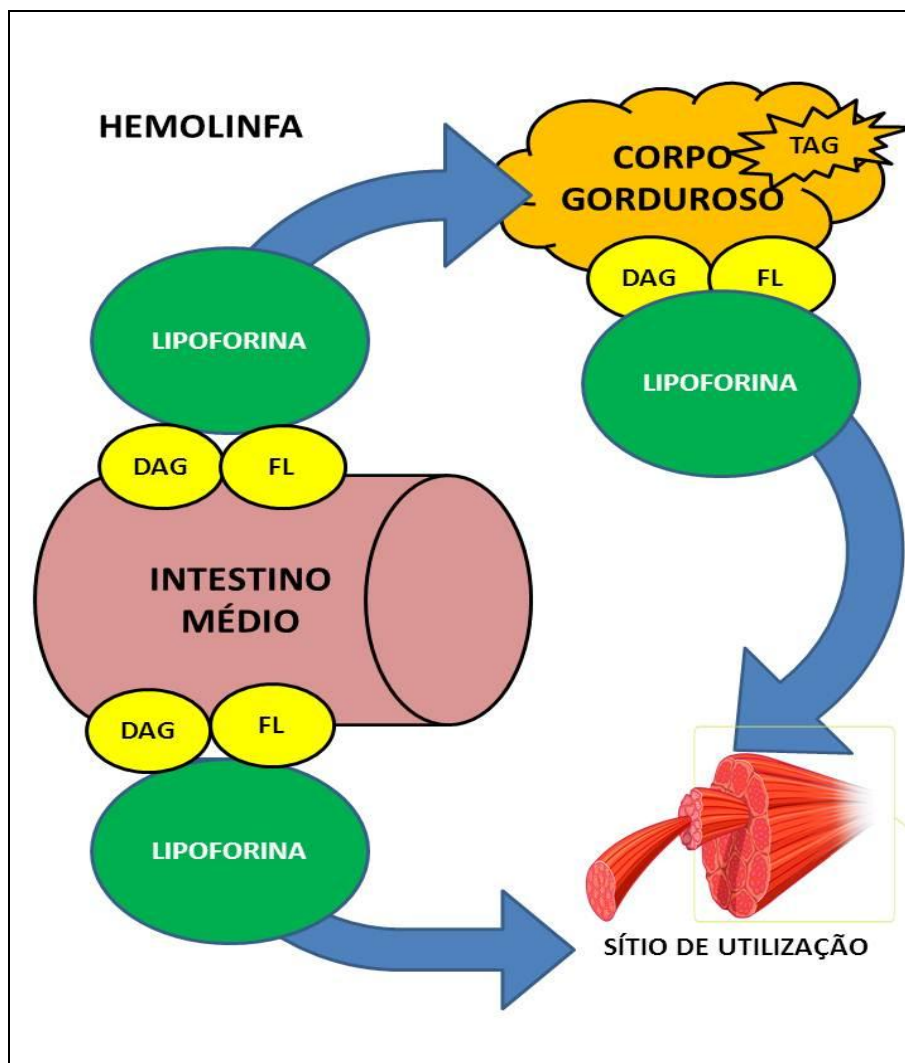


Figura 10: Esquema simplificado do transporte de lipídios pela lipoforina nos insetos. DAG (diacilglicerol), TAG (triacilglicerol) e FL (fosfolipídio) (Bretas, 2016).

Além disso, o estoque de lipídios pode ser resultado da síntese de novos lipídios no próprio corpo gorduroso (Canavoso *et al.*, 2001).

1.5 Justificativa

As várias funções desempenhadas pelo corpo gorduroso o qualificam como um excelente alvo para o controle do vetor, *L. longipalpis*. Assim, a participação do corpo gorduroso na produção de feromônios, por exemplo, pode ser explorada para o desenvolvimento de armadilhas tal como já ocorre no controle de pragas agrícolas.

O envolvimento do corpo gorduroso na produção de peptídeos de ação no sistema imune (Hoffmann, 2003), ativando vias de sinalização celular como a Toll e a Imd (imunodeficiência), podem se mostrar bastante efetivas no controle deste inseto (Zhang *et al*, 2016).

A ação direta do corpo gorduroso na produção de vitelogenina, principal proteína que constitui o vitelo dos insetos, também poderia ser utilizada para redução do sucesso reprodutivo das fêmeas.

A participação do corpo gorduroso na detoxificação de substâncias, tal como inseticidas (Daborn *et al*, 2007) também pode ser alvo de controle populacional de *L. longipalpis*.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- ✓ Fornecer dados morfológicos e citoquímicos sobre a morfologia e composição do corpo gorduroso do flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Descrever a organização do corpo gorduroso através de microscopia de luz e eletrônica.
- ✓ Descrever os principais tipos celulares encontrados no corpo gorduroso através de microscopia de luz e eletrônica.
- ✓ Analisar a composição lipídica, proteica e de glicogênio do corpo gorduroso por microscopia e citoquímica.
- ✓ Analisar a composição lipídica dos tergitos abdominais através de HPTLC.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Insetos

Os flebotomíneos, *L. longipalpis*, foram obtidos da colônia mantida em laboratório e estabelecidos a partir de coletas realizadas em cavernas da gruta da Lapinha (Estado Minas Gerais, Brasil, 19°37'S - 43°53'W) (figura 11). Os insetos, adultos de diferentes idades, foram mantidos a 25°C e 80% ± 10% de umidade relativa, tal como a metodologia descrita previamente por Modi e Tesh, 1983. Foram utilizados nos experimentos machos e fêmeas alimentadas, contudo, sem controlar os tempos decorridos após a alimentação.

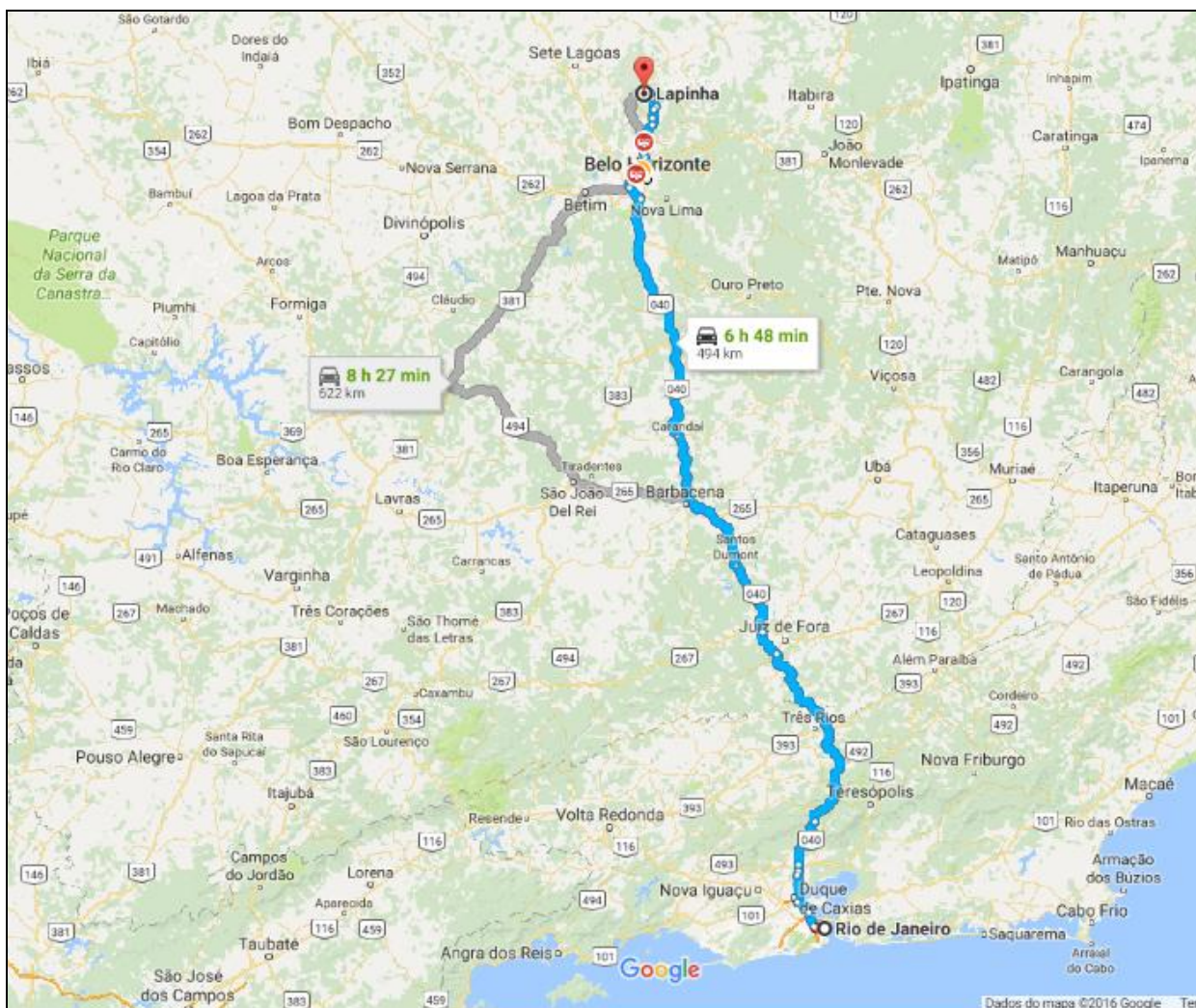


Figura 11: Localização da gruta da Lapinha em Lagoa Santa, Estado de Minas Gerais, Brasil (figura retirada do Google Maps)

Quantidade de Insetos Utilizados	
Microscopia de luz	50
Microscopia Eletrônica de transmissão	10
Microscopia Eletrônica de transmissão (método de Thiéry)	2
Microscopia Eletrônica de varredura	30
Análises lipídicas	200
Total	292

Tabela 1: Quantidade de insetos utilizados por técnica.

3.2 Microscopia Eletrônica de Varredura

Os insetos foram sedados por 2 minutos em CO₂, o abdômen foi dissecado e fixado por imersão por, no mínimo, duas horas em glutaraldeído 2.5% diluído em tampão cacodilato 0.1 M, pH 7.2. Após a fixação, os abdomens foram lavados em tampão cacodilato 0.1 M, pós-fixados por 1 hora em tetróxido de ósmio 1% diluído em tampão cacodilato 0.1 M, lavado por 10 minutos no mesmo tampão, desidratado em séries crescentes de acetona (70%, 80%, 90% e 100%), submetidos ao método de secagem pelo ponto crítico utilizando CO₂ superseco, e montados em suportes metálicos para microscopia eletrônica de varredura com ajuda de fita adesiva dupla face. Em seguida, foram cobertos com uma fina camada de ouro. Os espécimes foram observados no microscópio eletrônico de varredura. As imagens digitais foram adquiridas e armazenadas em computador.

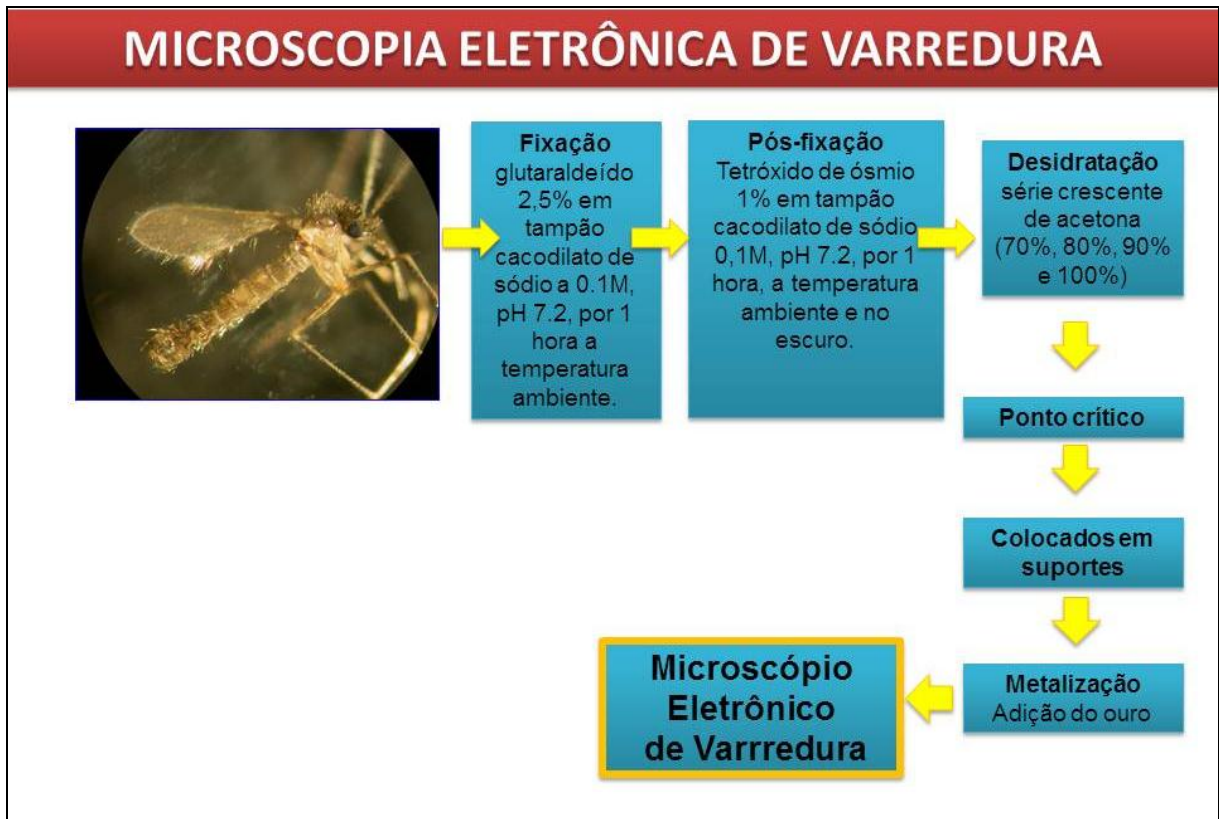


Figura 12: Fluxograma do processamento das amostras pra a microscopia eletrônica de varredura (Bretas, 2016).

3.3 Microscopia de luz e eletrônica de transmissão

Os insetos foram sedados por 2 minutos em CO₂, e em partes ou inteiros foram fixados por imersão por 2 horas, em glutaraldeído 2.5% diluído em tampão cacodilato 0.1 (pH 7.2). Posteriormente foram lavados duas vezes no mesmo tampão e pós-fixados por 1 hora em Tetróxido de ósmio 1% / Ferricianeto de potássio 0.8% / CaCl₂ 5 mM, diluídos em tampão Cacodilato 0.1 M. Os mesmos foram, então, lavados em tampão, desidratados em séries crescentes de acetona (50%, 70%, 90% e 100%) e embebidos por 48 horas a 60°C em resina PolyBed 812 (PolySciences, Warrington, PA, USA).

Para a microscopia de luz, cortes semifinos foram coletados em lâminas de vidro e então marcados com fucsina por 30 segundos e/ou cristal violeta por 2 minutos. Os cortes também foram corados com azul de bromofenol por 2 minutos o qual é utilizado para marcar

proteínas. Para marcar lipídios foi utilizado o *oilred* por 25 minutos. As lâminas foram observadas em um microscópio de luz.

Para a microscopia eletrônica de transmissão, cortes ultrafinos foram coletados em grades de cobre e marcados com acetato de uranila 5% e citrato de chumbo 1% para posterior observação no microscópio eletrônico de transmissão.

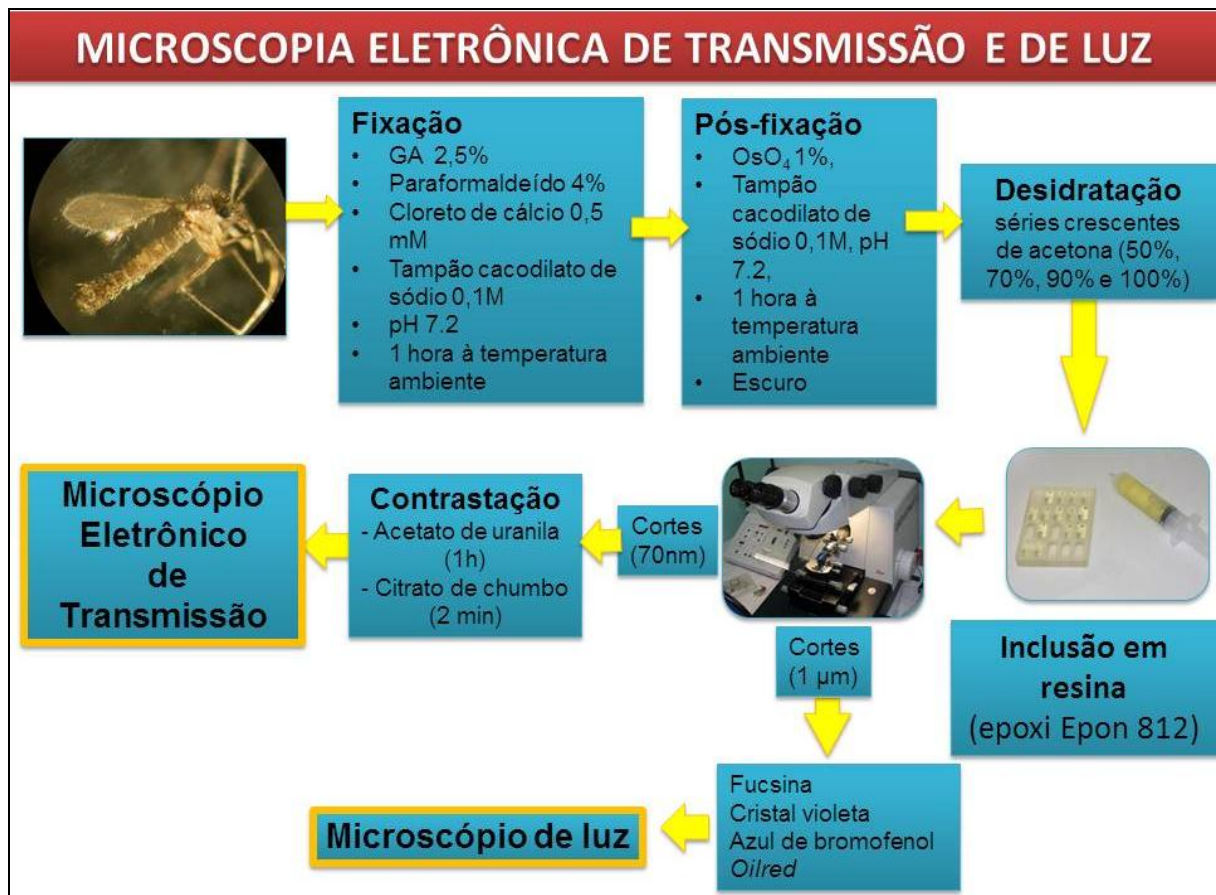


Figura 13: Fluxograma do processamento das amostras para microscopia de luz e eletrônica de transmissão (Bretas, 2016).

3.4 Marcação Citoquímica de Glicogênio

Para a marcação de glicogênio foi utilizado o método de Thiéry (Winston and Personne, 1970). Cortes ultrafinos foram coletados em grades de ouro, incubados por 30 minutos em ácido periódico 1%, lavados com água destilada e então incubados em tiosemicarbazida 2%. Posteriormente, as grades foram incubadas por 1 hora em ácido acético

20%, lavados com concentrações decrescentes de ácido acético (20%, 10%, 5%, 3% e 1%) e incubados por 20 minutos no escuro com proteinato de prata 1%. As grades foram, então, lavadas em água destilada e observadas no microscópio eletrônico de transmissão.

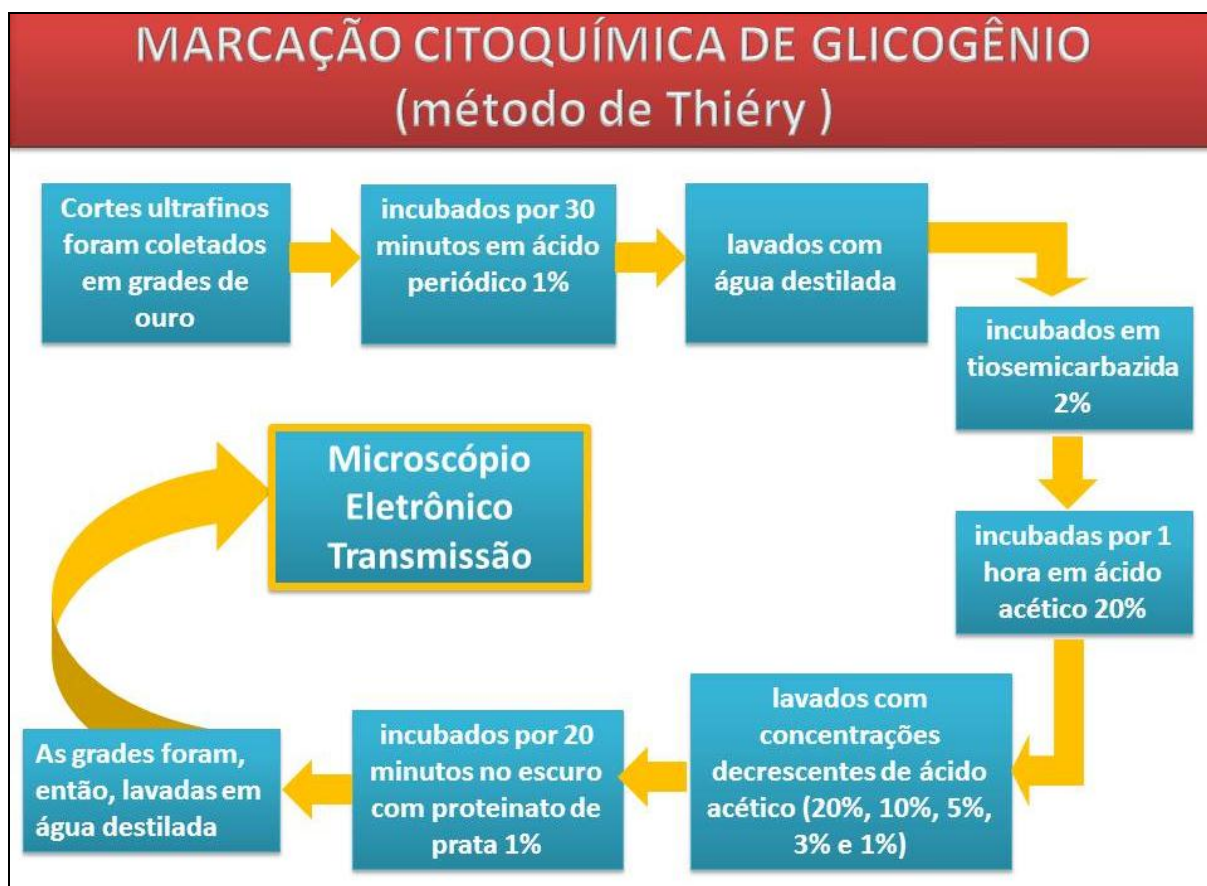


Figura 14: Fluxograma do processamento das amostras para citoquímica de glicogênio (Bretas, 2016).

3.5 Análise Lipídica

Os tergitos abdominais de número 3, 4 e 5 (T3, T4 e T5) (figura 15) de machos de diferentes idades foram dissecados e seus intestinos foram removidos. Estes tergitos foram selecionados para análise em virtude de suas localizações e dissecções.

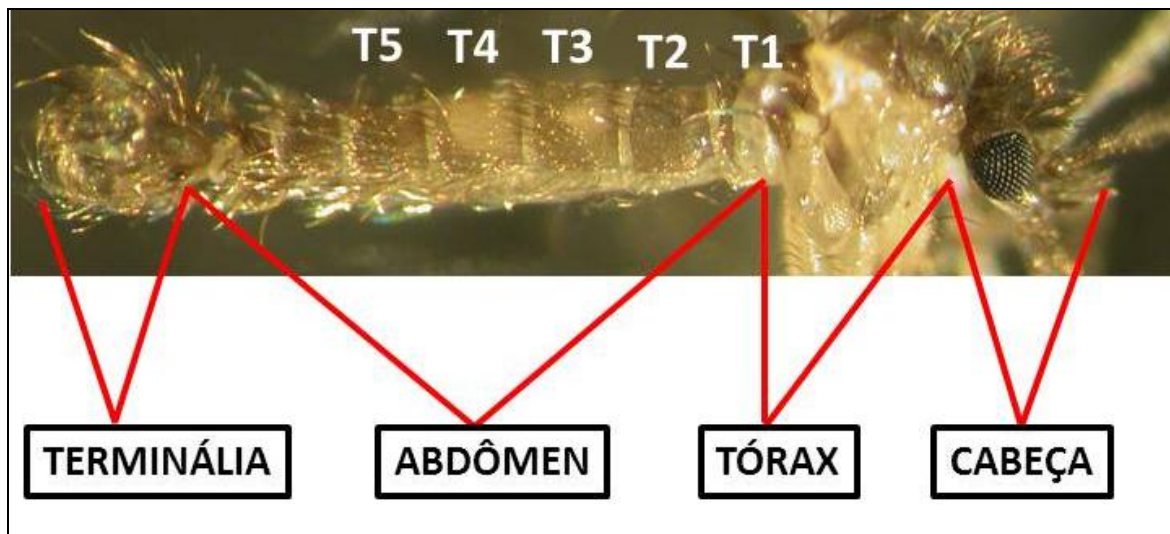


Figura 15: Tergitos abdominais de macho de *L. longipalpis*.

Os tergitos foram agrupados de acordo com suas posições e cada tergito foi, então, submetido à extração lipídica por 2 horas em 5 ml de uma solução de clorofórmio/metanol/água (1:2:0.8 v/v), sob condição de agitação (Blight e Dyer, 1959). Em seguida, a extração foi centrifugada a 700g, o sobrenadante foi coletado e o precipitado foi submetido a uma segunda extração lipídica por 1 hora. Ambas as fases orgânicas foram coletadas e secas sob atmosfera de nitrogênio. Os lipídios neutros e os fosfolipídios foram analisados através de cromatografia em camada fina de alta performance (HPTLC) usando placas de sílica (Horwitz e Perlman, 1987; Kawooya e Law, 1988), e então identificados pela comparação dos valores de retenção com padrões (Sigma Chemical Co, Saint Louis, MO, USA). As placas da HPTLC foram marcadas tal como descrito por Ruiz e Ochoa (1997) e submetidas à análise de densitometria. Os experimentos foram conduzidos em duplicatas, com um total de 100 tergitos abdominais dissecados por experimento.

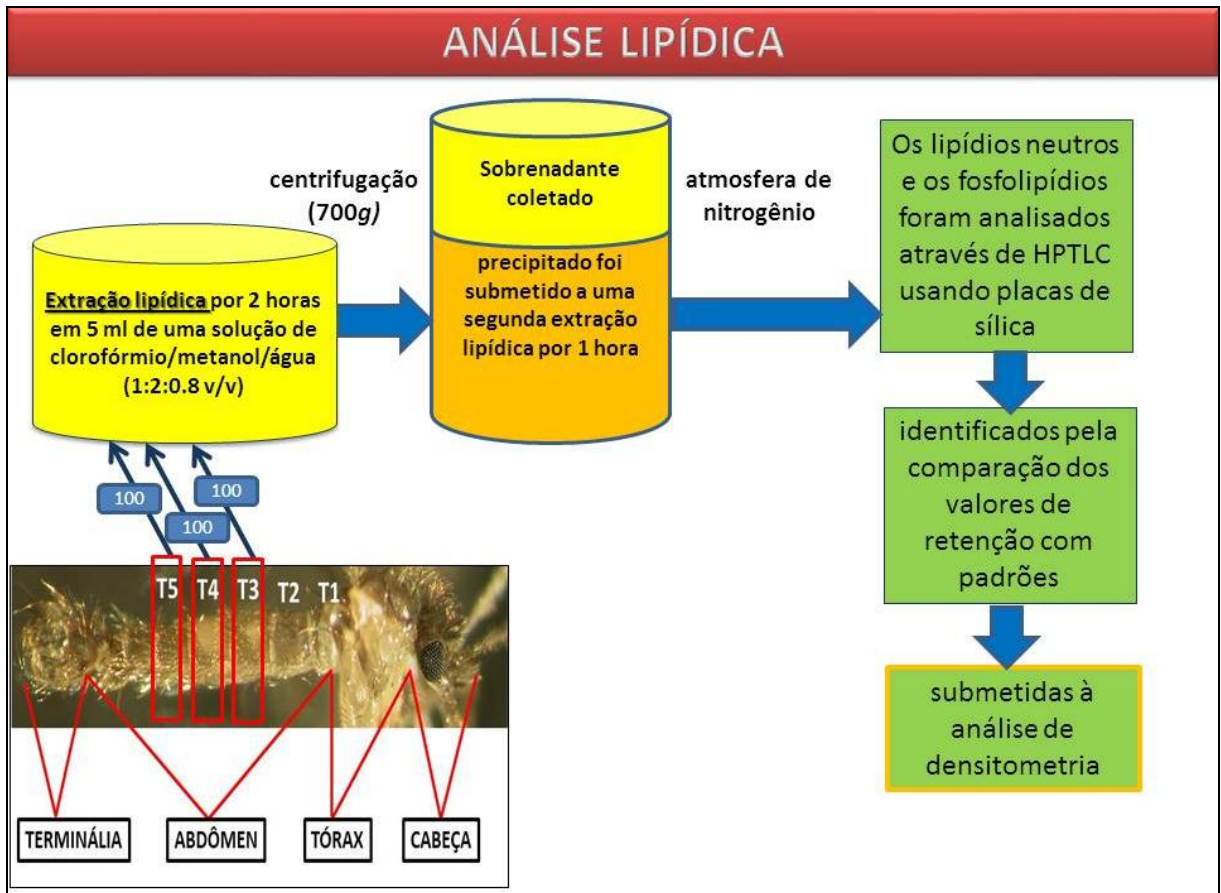


Figura 16: Fluxograma do processamento das amostras para as análises lipídicas (Bretas, 2016).

4. RESULTADOS

4.1 Microscopia de Luz

O corpo gorduroso de *L. longipalpis* está distribuído ao longo da cabeça, tórax e principalmente, abdômen. O corpo gorduroso abdominal, tanto em machos como em fêmeas, é encontrado em duas regiões distintas, formando assim o corpo gorduroso visceral e parietal (figuras 17, 18A e 18B).

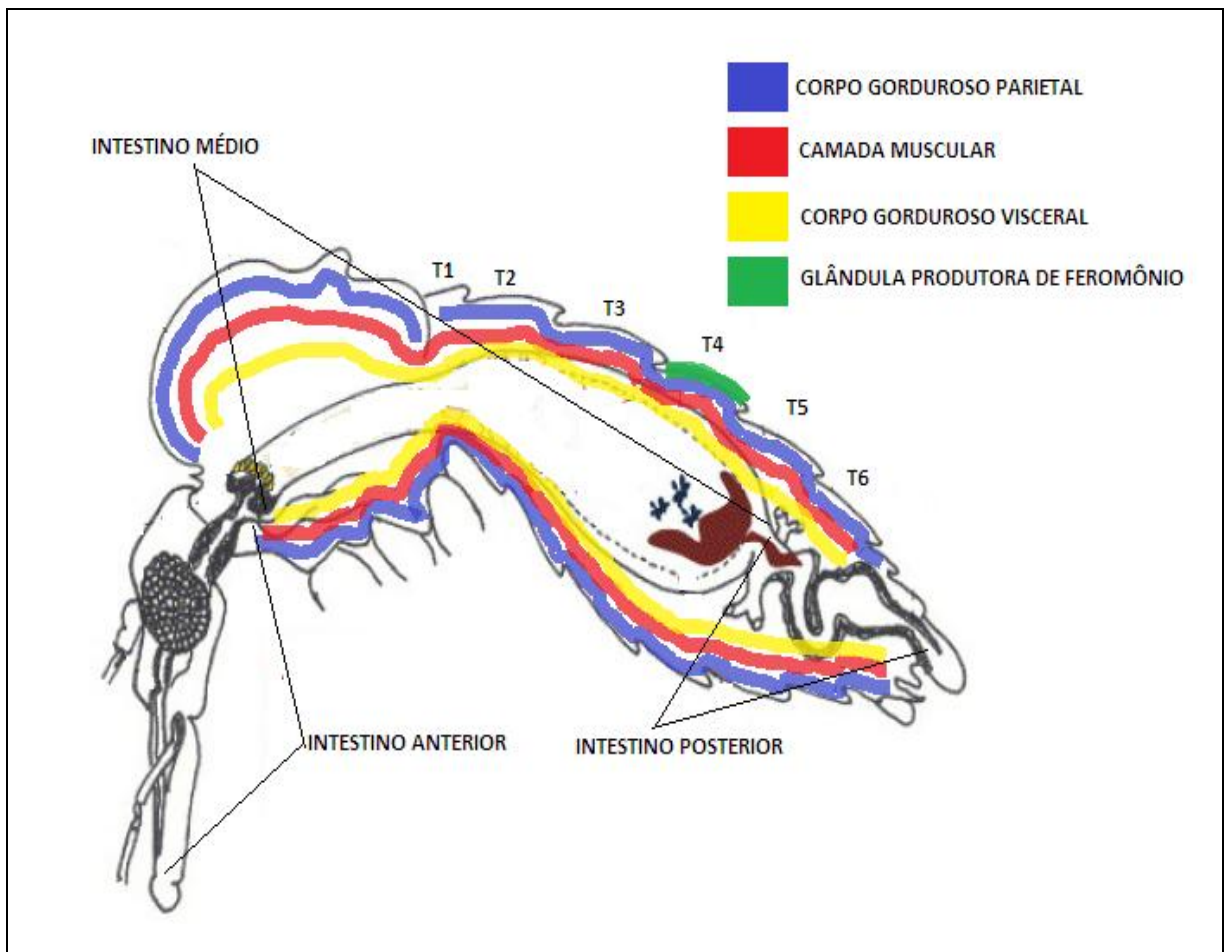


Figura 17: Desenho esquemático com a localização dos dois tipos de corpos gordurosos de *L. longipalpis*.

A análise por microscopia de luz, no corpo gorduroso abdominal, revelou diferentes padrões de marcação entre o corpo gorduroso visceral e parietal. O corpo gorduroso visceral apresenta maior afinidade por fucsina básica, apresentando coloração rosa, enquanto que o

parietal marca melhor com cristal violeta mostrando-se assim coloração azulada (figura 18C). Também foi observada a presença de corpo gorduroso na cabeça e tórax (figura 18D).

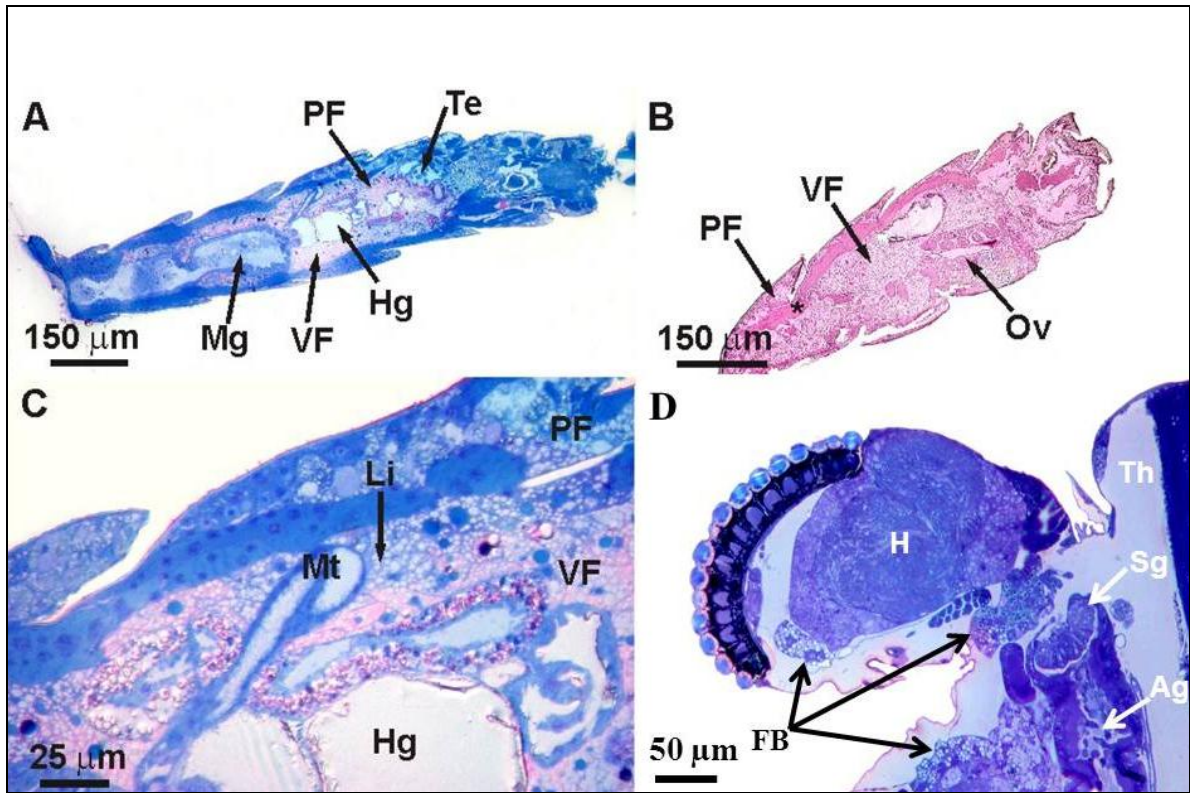


Figura 18: Microscopia de luz do corpo gorduroso de *L. longipalpis*.

- A) Secção Longitudinal dos segmentos abdominais de macho, marcado com cristal violeta e fucsina básica, mostrando a distribuição interna do corpo gorduroso. O corpo gorduroso parietal (PF) está marcado principalmente em azul, enquanto o corpo gorduroso visceral (VF) marcado principalmente em vermelho. Note a proximidade entre o intestino médio (Mg), intestino posterior (Hg), testículo (Te) e o corpo gorduroso visceral.
- B) Secção longitudinal dos segmentos abdominais de uma fêmea madura, marcada com fucsina básica, mostrando a distribuição interna do corpo gorduroso. Ambas as regiões do corpo gorduroso, parietal (PF) e visceral (VF), bem desenvolvidos. Note a associação entre ovário (Ov) e corpo gorduroso visceral. Uma camada muscular (*) separa as duas regiões do corpo gorduroso.
- C) Secção Longitudinal do tergito 4, fucsina básica mostrando o corpo gorduroso parietal (PF) e o visceral (VF). Note a interação entre os túbulos de Malpighi (Mt) e o intestino posterior (Hg) com as células do corpo gorduroso, as quais apresentam grande quantidade de gotículas de lipídios (Li).
- D) Secção longitudinal da cabeça (H) e tórax (Th), marcados com cristal violeta, mostrando a distribuição interna do corpo gorduroso (FB). Note que o corpo gorduroso está bastante desenvolvido e próximo das glândulas salivares (Sg), as quais estão localizadas no intestino anterior (Ag).

A utilização do corante *oilred* que tem afinidade por lipídios marcou em marrom grandes regiões tanto do corpo gorduroso visceral como do parietal (figura 19).

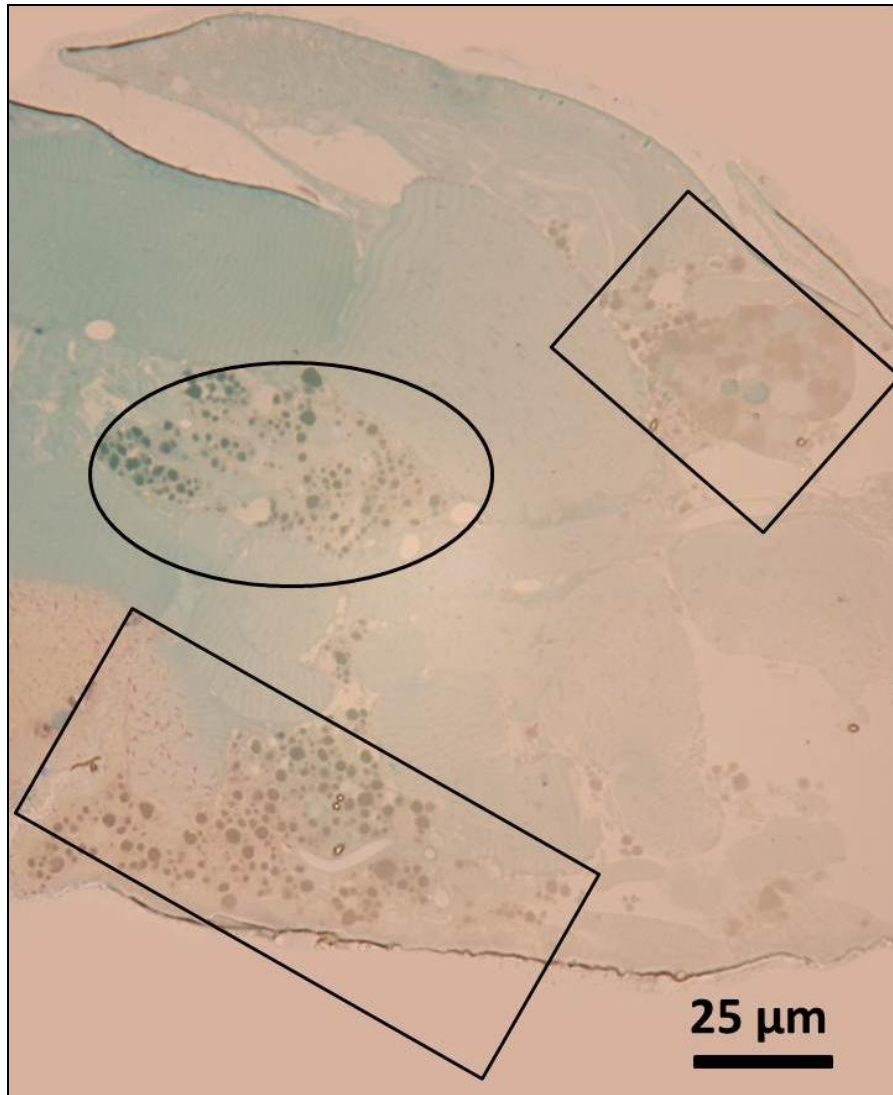


Figura 19: Microscopia de luz de tergitos abdominais de macho marcado com *oilred* e cristal violeta. Lipídios marcados em marrom (*oilred*) e proteínas marcadas em azul principalmente (cristal violeta). Corpo gorduroso visceral (círculo) e corpo gorduroso parietal (retângulos).

A presença de glândulas produtoras de feromônio no quarto tergito abdominal deslocou o corpo gorduroso parietal para uma posição mais interna (figura 20A).

Apenas um tipo celular foi encontrado no corpo gorduroso: o trofócito. Este tipo celular contém grande quantidade de grânulos de proteínas (marcados com azul de bromofenol) e gotículas de lipídio espalhadas pelo citoplasma (figura 20B).

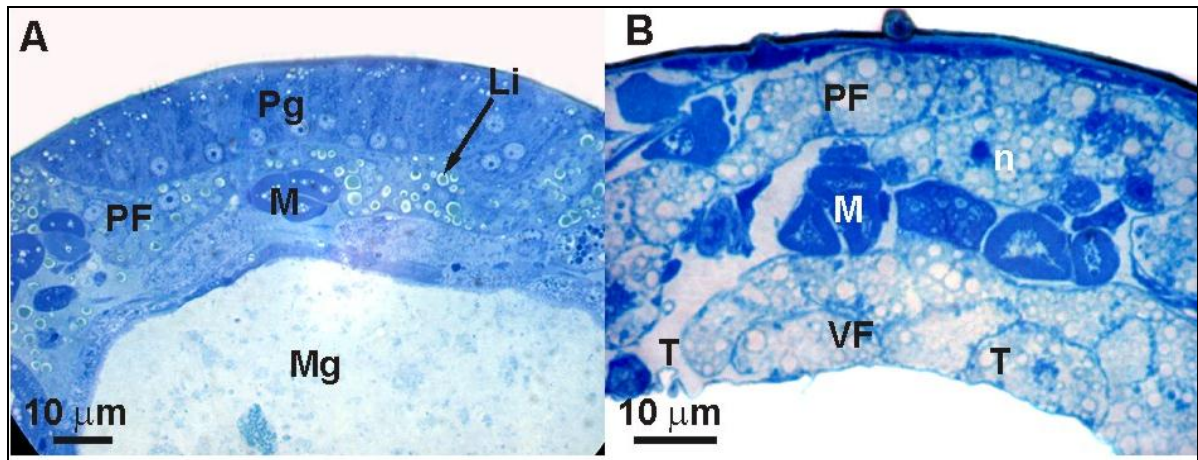


Figura 20: Microscopia de luz do corpo gorduroso de *L. longipalpis*.

- A) Secção transversal do quarto seguimento abdominal, marcado com cristal violeta. Glândulas de feromônio (Pg), corpo gorduroso parietal (PF). M, camada muscular; Mg, intestino médio; Li, gotículas de lipídios.
- B) Corte transversal do segmento abdominal, marcado com azul de bromofenol, mostrando grânulos de proteína nos trofócitos (T) tanto no corpo gorduroso parietal (PF) como no visceral (VF). Trofócitos das duas regiões do corpo gorduroso separados por camadas musculares (M). n, núcleo.

4.2 Microscopia eletrônica de varredura

Nas análises de microscopia eletrônica de varredura, frequentemente observamos a presença de traqueias associadas ao corpo gorduroso, em especial a lóbulos (figuras 21A, 21B e 22A), estruturas semelhantes a sacos.

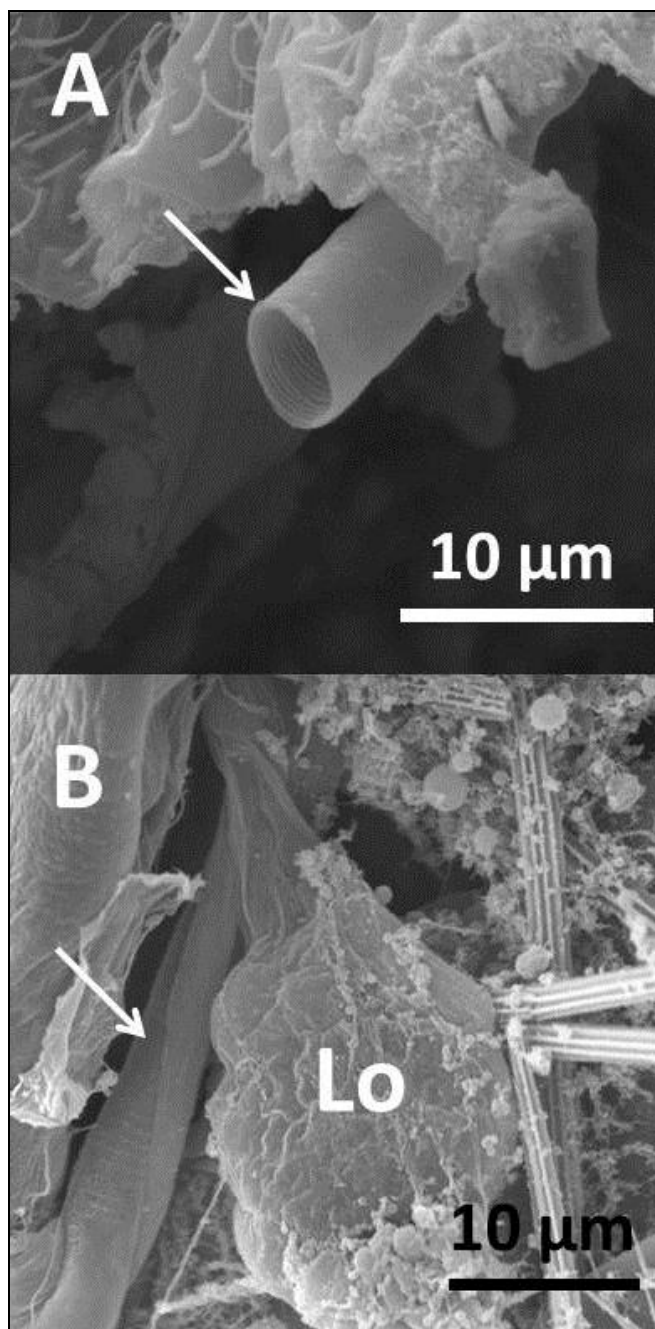


Figura 21: Microscopia eletrônica de varredura de associação entre traqueia e corpo gorduroso. Traqueia (seta) e Lo (lóbulo do corpo gorduroso).

Estes lóbulos do corpo gorduroso são delimitados por uma lâmina basal que agrupa os trofócitos de diferentes tamanhos, assim, resultando em uma superfície irregular do lóbulo (figura 22B e 22C). Os lóbulos estão suspensos na hemolinfa e rodeando o canal alimentar e próximo às gônadas. Os trofócitos localizados dentro destes lóbulos apresentam superfície lisa

e irregular (figura 21B). Nos lóbulos do corpo gorduroso visceral de fêmeas foi observada grande quantidade de matriz extracelular em especial entre os trofócitos (figura 22C e 23).

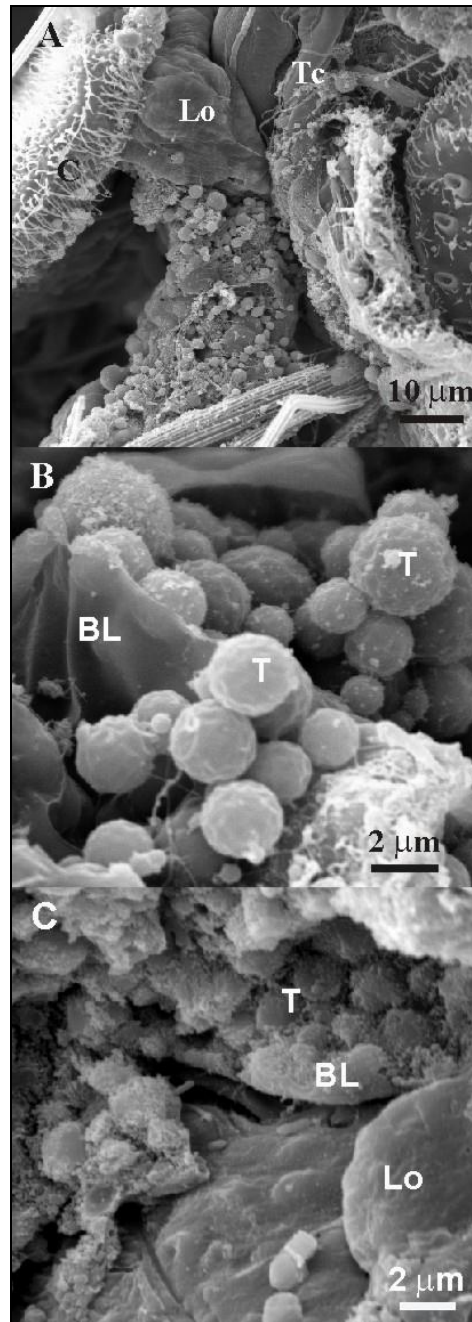


Figura 22: Microscopia eletrônica de varredura do corpo gorduroso de *L. longipalpis*.

- A) Vista da região interior do segmento abdominal de macho abaixo da cutícula (C). Note o grande volume ocupado pelo corpo gorduroso, assim como sua organização em lóbulos (Lo), frequentemente associados a traqueias (Tc).
- B) Um lóbulo aberto do corpo gorduroso visceral mostrando a lamina basal (BL) e trofócitos (T) na parte interna. Trofócitos de diferentes tamanhos e superfície lisa.
- C) Corte de um lóbulo (Lo) do corpo gorduroso de fêmea. Note a presença de proteínas entre os trofócitos (T) e a lâmina basal (BL) que agrupa os trofócitos.

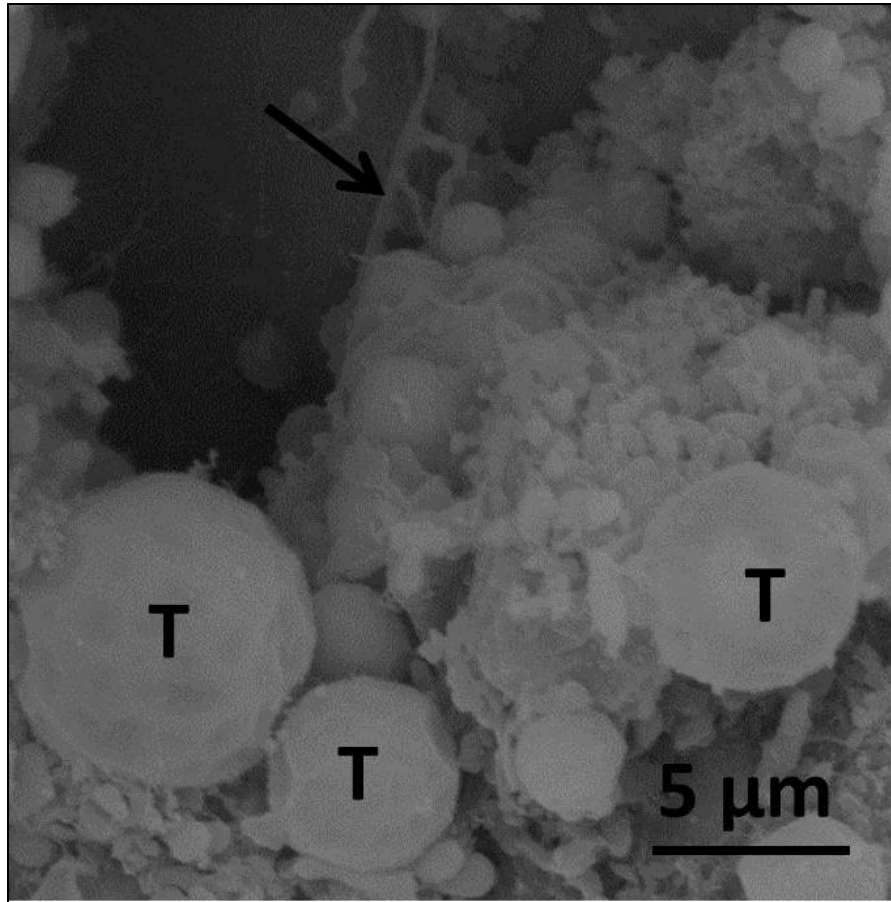


Figura 23: Microscopia eletrônica de varredura de trofócitos. Trofócitos (T) e traqueias (seta).

A microscopia de varredura também mostrou grande quantidade de inclusões lipídicas nas células produtoras de feromônio do quarto tergito abdominal (figura 24A e 24B).

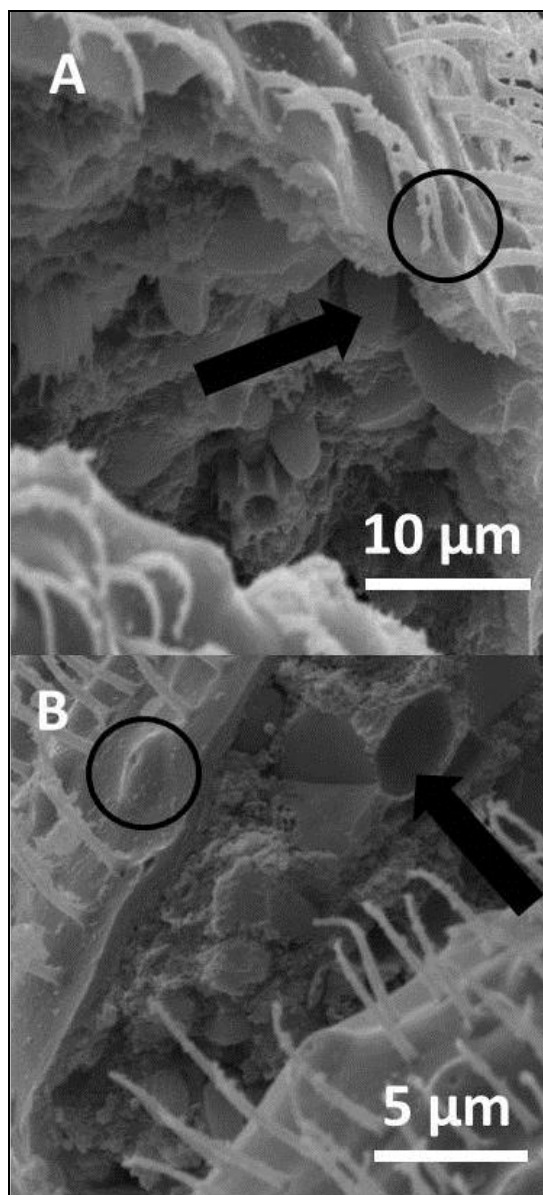


Figura 24: Microscopia eletrônica de varredura das glândulas produtoras de feromônio (4° tergito abdominal). Repare as inúmeras inclusões lipídicas (seta) e a abertura da glândula de feromônio (círculo).

4.3 Microscopia eletrônica de transmissão

A análise das células do corpo gorduroso por microscopia eletrônica de transmissão mostrou a presença de grande quantidade de inclusões lipídicas com diferentes eletrondensidades (figura 25A). Nos machos, é observada uma estreita associação entre as células do corpo gorduroso com a glândula produtora de feromônio as quais também apresentaram inúmeras inclusões lipídicas (figura 25B).

No entanto, a presença de inclusões lipídicas no citoplasma dessas células das glândulas produtoras de feromônio foi encontrada em menor número que no citoplasma dos trofócitos (Figura 25B). Além disso, grande quantidade de rosetas de glicogênio foi observada nos trofócitos após o processo para marcação de glicogênio pelo método de Thiéry (figuras 25C e 25D). Esses trofócitos continham vários vacúolos citoplasmáticos com homogênea e fraca eletrondensidade, tipicamente de gotículas de lipídios (figuras 25C e 25D). Esses elementos de reserva aparecem em diferentes proporções nos diferentes trofócitos.

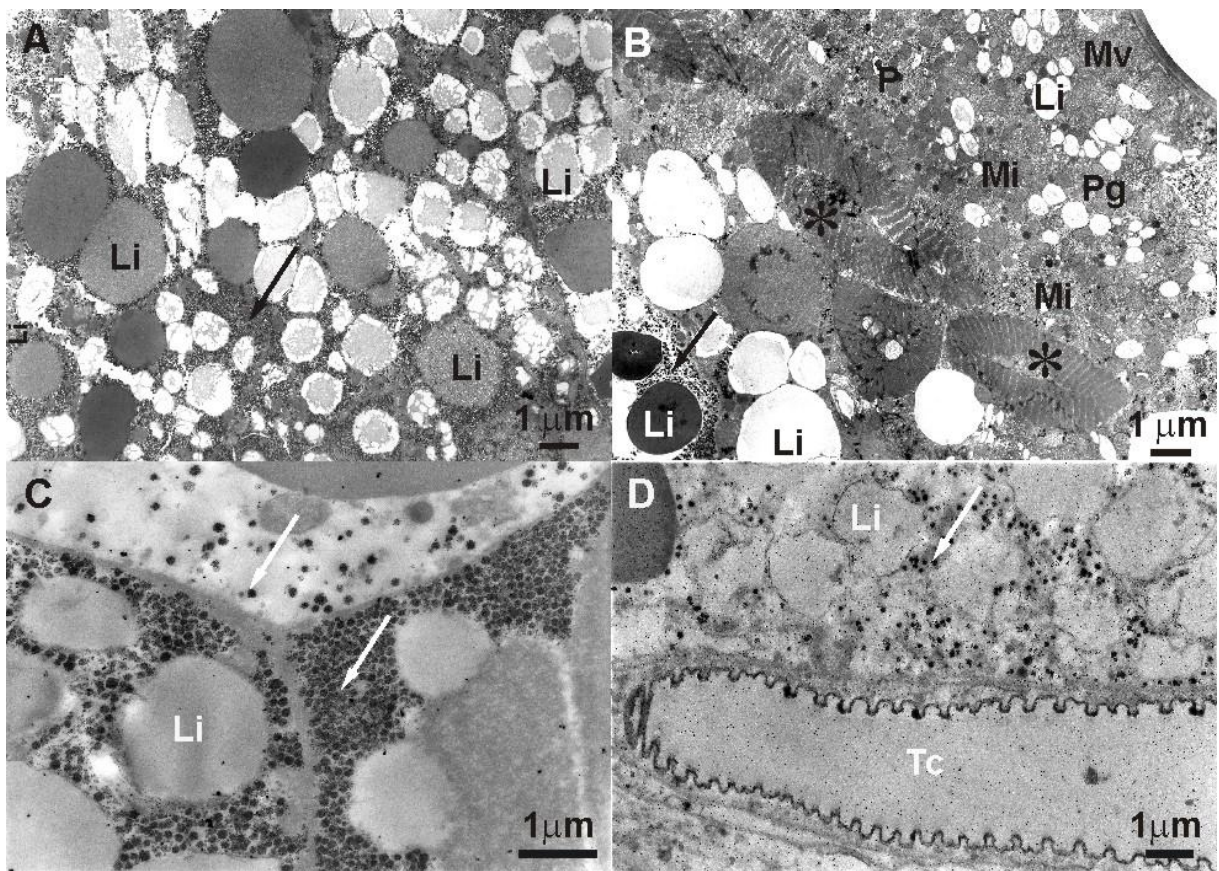


Figura 25: Microscopia eletrônica de transmissão do corpo gorduroso de *L. longipalpis*. A) Vista geral do corpo gorduroso mostrando inclusões lipídicas (Li) com diferentes eletrondensidades, assim como rosetas de glicogênio (seta) espalhadas pelo citoplasma das células. B) Associação entre as células da glândula de feromônio (Pg) com o corpo gorduroso. Gotículas de lipídio (Li) que podem ser observadas nas células da glândula de feromônio, as quais apresentam microvilosidades (Mv) na porção apical, e vários peroxissomos (P), mitocôndria (Mi) e inclusões lipídicas. Trofócitos com gotículas de lipídios grandes e rosetas de glicogênio (seta). Proximidade entre as células da glândula de feromônio e o corpo gorduroso e próximo às fibras musculares (asterisco). C) Método de Thiéry do citoplasma de trofócitos. Rosetas de glicogênio (seta). Note a forma poligonal dos trofócitos e as inclusões lipídicas (Li). D) Interação entre trofócito e traqueia (Tc). Inclusões lipídicas (Li) e rosetas de glicogênio (seta).

4.4 Análise lipídica

A cromatografia em camada fina de alta performance (HPTLC) para lipídios neutros mostrou que os tergitos de números 3, 4 e 5 (T3, T4 e T5) contém monoacilglicerol (MAG), diacilglicerol (DAG), triacilglicerol (TAG), ácidos graxos (FFA), colesterol (CHO) e colesterol esterificado (CHOE), mas a quantidade variou entre estes tergitos. O tergitto 4, em exceto pelo colesterol, contém maior quantidade de todos os lipídios neutros, quando comparado com os tergitos adjacentes (figuras 26A e 26B). Quando comparados os tergitos 4 com os tergitos 3 e 5, foram observadas grandes diferenças no perfil lipídico, em especial aos MAG (T3: 25%; T4: 61%; T5 14%), DAG (T3: 26%; T4: 46%; T5: 28%) e CHOE (T3: 24%; T4: 44%; T5: 32%).

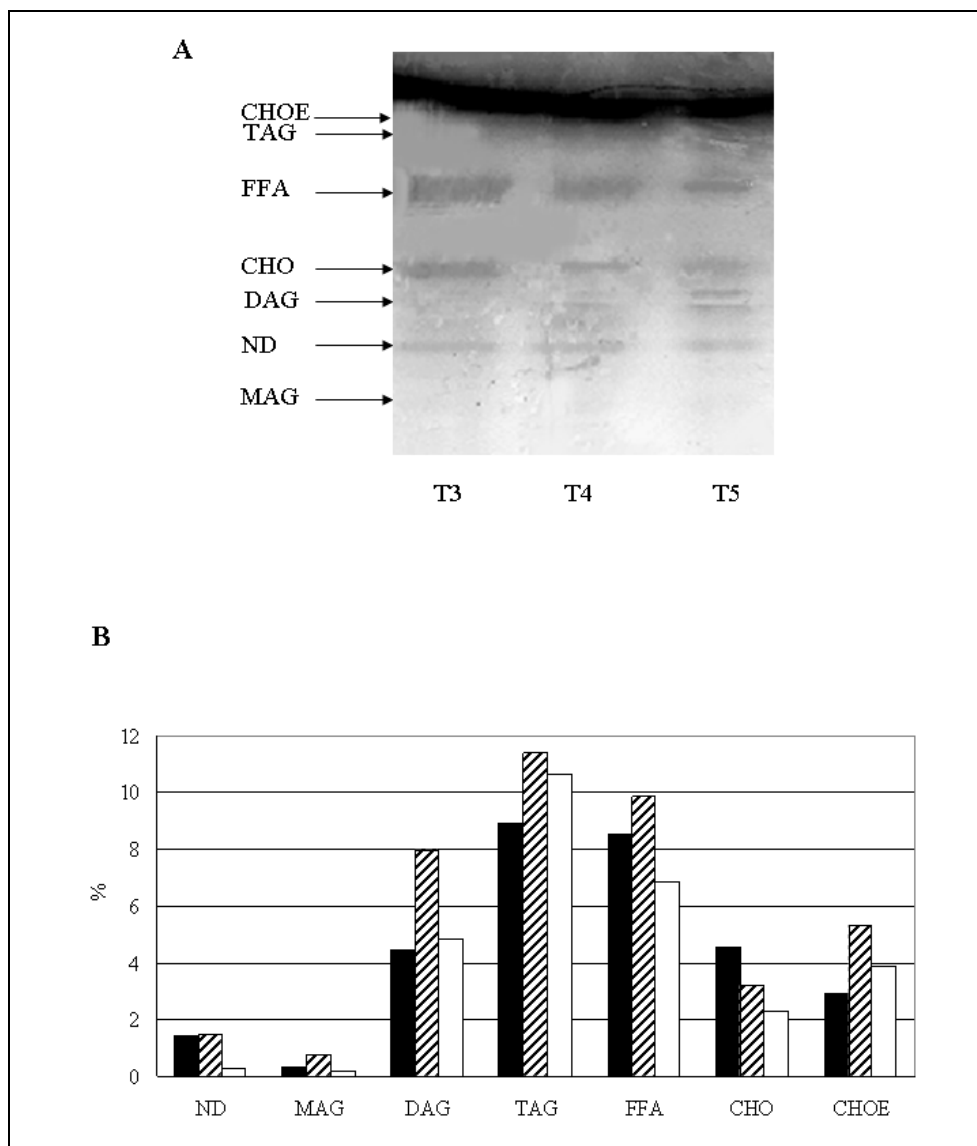


Figura 26: Composição de lipídios neutros dos tergitos abdominais de machos de *L. longipalpis*. A) Análise de uma placa de HPTLC. T3: 3° tergito; T4: 4° tergito; T5: 5° tergito. CHOE: colesterol esterificado; TAG: triacilglicerol; FFA: ácidos graxos livres; CHO: colesterol; DAG: diacilglicerol; ND: lipídio não determinado; MAG: monoacilglicerol. Cada ponto lipídico foi identificado pela comparação com um padrão que correu paralelamente. B) Uma placa de HPTLC analisada e submetida à análise de densitometria. As barras apresentam a porcentagem de cada classe de lipídio nos tergitos. Barra preta: 3° tergito; barra hachurada: 4° tergito; barra branca, 5° tergito.

O tergito 4 (T4), o qual possui glândulas produtoras de feromônio, apresentou maior quantidade de lipídios extraídos, contribuindo com 43% dos lipídios neutros, enquanto o tergito 3 (T3) contribuiu com 35% e o tergito 5 (T5) com apenas 22% (figura 26A, 26B e 27)

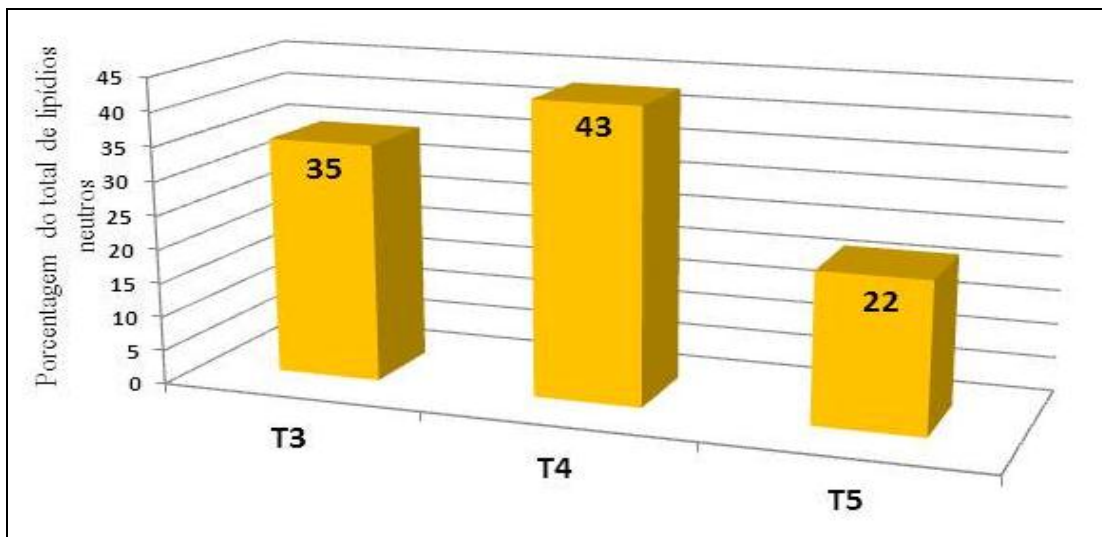


Figura 27: Porcentagem do total de lipídios neutros extraídos nos tergitos (T3, T4 e T5) de *L. longipalpis*.

Os lipídios neutros extraídos em maior quantidade, em todos os tergitos, foram os TAG (31% total de lipídios), seguido de FFA (25%) e DAG (17%) (figura 26A, 26B e 28).

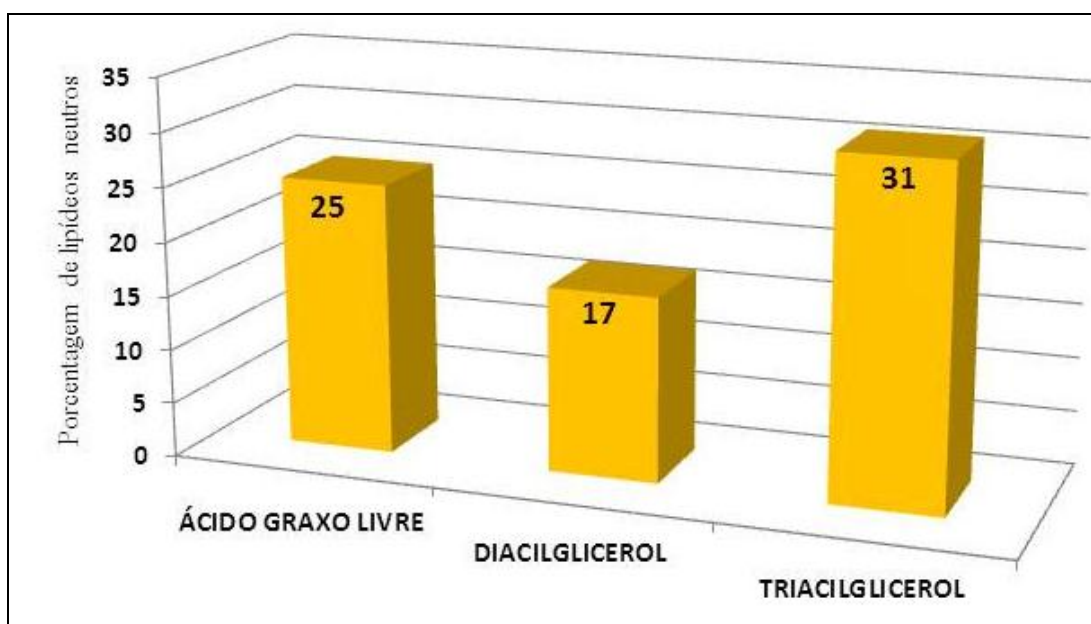


Figura 28: Principais lipídios neutros encontrados no total de lipídios extraídos dos tergitos (T3, T4 e T5) de *L. longipalpis*.

HPTLC dos fosfolipídios mostrou que o tergito 4 contribui com a maior parte dos fosfolipídios analisados (figura 29A e 29B). A maior diferença ocorreu com a lisofosfatidilcolina (LPC), quando o tergito 4 contribuiu com 69%, enquanto que os tergitos 3 e 5 contribuíram com apenas 15% e 16%, respectivamente.

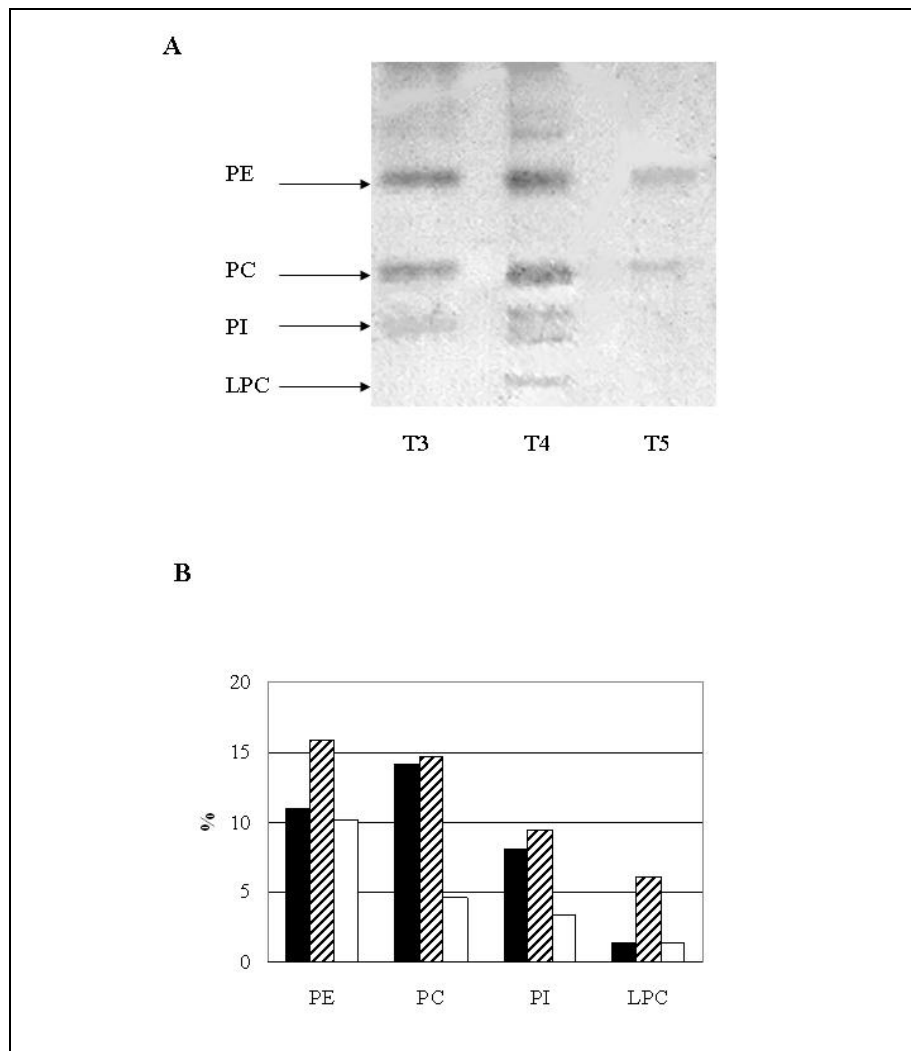


Figura 29: Composição fosfolipídica dos tergitos abdominais de machos de *L. longipalpis*. A) Análise da placa de HPTLC. T3: 3° tergito; T4: 4° tergito; T5: 5° tergito. PE, fosfatidiletanolamina; PC, fosfatidilcolina; PI, fosfatidilinositol; LPC, lisofosfatidilcolina. Cada ponto de fosfolipídio foi identificado através da comparação com um padrão fosfolipídico que correu paralelo. B) Uma placa de HPTLC foi escaneada e submetida a análise de densitometria. As barras representam a porcentagem de cada classe lipídica de cada tergito. Barra preta: 3° tergito; barra hachurada: 4° tergito; barra branca, 5° tergito.

O HPTLC também mostrou que o fosfolípido mais encontrado nos tergitos abdominais analisados foi a fosfatidiletanolamina seguida pela fosfatidilcolina (figura 30).

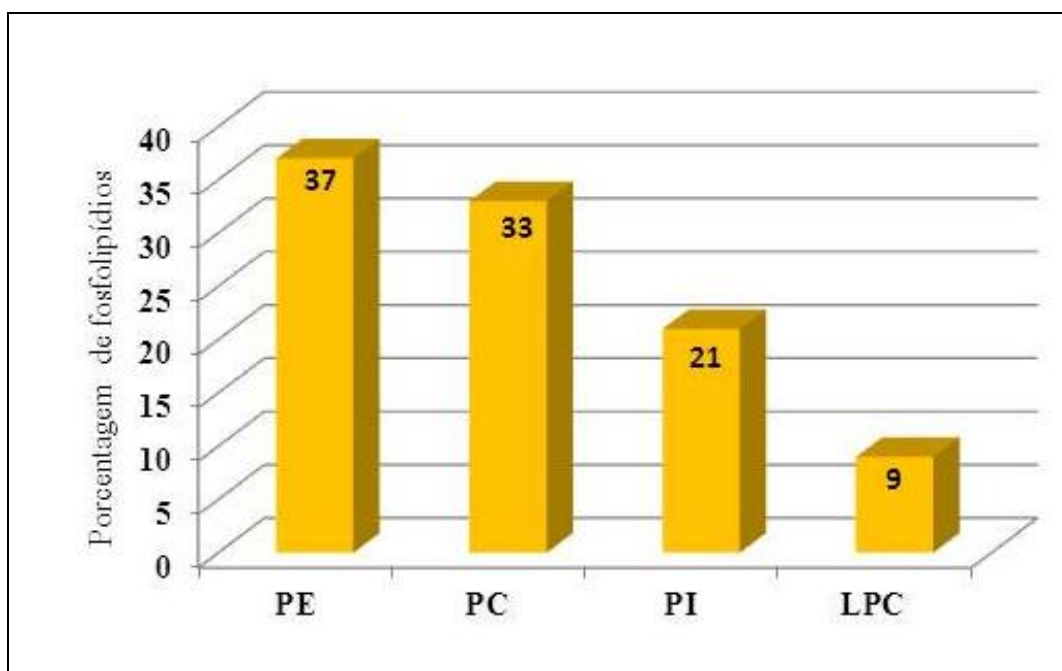


Figura 30: Porcentagem dos principais fosfolípidos extraídos dos tergitos (T3, T4 e T5) de *L. longipalpis*. PE, fosfatidiletanolamina; PC, fosfatidilcolina; PI, fosfatidilinositol; LPC, lisofosfatidilcolina.

5. DISCUSSÃO

Nossos dados morfológicos mostram que o corpo gorduroso de *L. longipalpis* está localizado na cabeça, tórax e principalmente no abdômen, tanto ao redor de órgão como o trato digestório e gônadas, ou próximo da cutícula. Este padrão de localização é frequentemente encontrado nos insetos (Jensen e Borgesen, 2000). O corpo gorduroso também foi usualmente observado associado a traqueias, as quais sugerem alta atividade metabólica deste órgão (Fontanetti *et al.*, 2004).

Em trabalho de 2014, Assis *et al.*, descreveram a presença trofócitos e oenócitos no corpo gorduroso de fêmeas de *L. longipalpis* e *Phlebotomus papatasi*, sendo os oenócitos encontrados no corpo gorduroso parietal. Contudo, em nossas análises, somente trofócitos foram observados no corpo gorduroso de *L. longipalpis*.

Os trofócitos são frequentemente encontrados no corpo gorduroso de vários insetos (Zara and Caetano, 2004). Alguns insetos podem apresentar somente trofócitos enquanto outros podem apresentar mais de dez diferentes tipos celulares no corpo gorduroso (Jensen e Borgesen, 2000; Yin *et al.*, 2001; Roma *et al.*, 2006).

Trofócitos de *L. longipalpis* apresentam vários tamanhos no mesmo corpo gorduroso e mostram diferentes quantidades de rosetas de glicogênio e gotículas de lipídios em seus citoplasmas, assim indicando que eles não têm um sincronismo metabólico, tal como já observado em trofócitos de outros insetos (Roma *et al.*, 2006). As gotículas de lipídios estão presentes em grande número no citoplasma dos trofócitos, assim confirmando a sua função primordial no estoque de lipídios do corpo gorduroso (Chapman, 1998).

Grânulos de proteína foram detectados no citoplasma de trofócitos de ambas as regiões do corpo gorduroso, tanto na visceral como na parietal. É possível que parte deste material tenha sido originada de fases imaturas do inseto (Dutkowski, 1974), uma vez que é conhecido que, durante o desenvolvimento larval dos insetos algumas proteínas sintetizadas pelos

trofócitos são liberadas na hemolinfa, e quando o inseto empulpa estas proteínas podem ser reabsorvidas pelas mesmas células para serem utilizadas como fonte de aminoácidos durante a formação de novos tecidos no adulto (Mintzas *et al.*, 1983, Gudderra *et al.*, 2002).

A presença de proteínas no corpo gorduroso é bastante conhecida, tal como a presença de proteínas precursoras da vitelogenina do ovo, da lipoforina e de peptídeos com função antimicrobiana (Yin *et al.*, 2001; Gilbert e Chino, 1974; Bao *et al.*, 2007). A grande quantidade de grânulos de proteína no corpo gorduroso das fêmeas deste flebotomíneo sugere que este órgão seja sítio de produção de vitelogenina, a principal proteína dos ovos.

As análises citoquímicas das células do corpo gorduroso também demonstraram a existência de grande quantidade de glicogênio no citoplasma dos trofócitos, assim indicando sua produção neste tipo celular, como visto em *Locusta migratoria* (Auerswald e Gade, 2006). O glicogênio nos insetos tem importante função no metabolismo, haja vista que é considerado como uma fonte de energia rápida. Em muitos insetos, é o glicogênio que fornece energia para os voos curtos, enquanto os lipídios são utilizados somente para o voo de grandes distâncias (Auerswald e Gade, 2006). Os flebotomíneos, em geral, voam em saltos curtos, assim o glicogênio pode contribuir como fonte de energia para este fim.

O corpo gorduroso é frequentemente descrito como um tecido uniformemente distribuído ao longo dos tergitos abdominais. As análises da composição lipídica por HPTLC mostraram diferentes quantidades de lipídios neutros e fosfolipídios entre os tergitos abdominais (T3, T4 e T5). Nossos dados bioquímicos sugerem que o corpo gorduroso apresenta distintos metabolismos nestes tergitos abdominais. As células do corpo gorduroso frequentemente cercam órgãos dos insetos, incluindo órgãos reprodutivos, canal alimentar, músculos torácicos e elementos do sistema nervoso central. Esta associação do corpo gorduroso com outros tecidos facilita a troca de moléculas. Deste modo, as diferenças no perfil lipídico podem ser próprias da proximidade com outros órgãos, tal como as gônadas

localizadas no quinto tergito abdominal, do intestino médio no terceiro tergito e das glândulas produtoras de feromônio do quarto tergito abdominal. As células produtoras de feromônio podem contribuir com alguns lipídios analisados, haja vista que estas possuem várias gotículas em seu citoplasma (Spiegel *et al.*, 2004).

Tal como ocorre na maioria dos insetos, o principal lipídio neutro encontrado no corpo gorduroso de *L. longipalpis* é o triacilglicerol (Canavoso *et al.*, 2001). Este lipídio normalmente assume função de reserve energética, embora seja conhecida sua capacidade de atuar como precursor na biossíntese de feromônios (Percy-Cunningham e MacDonald, 1987; Hoskovec *et al.*, 2002). Triacilglicerois foram encontrados em grande quantidade no tergito produtor de feromônio, sugerindo assim que possam estar atuando como fonte de ácidos graxos para a produção de feromônio em machos de *L. longipalpis*.

Contudo, nossos dados referentes a ácidos graxos livres e diacilglicerois foram acima do esperado quando comparados com estudos realizados em outros insetos (Canavoso *et al.*, 2001; Arrese e Soulages, 2010). Fato este, possivelmente ocasionado pela condição nutricional dos insetos a qual não foi controlada. Para experimentos futuros, seria interessante quantificar as diferentes classes lipídicas em diferentes condições de jejum. Além disso, em virtude do tamanho das amostras é possível que parte do corpo gorduroso visceral (o qual contém principalmente triacilglicerol) e da hemolinfa (a qual contém cerca de 90% dos lipídios diacilglicerol sendo transportados por lipoforina) (Atella *et al.*, 2012; Canavoso *et al.*, 2001; Arrese e Soulages, 2010) tenha sido perdida.

Os fosfolipídios são fontes energéticas pobres, no entanto, constituem a maior parte dos componentes de membrana celular além de atuarem como precursores de moléculas sinalizadoras celulares (Payrastra *et al.*, 2001). Nossos dados também mostram que, tal como ocorre em outros Dípteros, o fosfolipídio encontrado em maior quantidade no corpo gorduroso de *L. longipalpis* é a fosfatidiletanolamina (Fast, 1966). A grande quantidade de

fosfolipídios no quarto tergito abdominal pode ser própria das microvilosidades encontradas na membrana apical das células glandulares, a qual amplifica a superfície envolvida na secreção de feromônio. O grande número de mitocôndrias, peroxissomos e retículos endoplasmáticos fornecem evidências que estas células glandulares também possam contribuir para estas diferenças em relação aos fosfolipídios (Horie e Suga, 1989).

A grande quantidade de lisofosfatidilcolina no quarto tergito pode indicar a utilização de ácidos graxos da fosfatidilcolina. A análise do papel dos lipídios glandulares na broca do milho europeu, *Ostrinia nubilalis* (Hübner) suporta esta ideia, tal como verificado que três frações de fosfolipídios, continham ácidos graxos análogos à feromônio, com fosfatidilcolina sendo a mais abundante (Foster, 2004).

O corpo gorduroso dos insetos apresenta múltiplas funções; funções estas envolvidas em especial com aspectos de estoque e síntese de lipídios, proteínas e carboidratos. Apesar disso, O corpo gorduroso tem sido tratado como um simples tecido nos insetos, contudo, diferenças morfológicas e funcionais têm se sobressaído e destacado nos trabalhos recentes destacando as especificidades das diferentes regiões deste órgão (Jensen e Borgessen, 2000; Haunerland e Shirk, 1995). Nossos dados mostram diferenças morfológicas e bioquímicas no corpo gorduroso de *L. longipalpis*. Essas diferenças são especialmente observadas através de diferenças no perfil lipídico entre os tergitos abdominais, sugerindo assim que este importante órgão possa apresentar especificações metabólicas, embora mais experimentos sejam necessários para confirmação destes dados.

Mais estudos bioquímicos e fisiológicos, acerca do corpo gorduroso deste importante vetor são necessários para o melhor entendimento das funções deste órgão, o qual exerce funções chaves em importantes vias reprodutivas, tal como na formação de ovos e na biossíntese de feromônio.

6. CONCLUSÃO

1. O corpo gorduroso de *L. longipalpis* está distribuído em todas as regiões do corpo deste inseto (cabeça, tórax e abdômen) dividido em dois tipos: parietal e visceral.
2. Apresenta apenas um tipo celular (trofócito).
3. Tanto no corpo gorduroso parietal quanto no visceral há uma grande quantidade de glicogênio, proteínas e lipídios.
4. O principal lipídio neutro encontrado no corpo gorduroso foi o triacilglicerol enquanto que a fosfatidiletanolamina foi o principal fosfolipídio.
5. No quarto tergito abdominal, há maior quantidade de lipídios neutros e dos fosfolipídios em comparação com os tergitos adjacentes.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXANDER, B., JARAMILLO, C., CADENA, H., USMA, M.C., ROA, W. E TRAVI, B.L. An attempt to control phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) by residual spraying with permethrin in a Colombian village. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 90: 421-424, 1995.
- ALEXANDER, B. Sampling methods for phlebotomine sandflies. *Medical and Veterinary Entomology*, 14: 109-122, 2000.
- ARRESE, E. L. AND SOULAGES, J. L. Insect Fat Body: Energy, Metabolism, And Regulation. *Annual Review of Entomology*, 55: 207–225, 2010.
- ASSIS, W. A., MALTA, J., FILEMON, P., PIMENTA, P., RAMALHO-ORTIGÃO, J. M., MARTINS, G. F. The characterization of the fat bodies and oenocytes in the adult females of the sand fly vectors *Lutzomyia longipalpis* and *Phlebotomus papatasi*. *Arthropod Structure & Development*, 1-9, 2014.
- ATELLA, G.C., MAJEROWICZ, D. AND E GONDIM, K.C. Metabolismo de Lipídeos. *Tópicos Avançados em Entomologia Molecular*. Capítulo 6. 2012.
- AUERSWALD, L. AND GADE, G. Endocrine control of TAG lipase in the fat body of the migratory locust, *Locusta migratoria*. *Insect Biochemical and Molecular Biology*, 36: 759-768, 2006.
- BAO, Y., YAMANO, Y. AND MORISHIMA, I. Induction of hemolin gene expression by bacterial cell wall components in eri-silkworm, *Samia Cynthia ricini*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 146: 147-151, 2007.
- BLIGHT, E.G. AND DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37: 911-913, 1959.
- CHAPMAN, R. F. *The Insects: structure and function*. 4th edition. Cambridge University Press, Cambridge, 1998.

- CANAVOSO, L. E. AND WELLS, M. A. Metabolic pathways for diacylglycerol biosynthesis and release in the midgut of larval *Manduca sexta*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 30: 1173- 1180, 2000.
- CANAVOSO, L. E., JOUNI, Z. E., KARNAS, K. J., PENNINGTON, J. E., AND WELLS, M. A. Fat metabolism in insects. *Annual Review of Nutrition*, 21: 23- 46, 2001.
- CANAVOSO, L. E., FREDE, S., AND RUBIOLO, E. R. Metabolic pathways for dietary lipids in the midgut of hematophagous *Panstrongylus megistus* (Hemiptera :Reduviidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 34: 845-854, 2004.
- COSTA-LEONARDO, A.M., LARANJO, L.T., JANEI, V., HAIFIG, I. The fat body of termites: functions and stored materials. *Journal of Insect Physiology*, 59(6): 577-87, 2013.
- DABORN, P. J., LUMB, C., BOEY, A., WONG, W., FFRENCH-CONSTANT, R. H., AND BATTERHAM, P. Evaluating the insecticide resistance potential of eight *Drosophila melanogaster* cytochrome P450 genes by transgenic over-expression. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 37: 512-519, 2007.
- DANTAS-TORRES, F., BRANDAO-FILHO, S. P. Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, São Paulo*, v. 48, n. 3, p. 151-156, 2006.
- DEANE, L.M. E DEANE, M.P. Visceral Leishmaniasis in Brazil: Geographical distribution and transmission. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 4: 198-212, 1962.
- DEAN, R.L., LOCKE, M., COLLINS, J.V. Structure of fat body. In: Kerkut, G.A., Gilbert, L.I. (Eds.), *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, vol. 3. Pergamon Press, Oxford, 155–210, 1985.
- DESJEUX, P. Public health aspects and control. *Clinics in Dermatology*, 14: 417-423, 1996.

- DINIZ, L.M.O., DUANI, H., FREITAS, C.R., FIGUEIREDO, R.M., XAVIER, C.C.
Neurological involvement in visceral leishmaniasis: case report. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 43(6): 743-5, 2010.
- DOSTÁLOVÁ, A. AND VOLF, P. *Leishmania* development in sand flies: parasite-vector interactions overview. *Parasites & Vectors*, 5: 276, 2012.
- DUTKOWSKI, A.B. Fat body of *Galleria mellonella* during metamorphosis . Cytochemical and ultrastructural studies. *Folia Histochem Cytochem (Krakow)*, 12: 269-279, 1974.
- ENG, M.W., VAN ZUYLEN M.N. AND SEVERSON D.W. Apoptosis-related genes control autophagy and influence DENV-2 infection in the mosquito vector, *Aedes aegypti*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 76: 70–83, 2016.
- FAN, Y., ZUREK, L., DYKSTRA, M.J. AND SCHAL, C. Hydrocarbon synthesis by enzymatically dissociated oenocytes of the abdominal integument of the German Cockroach, *Blattella germanica*. *Naturwissenschaften*, 90: 121-126, 2003.
- FAST, P.G. A comparative study of the phospholipids and fatty acids of some insects. *Lipids*. 209-215, 1966.
- FERRO, C.; CARDENAS, E.; CORREDOR, D.; MORALES, A.; MUNSTERMANN, L. E. Life cycle and fecundity analysis of *Lutzomyia shannoni* (Dyar) (Diptera: Psychodidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 93, n. 2, p. 195-199, 1998.
- FONTANETTI, C.S., CAMARGO-MATHIAS, M.I. AND TIRITAN, B.M.S. The fat body in *Rhinocricus padbergi* (Diplopoda, Spirobolida). *Iheringia*, 94: 351-355, 2004.
- FORATTINI, O. Entomologia Médica. Psychodidae. Phlebotominae. Leishmanioses. Bartonelose. São Paulo. Editora Edgar Blucher Ltda. E Editora da Universidade de São Paulo. p.658. 1973.

- FOSTER, S.P. Fatty acid and sex pheromone changes and the role of glandular lipids in the Z-strain of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* (Hubner). Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 56: 73-83, 2004.
- FURTADO, W.C.A., AZEVEDO, D. O. , MARTINS, G. F. , ZANUNCIO, J. C. AND SERRÃO, J. E. Histochemistry and Ultrastructure of Urocytes in the Pupae of the Stingless Bee *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Meliponini). Microscopy and Microanalysis, 19: 1502-1510, 2013.
- GILBERT, L.I. AND CHINO, H. Transport of lipids in insects. Journal of Lipid Research, 15: 439-456, 1974.
- GILLOTT, C., Entomology. Plenum Press, New York, 1995.
- GUDDERRA, N.P., SONENSHINE, D.E., APPERSON, C.S. AND ROE, R.M. Hemolymph proteins in ticks. Journal of Insect Physiology, 48: 269-278, 2002.
- HAUNERLAND, N.H. AND SHIRK, P.D. Regional and functional-differentiation in the insect fat-body. Annual Review of Entomology, 40: 121-145, 1995.
- HOFFMANN, J.A. The immune response of *Drosophila*. Nature, 426: 33-38, 2003.
- HORIE, S. AND SUGA, T. Participation of peroxisomes in lipid biosynthesis in the harderian gland of guinea pig. The Biochemical Journal, 262: 677-680, 1989.
- HORWITZ, J. AND PERLMAN, R.L. Measurement of inositol phospholipid metabolism in PC12 pheochromocytoma cells. Methods in Enzymology, 141: 169-175, 1987.
- HOSKOVEC, M., LUXOVA, A., SVATOS, A. and Boland, W. Biosynthesis of sex pheromones in moths: stereochemistry of fatty alcohol oxidation in *Manduca sexta*. Tetrahedron, 58: 9193-9201, 2002.
- HU, J.S., LI, F.C., XU, K.Z., NI, M., WANG, B.B., TIAN, J.H., LI, Y.Y., SHEN, W.D., LI, B. Mechanisms of TiO₂ NPs-induced phoxim metabolism in silkworm (*Bombyx mori*) fat body. Pesticide Biochemistry and Physiology, 129: 89-94, 2016.

- JENSEN, P.V. AND BORGESSEN, L.W. Regional and functional differentiation in the fat body of pharaoh's ant queens, *Monomorium pharaonis* (L.). *Arthropod Structure and Development*, 29: 171-184, 2000.
- JURENKA, R.A., SUBCHEV, M., ABAD, J.L., CHOI, M.Y. AND FABRIAS, G. Sex pheromone biosynthetic pathway for disparlure in the gypsy moth, *Lymantria dispar*. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100: 809-814, 2003.
- KASINATHAN, S., BALASUBRAMANIAN, A., RAMAKRISHNAN, S. and BASU, S. L. The role of fat body in testicular spermatogenesis and steroidogenesis in *Rana hexadactyla* Lesson. *Journal of Biosciences*. June, 207–213, 1979.
- KAWOOYA, J.K. AND LAW, J.H. Role of lipophorin in lipid transport to the insect egg. *The Journal of Biological Chemistry*, 263: 8748-8753, 1988.
- KILLICK-KENDRICK R. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. *Medical and Veterinary Entomology*, 4: 1-24, 1990.
- KUNKEL, J. G. and NORDIN, J. H. Yolk Proteins. In *comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology*. Chapter 4, Vol.I, eds. GA Kerkut and LI Gilbert, Pergamon Press, 83-111, 1985.
- LAINSON, R., DYE, C., SHAW, J.J., MACDONALD, D.W., COURTENAY, O., SOUZA, A.A., *et al.* Amazonian visceral leishmaniasis-distribution of the vector *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) in relation to the fox *Cerdocyon thous* (linn.) and the efficiency of this reservoir host as a source of infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz*; 85(1):135-7, 1990.
- LOCKE, M. Surface membranes, Golgi complexes, and vacuolar systems. *Annual Review of Entomology*, 48: 1-27, 2003.

- LUTZ, A. AND NEIVA, A. Contribuição para o conhecimento das espécies do gênero *Phlebotomus* existentes no Brasil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 4, 84-95, 1912.
- MARTINS, G.F. AND RAMALHO-ORTIGÃO, J.M. Oenocytes in insects. Invertebrate Survival Journal, 139-152, 2012.
- MAJEROWICZ D, CEZIMBRA MP, ALVES-BEZERRA M, ENTRINGER PF, ATELLA GC, SOLA-PENNA M, MEYER-FERNANDES JR, GONDIM KC. *Rhodnius prolixus* lipophorin: lipid composition and effect of high temperature on physiological role. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 82 (3): 129-40, 2013.
- MCGETTIGAN, J., MCLENNAN, R.K., BRODERICK, K.E., KEAN, L., ALLAN, A.K., CABRERO, P., REGULSKI, M.R., POLLOCK, V.P., GOULD, G.W., DAVIES, S.A. AND DOW, J.A. Insect renal tubules constitute a cell-autonomous immune system that protects the organism against bacterial infection. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 35: 741-754, 2005.
- MINTZAS, A.C., CHRYSANTHIS, G., CHRISTODOULOU, C. AND MARMARAS, V.J. Translation of the mRNAs coding for the major hemolymph proteins of *Ceratitis capitata* in cell-free system: comparison of the translatable mRNA levels to the respective biosynthetic levels of the proteins in the fat body during development. Developmental Biology, 95: 492-496, 1983.
- MODI, G.B. AND TESH, R.B. A simple technique for mass rearing *Lutzomyia longipalpis* and *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) in the laboratory. Journal of Medical Entomology, 20: 568-569, 1983.
- MONTEIRO, C. C. O papel da microbiota intestinal na competência vetorial do *Lutzomyia longipalpis* para a *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* e a transmissão do parasito ao vertebrado pela da picada. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Programa

- de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Centro de Pesquisa René Rachou, Belo Horizonte. 71f. 2012.
- MORALES, A.; BELLO, F., CARDENAS, E. Establecimiento, mantenimiento y productividad de una colonia de laboratorio de *Lutzomyia spinicrassa* Morales, Osorno-Mesa, Osorno y Hoyos, 1969 (Diptera: Psychodidae) en Colombia. *Revista Ciencias de La Salud*, Bogotá, v. 3, n. 2, p. 129-135, 2005.
- PAYRASTRE, B., MISSY, K., GIURIATO, S., BODIN, S., PLANTAVID, M. AND GRATACAP, M. Phosphoinositides: key players in cell signalling, in time and space. *Cellular Signalling*, 13: 377-387, 2001.
- PERCY, J. AND MACDONALD, J. A. *Biology and ultrastructure of sex pheromone producing glands*. Academic Press, Florida, 1987.
- RAIKHEL, A.S. AND LEA, A.O. Previtellogenic development and vitellogenin synthesis in the fat body of a mosquito: an ultrastructural and immunocytochemical study. *Tissue and Cell* 15, 281-299, 1983.
- RICHARDI, V. S., VICENTINI, M., REBECHI, D., FÁVARO, L. F., NAVARRO-SILVA, M. A. Morpho-histological characterization of immature of the bioindicator midge *Chironomus sancticaroli* Strixino and Strixino (Diptera, Chironomidae). *Revista Brasileira de Entomologia*. 59: 240–250, 2015.
- ROMA, G.C., MATHIAS, M.I. AND BUENO, O.C. Fat body in some genera of leaf-cutting ants (Hymenoptera: Formicidae). Proteins, lipids and polysaccharides detection. *Micron*, 37: 234-242, 2006.
- ROMA, G. C., MATHIAS, M.I. AND BUENO, O.C. Morpho-physiological analysis of the insect fat body: A review. *Micron*, 41: 395–401, 2010

- RUIZ, J.I. AND OCHOA, B. Quantification in the subnanomolar range of phospholipids and neutral lipids by monodimensional thin-layer chromatography and image analysis. *Journal of Lipid Research*, 38: 1482-1489, 1997.
- SHIMABUKURO, P. H. F. AND GALATI, E. A. B. Checklist dos Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) do estado de São Paulo, Brasil, com comentários sobre sua distribuição geográfica. *Biota Neotropica*, São Paulo, v. 11, n. 1, 2011.
- SHIMABUKURO, P. H. F., TOLEZANO, J. E., GALATI, E. A. B. Chave de identificação ilustrada dos Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) do estado de São Paulo. *Papéis Avulsos do Departamento de Zoologia*, São Paulo, v. 51, n. 27, p. 399-441, 2011.
- SNODGRASS, R. E. Principles of insect morphology. New York (McGraw-Hill). 'A revised interpretation of the external reproductive organs of male insects.' *Smithsonian misc.* 1935.
- SPIEGEL, C.N., BRAZIL, R.P. AND SOARES, M.J. Ultrastructural cytochemistry of the sex pheromone glands of *Lutzomyia cruzi* male sand flies (Diptera : Psychodidae : Phlebotominae). *Arthropod Structure and Development*, 33: 399-404, 2004.
- SPIEGEL, C.N., BATISTA-PEREIRA, L.G., BRETAS, J.A., EIRAS, A.E., HOOPER, A.M., PEIXOTO, A.A., SOARES, M.J. Pheromone Gland Development and Pheromone Production in *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). *Journal of Medical Entomology*. 489-495, 2011.
- SPIEGEL, C. N., BRETAS J. A. C., PEIXOTO, A. A., VIGODER, F. M., BRUNO, R.V., SOARES, M. J. Fine Structure of the Male Reproductive System and Reproductive Behavior of *Lutzomyia longipalpis* Sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). *Plos One*. September 13, 2013.

- SLOCINSKA M, CZUBAK T, MARCINIAK P, JARMUSZKIEWICZ W, ROSINSKI G.
The activity of the monosulfated sulfakinin Zopat-sk-1 ligated larvae of the beetle *Zophobas atratus*. *Peptides*, 69: 127-32, 2015.
- TESH, R. B. The genus Phlebovirus and its vectors. *Annual Review of Entomology*, Palo Alto, 33: 169–181, 1988.
- TOJO, S., BETCHAKU, T., ZICCARDI, V.J. AND WYATT, G.R. Fat body protein granules and storage proteins in the silkworm, *Hyalophora cecropia*. *The Journal of Cell Biology*, 78: 823-838, 1978.
- TSUCHIDA, K. AND WELLS, M. A. Digestion, absorption, transport and storage of fat during the last larval stadium of *Manduca Sexta* - changes in the role of lipophorin in the delivery of dietary-lipid to the fat-body. *Insect Biochemistry*, 18: 263-268, 1988.
- TURUNEN, S. Metabolic pathways in the midgut epithelium of *Pieris-Brassicae* during carbohydrate and lipid assimilation. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 23: 681-689, 1993.
- VAN HEUSDEN, M.C. AND LAW, J.H. An insect lipid transfer particle promotes lipid loading from fat body to lipoprotein. *The Journal of Biological Chemistry*, 264: 17287-17292, 1989.
- VAN HOOFF, D., RODENBURG, K.W. AND VAN DER HORST, D.J. Lipophorin receptor-mediated lipoprotein endocytosis in insect fat body cells. *Journal of Lipid Research*, 44: 1431-1440, 2003.
- XIMENES, A. A., SILVA-CARDOSO, L., DE CICCO, N.N., PEREIRA, M.G., LOURENÇO, D.C., FAMPA, P., FOLLY, E., CUNHA-E-SILVA, N.L., SILVA-NETO, M.A., ATELLA, G.C. Lipophorin Drives Lipid Incorporation and Metabolism in Insect Trypanosomatids. *Protist*, 166: 297–309, 2015.

- WEERS, P.M., VAN DER HORST, D.J., VAN MARREWIJK, W.J., VAN DEN EIJDEN, M., VAN DOORN, J.M. AND BEENAKKERS, A.M. Biosynthesis and secretion of insect lipoprotein. *Journal of Lipid Research*, 33: 485-491, 1992.
- WHO - World Health Organization. Neglected tropical diseases. Disponível em: http://www.who.int/neglected_diseases/news/WHO_implement_epidemiological_surveillance_leishmaniasis/en/. Acesso em: 05/08/2016.
- WINSTON, A.A. AND PERSONNE, P. The localization of glycogen in the spermatozoa of various invertebrate and vertebrate species. *The Journal of Cell Biology*, 44: 29-51, 1970.
- YIN, L., NORDIN, J.H., LUCCHES, P. AND GIORGI, F. Cysteine proprotease colocalizes with vitellogenin in compound granules of the cockroach fat body. *Cell and Tissue Research*, 304: 391-399, 2001.
- ZHANG, G., HAO, Y., JIN, L. H. Overexpression of jumu induces melanotic nodules by activating Toll signaling in *Drosophila*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 77: 31-38, 2016.
- ZARA, F.J. AND CAETANO, F.H. Ultramorphology and histochemistry of fat body cells from last instar larval of the *Pachycondyla (=Neoponera) villosa* (Fabricius) (Formicidae: Ponerinae). *Brazilian Journal of Biology*, 64: 725-735, 2004.
- ZIEGLER, R. AND VAN ANTWERPEN, R. Lipid uptake by insect oocytes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 36: 264-272, 2006.
- YAKOVLEV, A.Y., NESIN, A.P., SIMONENKO, N.P., GORDYA, N.A., TULIN, D.V., KRUGLIKOVA, A.A., CHERNYSH, S.I. Fat body and hemocyte contribution to the antimicrobial peptide synthesis in *Calliphora vicina* R.-D. (Diptera: Calliphoridae) larvae. *In Vitro Cellular & Developmental Biology–Animal*, September. 2016.

YOUNG GD, DUNCAN MA. Guide to the identification and geographic distribution of Lutzomyia sand flies in Mexico, The West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). Mem Am Entomol Inst., 54: 1-881, 1994.