



Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
Coordenação de Capacitação
Divisão Apoio Técnico

PIBIC

2.270

**PROGRAMA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DO INPA
RELATÓRIO FINAL**

MAPEAMENTO DO *SUPERCONTIG MADS* – (FAMÍLIA DE FATORES DE TRANSCRIÇÃO 2 (MEF2)), EM CROMOSSOMOS POLITÊNICOS DE *Anopheles darlingi*, MANAUS, ESTADO DO AMAZONAS.

BOLSISTA: Daiane Cristine Negreiros Barbosa Chagas

ORIENTADOR(A): Dra. Miriam Silva Rafael

Relatório Final apresentado ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, como requisito para a conclusão como participante do Programa de Iniciação Científica do INPA.

Manaus – Amazonas
2017

Apoio Financeiro:



FAPEAM

Realização:



CIÊNCIA, TECNOLOGIA,
INOVAÇÕES E COMUNICAÇÕES





Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
Coordenação de Capacitação
Divisão Apoio Técnico

Título do Projeto do Orientador: Transcriptoma do mosquito *Anopheles darlingi*

Título do Plano de Trabalho do Bolsista: MAPEAMENTO DO SUPERCONTIG MADS – (FAMÍLIA DE FATORES DE TRANSCRIÇÃO 2 (MEF2)), EM CROMOSSOMOS POLITÊNICOS DE *Anopheles darlingi*, MANAUS, ESTADO DO AMAZONAS.

Resumo:

A malária é uma parasitose causada pelo protozoário *Plasmodium*, transmitida por meio da picada do mosquito fêmea que pertence ao gênero *Anopheles*, Filo Arthropoda, Classe Insecta, Ordem Diptera e Família Culicidae, que inclui todos os vetores conhecidos da malária humana. A caracterização de genes de interesse de mosquitos de importância epidemiológica, para o conhecimento de aspectos biológicos, evolutivos e controle vetorial tem sido realizada nas últimas décadas. Nesse sentido, o sequenciamento de genomas têm permitido comparações entre sequências gênicas de anofelinos, como o *Anopheles gambiae*, principal vetor da malária na África, *A. darlingi*, vetor primário no continente sul-americano. Citam-se também o *A. aegypti*, transmissor dos vírus zica (*zika*), chicungunha (*chikungunya*) e dengue, e de *Culex quinquefasciatus*, vetores de arboviroses e filariose, respectivamente. O *supercontig mef2* foi estudado, para uma melhor compreensão da variabilidade cromossômica de *A. darlingi*. Os resultados mostraram a localização cromossômica de *mef2* na região 43C, braço 3L. Após exaustiva busca do gene *mef2* em bancos genômicos públicos, este foi pouco estudado acerca de sua função. As proteínas *mef2* do fator potenciador de miócitos incluem os genes miosina, tropomiosina I e MLP60A, os quais regulam músculos específicos. As proteínas de *Mef2* são uma família de fatores de transcrição que, por meio do controle da expressão gênica, regulam a diferenciação celular e desempenham um papel crítico no desenvolvimento embrionário, como registrado em *Drosophila melanogaster*. O mapeamento físico cromossômico, do gene *mef2*, importante fator de transcrição, em *A. darlingi*, auxiliará estudos posteriores na compreensão da estrutura e organização do genoma e variabilidade cromossômica desse vetor primário de parasitos da malária, especialmente na Amazônia.

Apoio Financeiro:



FAPEAM

Realização:



CIÊNCIA, TECNOLOGIA,
INOVAÇÕES E COMUNICAÇÕES





Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
Coordenação de Capacitação
Divisão Apoio Técnico

Palavras Chave: Mapeamento cromossômico, *Anopheles darlingi*, cromossomos politênicos, Hibridização *In situ* Florescente

Subárea: Genética

Financiamento: PIBIC/CNPq

Data: ____ / ____ / ____

Orientador(a)

Deiane Cristina Rezende Barbosa dos Santos

Bolsista

Apoio Financeiro:



Realização:



CIÊNCIA, TECNOLOGIA,
INOVAÇÕES E COMUNICAÇÕES



INTRODUÇÃO

A malária é uma parasitose causada pelo protozoário *Plasmodium*, transmitida por meio da picada do mosquito fêmea que pertence ao gênero *Anopheles*, Filo Arthropoda, Classe Insecta, Ordem Diptera e Família Culicidae, que inclui todos os vetores conhecidos da malária humana. Em 2016 foram registrados 212 milhões de casos da doença no mundo, onde as crianças menores de cinco anos representaram cerca de 70% de todas as mortes por malária (WHO, 2016). Na América do Sul, o Brasil apresenta o maior número de casos (50,7%), com aproximadamente um milhão de ocorrências (SIVEP-Malaria, 2013), notadamente na Amazônia, com cerca de 99% dos casos da doença (MS, 2014).

O *A. darlingi* é o principal transmissor de parasitos da malária na América do Sul. Apresenta cariótipo com $2n=6$ cromossomos, com os autossomos (II e III) e um par de cromossomos sexuais heretomórficos (XX/XY), segundo (Rafael & Tadei, 1998). Os núcleos politênicos têm o autossomo 2 (braço 2R e braço 2L), autossomo 3 (braço 3R e braço 3L) e o cromossomo sexual X (Kreutzer *et al.*, 1972; Rafael *et al.*, 2010).

Considerando o método de FISH (*Fluorescent in situ hybridization*), que consiste no emparelhamento de determinado segmento de DNA/DNA, RNA/RNA ou DNA/RNA (sonda) com uma sequência complementar de nucleotídeos em amostra alvo, esta é uma ferramenta útil para identificar genes específicos em regiões cromossômicas (Guerra, 2004). Esse método tem sido empregado em mosquitos, para estudar a variabilidade, evolução cromossômica e sintenia gênica, caracterizada pela conservação na ordem e conteúdo gênico (Sharakhov *et al.*, 2002; Bridi *et al.*, 2013).

A caracterização de genes de interesse de mosquitos de importância epidemiológica, para o conhecimento de aspectos biológicos, evolutivos e controle vetorial tem sido realizada nas últimas décadas. Neste sentido, o sequenciamento de genomas têm permitido comparações entre sequências gênicas de anofelinos, como o *Anopheles darlingi*, vetor primário no Brasil e no continente sul-americano, o *Anopheles gambia*, principal vetor de protozoários causadores da malária na África, o *Aedes aegypti*, transmissor dos vírus zika, chikungunya e dengue, e *Culex quinquefasciatus*, vetor de arboviroses e filarioses.

Sequências de interesse do genoma e transcriptoma de *A. darlingi* têm sido mapeadas em cromossomos politênicos desse mosquito, tais como, os genes actina (Bridi *et al.*, 2013), miosina e arrestina (Grangeiro, 2013), GNBP (Bridi & Rafael 2016) e vitelogenina (Azevedo *et al.*, 2015), por meio do método de FISH.

A sequência do *superContig MADS* (família de fatores de transcrição = *box transcription enhancer factor 2* (*mef2*)) do genoma de *A. darlingi* (Rafael, dados não publicados) apresenta similaridade com *A. gambiae* (AgaP_ENSANGG00000023374). Também em *Drosophila melanogaster*, o gene *mef2* foi descrito com a função de responder a sinais extracelulares e ativar fatores genéticos, que controlam a diferenciação celular, sendo essencial para o desenvolvimento da musculatura larval desse mosquito. O promotor de transcrição *MADS* é uma região de 56 aminoácidos conservada encontrada dentro do domínio de ligação ao DNA de diversos organismos eucariotos (Shore & Sharrocks, 1995).

A literatura não registra mapeamento físico do gene *mef2* em cromossomos de *A. darlingi*. No presente estudo, o *SuperContig mef2* do genoma de *A. darlingi* será mapeado *in situ*, para preencher *gap* (lacuna) na descrição do genoma deste mosquito e, também, conhecer a evolução do *Supercontig mef2* em seus cromossomos politênicos.

MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Captura de Material

As capturas de *A. darlingi* foram realizadas em Manaus: Madeireira Portela (S 03° 05 19' 5'' e W 05° 98 92' 62''), Puraquequara (Figura 1). A identificação foi realizada, segundo Consoli & Lourenço-de-Oliveira (1994), Faran & Linthicum (1981) e Forattini (1962).



Figura 1. Mapa da área de estudo e imagem do local de coleta. Fonte: criadouro de mosquito no Bairro Puraquequara, AM (Guimarães, 2014).

2.2 Preparações de lâminas com cromossomos politênicos de *A. darlingi*

As preparações citológicas dos cromossomos politênicos de *A. darlingi* foram realizadas, segundo French *et al.* (1962) e Kumar e Collins (1994), com modificações para *A. darlingi* (Rafael *et al.* 2004). As Larvas de 4º estágio foram utilizadas para as preparações cromossômicas, a partir de glândulas salivares extraídas do protórax sobre as quais foram adicionados os fixadores I (1,5 mL Carnoy: 5 mL água destilada), II (2 mL Carnoy: 2 mL água destilada) e III (2 mL ácido lático 90%: 2 mL água destilada).

Sobre os cromossomos foi adicionada lamínula siliconizada e o material esmagado entre lâmina e lamínula (Figura 2).

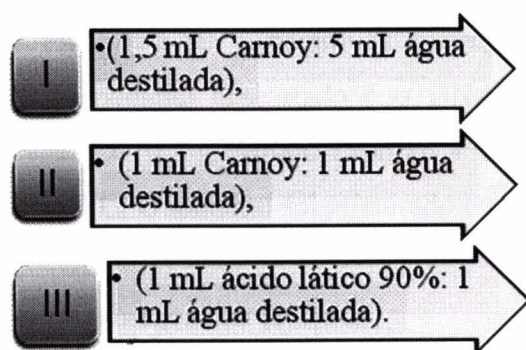


Figura 2. Preparações de lâminas com cromossomos politênicos de *A. darlingi*

As lâminas foram transferidas para refrigerador a 4 °C, em um recipiente com papel toalha umedecido com água destilada, por 12 horas. Em seguida, as lamínulas foram removidas em nitrogênio líquido e foram desidratadas em Etanol a 50%, 70%, 90% e 100%, por 5 minutos, cada. Após secagem das lâminas, estas, foram mantidas em refrigerador a 20°C negativos.

2.3. Hibridização *in situ* Fluorescente- FISH

2.3.1 Marcação do *SuperContig mef2* de *A. darlingi* por *Nick Translation System*(Invitrogen)

A sequência do *SuperContig mef2* de *A. darlingi* está clonado em um fosmídeo, inserido no vetor de clonagem *pCMV SPORT6* (INVITROGEN) foi obtido do genoma desse mosquito, disponível no Laboratório de Citogenética, Genômica e Evolução de Mosquitos, COSAS,INPA, Manaus – AM e foi marcado como sonda, com o *kit Nick translation* (Enzo cat. nº 42710-16).

Em um microtubo (1,5 mL) foram adicionados 2,5 µL de tampão 10x DNA-polimerase, 2,0 µL dNTP (*minus dATP*) *mix*; BSA 0.5 mg/mL, DNA (500 ng a 1 µg), 1,0 µL Cye³r dUTP (AmershamTM), DNase I (0.02U), 2,0 µL DNA Polimerase e completado o volume total para 25 uL água Milli - Q autoclavada. A sonda foi incubada 15 °C, por 2h30 min. A sonda foi homogeneizada e mantida 16°C, 3 horas.

2.3.2 Purificação da sonda

DNA de Salmon (1/10) do volume total da sonda e NaAc (3M) foram adicionados. A sonda foi purificada com Etanol (100% PA) a 1/10 do volume total da reação; Acetato de Sódio a 3M. A sonda foi mantida a 80 °C negativos *overnight*. O material foi centrifugado a 4° C, 14,000 rpm, 10 min. O sobrenadante descartado e o DNA fosmidial foi desidratado e diluído em solução de Hibridização 2x (0.2 g Sulfato Dextran + Formamida ultra pura+ H2O + 20 x SSC) previamente aquecida a 37°C. O material foi misturado e centrifugado antes do uso.

2.3.3 Pré-tratamento das lâminas

As lâminas depois de mergulhadas em tampão PBS 1X, durante 20 minutos foram transferidas para solução de paraformaldeído 4%, por 1 minuto, para desnaturação dos cromossomos. As lâminas foram desidratadas em etanol 50%, 70%, 90% e 100%, por 5 minutos. Foram secas ao ar

em temperatura ambiente. As lâminas foram mergulhadas em banhos de PBS 1X, por 20 minutos; paraformaldeído 4%, por 1 minuto e de etanol a 50%, 70%, 90% e 100% (5 min).

2.3.4 Desnaturação da sonda e DNA cromossomal

Foram adicionados em um tubo de 1,5 mL 10 μ L da sonda marcada com Cy³ (DNA na concentração final 0,5 μ g/ μ L a 1 μ g/ μ L) e 20 μ L de Sulfato Dextran 20% (em formamida) pré-aquecidos a 42°C. O conteúdo da sonda foi misturado por centrifugação brevemente. As lâminas foram aquecidas a 90 °C, por 5 segundos e, imediatamente a sonda (30 μ L) foi adicionada sobre a lâmina e coberta com lamínula 22x22 mm. O DNA cromossomal e a sonda foram desnaturados a 90 °C, por 10 minutos. (Figura 3)

2.3.5 Hibridização *in situ* fluorescente

As lâminas foram transferidas para câmara úmida com tampão 2XSSC, pré-aquecidas e incubadas a 37°C, por 18 horas. Posteriormente, as lâminas foram lavadas, removendo as lamínulas em 0,2X SSC em temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram banhadas em tampão 0,2X SSC a 37°C, 20 minutos. A última lavagem foi feita com o tampão 0,2X SSC em temperatura ambiente, por 20 minutos.



Figura 3: Desnaturação da sonda



Figura 4: Hibridização *in situ*

2.4. Detecção dos sinais:

Apoio Financeiro:



Realização:



MINISTÉRIO DA
CIÊNCIA, TECNOLOGIA,
INOVAÇÕES E COMUNICAÇÕES



Os cromossomos foram corados em 30 uL de solução YOYO 10X (Invitrogen – 895247, USA) diluídos em 270 uL de PBS 1X, em seguida adicionados 100 µL em cada lâmina, e cobertas com parafilme. As lâminas permaneceram em T.A, por 10 minutos, logo após o parafilme foi removido com jatos de PBS 1x. Posteriormente foram adicionados 10 µL de *Prolong Gold antifade* (Life – P36934, USA) e adicionada uma lamínula de 22x22mm. As lâminas permaneceram a T.A, durante 10 minutos. Posteriormente mantidas a 4°C e protegidas da luz.

2.5. Microfotografias:

Os cromossomos politênicos foram fotografados com maquina fotograficos digitais e analisados em microscópio de luz Axioplan Zeiss, campo claro com objetiva de 40x e 100x(com óleo de imersão) e ocular projectiva 10x/25.

3. Resultados

O *Blastx* da sequência do gene *mef2* de *A. darlingi* (<https://www.vectorbase.org/>), após a anotação, foi realizado como segue:

FEATURES Localização / qualificadores fonte 1..33303

/ Organismo = "Anopheles darlingi"

/ Db_xref = "taxon: 43151"

complemento gene (contig_15: 2631..6745)

/ Gene = ADAC002704

/ Nota = "MADS-box transcrição fator potenciador 2,

invertebrados [Fonte: Projetada de Anopheles gambiae

(AGAP007608) VB descrição externa; Prec: AGAP007608] "

mRNA join (complemento (657..710), complemento (373..576)

Por meio do método de FISH foi obtido o sinal fluorescente do *supercontig mef2* (sonda Pb22b) de *A. darlingi*. O gene *mef2* mapeou em um único sitio do braço cromossômico 3L, região

43C (figura 5). As regiões entre as seções 43C e 42C indicam possíveis pontos de interrupções de inversão heterozigótica. (Rafael *et al.*, 2010).

A figura 5 mostra o mapeamento físico do gene *mef2* no cromossomo 3 (braço 3L), segundo o fotomapa de *A. darlingi* (Rafael *et al.*, 2010).

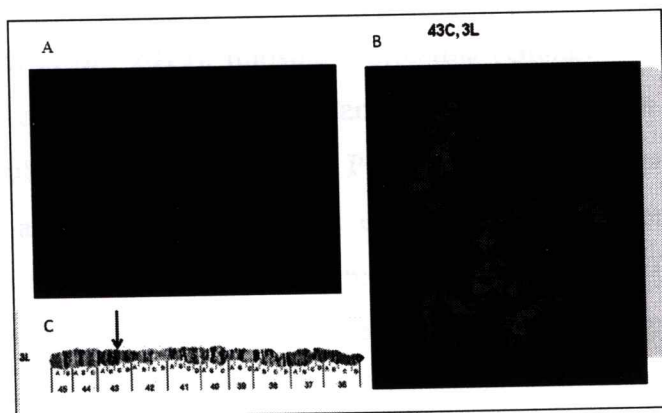


Figura 5. A: Mapeamento do gene *mef2* no cromossomo politênico 3L, região 43C de *A. darlingi* (seta). Figura B: Cromossomo 3 (braço 3L). Figura C: fotomapa de *A. darlingi* (Rafael *et al.* 2010), mostrando a localização do gene *mef2*, região 43C (seta).

A análise dos resultados foi realizado segundo o fotomapa de *A. darlingi* (Rafael *et al.*, 2010), ferramenta essencial para confirmação da localização da região hibridizada (Figura 6).

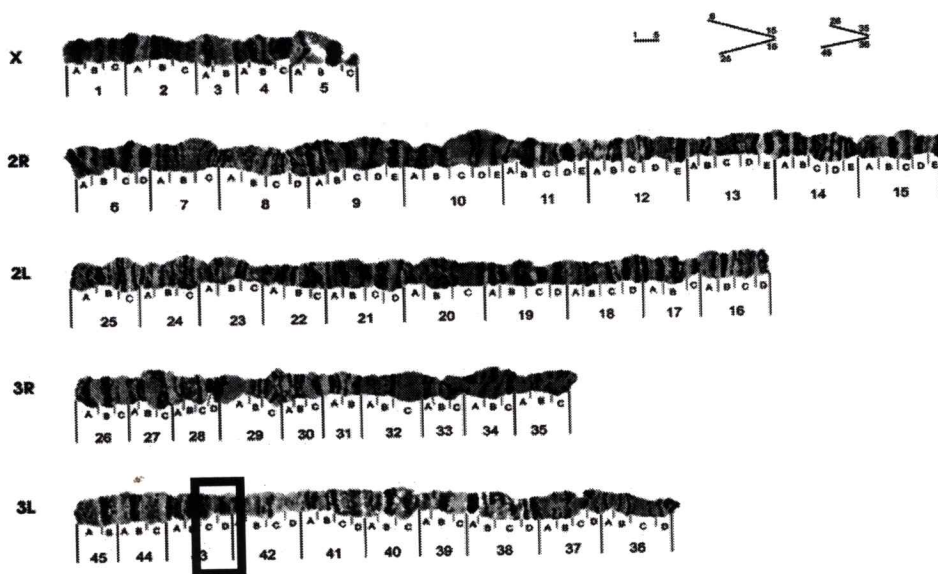


Figura 6. mostra a localização física do gene *mef2* no fotomapa de *A. darlingi* (Rafael *et al.*, 2010).

4. Discussão

Em *A. darlingi*, estudos acerca do mapeamento *in situ* cromossômico de sequências gênicas são escassos. Cita-se o mapeamento do DNAr (*pDm 238*) (Rafael et al, 2003), Hsp70 (Rafael et al., 2004), actina (Bridi et al., 2013), miosina e arrestina (Grangeiro de GNBPN Gran-negative binding protein) (Bridi et al., 2015) que permitiram determinar padrões e mecanismos para evolução cromossômica populacional desse mosquito. Pode-se observar que, em mosquitos de maneira geral, a principal resposta a pressões ambientais é o surgimento de inversões cromossômicas, estudado amplamente em anofelinos (Tadei et al., 2016; Cornel et al., 2016). Considerando as inversões, estas ocorrem quando um cromossomo é rompido em dois pontos e reorganiza-se de forma invertida. São mais facilmente reconhecíveis em cromossomos politênicos de dípteros (Guerra, 1988).

O mapeamento físico do *supercontig mef2* foi utilizado neste estudo, para uma melhor compreensão da variabilidade cromossômica de *A. darlingi*. Após exaustiva busca do gene *mef2* em bancos genômicos públicos, este foi pouco estudado acerca de sua função. Shore & Sharrocks, 1995; Stronach et al., 1999 mostraram que as proteínas *mef2* do fator potenciador de miócitos incluem os genes miosina, tropomiosina I e MLP60A, os quais regulam músculos específicos. *Mef2* são uma família de fatores de transcrição que, por meio do controle da expressão gênica, regulam a diferenciação celular e desempenha um papel crítico no desenvolvimento embrionário, como registrado em *Drosophila melanogaster*. Em organismos adultos, as proteínas *mef2* medeiam à resposta ao estresse em alguns tecidos (Bour et al., 2000). Na literatura, não foi encontrado nenhum registro do mapeamento físico cromossômico desse gene, por FISH, para análise comparativa com o resultado encontrado em *A. darlingi*. Neste mosquito, o sítio de marcação de *Mef2* na região de inversão (43C), braço 3L, indica alguma influência de aspectos ambientais na expressão desse gene já que na localidade Madeireira Portela, Puraquequara, AM, ocorre influência do ciclo de cheia e vazante da região, anualmente. Durante a subida das águas surgem mais criadouros, o que torna os ambientes diversificados, e os mosquitos precisam se adaptar a essas condições naturais,

Este estudo foi útil para mapear fisicamente o gene *Mef2* nos cromossomos de *A. darlingi*, considerando que este gene está envolvido no sistema muscular somático e miogênese desse mosquito.

5. CONCLUSÃO

O mapeamento físico cromossômico, do gene *mef2*, importante fator de transcrição, na região de inversão 43 C (braço 3L) de *A. darlingi*, auxiliará estudos posteriores na compreensão da estrutura e organização do genoma e variabilidade cromossômica desse vetor primário de parasitos da malária, especialmente na Amazônia.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Azevedo, K. M. D. ; Bridi, L.C. ; Rafael, M. S. 2015. Mapeamento Físico e Evolução Cromossômica do Gene vitelogenina de *Anopheles darlingi*, da Amazônia Central. In: *IV Congresso de Iniciação Científica (CONIC), do INPA-PIBIC/CNPq/PAIC/FAPEAM*, Manaus-AM, 20 de julho 2015.

Bour, B. A.; Chakravarti, M.; West, J.M., Abmayr, S. M. 2000. *Drosophila* SNS, a member of the immunoglobulin superfamily that is essential for myoblast fusion. *Genes & Development* 14:1498–1511.

Bridi, L.C.; Rafael, M.S. 2016. GNNP domain of *Anopheles darlingi*: are polymorphic inversions and gene variation related to adaptive evolution? *Genetica*, DOI 10.1007/s10709-016-9881-6

Bridi, L.C; Sharakhova, M.V; Sharakhov, I.V; Cordeiro, J; Azevedo-Junior, G.M; Tadei, W.P; Rafael, M.S., 2013. Chromosomal localization of actin genes in the malaria mosquito *Anopheles darlingi*. *Medical and Veterinary Entomology*. 27, 118–121.

Bour, B. A.; Chakravarti, M.; West, J.M., Abmayr, S. M. 2000. *Drosophila* SNS, a member of the immunoglobulin superfamily that is essential for myoblast fusion. *Genes & Development* 14:1498–1511.

Cornell, A.J.; Brisco, K. K.; Tadei, W.P.; Secundino N.F.C.; Rafael, M.S.; Galardo, A.K.R.; Medeiros, J.F.; Pessoa, F.A.C.; Ríos-Velásquez, C.M.; Lee, Y.; Pimenta, P.F.P.; Lanzaro, G.C. 2016 *Anopheles darlingi* polytene chromosomes: revised maps including newly described inversions and evidence for population structure in Manaus. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, Vol. 111(5): 335-346.

Consoli, R.A.G.B. & Lourenço-de-Oliveira, R. 1994. Principais Mosquitos de Importância Sanitária no Brasil. Rio de Janeiro – Fiocruz, 228p.

- Faran, M.E. & Linthicum, K.J. 1981. A handbook of the Amazonian species of *Anopheles* (Nyssorhynchus) (Diptera: Culicidae). *Mosq. Syst.* 13 (1): 01-81.
- Forattini, O. P. *Entomologia Médica*. 1962. Faculdade de Saúde e Higiene Pública da USP. Editora da USP. vol 1: 662 p.
- French, W. L.; Baker, R. H.; Kitzmiller, J. B. 1962. Preparation of mosquito chromosomes. *Mosquito. News* 22: 377-383.
- Gorham, J.R.; Stojanovich, J.C.; Scott, H.G. 1967. Clave ilustrada para los mosquitos anofelinos de Sudamerica Oriental. Department of Health, Education, and Welfare Public
- Grangerio, W. G.; Bridi, I. C.; Rafael, M.S. 2013. Mapping the myosin gene sequence in polytene chromosomes of *Anopheles darlingi* (diptera: culicidae) Manaus, State of Amazonas. In: 59º Congresso Brasileiro de Genética, 2013, Águas de Lindóia, SP.
- Guerra, M. dos S. *Introdução à citogenética geral*. Guanabara Koogan, 1988.
- Guerra, M. FISH. 2004. Conceitos e Aplicações na Citogenética. Ribeirão Preto: *Sociedade Brasileira de Genética*. 184p.
- Koeppel JK, Fuchs M, Chen TT, Hunt LM, Kovalick GE, Briers T. 1985. The role of juvenile hormone in reproduction. In *Comprehensive Insect Biochemistry and Pharmacology Volume 8*. Edited by: Kerkut GA, Gilbert LI. Pergamon Press, Oxford; 165-203.
- Kumar, V. & Collins, F. H. 1994. A technique for nucleic acid in situ hybridization to polytene chromosome of mosquitoes in the *Anopheles gambiae* complex. *Insect Molecular. Biology.* 3 (1): 41-47.
- Kreutzer, R.D.; Kitzmiller, J.B.; Ferreira, E. 1972. Inversion polymorphism in the salivary gland chromosomes of *Anopheles darlingi* Root. *Mosq. News*, 32: 555-556. Rafael, M. S.; Tadei, W. P.; Hunter, F. F. 2004. The physical gene Hsp70 map on polytene chromosomes of *Anopheles darlingi* from the Brazilian Amazon. *Genetica*, Netherlands, 121: 89-94.
- N.J. 2002. Inversions and Gene Order Shuffling in *Anopheles gambiae* and *A. funestus*. *Science*. 298 (5591):182-5.
- Rafael, M.S.; Rohde, C.; Bridi, L.C., Gaiety VLSV, Tadei, W.P. 2010. Salivary Polytene Chromosome Map of *Anopheles darlingi*, the Main Vector of Neotropical Malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 83: 241-249.
- Rafael, M. S.; Tadei, W. P. 1998. Metaphase karyotypes of *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *darlingi* Root and *A. (N) nuneztovari* Galbadón (Diptera: Culicidae). *Genetics and Biology*. 21 (4): 351- 354.
- Romans PA. 2002. Unique organization and unexpected expression patterns of *A. gambiae* Vitellogenin genes. 182.

Sengul, M. S e Tu, Z. 2010. Identification and characterization of odorant-binding protein 1 gene from the Asian malaria mosquito, *Anopheles stephensi*. *Insect Molecular Biology*. 19 (1):49–60.

SIVEP-Malaria. Notificações de casos de malária. Disponível em: http://portalweb04.saude.gov.br/sivep_malaria/. Data de acesso: 20 de março de 2017.

Song Chen, Jennifer S Armistead, Katie N Provost-Javier, Joyce M Sakamoto and Jason L Rasgon. 2010. Duplication, concerted evolution and purifying selection drive the evolution of mosquito vitellogenin genes. *BMC Evolutionary Biology*.10:142.

Sharakhov, I.V.; Serazin, A.C.; Grushko, O.G.; Dana, A.; Lobo, N.;Hillenmeyerill, M.E.; Westerman, R.; Romero-Severson, J.; Costantini, C.; Sagnon, N.; Collins, F.H.; Besansky,

Stronach, B.E., P.J. Renfranz, B. Lilly, M.C. Beckerle. 1999. Muscle LIM proteins are associated with muscle sarcomeres and require dMEF2 for their expression during *Drosophila* myogenesis. *Mol. Biol. Cell* 10: 2329–2342.

Tufail M, Takeda M. 2005. Molecular cloning, characterization and regulation of the cockroach vitellogenin receptor during oogenesis. *Insect Mol Biol* 14:389-401.

WHO, 2016. The World *Malaria Report 2016*. World Health Organization 280 pp.