

LARA CAROLINA MARIO

**Isolamento e caracterização de células indiferenciadas de ovos
embrionados de *Aedes aegypti* (Linnaeus 1762)**

São Paulo

2015

LARA CAROLINA MARIO

Isolamento e caracterização de células indiferenciadas de ovos embrionados de *Aedes aegypti* (Linnaeus 1762)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Cirurgia

Area de Concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientadora:

Prof. Dra. Maria Angelica Miglino

São Paulo
2015

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.3082 FMVZ	<p>Mario, Lara Carolina Isolamento e caracterização de células indiferenciadas de ovos embrionados de <i>Aedes aegypti</i> (Linnaeus 1762) / Lara Carolina Mario. -- 2015. 68 f. :il.</p> <p>Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2015.</p> <p>Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres. Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.</p> <p>Orientador: Prof. Dra. Maria Angelica Miglino.</p> <p>1. <i>Aedes aegypti</i>. 2. Dengue. 3. Cultivo celular. 4. Células-tronco. I. Título.</p>
----------------	---

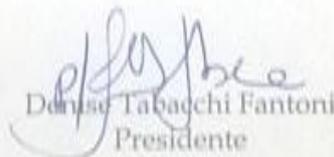


CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Isolamento e caracterização de células indiferenciadas de ovos embrionários de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762)", protocolado sob o nº 2949/2013, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Maria Angélica Miglino, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 13/3/2013.

We certify that the Research "Isolation and characterization of undifferentiated embryonic eggs from *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762)", protocol number 2949/2013, under the responsibility Profa. Dra. Maria Angélica Miglino, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 3/13/2013.

São Paulo, 18 de março de 2013.


Denise Tabacchi Fantoni
Presidente



Autor: MARIO, Lara Carolina

Título: Isolamento e caracterização de células indiferenciadas de ovos embrionados de *Aedes aegypti* (Linnaeus 1762)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: __/__/__

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição _____ Julgamento _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____ Julgamento _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____ Julgamento _____

DEDICATÓRIA

Dedico a Deus, por estar em todos os momentos da minha vida, sempre iluminando meu caminho.

Aos meus amados pais (Angélica e Donizeti). Por todo apoio e incentivo. Obrigada por sempre me apoiarem e acreditarem em mim e por compartilharem deste sonho comigo, dedico a vocês esta grande vitória de minha vida, com a mais profunda gratidão, carinho e amor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus em primeiro lugar, Ele foi meu porto seguro em todos os momentos: nas horas de angustia e aflição e conquistas.

Aos meus pais, que sempre me apoiaram e me incentivaram a nunca desistir de um sonho, por mais difícil que ele esteja. Todas as dificuldades enfrentadas neste projeto só foram possíveis pelo carinho e apoio vindo deles!

A minha orientadora, Prof. Dra. Maria Angelica Miglino, pela confiança, por compartilhar seus conhecimentos e por me ensinar a ter seriedade e postura profissional.

Ao Prof. Dr. Durvanei Augusto Maria, por sua contribuição para a confecção deste trabalho, e por todos seus ensinamentos, sem seu auxílio não seria possível dar início a este projeto. Muito obrigada pela paciência e pela ajuda durante esta jornada!

A Dra. Ana Flávia de Carvalho, pela amizade e confiança, por ser a primeira a me incentivar na área da pesquisa, por ter aceitado me orientar na iniciação científica, sempre serei muito grata por tudo.

A Dra. Ana Claudia Oliveira Carreira, pela disponibilidade e contribuição neste projeto, pelo auxílio nos momentos mais críticos, obrigada.

Ao Dr. Phelipe Oliveira Favaron, por sua contribuição neste projeto, pela ajuda nos momentos difíceis e pela paciência em me ensinar, obrigada.

A Dra. Sonia Will, pela ajuda e ensinamento que foram de grande importância para realização deste projeto.

Ao Dr. André Luis Resende Francioli, por toda ajuda quando cheguei a São Paulo e pelo auxílio no projeto, obrigada.

A Dra. Cristiane Valverde Wenceslau pelos ensinamentos, amizade e apoio.

A Dra. Celina Almeida Furlanetto Mançanares pelos primeiros ensinamentos em Anatomia.

Aos amigos que sempre estiveram presentes em minha vida, Jéssica Borghesi, Miguel Lobo e Rennan Lopes, que desde a graduação me auxiliam e me apóiam.

Aos amigos de todas as horas, Carol Martins, Natal (Franceliusa Delis), Carla Carvalho, Marcão (Marcos Vinícius Mendes), M.A (Maria Angélica Arroyo) e Paulo Ramos. Obrigada pela amizade, pelos momentos de descontração, pelas festas e passeios em São Paulo, enfim por todos os momentos bons que passamos juntos.

Aos meus amigos de orientação: Marcio Pereira, César Prado, Valdir Pavanello Jr., Adriana Raquel, Daily Orechio, Bruna Andrade, Luciano Leonel, Horácio Tommasi Jr., Ana Paula Miranda e Josileide. E também aos que já se formaram Marcio Rodrigues, Rafael Cardoso, Fernanda Menezes e Dayane Alcântara.

A todos os amigos do departamento de anatomia, principalmente os amigos Katia Guimarães, Raphael Cruz, Mariah Munhoz, Caio Carniatto, Juliana Catoia, Dani de Oliveira e Amilton Santos.

Aos amigos do Instituto Butantan que sempre me acolheram e me auxiliaram, principalmente ao Tito Crivellari-Damasceno, por sempre estar presente em todos os momentos deste mestrado, nas horas difíceis e nas conquistas também.

A Dra. Juliana Guimarães por sua contribuição na parte histológica do projeto.

Ao amigo Eduardo Malavasi, pela disponibilidade todas as vezes que necessitei de auxílio, obrigada.

Aos amigos e familiares que mesmo longe sempre me apóiam em todos os momentos de minha vida, Daniela de Paiva, Bruna de Paiva, Ana Carla Pereira, Thiago Alonso, Mariana Zerbetto, Beatriz Alonso, Vanessa Ransani, Ritinha Minarbini, Larissa

Ronsani, Patrícia Garcia, Barbara Belizário, Daiane Borghesi, Gislaine Silva entre outros.

A todos os técnicos de laboratórios Dra. Rose Eli Grassi Rici, Ednaldo Farias por toda contribuição, ajuda e amizade. Agradeço em especial o técnico Ronaldo Agostinho, pela amizade e paciência e pelo grande auxílio na parte histológica do meu projeto.

A secretaria do departamento Jaqueline Santana, pela atenção e dedicação.

Agradeço a todos os funcionários que sempre nos proporcionaram um ambiente muito agradável, principalmente a Ana Paula da Silva, que contagia a todos com sua alegria e bom humor. E também ao José Augusto Feitosa Eulalio por toda ajuda.

As bibliotecárias Elsa Maria Rosa Bernardo Faquim e Neusa Kasue Habe pela dedicação e atenção. Muito obrigada.

A Prof. Doutora Margareth de Lara Capurro-Guimalhães responsável pela doação de ovos e larvas de *Aedes* do Departamento de Parasitologia ICB/BMP, em especial agradeço ao seu doutorando Danilo de Oliveira Carvalho, que sempre teve disponibilidade e atenção nos momentos que precisei.

A Prof. Dra. Valéria Cristina Soares Pinheiro, diretora do CESC/ UEMA, criadouro de insetos, instalado na UEMA, Universidade Estadual do Maranhão, na cidade de Caxias, no Estado do Maranhão, pela doação de ovos usados neste projeto.

Aos profissionais do INPA (Instituto Nacional de Pesquisa do Amazonas), a Prof. Dra. Vera Margarete Scarpassa pelo auxílio num momento difícil, e pelos colaboradores Prof. Ms. Gersonval Leandro Monte e Prof. Dr. Ronildo Baiatone Alencar pela confiança e auxílio num momento de extrema necessidade, e pelos ensinamentos com dissecação de larvas de *Aedes aegypti*.

A Prof. Dra. Ormezinda Celeste Cristo Fernandes da FioCruz (Fundação Oswaldo Cruz) de Manaus –AM, pelo auxílio com a identificação dos gêneros dos fungos

presentes na cultura celular, principalmente por sua aluna de mestrado Silmara Mundim, que auxiliou em toda parte prática.

A Prof. Dra. Marta Maria Antoniazzi do departamento de biologia celular do instituto Butantan, pelo sedimento do aparelho de Varredura utilizado neste trabalho, principalmente pela técnica responsável Beatriz Maurício, que me ensinou e auxiliou na execução desta técnica.

Ao técnico do departamento de Histologia do Departamento de Patologia Claudio Arroyo pelo auxílio na confecção das lâminas histológicas.

A Prof. Dra. Cláudia Regina Stricagnolo do Departamento de Microbiologia pela ajuda com a identificação dos agentes contaminantes.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste projeto.

Por fim, agradeço a FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), pela oportunidade e financiamento durante a realização deste trabalho.

EPIGRAFE

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito.
Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

(Marthin Luther King).

“Eu tentei 99 vezes e falhei. Mas na centésima tentativa eu consegui. Nunca Desista de seus objetivos, mesmo que eles pareçam impossíveis. A próxima tentativa pode ser a vitoriosa.”

(Albert Einstein)

RESUMO

MARIO, L. C. **Isolamento e caracterização de células indiferenciadas de ovos embrionados de *Aedes aegypti* (Linnaeus 1762)**. [Isolation and characterization of undifferentiated cells of embryonated eggs from *Aedes aegypti* (Linnaeus 1762)]. 2015. 68 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Um dos grandes problemas da saúde pública no país esta diretamente ligada à dengue, uma vez que aproximadamente 550 mil pessoas são infectadas anualmente, e cerca de 20 mil vêm a óbito. Esta doença é causada pelo vírus da família Flaviviridae, transmitido pela fêmea ao hospedeiro durante o repasto sanguíneo. Este projeto teve como objetivo isolar e caracterizar células indiferenciadas de ovos embrionados e do tubo digestivo de larvas em quarto instar de *Aedes aegypti*, como fonte de pesquisa na área de biologia celular e estrutural destes vetores. Mediante cultura celular, as células foram isoladas e recultivadas em meio de cultura DMEM-High, e temperatura de 28 °C. As seguintes análises foram feitas: morfologia celular, ciclo celular, testes de imunofenotipagem pelo método de citometria de fluxo e análise de imunohistoquímica. As células de *Aedes aegypti* analisadas pela morfologia celular, apresentaram formato globóide, tamanho pequeno e população heterogênea. A análise das fases do ciclo Sub-G1, G0-G1, S e G2-M após cultura primária de ovos embrionados atingiram (27,5%; 68%; 30,2% e 1,9%, respectivamente). Após 24 horas atingiram (10%; 92,4%; 6,2% e 0,6%, respectivamente). A análise de imunofenotipagem realizada pelo método de citometria de fluxo demonstrou em ovos embrionados, marcações positivas para pluripotência, assim como baixa expressão para Oct 3/4, e alta expressão para o (Sox2). As células mesenquimais tiveram alta expressão para os marcadores (Stro-1, Vimentina e Nestin). O marcador de morte celular por apoptose (Caspase3), teve alta expressão nas células cultivadas, enquanto que os marcadores endossômicos específicos para células de insetos (Anti GM130 e Anti RAB-5) também foram altamente expressos. Na cultura celular derivada do tubo digestivo de larvas de *Aedes aegypti*, as análises dos marcadores para pluripotência tais como Oct 3/4 não demonstrou expressão, entretanto, o marcador Sox2 foi altamente expresso na cultura. Para as células mesenquimais não houve expressão de nenhum marcador

utilizado, ou seja, (Stro-1, Vimentina e Nestin). No entanto para o marcador de morte celular por apoptose (Caspase 3) as células em cultura demonstraram alta expressão, enquanto que para os marcadores endossômicos específicos de insetos os mesmos foram altamente marcados. O teste de imunohistoquímica realizado em ovos embrionados no final do período embrionário demonstrou que as células tinham potencial proliferativo mediante marcação positiva para PCNA. As células pluripotentes foram pouco expressas pelos marcadores Nanog, Oct 3/4, e muito expressas pelo marcador Sox2. As células de origem mesenquimais foram altamente expressas pelos marcadores SSEA-4, Stro-1, Vimentina e Nestin assim como para os marcadores endossômicos específicos para células de insetos, os quais demonstraram alta expressão nas células de embriões de *Aedes*. Sendo assim, conclui-se que tanto ovos embrionados quanto larvas de quarto instar de *Aedes aegypti* possuem células indiferenciadas, com grande potencial para estudos com biologia molecular, visando o controle biológico deste vetor.

Palavras-chave: *Aedes aegypti*. Dengue. Cultivo celular. Células-tronco.

ABSTRACT

MARIO, L. C. **Isolation and characterization of undifferentiated cells of embryonated eggs from *Aedes aegypti* (Linnaeus 1762)**. [Isolamento e caracterização de células indiferenciadas de ovos embrionados de *Aedes aegypti* (Linnaeus 1762)]. 2015. 68 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

A major problem of public health in the country is directly linked to dengue, as approximately 550 million people are infected annually, and about 20,000 have died. This disease is caused by the virus of the Flaviviridae family, transmitted by the female to the host during blood feeding. This project aimed to isolate and characterize stem cells from fertilized eggs and larvae gut fourth instar *Aedes aegypti*, as a source of research in cell biology and structural area of these vectors. Upon cell culture, the cells were isolated and recultured in DMEM-high culture temperature and 28 ° C. The following analyzes were performed: cell morphology, cell cycle tests immunophenotyping by flow cytometry and immunohistochemistry analysis. The *Aedes aegypti* cells analyzed by cell morphology showed globular shape, small size and heterogenic population. The analysis of sub-G1 phase of the cycle, G0, G1, S and G2-M after primary culture reached embryonated eggs (27.5%, 68%, 30.2% and 1.9%, respectively). Achieved after 24 hours (10%, 92.4%, 6.2% and 0.6%, respectively). Immunophenotyping analysis by flow cytometry demonstrated in embryonated eggs, positive for pluripotency markers, as well as low expression of Oct 3/4 and high expression for the (Sox2). The mesenchymal cells had high expression for markers (Stro-1, vimentin and Nestin). The marker of cell death by apoptosis (Caspase3) had high expression in cultured cells, whereas the endosomal markers specific for insect cells (GM130 and Anti-Anti RAB 5) were also highly expressed. In cell culture derived from the gut of larvae of *Aedes aegypti*, the analysis of pluripotency markers such as Oct for 3/4 showed no expression, however, the marker Sox2 was highly expressed in the culture. For mesenchymal cells no expression of any label used, ie (Stro-1, Nestin and vimentin). However marker for cell death by apoptosis (caspase 3) cells in culture showed high expression, whereas for the specific endosomal markers insects they were highly labeled. The immunohistochemistry test on embryonated eggs at the end of the incubation period the cells have demonstrated potential ploriferativo by positive staining for PCNA. Pluripotent cells were slightly expressed by markers Nanog, Oct

3/4, Sox2, and expressed by the marker. The cells of mesenchymal origin were highly expressed by SSEA-4 markers, Stro-1, Nestin and vimentin as well as the specific endosomal markers for insect cells, which showed high expression in cells of Aedes embryos. Therefore, it is concluded that both embryonated eggs as room instar larvae of Aedes aegypti have undifferentiated cells, with great potential for studies of molecular biology, targeting the biological control of this vector.

Keyword: Aedes aegypti. Dengue. Cell culture. Stem cells.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1	BIOLOGIA DA ESPÉCIE	21
2.2	DOENÇA DENGUE	23
2.3	DOENÇA CHIKUNGUNYA.....	24
2.4	CULTIVO DE CÉLULAS DE INSETO.....	24
2.5	CÉLULAS-TRONCO.....	26
3	OBJETIVO GERAL	27
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
4	HIPOTESE	28
5	MATERIAL E MÉTODOS	29
5.1	COLETA DO MATERIAL.....	29
5.2	CARACTERÍSTICA MICROSCOPICA DO EMBRIÃO.....	29
5.3	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	30
5.4	CULTIVO CELULAR.....	31
5.5	CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DAS CÉLULAS	32
5.6	ANÁLISE DAS FASES DO CICLO CELULAR.....	32
5.7	ANÁLISES POR IMUNOFENOTIPAGEM PELA CITOMETRIA DE FLUXO	33
5.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	34
5.9	IMUNOHISTOQUIMICA	34
6	RESULTADOS	35
6.1	ANÁLISE MORFOLÓGICA DO TECIDO EMBRIONÁRIO DE <i>Aedes aegypti</i>	35
6.2	ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO CELULAR.....	36
6.3	MORFOLOGIA CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO	39

6.4	ANÁLISES DAS FASES DO CICLO CELULAR	40
6.5	ANÁLISES POR IMUNOFENOTIPAGEM MEDIANTE A UTILIZAÇÃO DA TÉCNICA DE CITOMETRIA DE FLUXO	41
6.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	47
6.7	ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA	50
7	DISCUSSÃO	55
8	CONCLUSÃO	61
	REFERÊNCIAS	62

1 INTRODUÇÃO

A partir do século XIX várias hipóteses relacionadas à participação de insetos da família Culicidae, como transmissores de infecções, vêm sendo descritas. Desde então o número de pesquisas sobre estes Dípteros tem aumentado consideravelmente, sendo que aqueles pertencentes ao filo Artrópodes constituem o maior grupo de pesquisa na atualidade (FORRATTINI, 2002).

A dengue é uma doença emergente que se espalha pelo mundo em um ritmo muito acelerado. Cerca de 100 milhões de pessoas são infectadas anualmente e destas cerca de 20 mil vem a óbito. Dengue é uma doença em expansão, necessitando cada vez mais do auxílio financeiro do setor da saúde. Em 2013 ocorreu uma grande epidemia no Brasil, e o Ministério da Saúde investiu um total de 173 milhões no combate a esta doença. Em 2014 até o mês de julho foram registrados 688.287 casos de dengue no país. A região do país onde a doença foi predominante foi o Sudeste com 57,8% dos casos comparados com os demais. Em seguida surge a região Centro-Oeste com 18,2% dos casos, Nordeste, 12,3%; Sul, 6,8% e Norte, 4,9% (MENDONÇA et al., 2003; BARROS et al., 2007; BRASIL, 2009; BRASIL, 2014).

No Brasil, nos últimos dez anos, foram verificados cerca de 82.039 casos graves da doença, sendo que 2.931 pessoas vieram a óbito (BRASIL, 2013). De janeiro a abril de 2012, foram notificados 74 óbitos por dengue. No mesmo período do ano de 2011, o número de mortes foi 80,2% maior, comparado a 2012, sendo um total de 374. Os casos relatados da doença nos quatro primeiros meses de 2012 também foram menores relacionados ao mesmo período de 2011. Em 2011 os casos da doença chegaram a 507.798, e no ano de 2012 este valor reduziu para 286.011, uma queda de 43,7% comparada ao ano anterior. Mesmo assim estes valores são elevados para esta doença. Atualmente o país gasta em média cerca de 800 milhões anualmente no combate a dengue (BRASIL, 2013)

Sabe-se que o maior vetor da dengue é o *Aedes aegypti*, o agente etiológico é um arbovírus do gênero *Flavivírus*, pertencente à família Flaviviridae (BARROS, 2007), transmitido pela fêmea ao hospedeiro durante o repasto sanguíneo (GLUBER et al., 2001). Este vírus possui quatro sorotipos, o DENV1, DENV2, DENV3 e DENV4. A circulação simultânea de diferentes sorotipos acaba por aumentar as

infecções sucessivas, favorecendo assim o aparecimento de novas formas clínicas mais graves da doença, como foi evidenciado, pela presença de formas hemorrágicas após a introdução do DEN-2 (GUSMAN, 2010; PESSOA et al., 2005). Outra espécie que também é responsável pela transmissão desta enfermidade é o mosquito *Aedes albopictus* mais comumente encontrado em florestas e zona rurais. Suas fêmeas apresentam os mesmos padrões do *Aedes aegypti*, porém com uma ressalva, além de sangue humano, suas fêmeas também se alimentam de sangue animal (GUZMAN; KOURI, 2001).

Outra enfermidade causada pelo mesmo mosquito transmissor da dengue é a febre da Chikungunya, doença com características muito semelhantes às encontradas na dengue, porém o arbovírus transmissor da mesma pertence à família Togaviridae (KUNIHOLM et al., 2006). Em 2014, segundo dados da Organização Pan-Americana da Saúde, 33 países das Américas foram notificados como transmissores desta doença, totalizando 570.972 casos suspeitos (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE 2014).

Para entender melhor o funcionamento do organismo dos insetos, várias pesquisas vem sendo realizadas, linhagens celulares têm sido estudadas desde o primeiro isolamento celular, realizada por Grace (1959). As populações de células tronco de insetos apesar de serem distintas quanto às espécies e os tecidos, apresentam características semelhantes em seu desenvolvimento (GRACE, 1959; WONG et al., 2005; NYSTUL, 2006).

Estudos realizados recentemente com células-tronco de insetos foram descritas em vários tecidos, porém os tipos celulares mais estudados são células-tronco de intestino médio (LOEB et al., 1996; LOEB et al., 1999; LOEB et al., 2003; MICHELLI; PERRIMON, 2006; OHLSTEIN; SPRADLING, 2006; BATON; RANFORD-CARTWRIGHT, 2007; HAKIM et al., 2009; NARDI et al., 2010; NAVASCUÉS et al., 2012), e do folículo ovariano (PETERSON et al.; 2003; SWEVERS; IATROU, 2003; SWEVERS et al., 2005; BELLES; PIULACHS, 2014; JIA et al., 2014) tanto em células embrionárias como também em adultas a partir de uma vasta diversidade de insetos.

As células-tronco são células indiferenciadas, precursoras que tem a capacidade de se diferenciar em um tecido, tem como repor algumas populações de células-tronco quando necessário. Existem vários tipos de células-tronco, sendo a mais simples Unipotente, que pode se diferenciar em apenas um tipo celular

específico (LI; XIE, 2005). As células germinativas são aquelas responsáveis pela formação de gametas e também pela auto-renovação celular, (EXTAVOUR et al., 2003). As células embrionárias são derivadas da massa interna do blastocisto, e tem grande capacidade proliferativa (RAFF, 2003). Este tipo celular é muito utilizado para produção de linhagens celulares *in vitro* em pesquisas (SCHNEIDER, 1972). As células multipotentes são aquelas com capacidade limitada de diferenciação (KULTERER et al., 2007). Em insetos as células-tronco multipotentes não são muito definidas assim como nos mamíferos. Dentre elas incluem-se as linhagens celulares neurais, hematopoéticas, e as células-tronco epiteliais do intestino médio. Estas células apresentam duas fases bem marcantes, células imaturas e as adultas (RAFF, 2003). Por fim, as células com maior grau de diferenciação são as células totipotentes, que podem dar origem a todas as células do embrião, bem como dos seus anexos embrionários (SMITH, 2001).

Devido aos dados mencionados acima, a dengue é uma doença em expansão, necessitando muito de auxílio do setor da saúde. Por este fato, investimentos em novas pesquisas nas áreas de engenharia genética e biologia molecular dos vetores transmissores devem ser realizados. A cultura de células embrionárias do mosquito *Aedes aegypti*, pode contribuir para novas estratégias no desenvolvimento de novos medicamentos e terapias específicas ainda não existentes.

No presente projeto, objetiva-se obter e caracterizar células indiferenciadas de insetos, como fonte de estudo para a biologia celular e estrutural. Por estarem envolvidas no desenvolvimento e no controle da infecção pelo vírus, estudos com essas células representam uma ferramenta importante para a biotecnologia, com consequentes informações inovadoras à saúde pública.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 BIOLOGIA DA ESPÉCIE

Atualmente, mais de três mil espécies de mosquitos são conhecidos, dispersos por todo o mundo, com exceção da Antártica que é um continente congelado (FORRATINI, 2002).

O gênero *Aedes*, pertence à ordem Díptera, subordem Nematocera, família Culicidae, subfamília Culicinae. Esta subfamília é considerada a maior existente, reunindo 10 tribos e 34 gêneros distintos, sendo sete tribos e 18 gêneros de ocorrência no Brasil, dentre eles o gênero *Aedes* (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994).

A tribo a qual pertence o gênero *Aedes* chama-se Aedini, e nela estão inclusos mais dois gêneros que ocorrem no Brasil, o *Psorophora* e *Haetnagogus*. Nesta tribo estão agrupadas dezenas de espécies cujos hábitos diferem bastante entre si. Contudo, boa parte dos Aedini é de hábito diurno ou crepuscular vespertino (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994). Este inseto é considerado um mosquito tropical e subtropical, caracterizando-se como um inseto de clima quente, também já foi encontrado em regiões de baixa temperatura, como nos Estados Unidos. Nesses casos acredita-se que o inseto fique em locais protegidos esperando que a temperatura aumente (FORATTINI, 2002).

A espécie *Aedes aegypti* é caracterizada por um alto nível adaptativo ao ambiente urbano (SILVA, 1998; LIMA-CAMARA et al., 2006); este fato ocorre devido à fêmea necessitar de hospedeiros para seu repasto sanguíneo (FORATTINI, 2002). Suas espécies são muito agressivas e oportunistas, depositando seus ovos isoladamente sobre a superfície líquida ou em um substrato úmido, próximo à água ou em local inundável (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994). No Brasil, todos os estados apresentam altos índices de disseminação de *Aedes aegypti* sendo muito susceptíveis ao vírus da dengue (LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 2004).

Os insetos se reproduzem através de feromônios sexuais, os quais são detectados pelo indivíduo do sexo oposto de cada espécie. Essa substância, quando liberada, é um sinal de início do período reprodutivo destes animais (ZARBIN et al., 1998).

Várias espécies do gênero *Aedes*, *Psorophora* e *Haetnagogus* produzem ovos resistentes à dessecação (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994). A oviposição ocorre no período diurno com um pico matutino (6 h e 8h), e um pico vespertino (16h às 18h) (GOMES et al., 2006). Uma fêmea não tem um número constante de ovos liberados por dia, sendo dependente da quantidade de sangue que ela vai ingerir. A média da quantidade diária de ovos é em torno de 120 (FORATTINI, 2002).

Os criadouros destes ovos, representados pelas poças de água e pelos recipientes naturais e artificiais, são preenchidos quase somente na época chuvosa. Com o aumento da precipitação pluviométrica, simultânea às ascensões térmicas que precedem a chegada do verão e que se mantêm durante esta estação, estes criadouros passam a ser ciclicamente reabastecidos de água, desencadeando o processo de eclosão dos ovos depositados ali meses antes. Assim, as chuvas influenciam positivamente na densidade desses insetos, elevando-a enormemente nessas ocasiões (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994).

Neste caso, após o período necessário para o desenvolvimento embrionário inicial, passado em ambiente ainda úmido, os ovos podem permanecer mais de um ano em locais secos (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994). O *Aedes aegypti* possui um ciclo de vida do tipo holometábolo, ou seja, durante seu desenvolvimento o inseto passa por quatro estágios (ovo, quatro ínstares larvais, pupa e adulto) com forma de alimentação e habitat distintos (LOZOVEI, 2001).

A eclosão das larvas ocorre de dois a três dias após a oviposição, caso as condições ambientais sejam favoráveis, e tem como principal estímulo o contato com a água do criadouro (FORATTINI, 2002; VITAL et al., 2010). As formas imaturas se desenvolvem em água doce e parada, com pouca matéria orgânica em decomposição (CONSOLI; OLIVEIRA 1994).

As larvas nascem facilmente, com um posterior contato dos ovos com a água. Devido a essa característica, os insetos da tribo Aedini têm os criadouros transitórios, que são condicionados diretamente pelas chuvas, como os seus preferenciais. Decorrente disso, sua população de alados sofre flutuação grande e abrupta de densidade no ciclo anual, isto é, seu ciclo anual é controlado pela quantidade de chuvas e pela temperatura ambiente. (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994).

As larvas de *Aedes* apresentam sifão curto, quase cônico, geralmente bem escurecido, constituída de apenas um par de pêlos, embora quase sempre múltiplos

e desenvolvidos. A sela do segmento X é geralmente incompleta (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994).

Outra espécie muito estudada é o *Aedes albopictus* que assim como o *Aedes aegypti* também transmite o vírus da dengue, apenas com uma diferença, as fêmeas do vetor além de sangue humano também se alimentam de sangue animal (GUZMAN; KOURI, 2004).

2.2 DOENÇA DENGUE

Primariamente o vírus da dengue era mantido em ciclos de transmissão silvestres, envolvendo primatas inferiores e os mosquitos *Aedes aegypti*, na Ásia e na África. Ele se adaptou ao ambiente urbano, principalmente em áreas tropicais. Durante o século XX, a transmissão do vírus da dengue tornou um grande problema para a saúde pública (GUBLER, 2001; BARRETO; TEIXEIRA 2008).

A dengue é uma infecção preocupante, de alto poder disseminativo, seus vírus circulam pelos cinco continentes e tem um alto potencial para causar a forma grave da doença que pode ser letal (HALSTEAD, 1997; TAUILL, 2002).

Existem quatro tipos diferentes do vírus da dengue, os sorotipos DENV I, DENV II, DENV III e DENV IV, pertencentes ao gênero *Flavivirus* (COSTA et al., 2009).

Mais de 90% das doenças vinculadas ao homem por insetos ocorrem nas regiões tropicais (ARAUJO, 2009) e a incidência do caso de dengue tem aumentado muito nos países tropicais e subtropicais, como é o caso das Américas, aumentado significativamente. Os casos fatais da doença têm sido mais comuns no sudeste da Ásia e no oeste do Pacífico. Isso se relaciona com o crescimento da urbanização não planejada, resultando em grande impacto ambiental, quanto à deterioração dos sistemas de saúde e facilidade de disseminação de genótipos virais mais virulentos em indivíduos mais susceptíveis (GUZMÁN; KOURÍ, 2001).

Quando uma pessoa é infectada pelo vírus, em torno de 3 a 14 dias ocorre o período de incubação, onde o indivíduo fica sem sintomas, apenas procedendo aos primeiros episódios de febre (GUBLER, 2001). O período de viremia, ou seja, o período onde o vírus pode ser isolado do sangue circulante começa dois dias antes

do sintoma e vai até cinco ou seis dias após os quais ocorrem clearance da circulação e aparecimento de anticorpos neutralizantes (FONSECA; FONSECA, 2002).

2.3 DOENÇA CHIKUNGUNYA

Esta doença é causada por um vírus de RNA (CHIK V) do gênero *Alphavirus*, sendo transmitido para o ser humano pela fêmea do mosquito do gênero *Aedes* durante seu repasto sanguíneo, assim como a dengue (BRASIL, 2010).

A febre de Chikungunya foi constatada no país pela primeira vez em 2010 (BRASIL, 2010), transmitida por pacientes oriundos de locais infectados. Porém, apenas em setembro de 2014, o Ministério da Saúde lançou dados endêmicos da doença no Brasil. Foram registrados 79 casos, 41 autóctones, ou seja, pessoas que se infectaram com o vírus, sem terem estado nos locais onde a doença já existia, e 38 casos de pessoas que viajaram para fora do Brasil, para lugares com infestação da doença (BRASIL, 2014). Tanto o mosquito *Aedes aegypti* quanto o *Aedes albopictus* são transmissores da febre de Chikungunya nas Américas, nas diferentes regiões do continente (BRASIL, 2010).

2.4 CULTIVO DE CÉLULAS DE INSETOS

No Brasil muitas pesquisas estão sendo realizadas com o uso de patógenos como é o caso do baculovírus, que causam doenças fatais a esses organismos. Baculovírus são partes integrantes do ecossistema e têm importância significativa na regulação da população de insetos (SANDERSON et al., 1999).

O primeiro cultivo de células de insetos ocorreu no período de 1915 / 1959, e nesta época, ainda não havia uma linhagem de células (GRACE, 1959).

As tentativas iniciais dos cultivos de células de insetos tinham na época enfoques muito diferentes dos atuais. O interesse pelo cultivo baseava-se no estudo da fisiologia do inseto, como por exemplo, estudos da gametogênese, morfogênese

e diferenciação, seguidas do estudo da atuação de hormônios em insetos, dentre outros. Estas células também são utilizadas na produção de proteínas recombinantes de mamíferos, por serem capaz de realizar modificações de pós-tradução na complexidade requerida (BATISTA et al., 2003).

Ao contrário de alguns microrganismos, as células de inseto cultivadas não são capazes de sobreviver de maneira independente em um ambiente que não conserve as condições do tecido original, do qual as mesmas são oriundas, fato que aumenta a complexidade no entendimento das necessidades do sistema e no diagnóstico de problemas (BATISTA et al., 2003).

As células de insetos, geralmente, são cultivadas em suspensão. Portanto, não necessitam de suporte sólido, desenvolvendo-se livremente no meio de cultura. São mantidas mediante repiques sucessivos, pela retirada do meio saturado por metabólitos e desprovido de nutrientes, e a subsequente adição de meio fresco (BATISTA et al., 2003). Segundo Mitsuhashi (1989) outros fatores que influenciam o cultivo celular, são a temperatura, o pH, a pressão osmótica, a agitação e a concentração de oxigênio dissolvido.

Células de insetos são significativamente mais robustas quanto ao cultivo, principalmente em relação à sua manutenção, facilidade de adaptação na mudança de sistemas aderentes para suspensos, e principalmente por apresentarem maior resistência a estresse ambiental, tais como mudanças de pH e de osmolaridade (IKONOMOU et al., 2003).

A osmolaridade pode variar no decorrer do seu crescimento, como resultado de fatores tais como o acúmulo de produtos metabólicos, a adição de agentes anti-espumantes, a alimentação de nutrientes, entre outros. O emprego de meios com osmolaridade superior a 400mOsm/kg, costuma resultar em forte estresse osmótico para as mesmas (TONSO, 2000).

Dentre os diversos meios de cultivo que podem ser empregados no desenvolvimento e proliferação de células de insetos, destacam-se os meios, Sf900II e o meio de Grace. Estes meios, quando adequadamente suplementados com soro fetal bovino, podem ser empregados na cultura de células de insetos, como por exemplo, os Lepidópteros e Dípteros (BATISTA et al., 2003).

Um dos meios mais utilizados para o cultivo das células de insetos é o de Grace, o qual apresenta elevada quantidade de carboidratos (27g/L de sacarose), empregados na manutenção adequada da pressão osmótica do meio, de cerca de

300mOsm/kg. Isso demonstra que as células de inseto podem também tolerar altas concentrações de açúcares. Os meios de cultura são formulados normalmente para apresentarem valores entre 260 a 330mOsm/kg (FRESNHEY, 1994).

Segundo Batista et al. (2003), o meio Grace pode ser adequadamente suplementado com soro fetal bovino, e empregado na cultura de células de lepidópteros e também de alguns dípteros (artrópodes da classe Díptera, como moscas e mosquitos).

2.5 CÉLULAS-TRONCO

Células-tronco são células indiferenciadas ou com baixo grau de diferenciação, encontradas em tecidos embrionários e extra-embrionários. Elas podem permanecer em estado quiescente até a fase adulta, através da auto-replicação, ou diferenciar-se em diversos tecidos, a partir da expressão de determinados genes, e exercer funções específicas (SOUZA et al., 2003; ZAGO; COVAS, 2006).

Segundo Watt e Hogan (2000), o termo células tronco, do inglês “stem cells”, diz respeito a células precursoras que possuem a capacidade de diferenciação e de auto-renovação, ilimitadas, podendo dar origem a uma variedade de tipos teciduais.

Muitos tecidos, incluindo as células do sangue, pele, intestino, são continuamente mantidos por tecido de células-tronco. Sob certas condições, outros órgãos podem ser reparados utilizando células-tronco como progenitores gerados pela célula de diferenciação (KAI; SPRADLING, 2004).

O ovo de *Drosophila* forma na extremidade anterior do ovário uma estrutura chamada germário, a qual abriga a linhagem germinal e as células-tronco somáticas. No germário, as células germinativas dividem-se assimetricamente e dão origem ao cistoblasto (ROTH, 2001).

3 OBJETIVO GERAL

Isolar e caracterizar células indiferenciadas, precursoras da musculatura lisa, da massa de ovos embrionários de *Aedes aegypti* através do desenvolvimento embrionário, para obtenção de um modelo de linhagens celulares.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estabelecimento de um protocolo adequado para cultivo de células embrionárias, expansão, manutenção e congelamento desta espécie.
- Realizar micro dissecação em lupa, para isolar o tubo digestivo de larvas, e obter células indiferenciadas específicas.
- Utilizar marcadores específicos para isolar e caracterizar as células indiferenciadas por citometria de fluxo e imunohistoquímica.
- Obter um banco de células tronco embrionárias para sua manutenção e expansão.

4 HIPOTESE

As células indiferenciadas de ovos embrionados e do tubo digestivo de larvas podem ser isoladas e cultivadas para novas pesquisas envolvendo biologia molecular.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

Para realização desta pesquisa, foram utilizados ovos embrionados de *Aedes aegypti* no final do período embrionário. Todo o projeto estava de acordo com as normas de bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

5.1 COLETA DO MATERIAL

As coletas dos ovos e larvas de *Aedes aegypti* foram feitas em dois locais, no criadouro de insetos, instalado na UEMA, Universidade Estadual do Maranhão, na cidade de Caxias, no Estado do Maranhão, cedido pela professora Dra. Valéria Cristina Soares Pinheiro, diretora do CESC/ UEMA. O material foi coletado em agosto de 2013 e em fevereiro e agosto de 2014. Depois da coleta, os ovos foram mantidos a temperatura ambiente para realização do cultivo celular. A segunda coleta ocorreu no criadouro de Culicídeos do Departamento de Parasitologia ICB/BMP, cedido pela professora Doutora Margareth de Lara Capurro. O material (ovos e larvas) foi coletado em fevereiro, agosto e outubro de 2014. Após as coletas o material foi mantido em temperatura ambiente para o cultivo celular.

5.2 CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS DO EMBRIÃO

Para o processamento histológico, os ovos embrionados foram previamente fixados em solução de formaldeído 10%. Em seguida, sofreram desidratação em uma série de etanóis em concentrações crescentes (de 70 a 100%) cinco minutos cada, diafanizados em xilol I e II por cinco minutos, e embebidos em parafina (Histosec® - MERCK, lote K91225309). Na sequência, o material foi submetido à microtomia, obtendo-se cortes de espessura de 3µm, em um micrótomo automático (Leica, RM2165). Os cortes foram aderidos em lâminas histológicas e deixados em

estufa a 60 °C para serem desparafinizados. Em sequência, os cortes foram corados a partir da técnica de Hematoxilina e Eosina – HE modificada, onde as lâminas foram deixadas em Xilol e na serie crescente de álcool. Na sequência as mesmas permaneceram em água corrente por cinco minutos. Feito isso, as lâminas ficaram 2 minutos e meio na Hematoxilina, e foram lavadas a seguir por cinco minutos em água corrente. Após este procedimento, as lâminas permaneceram por dez segundos na Eosina, para posteriormente passarem um banho em água, álcool 95%, álcool 100% e álcool 100%. Após este procedimento as mesmas foram deixadas por deixou um minuto em Xilol-Álcool, e depois mais dois minutos no Xilol I e II, feito isso. Realizou-se então a montagem das lâminas. Por fim, o material foi analisado e as características morfológicas encontradas foram devidamente fotodocumentadas em Câmera Sony MVC – CD500.

5.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

O material foi primeiramente fixado em glutaraldeído 2%, foi lavado com solução tampão Cacodilato de sódio, (pH 7,2) por três vezes consecutivas durante 15 minutos. Em seguida realizou-se impregnação em ósmio a 1% por 1 hora, e, após esta sequência, foi realizada nova lavagem com solução tampão de Cacodilato de Sódio por três vezes de 15 minutos. Em sequência, realizou o procedimento de limpeza do material mediante utilização de um desengordurante/desinfetante, constituído de hipoclorito de sódio a 2,025%, lauril éter sulfato de sódio, amina oxida e hidróxido de sódio, por cinco minutos. Tal procedimento ocorreu com auxilio de aparelho de ultrassonografia seguido de quatro banhos com duração de três minutos em água destilada no ultrassom. Após verificação da condição do material em uma lupa, repetia-se o procedimento. Procedeu-se então a desidratação em serie etanóica em concentração crescente, obedecendo a seguinte sequência, 15 minutos em álcool a 15%, 15 minutos em álcool à 30%, 15 minutos em álcool à 50%, 15 minutos em álcool à 70% , 15 minutos em álcool à 90% e 15 minutos em álcool à 100%. A secagem do material foi feita mediante a utilização de ponto crítico, utilizando gás carbônico como líquido do fluído de transição. Depois, as estruturas foram montadas em stubs, seguida da utilização do sistema sputtering para fazer a

cobertura metálica (ouro). A leitura do material foi realizada em microscópio eletrônico de varredura FEI Quanta 250. Estas técnicas foram necessárias para identificação dos diferentes seguimentos do tubo digestivo bem como da identificação das características histológicas deste tecido. Com o auxílio da microscopia eletrônica de varredura pudemos observar as regiões bem delimitadas do tubo digestivo tais como: região do intestino anterior, médio, túbulos de Malpighi e intestino posterior. Com a técnica da microscopia de luz, pudemos identificar os tecidos que compõem o tubo digestivo tais como o tecido epitelial, sua musculatura e também células-tronco indiferenciadas.

5.4 CULTIVO DO CELULAR

O estabelecimento de cultura primária destes ovos foi realizado utilizando-se protocolo de cultivo celular, para testar o cultivo e a sua viabilidade celular.

Os ovos de *Aedes aegypti* eram depositados pela fêmea, diretamente em um papel filtro, e após a coleta, estes eram acondicionados em um gral. Os ovos foram lavados com solução Tween a 20% e 10% por duas vezes respectivamente, agitando bem antes de cada lavagem, objetivando-se retirar a camada de sujeira que se encontrava sobre os ovos. Em seguida quatro lavagens com Solução de Phosphate Buffered Saline (PBS) foram feitas, agitando-as bem em cada lavagem. Posteriormente, realizou-se uma lavagem com gentamicina e com estreptomicina e penicilina, deixando agir por cinco minutos cada lavagem. Na sequência, os ovos foram cobertos por Anfotericina B, deixando a substância agir cerca de cinco minutos. Novas quatro lavagens com solução PBS foram feitas depois destes procedimentos. Em seguida, acrescentava-se 2mL de meio DMEM-High Glucose. Com o auxílio de um pistilo, os ovos foram macerados, e colocados em cultivo celular em garrafas pequenas com meio DMEM-High na proporção 1 mL de macerado celular com 3 mL de meio DMEM-High suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) e 1% de Antibiótico (Gentamicina, Estreptomicina e Penicilina e Anfotericina B). Estas garrafas foram acondicionadas e uma estufa com temperatura de $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ umidificada.

O cultivo celular do intestino, foi feito a partir de larvas de 3 Instar, estágio mais visível para realizar a dissecação. Esta foi realizada utilizando-se uma lupa Laica S6E. As larvas foram sobrepostas a uma lâmina de microscopia, na qual adicionava-se uma gota de solução salina. Com o auxílio de um estilete cuja ponta formava um ângulo de 90 °, foi possível segurar a cabeça da larva, e, com mais um alfinete, abrir seu abdômen para retirada do aparelho digestivo. Na sequência, o material era acondicionado em um “cell strainer”, e lavado por 3 vezes com uma solução de antibiótico (Penicilina e Streptomina e PBS, numa proporção 1:100 respectivamente). Depois das lavagens, os intestinos foram dispostos em placas de cultivo de 30 mm, com 2 mL de meio DMEM-High. Na sequência com o auxílio de dois alfinetes, foram feitos cortes do material, deixando apenas pequenos fragmentos para proliferação das células. A placa era então colocada em uma estufa a uma temperatura de 27°C ± 2°C umidificada.

5.5 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DAS CÉLULAS

A morfologia celular foi observada e fotografada utilizando microscópio invertido NIKON ECLIPSE TS-100 com fase de contraste "Leitz" sistema de vídeo CCD no aumento de 20 a 40 vezes de ampliação. A cultura celular foi observada a cada 24 horas do cultivo.

5.6 ANÁLISE DAS FASES DO CICLO CELULAR

Para realização do ciclo celular, foi usado um milhão de células por amostra, num total de quatro amostras. As células em cultivo foram centrifugadas durante 10 minutos a 1800 rpm. O sobrenadante descartado e as células ressuspendidas em tampão para a retirada da citometria de fluxo (FACS FLOW - BD). Novamente as células foram centrifugadas durante 3 minutos a 2000 rpm e descartado o sobrenadante. As células foram cuidadosamente ressuspendidas em 1mL de etanol 70% RNase (invitrogen, 10777-019, concentração 0,3 mg/mL), transferidas para microtubos e armazenadas à uma temperatura de -4°C. Para o preparo do ciclo

celular, as células foram centrifugadas a 1200 rpm por cinco minutos com 1 mL de tampão Facs (PBS, EDTA 2 mM, SFB 2%). Depois, desprezava-se o sobrenadante e o *pellet* era ressuscitado em 100 µL de tampão Facs. Acrescentava-se 10 µL de triton X e 5 µL de Iodeto de Propídeo (Sigma, P4170, 1mg/ml). As amostras eram então envoltas por papel alumínio e levadas para serem lidas no Citômetro de Fluxo FACS Calibur e analisadas pelo programa Modfit 2.9.

5.7 ANÁLISES POR IMUNOFENOTIPAGEM PELA CITOMETRIA DE FLUXO

Para cada amostra utilizada na citometria de fluxo, foram usadas um milhão de células. Após o crescimento e expansão celular, o material era centrifugado à 1500rpm durante 10 minutos, para a formação do precipitado celular. Após a centrifugação, era descartado o sobrenadante e ressuscitado em 1mL solução salina 0,9% para lavagem. Em seguida o material era centrifugado à 1500rpm durante 10 minutos. Após a centrifugação, era descartado novamente o sobrenadante e acrescentado o tampão FACsFlow. A suspensão era então transferida para tubos de citometria, e adicionados os anticorpos específicos: Oct 3/4 (1:100, rabbit, policlonal, antibody ab: 137427); Vimentina (1:100, mouse monoclonal anti-human antibody: RTU-Vim V9; Novacastra wetzear, Germany) para identificação de células mesenquimais; Caspase 3 (1:100, mouse-monoclonal, Santa cruz, antibody sc 271759); Stro-1 Stro-1 (1:100, Mouse-monoclonal IgG-sc47733, Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe); Nestin (1:100, mouse-monoclonal, rat -401 sc 33677); Sox2 (1:100, goat polyclonal,y-17, sc 17320); HSP70 (mouse-monoclonal, SAS antibody ab: 2787); Anti GM 130 (rabbit-polyclonal, ab: 30637); Anti RAB 5 (rabbit-polyclonal, ab: 31261) .

As análises de expressão dos marcadores celulares foram realizadas em Citômetro de Fluxo FACS Calibur e analisadas pelo programa WinMdi 2.9. A expressão destes marcadores foi determinada pela comparação com um isótopo controle marcado com o fluorocromo FITC inespecífico.

5.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram feitas com auxílio do software Graphpad Prism 5, com um nível de significância em 5%.

5.9 IMUNOHISTOQUIMICA

Foram realizadas reações de imunohistoquímica em cortes de embriões de *Aedes aegypti* para Stro-1 (1:200) (Mouse-monoclonal IgG-sc47733, Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe); SSEA-4 (1:200) (Mouse-monoclonal IgG-sc59368, Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe); Nanog (1:200) (Goatpolyclonal IgG-n-17, sc30331, Santa cruz Biotechnology, incEurope) e PCNA (1:200, proliferating cell nuclear antigen, clone PC10, St. Louis, U.S.A). O controle negativo das reações imunohistoquímicas foi realizado utilizando o IgG (Goatanti-Mouse IgG – AP 308F, ChemicalInternational, Temecula, California, USA).

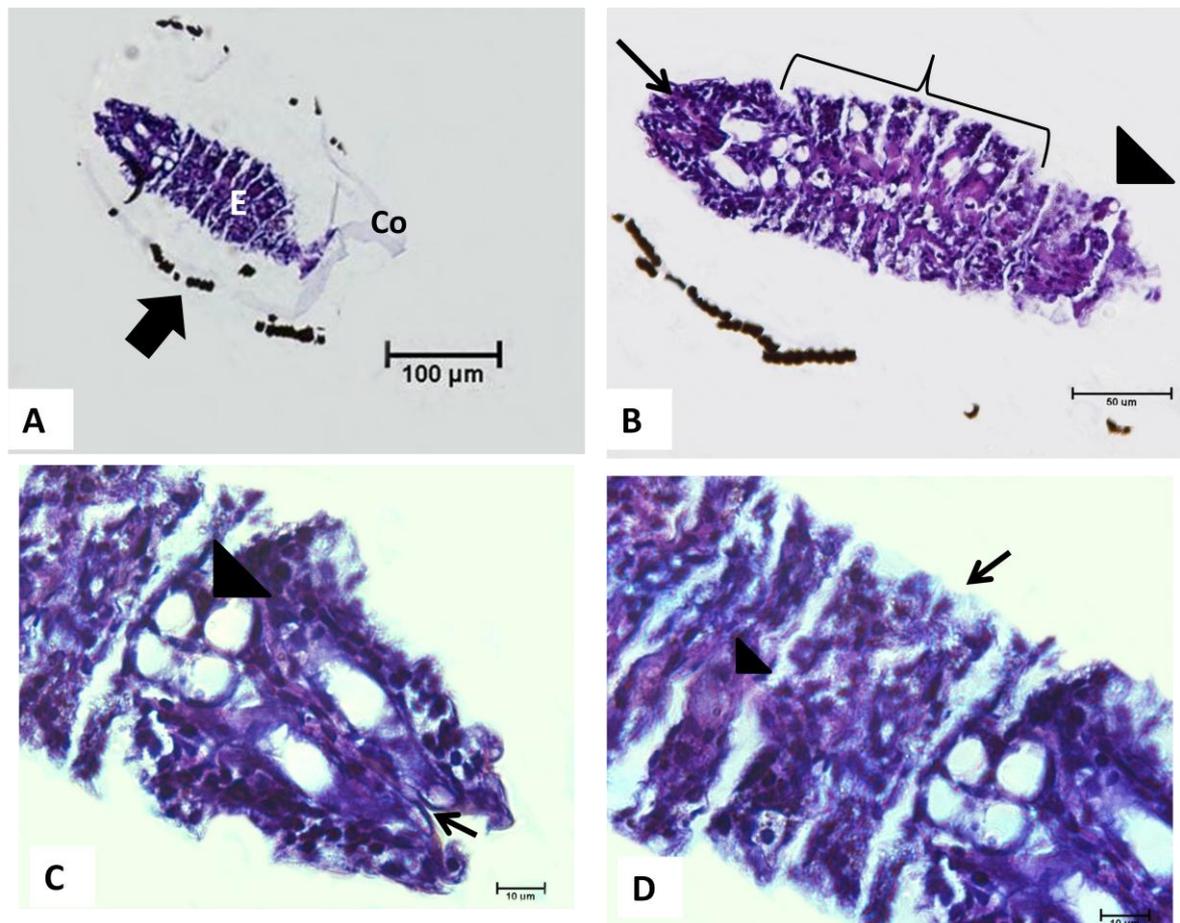
Os cortes histológicos foram desparafinizados em xilol, posteriormente sofreram o bloqueio da peroxidase endógena com 3% de H₂O₂ em etanol 100%, por 20 minutos ao abrigo da luz. Os cortes foram hidratados em concentrações decrescentes de etanol, e tratados com tampão citrato 0,1M pH 6,0 e irradiados em microondas por três vezes de 60 segundos. Os cortes foram equilibrados em tampão fosfato-salina (PBS) 0,1M pH 7,4 com o kit Dako ProteinBlock (X 0909, Dako Cytomation, Carpinteria, CA, USA) por 20 minutos. As inclusões com anticorpos primários foram realizadas em câmara úmida overnight a 4°C. Após esse período, os cortes foram lavados em PBS e incubados com o anticorpo secundário conjugado com peroxidase Kit Dako LSAB (K 0690, Dako Cytomation, Carpinteria, CA, USA) por 45 minutos, seguido de streptoavidina do mesmo Kit também por 45 minutos. A reação foi visualizada pela adição do revelador DAB (Revelador Liquido DAB + SubstrateChromogen System, Dako Cytomation, Carpinteria, CA, USA) por 5-7 minutos, seguido de contra-coloração com hematoxilina e montagem em Permout (Dako Cytomation, Carpinteria, CA, USA).

6 RESULTADOS

6.1 ANÁLISES MORFOLÓGICAS DO TECIDO EMBRIONÁRIO DE *Aedes aegypti*

Mediante análise histológica realizada nos embriões contidos nos ovos de *Aedes aegypti* observou-se que estes se encontravam no final do período embrionário. Eles apresentavam as seguintes divisões: cabeça, tórax e abdômen, composto por oito segmentos abdominais. Neste estágio os embriões possuem as mesmas estruturas presentes nas larvas de primeiro instar (Figura 1A).

Figura 1 - Análise histológica de ovos embrionados de *Aedes aegypti*



Fonte: (MARIO, L. C., 2015)

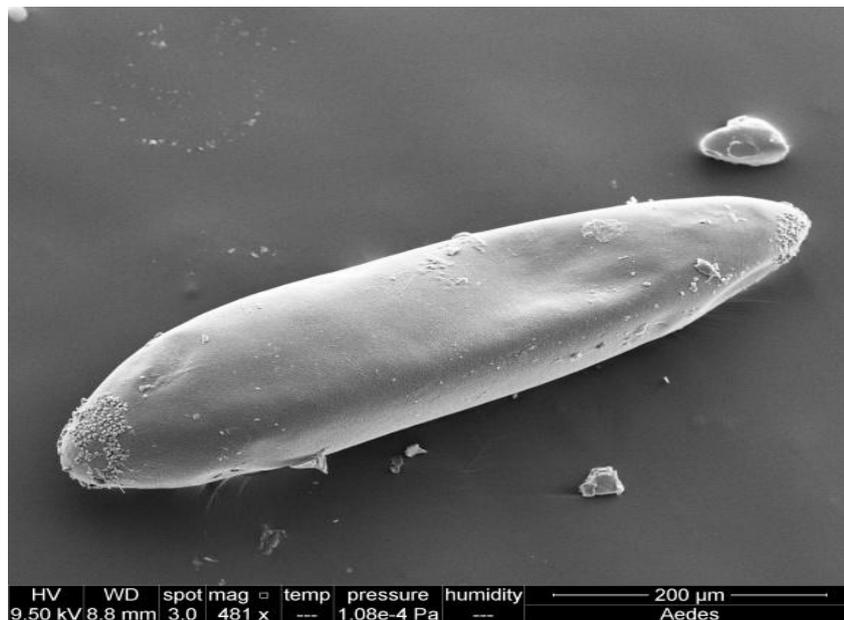
Legenda: Análise histológica de ovos embrionados de *Aedes aegypti*. Em A, embrião (E) *Aedes aegypti* envolvido pela camada do córion (Co) e ao seu redor sua a casca (seta). Em B, observam-se as divisões do embrião em cabeça (cabeça de seta), tórax e abdômen (chave) e a porção final do embrião (seta). Em C, região da probóscide (seta), gânglios esofágicos (cabeça de seta). Em D, segmentos torácicos e abdominais (seta), e células intestinais (cabeça de seta).

6.2 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO CELULAR

Os ovos utilizados neste trabalho encontravam-se no final do período embrionário (Figura 2), apresentando em média 1mm de comprimento. Possuíam formato achatado, e em sua superfície demonstrava a presença de substância de origem lipídica, responsável pela sua fixação ao substrato.

A cultura celular a partir de ovos embrionados foi realizada após a maceração mecânica dos ovos, sendo utilizados em média de 100 a 150 ovos por cultura.

Figura 2 - Microscopia Eletrônica de Varredura do ovo embrionado

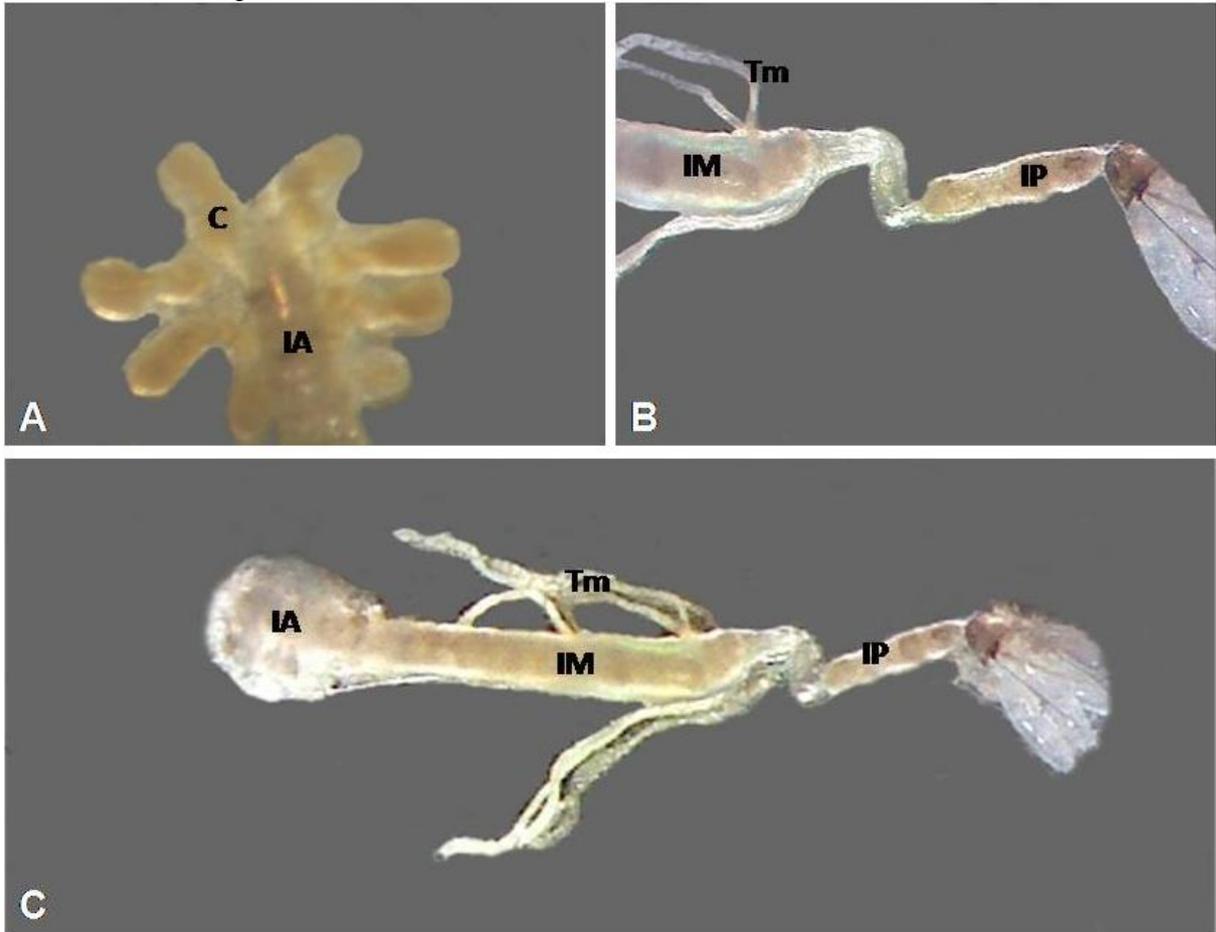


Fonte: (MARIO, L. C., 2015)

Legenda - Microscopia Eletrônica de Varredura do ovo embrionado de *Aedes aegypti* por Microscopia Eletrônica de Varredura, onde se observa seu formato achatado.

No cultivo celular com larvas de terceiro instar de *Aedes aegypti*, apenas o tubo digestivo foi utilizado (Figura 3). A estrutura do tubo digestivo foi mediante microdissecação em lupa Leica Mod. S6E, e em sequência cultivadas mediante explante celular.

Figura 3 - Microdissecação de larvas de quarto instar de *Aedes aegypti* para a retirada do tubo digestivo

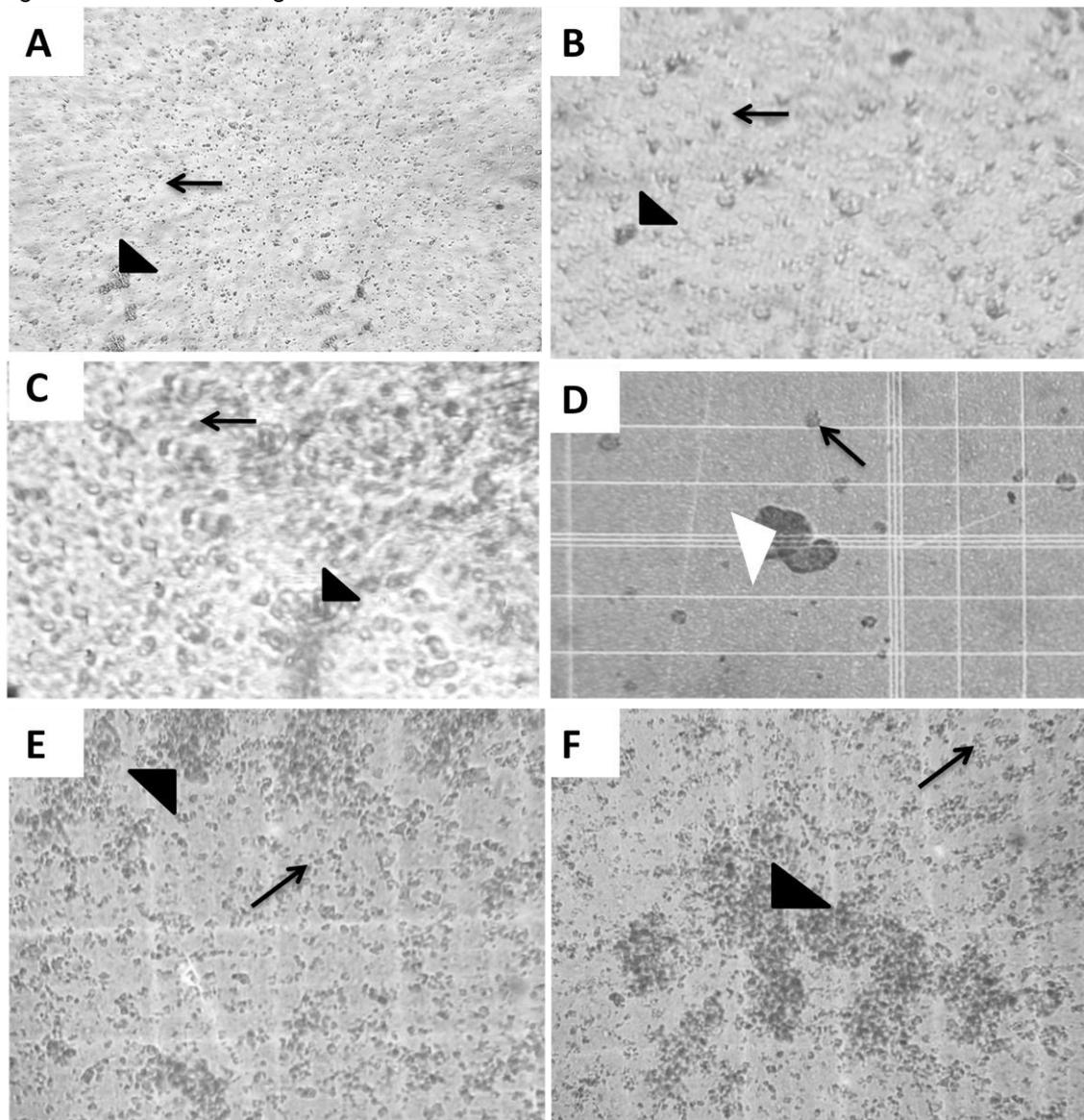


Fonte: (MARIO, L. C., 2015)

Legenda: Dissecação do intestino de larvas de *Aedes aegypti* de quarto instar. Imagens retiradas a partir de uma lupa Leica Mod. S6E. Em A, porção superior do intestino, com os cecos gástricos (C) e o intestino anterior (IA). Em B, intestino médio e posterior, intestino médio (IM), Túbulos de Malpig (Tm) e intestino posterior (IP). Em C, visão geral do tubo digestivo, mostrando o intestino anterior (IA), intestino médio (IM), Túbulos de Malpighi (Tm) e intestino posterior (IP).

As células provenientes do macerado celular de ovos embrionados foram identificadas quanto ao formato. Estas eram pequenas e globóides (seta), e formavam colônias (cabeça de seta). Em aumento de 40x, foi possível diferenciar as células das colônias celulares (Figura 4). As células de insetos cresceram rapidamente após 24 horas de cultivo, necessitando ser expandidas para uma segunda passagem.

Figura 4 - Fotomicrografia das células de ovos embrionados cultivadas

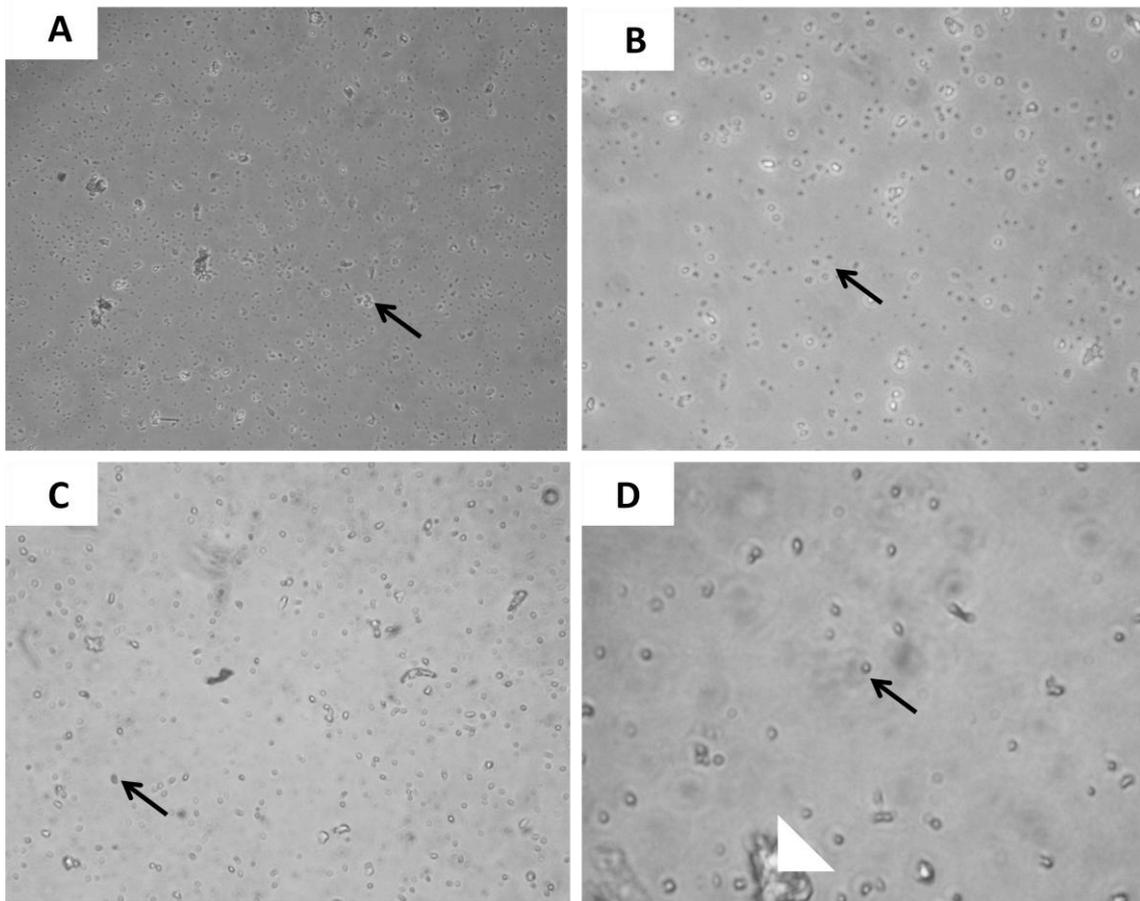


Fonte: (MARIO, L. C., 2015)

Legenda: Cultura celular de ovos embrionados *de Aedes aegypti* em primeira e segunda passagens. Em A, B e C, células (seta) e formação de colônias (cabeça de seta), em aumento de 3,2 vezes 10 vezes respectivamente em primeira passagem. Em D, cultura celular analisadas em câmara de Neubauer, notar um tipo celular pequeno (seta) e um macerado celular (cabeça de seta branca), aumento de 40 vezes em microscópio óptico de luz em primeira passagem. Em E e F, células (seta) e colônias (cabeça de seta) analisadas na câmara de Neubauer em aumento de 10 vezes na segunda passagem.

As células do tubo digestivo apresentavam-se pequenas e globulosas, mantendo-se assim até a sexta passagem de cultura (Figura 5).

Figura 5 - Fotomicrografia das células de tubo digestivo de larvas em quarto instar cultivadas



Fonte: (MARIO, L. C., 2015)

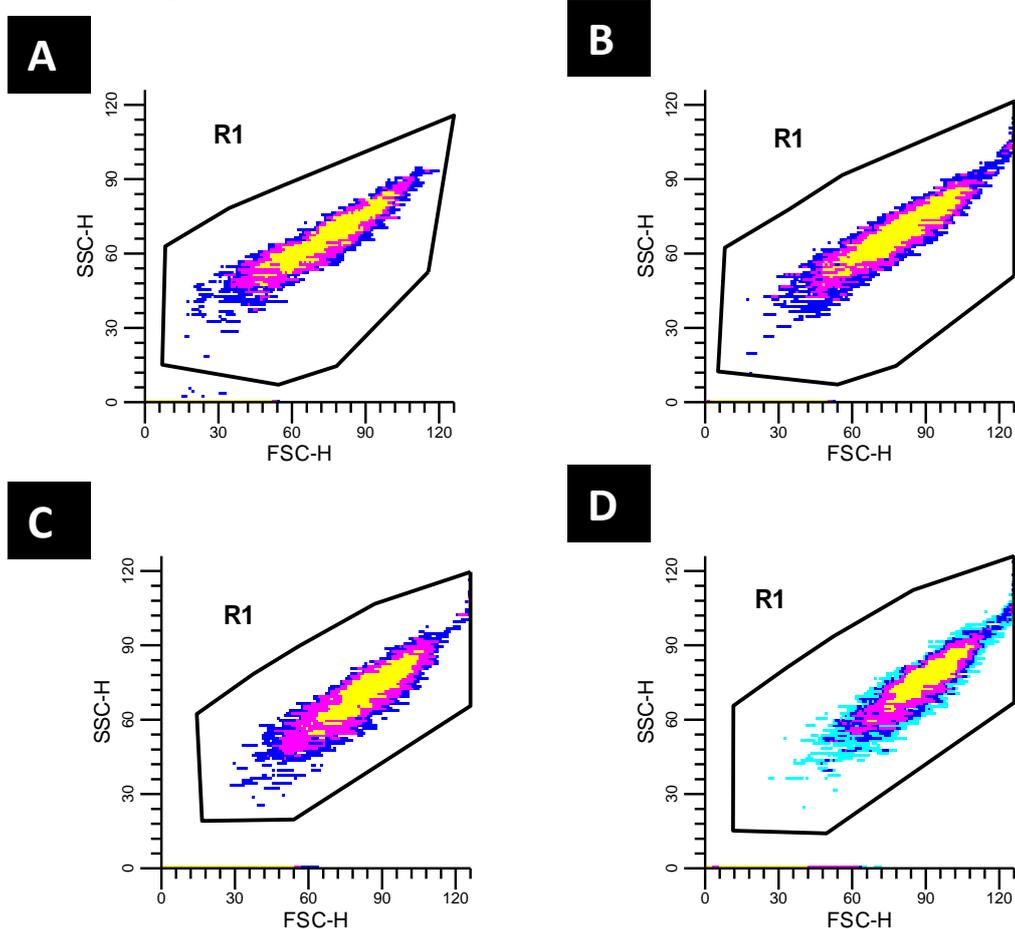
Legenda: Cultura celular de tubo digestivo de *Aedes aegypti* em segunda e quarta passagens de cultura. Em A, células (seta) em aumento de 10 vezes na segunda passagem. Em B, células (seta) em aumento de 20 vezes na segunda passagem. Em C, células (seta) em aumento de 20 vezes na quarta passagem. E em D, células (seta) em aumento de 40 vezes, na quarta passagem. Observou-se agrupamento de células lisadas (cabeça de seta branca).

6. 3 MORFOLOGIA CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO

A análise quantitativa dos tipos celulares de *Aedes aegypti*, demonstrou a presença de células com granulosidade e tamanhos diferentes, nas amostras cultivadas na primeira e segunda passagens da cultura. Esta análise ocorreu concomitantemente com a análise das fases do ciclo celular. Após cinco horas de cultivo, observou-se que as populações celulares apresentaram uma homogeneidade diferente no tamanho das células com densidades diferentes (Figura 6 A e B). O mesmo ocorreu com a amostra após 24 horas de cultura.

Observou-se assim um gráfico similar ao anterior, demonstrando homogeneidade da população celular, porém, com redução da densidade celular (Figura 6 C e D).

Figura 6 - Morfologia das amostras de células de ovos embrionados, após cultura celular



Fonte: (MARIO. L. C., 2015)

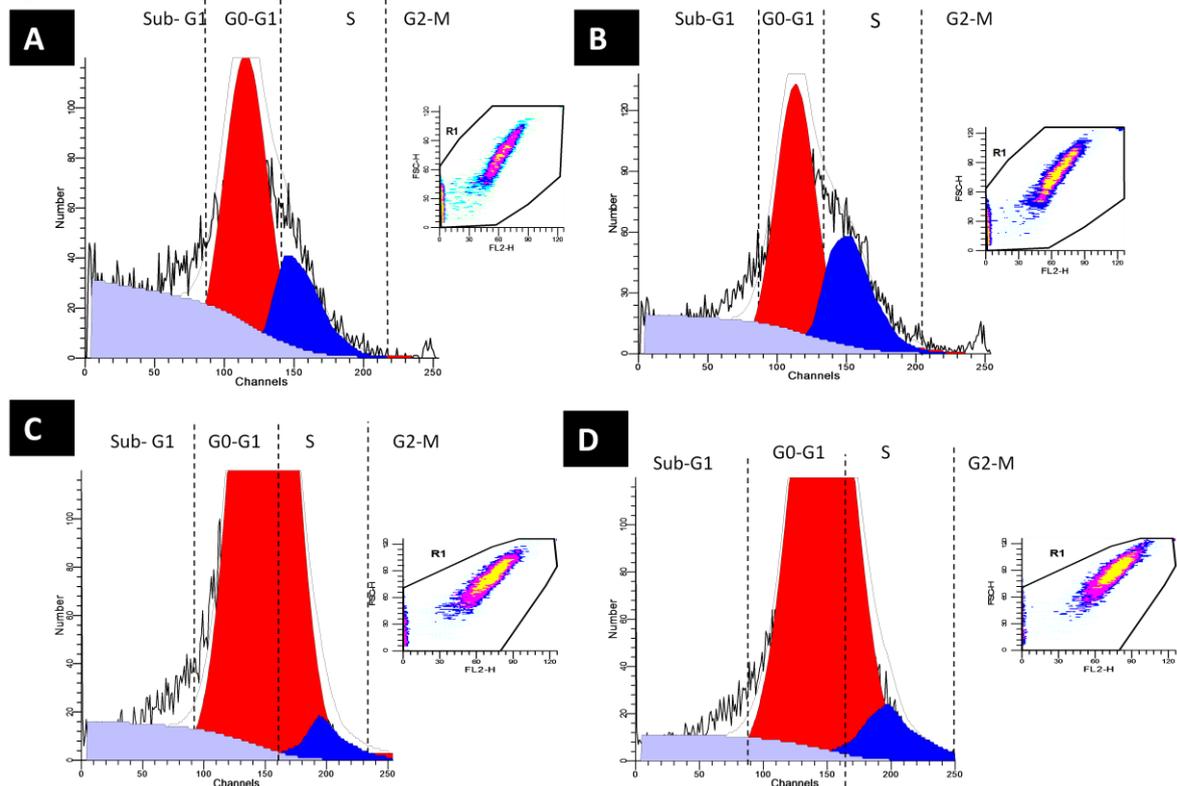
Legenda: Morfologia das amostras de células de ovos embrionados, após a cultura celular. Em A e B, análise do tamanho celular por granulosidade em células após cinco horas de cultivo em P0. Em C e D, análise do tamanho por granulosidade em células após 24 horas em primeira e segunda passagens.

6.4 ANÁLISES DAS FASES DO CICLO CELULAR

As fases do ciclo celular das células da primeira passagem apresentaram valores médios de: $27,5\% \pm 2,0\%$ de debris celulares, 68% G0-G1, na qual as células estão no início do desenvolvimento celular. Apresentando $30,2\%$ de fase S, de crescimento celular, $91,9\% \pm 0,5\%$ de fase G2-M, demonstrando que as células encontravam-se em preparação para dividir seu DNA (Figura 7 A e B). Em seguida, foram analisadas

amostras após a segunda passagem do cultivo celular, e os seguintes valores foram obtidos: 10% de debris celulares, 92,4% encontravam-se na fase G0-G1, 6,8% na fase S e 0,6% na fase G2-M. Os dados estão representados na figura 7 C e D.

Figura 7 - Análise das fases do ciclo celular de células de ovos embrionados



Fonte: (MARIO, L. C., 2015)

Legenda: Análise das fases do ciclo celular (debris celulares(Sub-G1), G0/G1, S e G2M) em cultura celular após 5 de cultura.

6.5 ANÁLISES POR IMUNOFENOTIPAGEM MEDIANTE A UTILIZAÇÃO DA TÉCNICA DE CITOMETRIA DE FLUXO

Mediante o teste de imunofenotipagem por citometria de fluxo para a determinação de marcadores e caracterização celular, amostras de células dos ovos embrionados de *Aedes aegypti* em segunda e quarta passagens e do tubo digestivo de larvas de quarto instar na quarta e sexta passagens foram realizadas. Os marcadores celulares utilizados no experimento estão descritos na quadro1 abaixo.

Quadro 1 - Tabela dos marcadores celulares e de sua função através da citometria de fluxo (São Paulo 2015)

Marcadores celulares	Função
Oct ³/₄	Marcador de células tronco embrionárias
Vimentina	Marcador de células de origem mesenquimal
Caspase 3	Marcador de morte celular por apoptose
Stro-1	Marcador de células de origem mesenquimal
Nestin	Marcador de células de origem mesenquimal
Sox2	Marcador de células pluripotentes
HSP70	Marcador de apoptose celular
Anti GM130	Marcador de proteínas do Complexo de Golgi
Anti RAB 5	Marcador de vesículas endossômicas

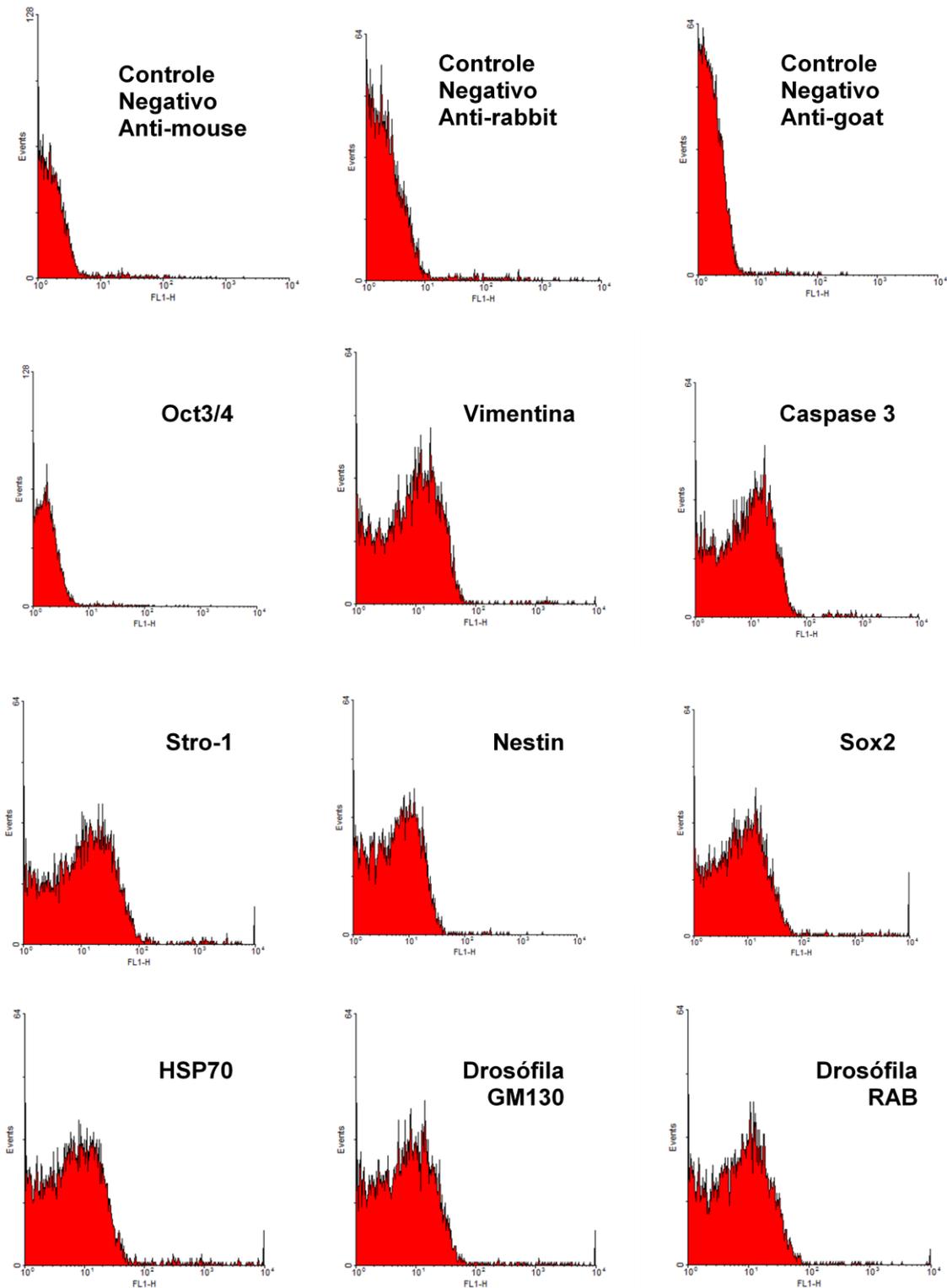
As análises em porcentagens para os resultados do primeiro grupo, ou seja, células de ovos embrionados de *Aedes aegypti* na segunda passagem de cultura celular foram realizadas para avaliação do nível de expressão do marcador, sendo assim cada marcador expressou em média percentual: Oct3/4 (0,9%), Vimentina (24,1%), Caspase 3 (24,1%), Stro-1 (27,9%), Nestin (14,6%), Sox2 (19,9%), HSP 70 (18,0%), Anti GM130 (17,3%) e Anti RAB 5 (19,3%) (Figura 8).

No segundo grupo, as células de ovos embrionados em quarta passagem de cultura celular, foram obtidas as seguintes marcações: Oct3/4 (23,8%), Vimentina (28,0%), Caspase 3 (26,2%), Stro-1 (27,8%), Nestin (25,7%), Sox2 (32,1%), HSP 70 (32,8%), Anti GM130 (29,8%) e Anti RAB 5 (29,6%) (Figura 9).

Para as células oriundas do tubo digestivo de larvas de quarto instar em quarta passagem de cultura celular, os seguintes resultados, em média percentuais foram expressos: Oct3/4 (5,3%), Vimentina (5,4%), Caspase 3 (17,4%), Stro-1 (4,4%), Nestin (5,1%), Sox2 (22,6%), HSP 70 (30,6%), Anti GM130 (15,3%) e Anti RAB 5 (23,5%) (Figura 10).

As marcações de células para tubo digestivo de larvas de quarto instar em sexta passagem de cultura celular foram: Oct3/4 (12,9%), Vimentina (12,5%), Caspase 3 (22,8%), Stro-1 (11,1%), Nestin (12,8%), Sox2 (30,7%), HSP 70 (23,6%), Anti GM130 (16,9%) e Anti RAB 5 (28,5%) (Figura 11).

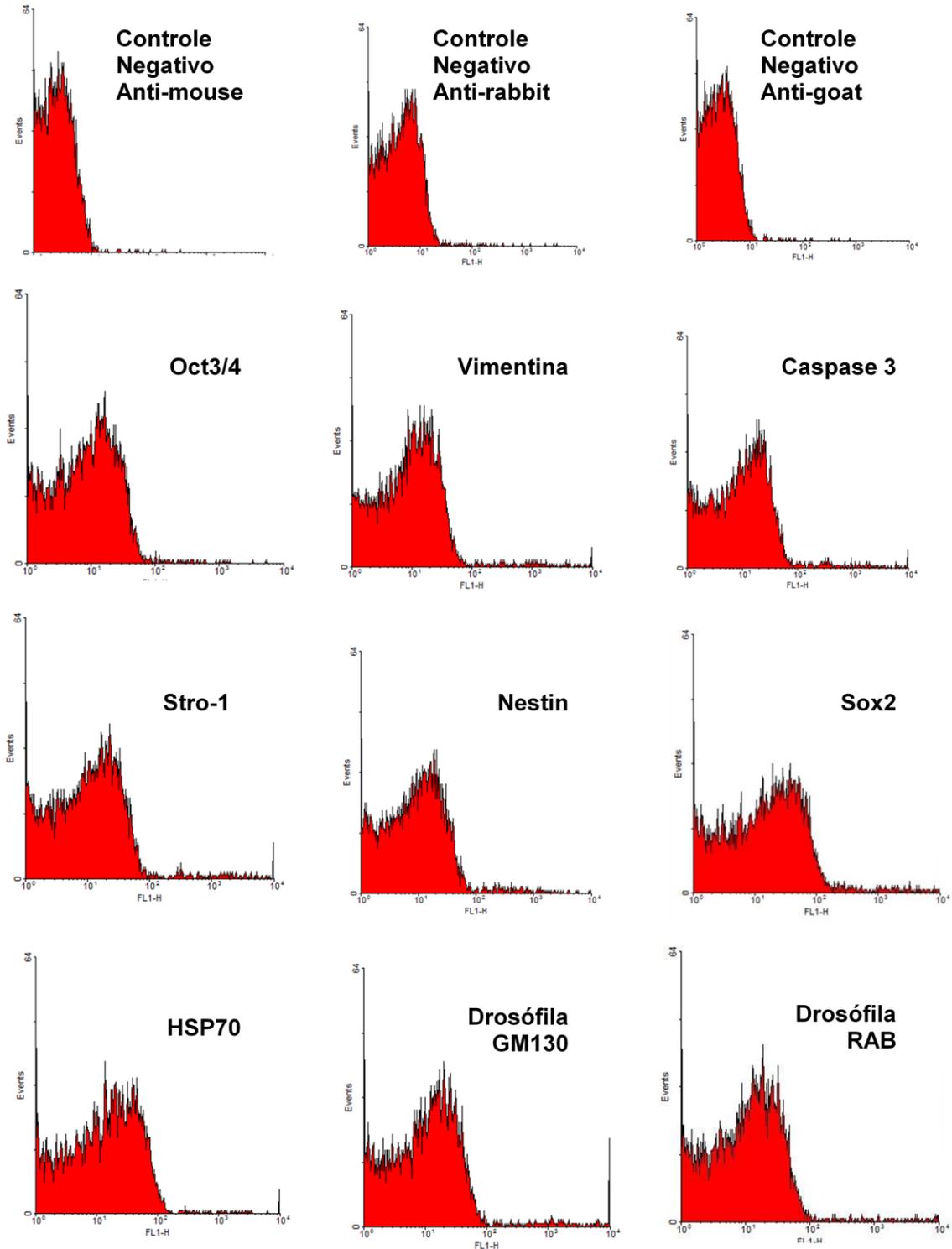
Figura 8 - Análise de expressão dos marcadores por citometria de fluxo de células em cultura celular de ovos embrionados de segunda passagem



Fonte: (MARIO, L. C., 2015)

Legenda: Histograma representativo obtido pelo programa WinMdi 2.9, através das células de ovos na segunda passagem de cultura celular mediante análise dos marcadores por citometria de fluxo.

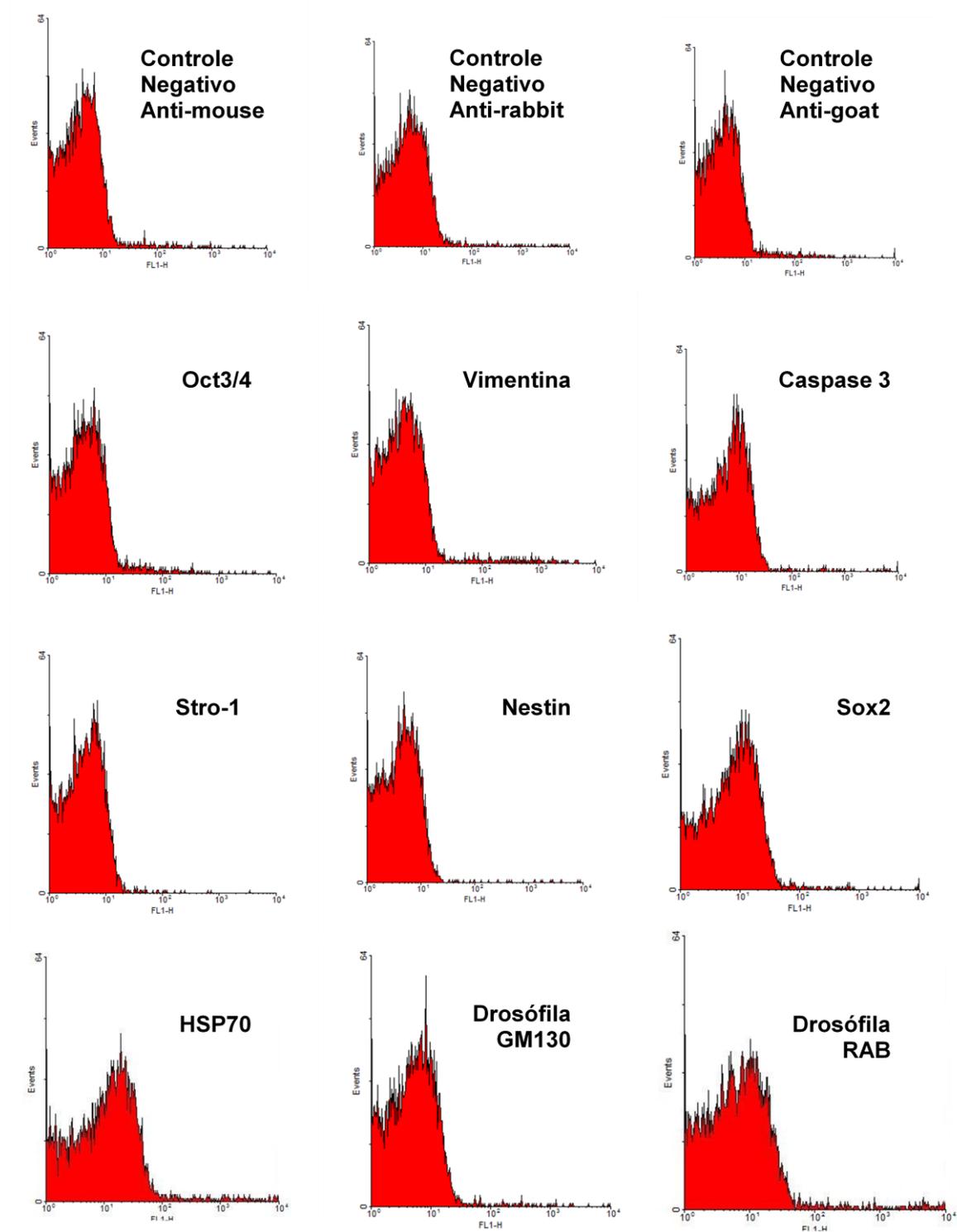
Figura 9 - Análise de expressão dos marcadores por citometria de fluxo de células em cultura celular de ovos embrionados de quarta passagem



Fonte: (MARIO, L. C., 2015)

Legenda: Histograma representativo obtido pelo programa WinMdi 2.9, através das células de ovos na quarta passagem de cultura celular mediante análise dos marcadores por citometria de fluxo.

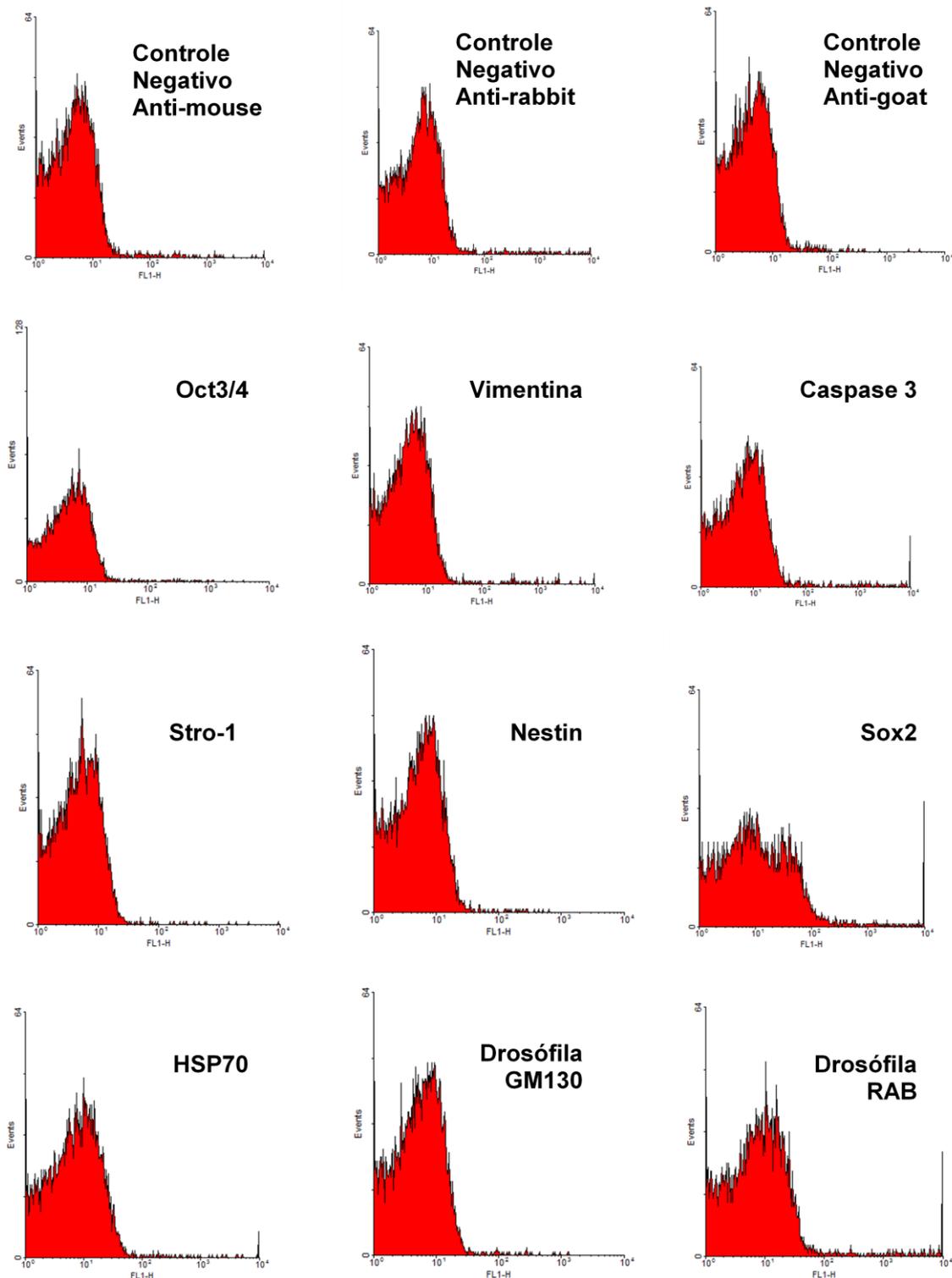
Figura 10 - Análise de expressão dos marcadores por citometria de fluxo de células em cultura celular do tubo digestivo de larvas em quarto instar na quarta passagem



Fonte: (MARIO, L. C., 2015)

Legenda: Histograma representativo obtido pelo programa WinMdi 2.9, através das células de tubo digestivo de larvas em quarto instar na quarta passagem de cultura celular mediante análise dos marcadores por citometria de fluxo.

Figura 11 - Análise de expressão dos marcadores por citometria de fluxo de células em cultura celular do tubo digestivo de larvas em sexto instar na quarta passagem



MARIO, L. C., 2015)

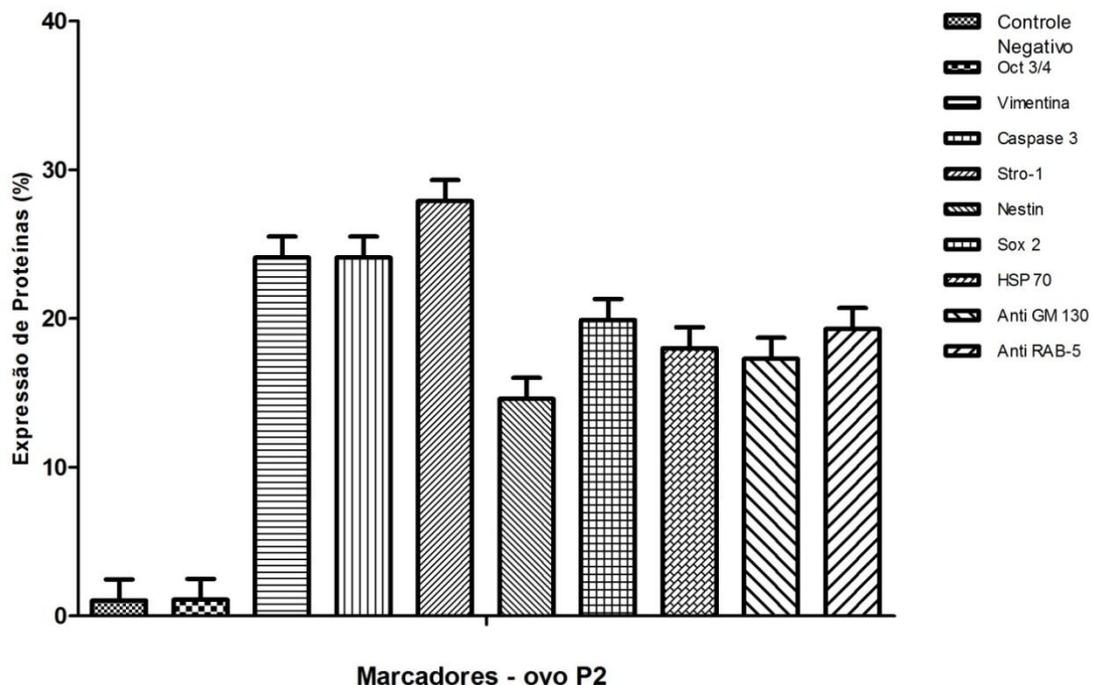
Legenda: Histograma representativo obtido pelo programa WinMdi 2.9, através das células de tubo digestivo de larvas em quarto instar na sexta passagem de cultura celular mediante análise dos marcadores por citometria de fluxo.

6.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas pelo programa Graphpad prism 5, para as diferenças da intensidade de fluorescência de cada marcador entre as amostras das células de ovos embrionados e do tubo digestivo de quarto instar.

Foram diferencialmente expressos com os seguintes marcadores em células de ovos embrionados da segunda passagem de cultura celular: Vimentina, Caspase 3, Stro-1, Nestin, Sox 2, HSP 70, Anti GM 130 e Anti RAB-5 (Figura 12).

Figura 12 - Análise estatística dos marcadores em ovos de segunda passagem

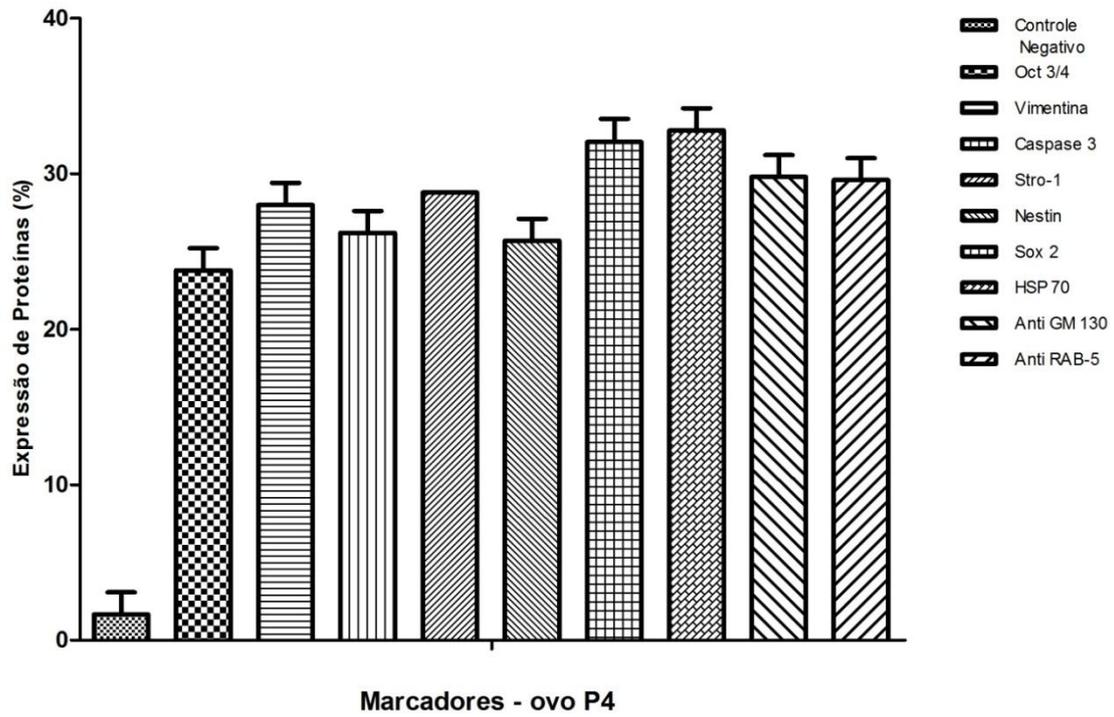


MARIO, L. C., 2015)

Legenda: Gráfico de barras das médias \pm desvio padrão dos marcadores em células de ovos de segunda passagem.

Nas células da cultura de ovos embrionados em quarta passagem, os marcadores expressos foram: Oct 3/4, Vimentina, Caspase 3, Stro-1, Nestin, Sox 2, HSP 70, Anti GM 130 e Anti RAB-5 (Figura 13).

Figura 13 - Análise estatística dos marcadores em ovos de quarta passagem

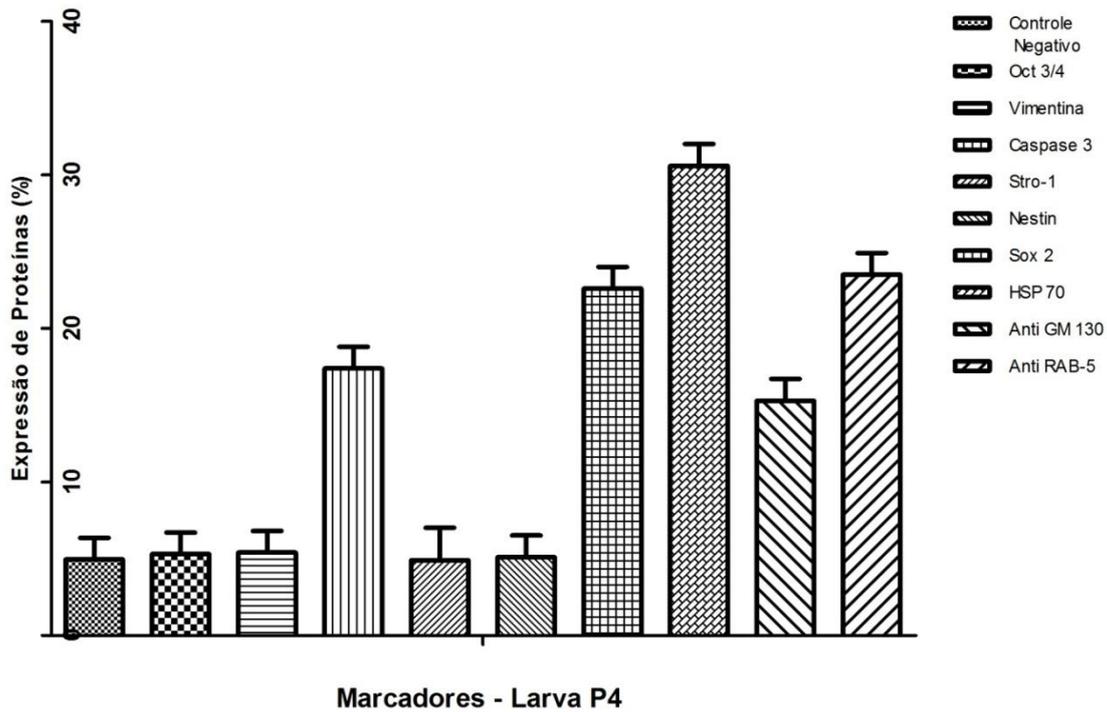


MARIO, L. C., 2015)

Legenda: Gráfico de barras das médias \pm desvio padrão dos marcadores em células de ovos de quarta passagem.

Nas análises da expressão dos marcadores das células obtidas pelo tubo digestivo em larvas de quarto instar, os marcadores diferencialmente expressos foram: Caspase 3, Sox 2, HSP 70, Anti GM 130 e Anti RAB-5 (Figura 14).

Figura 14 - Análise estatística dos marcadores de tubo digestivo de larvas de quarto instar em quarta passagem

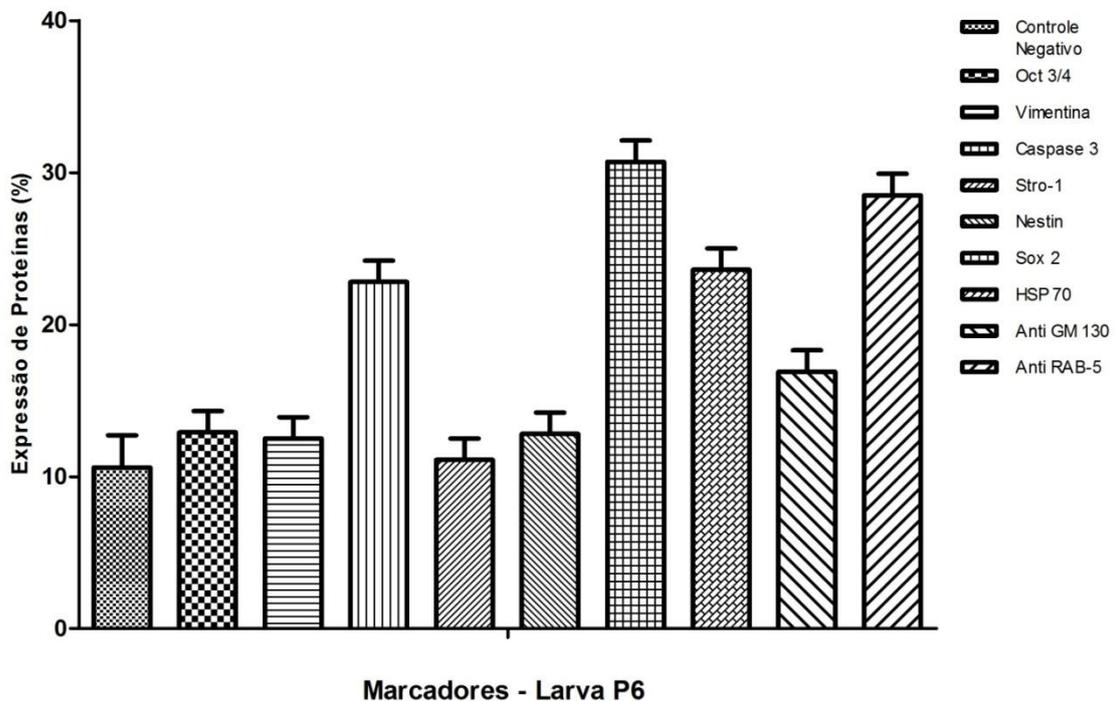


MARIO, L.C., 2015)

Legenda: Gráfico de barras das médias \pm desvio padrão dos marcadores em células de tubo digestivo em larvas de quarto instar de quarta passagem.

Em cultura realizada a partir do tubo digestivo em larvas de quarto instar em sexta passagem de cultivo celular, os marcadores expressos foram: Caspase 3, Sox 2, HSP 70, Anti GM 130 e Anti RAB-5 (Figura 15).

Figura 15 - Análise estatística dos marcadores em tubo digestivo de larvas em quarto instar em sexta passagem



MARIO, L. C., 2015)

Legenda: Análise estatística dos marcadores de cultura celular de tubo digestivo partir de larvas de sexto instar.

6.7 ANÁLISE DE IMUNOHISTOQUÍMICA

Análises por imunohistoquímica, em ovos embrionados de *Aedes aegypti* de final do período embrionário, foram realizadas utilizando os seguintes marcadores:

O PCNA utilizado para marcação de proliferação celular apresentou positivo, com forte marcação (Figura 16 A).

A caracterização do ovo embrionado de *Aedes aegypti*, realizada com marcadores de pluripotência, proliferação celular, morte celular e de células mesenquimais, demonstrou os seguintes resultados:

O SSEA-4, indicativo de células pluripotentes apresentou forte marcação nos embriões de final de período gestacional (Figura 16 B e C).

O Nanog é um marcador nuclear que marca a presença de células embrionárias, apresentando uma proteína de homeodomínio na qual direciona a

pluripotência em células indiferenciadas. Este marcador foi pouco expresso na fase final do estágio embrionário do *Aedes aegypti* (Figura 16 D e E).

O Stro-1 que é um marcador de origem mesenquimal, apresentou forte expressão nos tecidos embrionários no final do desenvolvimento embrionário (Figura 16 F).

O Oct 3/4 é um marcador de células embrionárias. Este marcador foi fracamente expresso na fase final do estágio embrionário do *Aedes aegypti* (Figura 17 A).

A Vimentina é um marcador de origem mesenquimal, observou-se forte expressão nos tecidos embrionários no final do desenvolvimento embrionário (Figura 17 B).

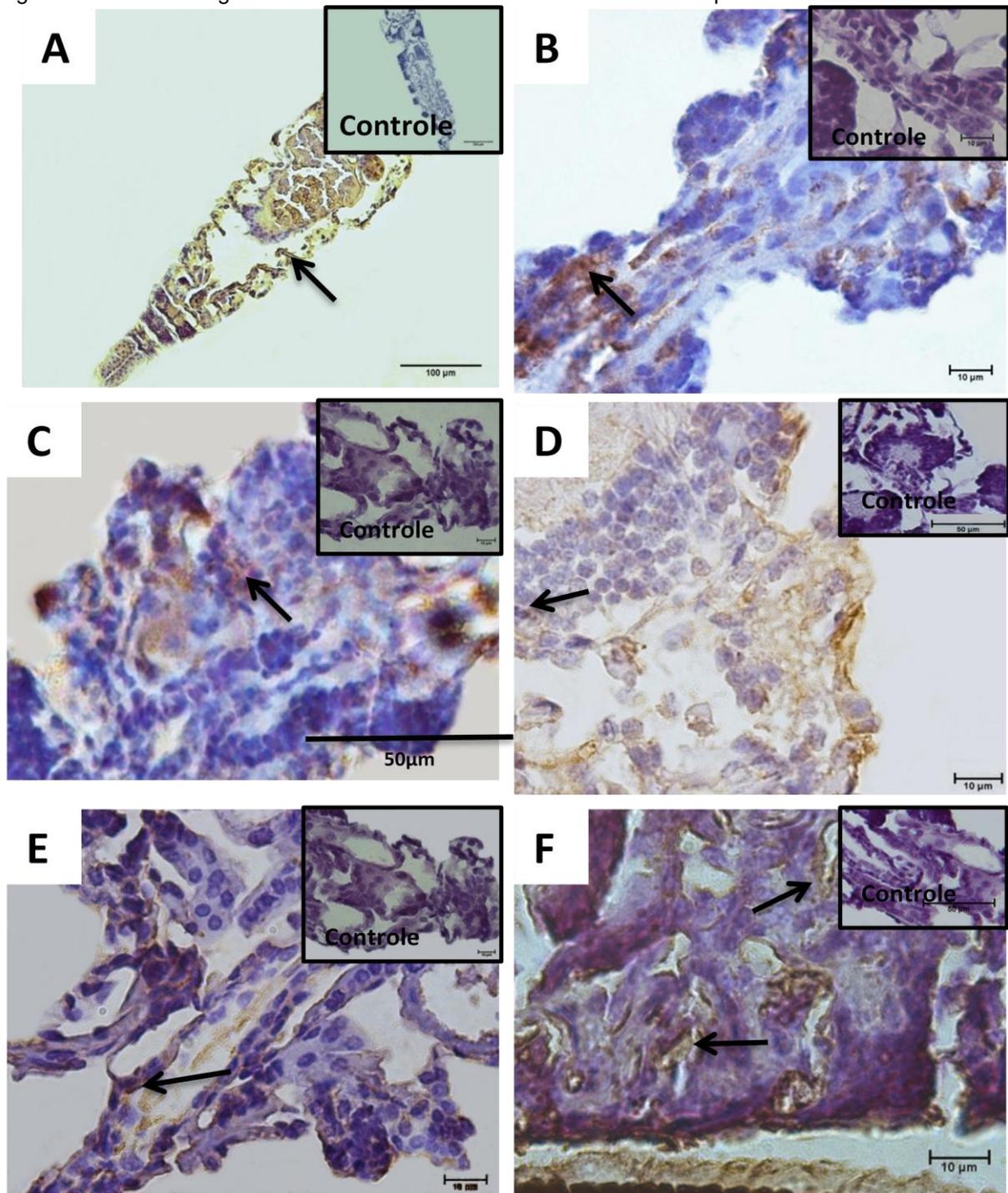
O marcador Sox 2 é um indicativo de células pluripotentes, e demonstrou forte marcação nos embriões de final de período gestacional (Figura 17 C).

O marcador Nestin marcador de origem mesenquimal, apresentou fraca marcação nos embriões de final de período gestacional (Figura 17 D).

O Anti GM 130, um marcador que expressa células presentes na membrana do complexo de Golgi. Este foi expresso em embriões de final do estágio embrionário de *Aedes aegypti* (Figura 18 A), assim como também demonstrou-se expresso como controle positivo, células adultas da mosca *Drosophila sp* (Figura 18 B).

O Anti RAB-5, um marcador para endossomos foi expresso em embriões de final do estágio embrionário de *Aedes aegypti* (Figura 18 C), assim como também foi expresso como controle positivo, células adultas de *Drosophila sp* (Figura 18 D).

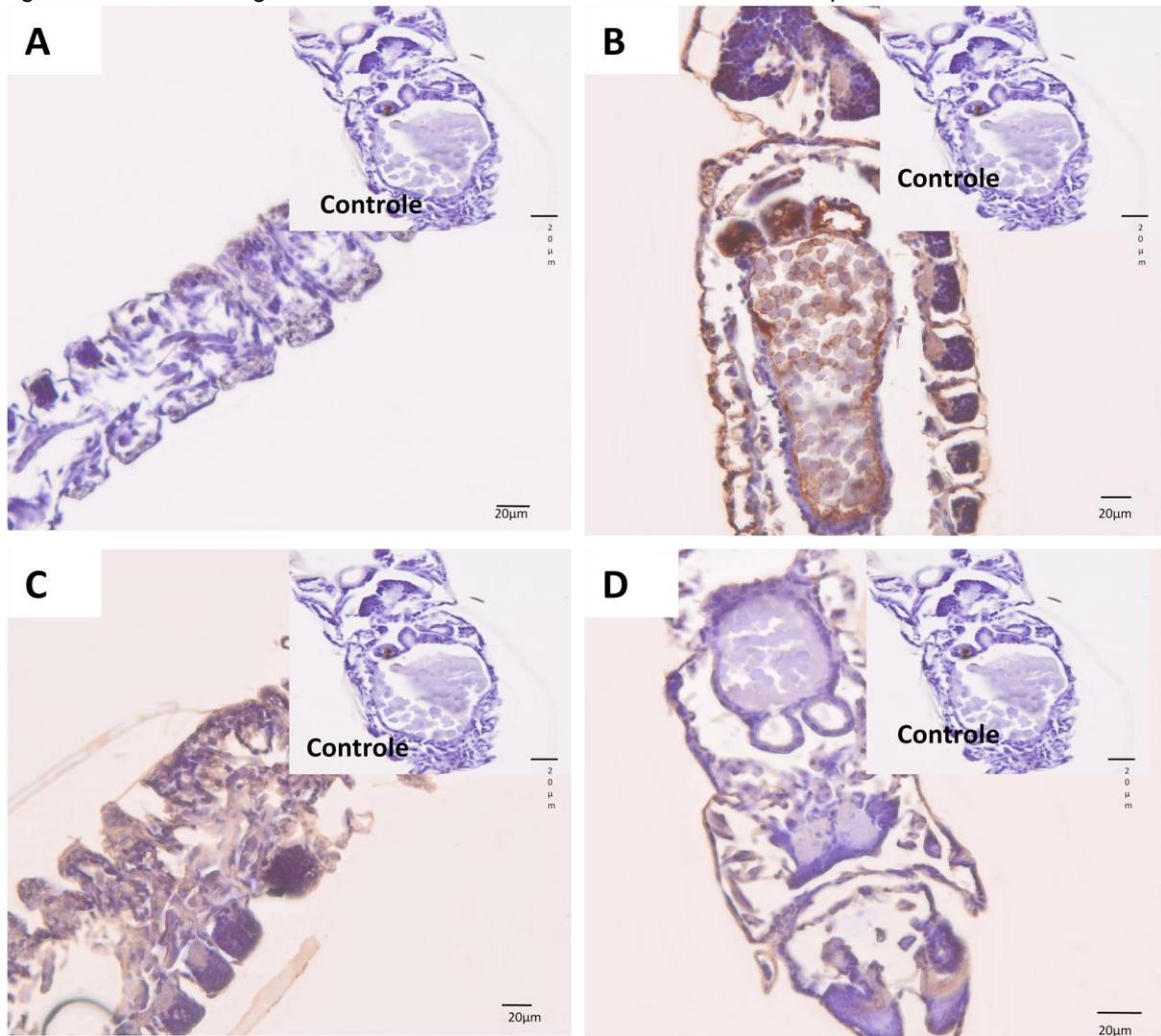
Figura 16 - Fotomicrografia de ovos embrionados mediante imunohistoquímica



Fonte: (MARIO, L. C., 2015)

Legenda - Embriões de *Aedes aegypti* no final do período embrionário. Em A, observou-se marcação positiva para PCNA (seta), em um aumento de 20x. Em B e C, tecido celular mostrando marcação positiva para SSEA-4 em células pluripotentes (seta), nos aumentos 10x e 20x respectivamente. Em D e E, tecido marcado (seta) com o anticorpo (Ac) primário Nanog em aumento de 10x. Em F, tecido celular marcadas (seta) com Ac primário Stro-1 em aumento de 10x. O controle negativo esta localizado na parte superior direita de cada marcação.

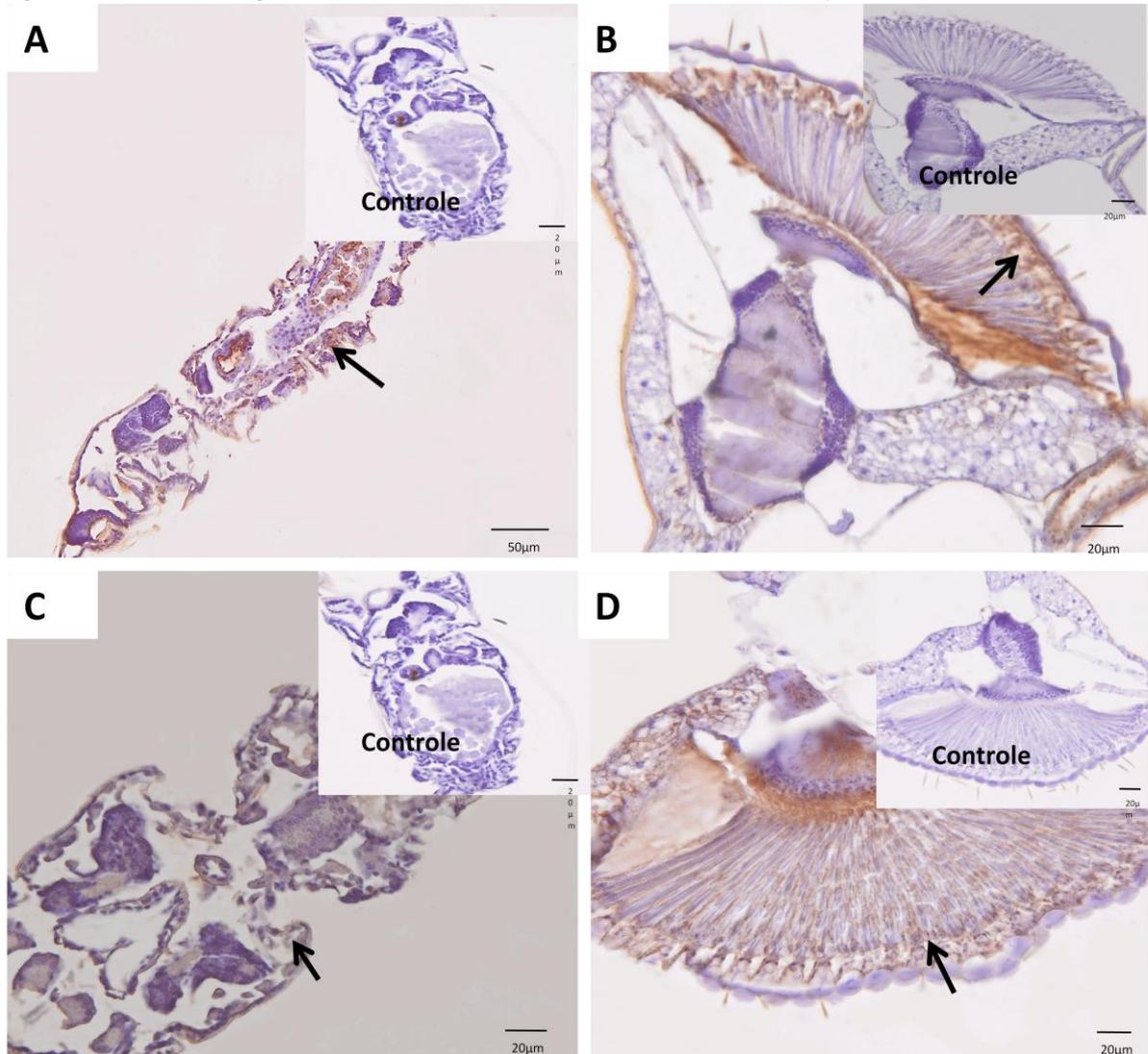
Figura 17 - Fotomicrografia de ovos embrionados mediante imunohistoquímica



Fonte: (MARIO, L. C., 2015)

Legenda: Embrião de *Aedes aegypti* no final do período embrionário. Em A, observou-se pouca marcação para Oct 3/4 em embrião de *Aedes aegypti*, (seta) em aumento de 400 vezes. Em B, forte marcação para Vimentina (seta), em aumento de 400 vezes. Em C, observou-se forte marcação para SOX2 (seta), em aumento de 400 vezes. E em D, fraca marcação para Nestin (seta), em aumento de 400 vezes.

Figura 18 - Fotomicrografia de ovos embrionados mediante imunohistoquímica



Fonte: (MARIO, L. C., 2015)

Legenda: Embrião de *Aedes aegypti* no final do período embrionário. Em A observou-se expressão do marcador Anti GM-130 (seta), para *Aedes aegypti*, em aumento de 20x. Em B, controle positivo do marcador Anti GM 130, (seta), realizado em *Drosophila sp* em aumento de 40x. Em C, expressão do marcador Anti RAB-5 (seta), em *Aedes aegypti* em aumento de 40x. Em D, controle positivo do marcador Anti RAB-5, (seta), realizado em *Drosophila sp* em aumento de 40x.

7 DISCUSSÃO

O desenvolvimento embrionário do *Aedes aegypti* em condições ideais ocorre após 62 horas da fertilização. Neste estágio o embrião encontra-se com todas as características presentes em larvas de primeiro instar (VITAL et al., 2010). Mesmo sem o contato com a água em temperatura ideal, mínima 12°C e máxima de 35°C – o ovo torna-se viável em média por um ano (FARNESI et al., 2009). Quando o ovo entra em contato novamente com a água, o embrião eclode. Analisando os ovos coletados mediante análise histológica, os embriões presentes neste estudo encontravam-se no final do período embrionário (após 62 horas), sendo que, neste estágio encontravam-se divididos em cabeça, tórax e abdômen, no qual oito seguimentos abdominais foram identificados, assim como descrito no estudo de Vital et al., 2010.

Estes insetos apresentam desenvolvimento holometábolo, ou seja, as larvas passam por quatro estágios subsequentes, permitindo assim o seu crescimento e desenvolvimento (GULLAN; CRANSTON, 2008). Foi observado neste estudo que as larvas possuíam uma camada epitelial de cutícula, que impossibilitava seu o seu crescimento. Portanto, para elas crescerem necessitavam realizar uma ecdise, ou seja, trocar seu exoesqueleto. Nos insetos com desenvolvimento holometabólico após as larvas passarem pelas mudas, elas entram no estágio de pupa, onde ocorrem às grandes transformações das fases imaturas para a fase adulta, assim sendo, o inseto muda totalmente o seu habitat, de aquático para terrestre (GULLAN; CRANSTON, 2008).

Sabendo que as larvas encontram-se mais desenvolvidas no terceiro e quarto instares (GULLAN; CRANSTON, 2008), neste estudo decidiu-se pela utilização de larvas de quarto instar, estágio de fácil manuseio para a microdissecação em lupa que foi realizada com o intuito de retirar o tubo digestivo e mantê-lo em cultura, para posteriores análises.

A partir dos ovos embrionados e do tubo digestivo de *Aedes aegypti*, foi possível realizar o cultivo celular de ambas as amostras. Estas células apresentavam formato arredondado e tamanho reduzido. A cultura celular com os insetos enfrentou grandes problemas com agentes contaminantes. Este dado soma-se às informações apresentados por Linn (1996), uma vez que o autor relata que o

tamanho pequeno das células, tende a dificultar o seu manuseio, além do fato do ambiente em que os insetos vivem, ser predisposto à contaminação celular, devido ao acúmulo de sujidades e de microorganismos existentes nestes locais. O intestino é o maior órgão em larvas de insetos, devido à grande necessidade de se alimentar no período imaturo de seu desenvolvimento, portanto as larvas acabam ingerindo grande quantidade de agentes contaminantes junto com os alimentos (BILLINGDLEY; LEHANE, 1996). Estudo recente mostrou que o lúmen do intestino médio do *Aedes* é altamente colonizado por bactérias, (GUSMÃO et al., 2010), o qual dificulta o cultivo celular do tubo digestivo.

Mesmo assim, o sucesso com o cultivo celular em insetos foi demonstrado por várias linhagens celulares já estabelecidas. O desenvolvimento de uma nova linhagem celular, em novas espécies, necessita de adaptações dos protocolos existentes, adequando assim um protocolo distinto para cada material (LINN, 2001). No cultivo celular de ovos embrionados de *Aedes aegypti*, as adaptações necessárias para estabelecimento da cultura foram feitas nas lavagens do material. Neste estavam presentes muitos agentes contaminantes impregnados em sua casca. Para a remoção dos mesmos utilizou-se agentes surfactantes como o Tween, para a retirada da substância viscosa com base lipídica do exterior de sua casca. Para o cultivo do tubo digestório, apenas lavagens com PBS e antibióticos foram suficientes para remoção dos agentes contaminantes.

Muitas pesquisas vêm sendo realizadas com células de insetos. As linhagens celulares de *Drosophila* são muito utilizadas como modelos experimentais de diversos organismos. As duas linhagens celulares mais estudadas são células-tronco de folículo ovariano e células-tronco intestinais. Pesquisa realizada recentemente com células de intestino médio posterior de *Drosophila* teve como objetivo um modelo útil para manutenção das células-tronco intestinais adultas (ROTH, 2001; NAVASCUÉS et al., 2012; PANTHAK et al., 2012). Existem várias linhagens celulares sendo estudadas em *Drosophila*. Bello et al. (2008) estudou as linhagens de células-tronco neurais, para estudos com neurogênese no cérebro de larvas e para a proliferação de neuroblastos. Nestes insetos adultos, o intestino médio é mantido por células-tronco pluripotentes. O sistema digestivo dos vertebrados e invertebrados mostra extensa semelhança no seu desenvolvimento celular e controle genético (OHLSTEIN; SPRADLING, 2006).

No cultivo celular de *Aedes aegypti* observou-se vários tipos celulares distintos. Mediante análise morfológica descrita pela citometria de fluxo, notou-se a presença de vários tipos celulares com densidades diferentes, demonstrando assim uma homogeneidade celular ao longo do cultivo. Em estudo realizado com linhagens celulares de larvas de *Aedes aegypti* (SUDEEP et al., 2009) os autores descreveram três tipos celulares: células epiteliais (92%), fibroblastóides (7%) e células gigantes (1%). Estes dados também foram encontrados nos resultados apresentados neste trabalho, onde vários tipos o celulares foram identificados e apresentados em cultura com todo o inseto.

Os dados obtidos nas fases do ciclo celular demonstraram que as células estavam realizando os processos naturais de interfase e de divisão celular. O ciclo celular de uma maneira geral é necessário para produzir cópias celulares responsáveis pela manutenção de células mortas de um tecido, e também pelo desenvolvimento embrionário, no qual o indivíduo se forma a partir de uma única célula, onde ocorrem multiplicação e diferenciação celular (ALBERT, 2002).

Independente dos detalhes que ocorrem no ciclo celular, o objetivo central do mesmo é transferir as informações contidas no material genético igualmente para as células que se dividem. As duas etapas principais do ciclo celular são: primeiro a interfase, a qual a célula aumenta o seu tamanho e duplica o material genético, esta fase é dividida em três etapas, G1, S e G2. Na G1. A célula aumenta seus constituintes para o processo de divisão celular. A fase S ocorre à duplicação do material genético e a fase G2 a verificação das fases anteriores, para averiguar se a célula pode entrar no processo de divisão celular. A segunda fase é a M, onde ocorre à divisão do material genético e divisão das células. Esta fase possui duas etapas, a mitose, onde ocorre a separação do material genético de forma que ambas as células possuam a mesma carga de material genético, e a citocinese, onde ocorre a divisão celular (ALBERT, 2002).

Nas análises de imunofenotipagem a expressão dos marcadores por citometria de fluxo foram realizadas utilizando-se marcadores celulares de culturas regulares e específicos, os quais expressam proteínas presente em: células pluripotentes, mesenquimais, apoptóticas, além dos marcadores específicos expressos em células de moscas do gênero *Drosophila*. Estes insetos são da ordem do *Aedes aegypti*, portanto presumiu-se que haveria similaridade na expressão de seus marcadores.

Dos dois marcadores de pluripotência testados neste trabalho, um obteve fraca marcação e o outro foi altamente expresso. O Oct 3/4 apresentou fraca marcação em cultura de ovos embrionados e nenhuma marcação na cultura com tubo digestivo de larvas de quarto instar. Já o marcador Sox2 foi altamente expresso nas duas passagens de ovos embrionados e das células intestinais. Segundo dados apresentados pelos autores Zang e Cui, (2014), estes marcadores de pluripotência celular, são expressos para células embrionárias (ZANG; CUI, 2014).

Os marcadores de células mesenquimais, neste trabalho representados pelos marcadores: Stro-1, Vimentina e Nestin, apresentaram marcação positiva para ambas as passagens das células de ovos embrionados, porém nenhuma marcação para células do tubo digestivo de ambas as passagens das larvas. Estes dados somam-se aos encontrados por Loeb et al. (2003), em cultura celular do intestino de larvas de lepidópteras (*Heliothis virescens*). Os tipos celulares encontrados foram: monocamada epitelial, células caliciformes, colunares, poucas células secretoras e células tronco epiteliais que são responsáveis pela reposição de células intestinais nos adultos, portanto quando as células de intestino já estão diferenciadas não se observou presença de células precursoras mesenquimais.

A expressão para o marcador de morte celular por apoptose, representado por caspase3, esteve presente em todas as passagens da cultura celular, sendo que sua expressão diminuiu na sexta passagem de cultura em células do tubo digestivo. A morte por apoptose serve para manter a homeostase nos organismos multicelulares (MEÇA et al., 2010), e tecidos embrionários, quando os tecidos embrionários sofrem involução estas proteínas se auto-degeneram (HENGARTNER, 2000). Sendo assim, como existem células embrionadas que estão se diferenciando com o passar do tempo é comum encontrarmos algumas células em apoptose celular.

Os dois marcadores específicos utilizados para células de *Aedes aegypti* tiveram marcação positiva. O primeiro deles, o Anti GM130, um marcador que expressa proteínas pertencentes ao grupo do complexo multimérico denominado complexo Retremer, envolvido no transporte retrógrado de proteínas a partir de endossomos para a rede Trans-Golgi do Aparelho de Golgi. O complexo Retremer é necessário para reciclagem de rodopsina. E esta por sua vez é um receptor acoplado à proteína que funcionam como sensor de luz em fotorreceptores dos olhos dos insetos. Os insetos apresentam olhos compostos, a *Drosophila* apresenta

em média 800 unidades hexagonais, e cada unidade, destas possui cerca de oito locais que expressam a rodopsina (WANG et al., 2014).

O segundo marcador apresentou forte expressão para ambas as amostras de materiais. Este marcador também está presente em endossomos, porém estes são endossomos primários localizados próximos a membrana plasmática. Estudo realizado por Zschätzsch et al. (2014), mostrou que no início da reciclagem dos endossomos encontra-se presente o fator EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor), responsável pela localização de filopodia de neurônios primários em *Drosophila*. A endocitose regula distribuição espacial de sinalização de EGFR em vários tipos de células epiteliais *in vitro*, e também de neurônios *in vivo* (ZSCHÄTZSCH et al., 2014).

Para validar a especificidade e avidéz dos anticorpos utilizados neste trabalho foram realizadas em cortes de ovo embrionados por imunohistoquímica (Figuras 16, 17 e 18). Estes marcadores seguiram as mesmas marcações dos feitos por citometria de fluxo.

O PCNA (Figura 16 A) é um marcador que demonstra a atividade proliferativa das células o qual foi muito expresso. Como esta análise foram feitas em ovos embrionados, com alto potencial de desenvolvimento (VITAL et al., 2010) a expressão deste marcador está dentro dos parâmetros previstos no experimento.

Os marcadores com expressão de pluripotência celular: Nanog (Figura 16 D e E), Oct 3/4 (Figura 18 A) e Sox 2 (Figura 18 C), apresentaram em grande parte fraca expressão, apenas o marcador Sox 2 foi bem expresso. Quando estes marcadores são expressos em células como objetivos de tratamento celular, tem-se que ficar atento, pois como estas células podem se diferenciar em qualquer tecido, elas apresentam grande possibilidade de se tornarem instáveis geneticamente (ABREU et al., 2008; CARRION et al., 2009; YARAK; OKAMOTO, 2010) como o estudo com estas células não teve objetivo de terapia celular e sim de análise celular para futuros estudos com biologia molecular no combate ao inseto, não foi um aspecto preocupante, porém se caso estas células forem utilizadas posteriormente em terapias celulares, elas apresentam grandes possibilidades de se tornarem tumorigênicas.

Os marcadores de células mesenquimais: SSEA-4 (Figura 16 B e D) Stro-1 (Figura 16 F) Vimentina (Figura 18 B) e Nestin (Figura 18 D) foram altamente expressos. Estas células quando isoladas são muito utilizadas na medicina

regenerativa, devido sua alta capacidade de diferenciação celular (RIVAS et al., 2013). Estas células nos vertebrados podem ser diferenciadas em três tipos celulares: osteogênica, condrogênica e adipogênica (BYDLOWSKI et al., 2009), porém nos invertebrados a única linhagem que ela se diferencia é na adipogênica.

E os marcadores específicos de insetos, os marcadores Anti GM130 (Figura 18 A) e Anti RAB-5 (Figura 18 C), também foram marcados nos embriões. Estes dados estão de acordo com os resultados apresentados pelos autores Wang et al. (2014) no qual relatam que o marcador Anti GM 130 é fortemente expresso em olhos de *Drosophila* (Figura 18 B) . Este resultado também foi averiguado por Zschätzsch et al. (2014) o marcador Anti RAB-5 possui forte expressão nas regiões que se encontram os neurônios primários, assim como observado no controle positivo de *Drosophila* (Figura 18 D).

Muitos estudos envolvendo linhagens celulares de insetos estão sendo realizados, principalmente para os mosquitos de importância médica como é o caso do *Aedes aegypti*. Novos estudos com células de insetos infectadas por arbovirose estão sendo realizados com o objetivo de buscar novas melhorias no combate a estas doenças. (BELLO et al., 2001; LAWRIE et al., 2004; SUDEEP et al., 2009). Seguindo o mesmo pensamento dos demais autores, este estudo através da caracterização celular de ovos embrionados e do tubo digestivo de larvas de quarto instar, objetivou-se pela contribuição da descrição morfológica dos tipos celulares encontrados nas células de ovos embrionados e tubo digestivo de larvas de quarto instar de *Aedes aegypti* para novas pesquisas envolvendo a biologia molecular, como base para o combate desta doença.

8 CONCLUSÃO

Conclui-se:

- É possível estabelecer um protocolo de cultura para células de ovos embrionados e de tubo digestivo de larvas de quarto instar do *Aedes aegypti*, sem agentes contaminantes.
- Tanto ovos embrionados quanto células do tubo digestivo de larvas de quarto instar possuem células indiferenciadas e com grande potencial de proliferação celular.
- Os marcadores utilizados neste trabalho apresentam marcações positivas para as células indiferenciadas de ovos embrionados e do tubo digestivo de larvas de quarto instar do *Aedes aegypti*.

REFERÊNCIAS

- ABREU, S. C.; PASSARO, C. P.; NASCIMENTO, C. S.; GARCIA, B.; MORALES, M. M.; ROCCO, P. R. M. Terapia celular nas doenças respiratórias. **Pulmão RJ**, v. 17, n. 2- 4, p. 91-97, 2008.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **The cell**. 4. ed. New York : Garland Science. 2002, 1400 p.
- ARAÚJO, H. R. C. **Ultra-estrutura dos hemócitos de *Aedes aegypti* (Linnaeus,1762) (Diptera, Culicidae)**. 2009. 86 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2009.
- BARRETO, M. L.; TEIXEIRA, M. G. Dengue no Brasil: situação epidemiológica e contribuições para uma agenda de pesquisa. **Estudos Avançados**, v. 22, n. 64, p. 53-72, 2008.
- BARROS, M. C. E. **Expressão de proteínas do vírus da Dengue em células de inseto utilizando o sistema Baculovírus de expressão**. 2007. 108 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Molecular) - Universidade de Brasília, Brasília, 2007.
- BATISTA, F. R. X.; PEREIRA, C. A.; MENDONÇA, R. Z.; MORAIS, A. M. Avaliação de suplementos na formulação de meios de cultura para células de inseto visando à substituição do soro fetal bovino. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 2003. Florianópolis. 2003. 146 p.
- BATON, L. A.; RANFORD-CARTWRIGHT, L. C. Morphological evidence for proliferative regeneration of the *Anopheles stephensi* midgut epithelium following *Plasmodium falciparum* ookinete invasion. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 96, p. 244–254, 2007.
- BELLES, X.; PIULACHS, M. D. Ecdysone signalling and ovarian development in insects: from stemcells to ovarian follicle formation. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 6, p. 1-6, 2014.
- BELLO, B. C.; IZERGINA, N.; CAUSSINUS, E.; REICHERT, H. Amplification of neural stem cell proliferation by intermediate progenitor cells in *Drosophila* brain development. **Bio Med Central**, v. 3, n. 5, p. 1-17, 2008.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Dengue. Instruções para pessoal de combate ao vetor: manual de normas técnicas**. 3. ed. Brasília: Ministério da Saúde: Fundação Nacional de Saúde, 2009. 288 p.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Dengue: manual de enfermagem**. 2013. 2. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2013.

BRASIL. Ministério da saúde. 2013. Portal da Saúde. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/18052012.pdf>. Acesso em: 28 jan. 2013.

BRASIL. Ministério da saúde. s/n. Portal da Saúde. 2014. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio?principal/leia-mais-o-ministerio/435-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/dengue/l1-dengue?10708-dengue-texto-introdutorio>. Acesso em: 26 maio 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Registro de 79 casos de Chikungunya no Brasil**. 2014. Disponível em: <http://www.brasil.gov.br/saude/2014/10/registrados-79-casos-de-febre-chikungunya-no-brasil>. Acesso em: 03 nov. 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Casos importados da febre do Chikungunya no Brasil**. Brasília: Ministério da Saúde, 2010.

BYDLOWSKI, S. P.; DEBES, A. A.; MASELLI, L. M. F.; JANZ, F. L. Características biológicas das células-tronco mesenquimais. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 31, p. 25-35, 2009.

CARRION, M. J. M.; VENTURIN, G. T.; DACOSTA, J. C. Potencial terapêutico das células-tronco da medula óssea no tratamento da epilepsia. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 31, n. 1, p. 112-119, 2009.

CONSOLI, R. A. G. B.; OLIVEIRA, R. L. **Importância sanitária no Brasil. Classificação e principais espécies de importância sanitária**. Rio de Janeiro: FioCruz, 1994.

COSTA, C. A.; SANTOS, I. G. C.; BARBOSA, M. G. Detecção e tipagem de vírus dengue em *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) na Cidade de Manaus, Estado do Amazonas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 6, p. 677-68, 2009.

EXTAVOUR, C. G.; AKAM, M. Mechanisms of germ cell specification across the metazoans: epigenesis and performance. **Development**, v. 130, p. 5869–5884, 2003.

FARNESI, L. C.; MARTINS, A. J.; VALLE, D.; REZENDE, G. L. Embryonic development of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): influence of different constant temperatures. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 1, p. 124-126, 2009.

FONCECA, B. M.; FONCECA, S. N. S. Dengue vírus infections. **Current Opinion in Pediatrics**, v. 14, p. 67-71, 2002.

FORRATTINI, O. P. **Culicidologia médica**. São Paulo: Universidade de São Paulo. 2002, v. 2, 549 p.

FRESHNEY, R. I. **Culture of animal cells: a manual of basic technique**. New York: Wiley-Liss, 1994. p. 25-42.

GOMES, A. S.; SCIAVICO, C. J.; EIRAS, A. E. Periodicidade de oviposição de fêmeas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Díptera: Culicidae) em laboratório e campo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 4, p. 327-32, 2006.

GRACE, T. D. C. Prolonged survival and growth of insect ovarian tissue in vitro conditions. **Annals of New York Academy of Sciences**, v. 77, p. 275-282, 1959.

GUBLER, D. J.; REITER, P.; EBI, K. L.; YAP, W.; NASCI, R.; PATZ, J. A. Climate variability and change in the United States: potential impacts on vector and rodent-borne diseases. **Environmental Health Perspectives**, v. 109, p. 223-233, 2001.

GULLAN, P. J.; CRANSTON, P. S. **Os insetos**. um resumo de entomologia. 3. ed. São Paulo: Roca, 2008, 427 p.

GUSMÃO A, D. S.; SANTOS, A. V.; MARINI, D. C.; BACCI, J. R. M.; BERBERT-MOLINA, M. A.; LEMOS, F. J. Culture-dependent and culture-independent characterization of microorganisms associated with *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) and dynamics of bacterial colonization in the midgut. **Acta Tropical**, v. 115, p. 275-281, 2010.

GUZMAN, M. G.; HALSTEAD, S. B.; ARTSOB, H.; BUCHY, P.; FARRAR, J.; GUBLER, D. J.; HUNSPERGER, E.; KROEGER, A.; MARGOLIS, H. S.; MARTÍNEZ, E.; NATHAN, B.; PELEGRINO, J. L.; SIMMONS, C.; YOKSAN, S.; PEELING, R. W. Dengue: a continuing global threat. **Nature**, v. 2460, p. 7-16, 2010.

GUZMÁN, M. G.; KOURÍ, G. Dengue: an update. **Lancet Infectious Diseases**, v. 2, p. 33-42, 2001.

HAKIM, R. S.; CACCIA, S.; LOEB, M.; SMAGGHE, G. Primary culture of insect midgut cells. **In Vitro Cellular e Developmental Biology – Animal**, v. 45, p. 106-110, 2009.

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

HENGARTNER, M. O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, v. 407, p. 770-776, 2000.

IKONOMOU, L.; SCHNEIDER, Y. J.; AGATHOS, S. N. Insect cell culture for industrial production of recombinant proteins. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 6, p.1-20, 2003.

JIA, D.; TAMORI, Y.; PYROWOLAKIS, G.; DENG, W. M. Regulation of broad by the notch pathway affects timing of follicle cell development. **Developmental Biology**, v. 392, p. 52-61, 2014.

KAI, T.; SPRADLING, A. Differentiating germ cells can revert into functional stem cells in *Drosophila melanogaster* ovaries. **Nature**, v. 428, p. 564-569, 2004.

- KULTERER, B.; FRIEDL, G.; JANDROSITZ, A.; SANCHEZ-CABO, F.; PROKESCH, A.; PAAR, C.; SCHEIDLELER, M.; WINDHAGER, R.; PREISEGGER, K.; TRAJANOSKI, Z. Gene expression profiling of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow during expansion and osteoblast differentiation. **BioMed Central Genomics**, v. 8, p. 70-85, 2007.
- KUNIHOLM, M. H.; WOLFE, N. D.; HUANG, C. Y. H.; MPOUDI-NGOLE, E.; TAMOUFE, U.; BURKE, D. S.; GUBLER, D. J. Seroprevalence and distribution of Flaviviridae, Togaviridae, and Bunyaviridae arboviral infections in rural cameroonian adults. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 74, n. 6, p. 1078-1083, 2006.
- LAWRIE, C. H.; UZECATEGUI, N. Y.; ARMESTO, M.; BELL-SAKYI, L.; GOULD, E. A. Susceptibility of mosquito and tick cell lines to infection with various flaviviruses. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 18, p. 268–274, 2004.
- LI, L.; XIE, T. Stem cell niche: structure and function. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 21, p. 605-631, 2005.
- LIMA-CAMARA, T. N.; HONÓRIO, N. A.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. Frequência e distribuição espacial de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* (Diptera, Culicidae) no Rio de Janeiro, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 22, n.10, p. 2079-2084, 2006.
- LOEB, M. J.; CLARK, E. A.; BLACKBURN, M.; HAKIM, R. Z.; ELSEN, K.; SMAGGHE, G. Stem cells from midguts of lepidopteran larvae: clues to the regulation of stem cell fate. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 53, p. 186-198, 2003.
- LOEB, M. J.; HAKIM, R. S. Insect midgut epithelium *in vitro*: an insect stem cell system. **Journal of Insect Physiology**, v. 42, p. 1103-1111, 1996.
- LOEB, M. J.; JAFFE, H.; GELMAN, D. B.; HAKIM, R. S. Two polypeptide factors that promote differentiation of insect midgut stem cells *in vitro*. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 40, p. 129-140, 1999.
- LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R.; VAZEILLE, M.; FILIPPIS, A. M. B.; FAILLOUX, A. B. *Aedes aegypti* in Brazil: genetically differentiated populations with high susceptibility to dengue and yellow fever viruses. **Transactions of the Royal Society Tropical Medicine and Hygiene**, v. 98, p. 43-54, 2004.
- LOZOVEI, A. L. Culicídeos (Moesquitos). In: MARCONDES, C. B. **Entomologia médica e veterinária**. Rio de Janeiro: Editora Atheneu, 2001. v. 1, 432 p.
- MENDONÇA, F.; PAULA, E. V.; OLIVEIRA, M. M. F. **Approche climatologique de La periode**. Curitiba: Brésil, 2003. p. 253-256.
- LYNN, D. E. Development and characterization of insect cell lines. **Cytotechnology**, v. 20, p. 3-11, 1996.

YNN, D. E. Novel techniques to establish new insect cell lines. **In Vitro Cellular e Developmental Biology – Animal**, v. 37, p. 319-321, 2001.

MEÇA, K. K. O. L.; MARTINS, A. S.; DEL PUERTO, H. L.; VASCONCELOS A. C. Apoptose e expressão de Bcl-2 e das caspases 3 e 8 em placenta bovina, em diferentes estádios de gestação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, n. 2, p. 258-264, 2010 .

MICCHELLI, C. A.; PERRIMON, N. Evidence that stem cells reside in the adult *Drosophila* midgut epithelium. **Nature**, v. 439, n. 26, p. 475-479, 2006.

MITSUHASHI, J. **Invertebrate cell system application**. Florida: Boca Raton, v. 2, p. 3-20, 1989.

NARDI, J. B.; BEE, C. M.; MILLER, L. A. Stem cells of the beetle midgut epithelium. **Journal of Insect Physiology**, v. 56, p. 296–303, 2010.

NAVASCUES, J.; PERDIGOTO, C. N.; BIAN, Y.; SCHNEIDER, M. H.; BARDIN, A. J.; MARTÍNEZ-ARIAS, A. M.; SIMONS, B. D. *Drosophila* midgut homeostasis involves neutral competition between symmetrically dividing intestinal stem cells. **The EMBO Journal**, v. 31, p. 2473-2485, 2012.

OHLSTEIN, E.; SPRADLING, A. The *Drosophila* posterior midgut is maintained by pluripotent stem cells. **Nature**, v. 439, p. 470-474, 2006.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE. (OMS). **Situação da Chikungunya nas Américas**. República Dominicana. Ministério da Saúde, 2014.

PATHAK, S. K.; SKÖLD, A. E.; MOHANRAM, V.; PERSSON, C.; JOHANSSON U.; SPETZ, A. Activated apoptotic cells Induce dendritic cell maturation via engagement of toll-like receptor 4 (TLR4), dendritic cell-specific Intercellular adhesion molecule 3 (ICAM-3)- grabbing nonintegrin (DC-SIGN), and β -2 integrins. **The Journal of Biological Chemistry** v. 287, n. 17, p. 13731–13742, 2012.

PESSOA, I.; FONTES, E.; GABURO, N. Dengue: diagnósticos da América, núcleo técnico-operacional – Rio de Janeiro, setor de biologia molecular e canal do médico. **O Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 41, n. 5, p. 313-314, 2005.

PETERSON, J. S.; BARKETT, M.; MCCALL, K. Stage-specific regulation of caspase activity in *Drosophila* oogenesis. **Developmental Biology**, v. 260, p.113-123, 2003.

RAFF, M. Adult stem cell plasticity: fact or artifact? **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 19, p. 1-22, 2003.

RIVAS, M. P. **Avaliação de marcadores da senescência celular replicativa em células tronco mesenquimais humanas**. 2013. 37 f. Monografia (Bacharel em Ciências Biológicas) - Instituto de Biologia da Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2009.

ROTH, S. *Drosophila* oogenesis: coordinating germ line and soma. **Current Biology**, v. 2, p. 779-781, 2001.

SANDERSON, C. S.; BARFORD, J. P.; BARTON, G. W.; WONG, T. K. K.; REID, S. A Structure, dynamic model for animal cell culture: application to baculovirus/insect cell system. **Biochemical Engineering Journal**, v. 3, p. 219-229, 1999.

SCHNEIDER I. Cell lines derived from late embryonic stages of *Drosophila melanogaster*. **Journal of Embryology and Experimental Morphology**, v. 27, p. 363-365, 1972.

SMITH, A. G. Embryo-derived stem cells: of mice and men. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 17, p. 435-62, 2001.

SOUZA, V. F.; LIMA, L. M. C.; REIS, S. R. A.; RAMALHO, L. M. P.; SANTOS, J. N. Células-tronco: uma breve revisão. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 2, n. 2, p. 251-256, 2003.

SILVA, H. H. G.; SILVA, I. G.; LIRA, K. S. Metodologia de criação de *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera Culicidae) em condições laboratoriais. **Revista de Patologia Tropical**, v. 27, n. 1, p. 53-63, 1998.

SUDEEP, A. B.; PARASHAR, D.; JADI, R. S.; BASU, A.; MOKASHI, C.; ARANKALLE, V. V. A.; MISHRA, A. C. Establishment and characterization of a new *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) cell line with special emphasis on virus susceptibility. **In Vitro Cellular e Developmental Biology-Animal**, v. 45, p. 491-495, 2009.

SWEVERS, L.; IATROU, K. The ecdysone regulatory cascade and ovarian development in lepidopteran insects: insights from the silkworm paradigm. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 33, p. 1285-1297, 2003.

SWEVERS, L.; RAIKHEL, A. S.; SAPPINGTON, T. V.; SHIRK, P.; IATROU, K. Vitellogenesis and postvitellogenic maturation of the insect ovarian follicle, In: GILBERT, L. I.; IATROU, K.; GILL S. S. **Comprehensive Molecular Insect Science**, Amsterdam: Elsevier, 2005. v. 3, p. 87-155.

TAUIL, P. L. Aspectos críticos do controle do dengue no Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, v. 18, p. 867-871, 2002.

TONSO, A. **Monitoramento e operação de cultivos de células animais em sistemas de perfusão**. 2000. 109 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Escola Politécnica, Engenharia Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

VITAL, W.; REZENDE, G. L.; ABREU, L.; MORAES, J.; LEMOS, F. J. A.; SILVA VAZ JR, I.; LOGULLO, C. Retração banda Germ como um marco no metabolismo da glicose durante o *Aedes aegypti* embriogênese. **BMC Development Biology**, v. 10, p. 10-25, 2010.

WANG, S.; TAN, K. L.; AGOSTO, M. A.; XIONG, B.; YAMAMOTO, S.; SANDOVAL, H.; MANISH JAISWAL, M.; BAYAT, V.; ZHANG, K.; CHARNG, W.; DAVID, G.; DURAINÉ, L.; VENKATACHALAM, K.; WENSEL, T. G.; BELLEN, H. J. The retromer complex is required for rhodopsin recycling and its loss leads to photoreceptor degeneration. **Plos Biology**, v. 12, n. 4, p. 1001-1023, 2014.

WATT, F. M.; HOGAN, B. L. M. **Out of the Eden: stem cells and their niches.** Washington: Science, 2000. v. 287, p. 1427-1430.

ZAGO, M. A.; COVAS, D. T. **Células-tronco. A nova fronteira da medicina.** São Paulo: Atheneu, 2006. 268 p.

ZHANG, S.; CUI, W. Sox2, a key factor in the regulation of pluripotency and neural differentiation. **World Journal of Stem Cells**, v. 6, n. 3, p. 305-311, 2014.

ZARBIN, P. H. G.; FERREIRA, J. T. B.; LEAL, W. S. Metodologias gerais empregadas no isolamento e identificação estrutural de feromônios de insetos, **Química Nova**, v. 22, n. 1, p. 263-268, 1998.

ZSCHÄTZSCH, M.; OLIVA, C.; LANGEN, M.; DE GEEST, N.; OZEL, M. N.; WILLIAMSON, W. R.; LEMON, W. C.; SOLDANO, A.; MUNCK, S.; HIESINGER, P. R.; SANCHEZ-SORIANO, N.; HASSAN, B. A. Regulation of branching dynamics by axon-intrinsic asymmetries in tyrosine kinase receptor signaling. **eLife**, v. 3, p. 1-23, 2014.

YARAK, S.; OKAMOTO, O. K. Células-tronco derivadas de tecido adiposo humano: desafios atuais e perspectivas clínicas. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 85, n. 5, p. 647-656, 2010.