

Joselita Maria Mendes dos Santos (2)

Wanderli Pedro Tadei (3)

Eucléia P. B. Contel (4)

RESUMO

Foram estudadas populações de *Anopheles triannulatus* procedentes da hidrelétrica de Balbina (AM), quanto ao sistema das esterases, usando-se gel de poli-acrilamida e como substrato α -naftil propionato. A análise eletroforética possibilitou identificar seis zonas de atividade e o mecanismo de herança foi estudado para cinco loci que foram polimórficos. Foram detectados dois alelos para as esterases 1, 2 e 4 e três para as esterases 3 e 5, sendo todos de ação codominante. Os dados de frequências gênicas mostraram-se diferentes para os alelos em cada locus. Os valores de qui-quadrados para as frequências genotípicas evidenciaram que a população não está em equilíbrio para todos os loci, sendo as frequências observadas dos homozigotos superiores às esperadas. Esses resultados foram interpretados como decorrentes de alterações ambientais que estão ocorrendo na área em estudo.

INTRODUÇÃO

Anopheles triannulatus do subgênero *Nyssorhynchus* apresenta ampla distribuição na América do Sul e em áreas da América Central, incluindo o Panamá, a Costa Rica e a Nicarágua. Na América do Sul, a espécie foi registrada nas Guianas, Colômbia, Venezuela, Equador, Peru, Bolívia, Paraguai, Brasil e Argentina (Lane, 1953; Forattini, 1962; Faran, 1980). A importância de *A. triannulatus* como transmissora da malária humana é assunto controverso. Na Venezuela, Benarroch (1931) a assinalou como possível vetor durante surto epidêmico. Gabaldon & Cova Garcia (1946) relatam registro de infecção natural com oocisto. No entanto, Faran & Linthicum (1981) descrevem que *A. triannulatus* não tem importância na transmissão da malária, na maior parte de sua área de ocorrência e Gorhan et al. (1967, 1973) consideram incerto o "vetorial status" da espécie.

Por outro lado, com a utilização de testes de radioimunoensaio e testes imunoenzimáticos com anticorpos monoclonais, foi detectada a infecção de *A. triannulatus* por *P. vivax*, em material procedente do estado do Pará. Foi registrada ainda a presença de esporozoítos e oocistos nas glândulas salivares e estômagos, respectivamente. (Arruda et al., 1986). Estudos

¹ Trabalho subvencionado pela ELETRONORTE/PIG-CNPq.

² Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA.

³ Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA/UNESP - Campus de São José do Rio Preto - SP.

⁴ Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP, Campus de Ribeirão Preto - SP.

recentes na região de Rondônia, por meio de testes imunoenzimáticos, foram registrados também para esta espécie infecção por *P. vivax* (Tadei et al., 1988).

Tendo em vista contribuir para os conhecimentos sobre populações naturais de *A. triannulatus* da Amazônia, apresentamos nesse trabalho dados de um estudo genético e populacional de esterases dessa espécie.

MATERIAL E MÉTODOS

As amostras de *A. triannulatus* foram obtidas na hidrelétrica de Balbina, na área próxima ao canteiro de obras. As coletas foram feitas na forma alada, em meio à mata, às margens do rio Uatumã no horário entre 17:00 e 22:00 horas. Após as capturas, as fêmeas foram postas para desovar isoladamente e, em seguida à eclosão dos ovos, as larvas foram mantidas até atingirem o quarto estágio e utilizadas na análise eletroforética. Na manutenção das larvas em laboratório, o alimento foi a base de pó de fígado, farinha de peixe e germe de trigo, conforme descrito em Santos et al. (1981), modificado a partir de Rabbani et al. (1976).

Para análise das isoenzimas de esterase, foram homogeneizadas, individualmente, larvas de quarto estágio em 15 μ l de água destilada contendo mercaptoetanol a 0,5%. O homogeneizado foi centrifugado a 5.000 rpm por 5 minutos, em temperatura ambiente. O sobrenadante era absorvido em papel de filtro Whatman nº 3 medindo 0,5 x 0,2 cm, com os quais eram feitas as aplicações verticais no gel. A técnica de eletroforese foi baseada na de Steiner & Joslyn (1979) e Contel (1980), com algumas modificações. O suporte usado foi gel de poliacrilamida, contendo 7 g de Cyanogum-41 em 100 ml de tampão Tris-HCl 0,02M pH 8,6, e a reação foi catalisada pela adição de 0,1 ml de Tetrametiletilenodiamina (TMED) e 0,43 ml de persulfato de amônia a 10%. O tampão das cubas foi Tris-HCl 0,3 pH 8,6. A eletroforese foi feita a 8°C, durava aproximadamente cinco horas usando-se 7 V/cm, quando obtínhamos uma linha de frente a 10 cm do ponto de aplicação das amostras.

A atividade das esterases foi caracterizada com α -naftil propionato, utilizando o procedimento descrito por Falcão (1984). Esse substrato é o que revela um número maior de bandas em anofelinos, conforme descrito em Santos (1979), Santos et al. (1985) e Scarpassa (1988). A mistura de reação era preparada com aproximadamente 40 mg de corante Fast Blue RR Salt, previamente dissolvidos em 100 ml de tampão fosfato 0,05 M pH 6,5 e 3 ml da solução estoque do substrato (1 g do éster em 10 ml de solução água: acetona, 1:1 em volume).

A mobilidade relativa dos alelos foi calculada para cada locus, tomando como referência o alelo mais freqüente (RF = 1,00).

RESULTADOS

Foram estudados 104 indivíduos descendentes de 52 fêmeas coletadas na natureza. As análises eletroforéticas revelaram um perfil com seis zonas de atividade (Figura 1), denominadas EST1 a EST6. Foi constatada variação para todos os loci e as seis isoenzimas podem ser assim caracterizadas:

Esterases 1 e 2 - estas isoenzimas apresentaram intensidade de coloração alta na maioria das larvas analisadas. O perfil eletroforético foi semelhante em ambas, caracterizado pelo aparecimento de duas bandas no indivíduo heterozigoto e com três fenótipos distintos no gel. O primeiro, apresentando uma única banda de mobilidade rápida, foi denominada por EST1 F e

EST2 F; o segundo, também mostrando uma única banda e de mobilidade lenta, foi designado por EST1 S e EST2 S. O terceiro, heterozigoto, apresenta simultaneamente duas bandas, foi denominado EST1 FS e EST2 FS. A variação dos genótipos sugere que o controle das duas esterases, depende da atividade de dois alelos de ação codominante, num mesmo locus autossômico - EST*F^{1,00}, EST2*F^{1,05} e EST1*S^{0,99}, EST2*S^{1,00}.

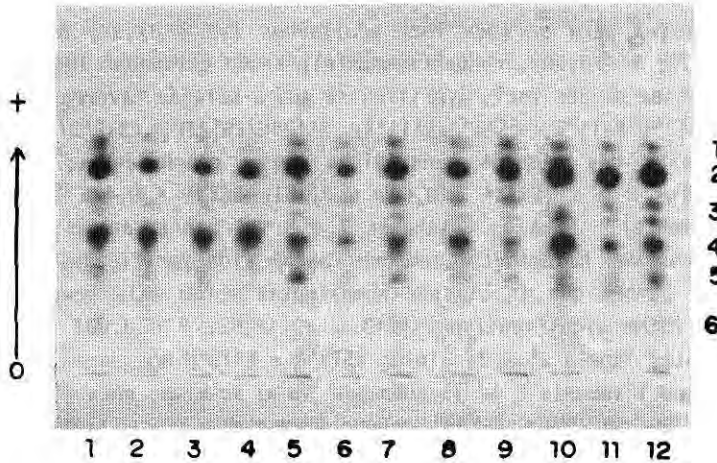


Figura 1 - Isoenzimas de esterase de larvas de 4º estágio de *Anopheles triannulatus* reveladas com α - naftil propionato. Nesta figura, observa-se variação para a EST3 (amostras 1, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 e 12) e EST5 (amostras 1, 2, 3, 4, 10 e 11). Gel de poliacrilamida, sistema tampão Tris-HCl, pH 8,6. Migração no sentido indicado.

Em algumas observações, foi registrada a superposição da banda mais lenta da esterase 1 com a banda mais lenta da esterase 2. Também foram observadas, em alguns casos, uma ou duas bandas de intensidade fraca entre as esterases 1 e 2 e foram interpretadas como sendo isoenzimas secundárias.

Esterase 3 - as análises mostraram seis fenótipos, sendo os indivíduos heterozigotos representados por duas bandas. O fenótipo determinado pela banda de mobilidade mais rápida foi denominado de EST3 F; o de mobilidade intermediária EST3 M, e o determinado pela banda de mobilidade lenta EST3 S. Os heterozigotos foram denominados de EST3 FS e EST3 MS. Estes resultados sugerem que o controle da Esterase 3 é feito por três alelos - EST3*F^{1,07}, EST3*M^{1,00} e EST3*S^{0,94}.

Esterase 4 - para esta isoenzima, o mesmo mecanismo genético observado para as esterases 1 e 2 foi constatado, sendo registrados os três fenótipos já mencionados. Seguindo-se a mesma denominação, o fenótipo determinado pela banda de mobilidade lenta foi designado EST4 S; o determinado pela banda de migração rápida de EST4 F e o heterozigoto com duas bandas, de EST4 FS. Também para esta isoenzima foi verificado um certo grau de superposição entre a banda rápida e a banda lenta da esterase 3.

Esterase 5 - o padrão eletroforético desta esterase é idêntico ao encontrado para esterase 3. Os seis fenótipos - EST5 F, EST5 M, EST5 S, EST5 FM, EST5 FS e EST5 MS foram observados - determinados pelos alelos EST5*F^{1,07}, EST5*M^{1,00} e EST5*S^{0,89}.

Esterase 6 - o perfil eletroforético desta isoenzima mostrou-se diferente do observado para as demais esterases. Foram relevadas, frequentemente três bandas de espessura menor em relação às bandas das outras esterases e de intensidade muito fraca. Este aspecto não permitiu identificar o possível mecanismo genético envolvido na herança. Os dados permitem também supor que todas as esterases têm estrutura monomérica (com exceção da Esterase 6).

As frequências gênicas calculadas mostraram os resultados que apresentamos nas Tabelas 1 e 2. Na tabela 1 constam os dados das esterases 1, 2 e 4 e na tabela 2, as frequências relativas às esterases 3 e 5. Para as esterases 1, 2 e 4 (Tabela 1), os valores de χ^2 foram altamente significativos para os três loci analisados ($\chi_1^2 = 37,32$; $P < 0,001$; $\chi_1^2 = 11,79$; $P < 0,001$; $\chi_1^2 = 30,71$; $P < 0,001$, respectivamente), sendo estudados 104, 103 e 98 indivíduos, respectivamente, em cada um dos loci. Verifica-se que a seleção favorece os duplos homozigotos nos três casos (EST1*F/EST1*F, EST1*S/EST1*S; EST2*F/EST2*F; EST2*S/EST2*S; EST4*F/EST4*F; EST4*S/EST4*S. Apesar das classes genotípicas serem concordantes, houve diferenças nas frequências dos alelos F e S (EST1* = 0,649 e 0,351; EST2* = 0,476 e 0,524; EST4* = 0,668 e 0,332, respectivamente). Para as esterases 3 e 5 foi constatado o mesmo resultado quanto às classes genotípicas dos homozigotos, embora tenham sido verificados três alelos para cada locus. Verifica-se também que as classes homozigotas foram mais frequentes que o esperado e os valores de χ^2 foram significativos (EST3 - $\chi_3^2=14,62$; $P < 0,001$ e EST5 - $\chi_3^2=24,06$ $P < 0,001$, respectivamente, Tabela 2). Os alelos EST3*M e EST5*M mostraram as frequências maiores - 0,481 e 0,409, respectivamente. As frequências foram próximas para os alelos EST3*F, EST3*S e EST5*F (0,264, 0,255, 0,298 e 0,293, respectivamente).

Tabela 1 - Distribuição das frequências observadas, esperadas e valores de qui-quadrado para as esterases 1, 2 e 4 de *Anopheles triannulatus* *** = $P < 0,001$.

Locus	Classe genotípica	N	Obs	Esp	Frequência dos alelos		χ_1^2
					EST*F	EST*S	
EST1	EST1*F/EST1*F	104	58	43,81	0,649	0,351	37,32***
	EST1*F/EST1*S		19	47,38			
	EST1*S/EST1*S		27	12,81			
EST2	EST2*F/EST2*F	103	32	23,31	0,476	0,524	11,79***
	EST2*F/EST2*S		34	51,38			
	EST2*S/EST2*S		37	28,31			
EST4	EST4*F/EST4*F	98	56	43,78	0,668	0,332	30,71***
	EST4*F/EST4*S		19	43,44			
	EST4*S/EST4*S		23	10,78			

Tabela 2 - Distribuição das frequências observadas, esperadas e valores de qui-quadrado para as esterases 3 e 5 de *Anopheles triannulatus* *** = P < 0,001.

Locus	Classe genotípica	N	Obs	Esp	Frequência dos alelos			χ^2
					F	M	S	
EST3	EST3*F/EST3*F	104	11	7,27	0,264	0,481	0,255	14,62***
	EST3*F/EST3*M		22	26,44				
	EST3*F/EST3*S		11	14,01				
	EST3*M/EST3*M		31	24,04				
	EST3*M/EST3*S		16	25,48				
	EST3*S/EST3*S		13	6,76				
EST5	EST5*F/EST5*F	104	14	9,24	0,298	0,409	0,293	24,06***
	EST5*F/EST5*M		14	25,34				
	EST5*F/EST5*S		20	18,18				
	EST5*M/EST5*M		29	17,37				
	EST5*M/EST5*S		13	24,93				
	EST5*S/EST5*S		14	8,94				

Tabela 3 - Heterozigosidade intraloco e média, observada e esperada para esterase de *Anopheles triannulatus*.

Locus	n° de indivíduos heterozigotos		n° Total de indivíduos	Heterozigosidade intraloco	
	observado	esperada		observada	esperada
EST 1	19	47,38	104	0,1827	0,4556
EST 2	34	51,38	103	0,3301	0,4988
EST 3	49	65,93	104	0,4712	0,6339
EST 4	19	43,44	98	0,1939	0,4433
EST 5	47	68,45	104	0,4519	0,6582

$$\bar{H}_a = 0,3260 \pm 0,3700$$

$$\bar{H}_e = 0,5380 \pm 0,3181$$

Embora as classes homozigotas sejam favorecidas para os três **loci**, verifica-se que existem diferenças entre os mesmos quanto às frequências dos alelos. Para as esterases 1 e 4, as frequências são opostas para os alelos **fast** e **slow** (**EST1*** = 0,649 e 0,351; **EST4*** = 0,668 e 0,332) e as frequências são relativamente próximas para esterase 2 (0,476 e 0,542). Para as esterases 3 e 5 (tabela 2) em que três alelos foram constatados em cada **locus**, verifica-se que também a seleção favorece a classe dos duplos homozigotos. Os valores de qui-quadrado foram altamente significativos para as duas esterases (**EST3** - $\chi^2_2 = 14,62$; $P < 0,001$ e **EST5** - $\chi^2_3 = 24,06$; $P < 0,001$).

Considerando-se os lados das tabelas 1 e 2, relativos às frequências genotípicas e dos alelos, foi calculada a heterozigosidade intraloco e média, observada e esperada, para os 5 **loci** (Tabela 3). A heterozigosidade média observada H_o foi estimada em $0,3260 \pm 0,3700$ e a esperada (H_e) em $0,5380 \pm 0,3181$.

DISCUSSÃO

Os resultados evidenciaram que as isoenzimas de esterase em **Anopheles triannulatus** apresentam seis zonas de atividade e que as esterases 1 a 5 mostram variação, sendo detectados dois alelos para **EST1**, **EST2** e **EST4** e três alelos para **EST3** e **EST5**. O mecanismo genético da **EST6** não foi analisado. Em **Anopheles darlingi**, também seis zonas de atividade foram descritas por Narang et al. (1979a), Santos (1979) e Santos et al. (1985), durante o desenvolvimento ontogenético. Para **Anopheles nuñez-tovari** do mesmo subgênero **Nyssorhynchus**, Narang et al. (1979a) e Scarpassa (1988) verificaram uma zona a mais de atividade, descrevendo sete isoenzimas. Em **Anopheles quadrimaculatus**, Trebatoski & Haynes (1969) detectaram 8 bandas. Contudo, padrões de esterases mais complexos foram descritos para outras espécies de **Anopheles**, como em **Anopheles stephensi** em que Freyvogel et al. (1968) relataram 19 bandas; Ved Brat & Whitt (1975) descrevem 9 zonas de atividade na ontogênese de **Anopheles albinanus**.

Em outros gêneros de mosquitos, diferentes padrões de esterases foram descritos. Em **Culex**, Freyvogel et al. (op. cit.) identificaram 24 bandas para **C. tarsalis**; Simon (1969) relatou seis zonas de atividade esterásica no desenvolvimento de **C. pipiens fatigans**. Para o gênero **Aedes**, Trebatoski & Haynes (op. cit.) também constataram um número elevado de bandas, sendo descritas 12 bandas em **Aedes albopictus** e **Aedes trisseriatus**, e 10 bandas em **Aedes togoi**.

Considerando o nível de variação das esterases para cada **locus**, os dados da literatura evidenciam mecanismos complexos, havendo diferenças conforme as espécies e os gêneros considerados. Em **Aedes albopictus**, Tadano (1987) detectou 4/5 alelos no **locus EST5** e três no **locus EST4**, com a ocorrência de alelos nulos. Este mesmo autor, em 1982, analisando **Aedes togoi**, detectou três zonas de atividade esterásica e verificou que o **locus EST3** tem cinco alelos. Saul et al. (1976) identificaram, em populações Africanas de **Aedes aegypti**, um sistema muito complexo para o **locus EST6**, sendo este constituído de 14 alelos.

No gênero **Anopheles** foram detectados polimorfismos em diferentes espécies. Considerando-se **A. darlingi** e **A. nuñez-tovari** (importantes vetores da malária na região Amazônica) para a primeira, Narang et al. (1979), Santos (1979) e Santos et al. (1985) constataram variação para os seis **loci** de esterase. Scarpassa (1988) identificou sete isoenzimas de esterase em **A. nuñez-tovari**, sendo observada variação genética em seis. Esta autora relata três alelos no **locus EST6** e dois nos demais **loci**, exceto para a **EST3**, que não foi analisado. Os dados da literatura relatam polimorfismos em **Anopheles atroparvus** (Bianchi & Rinaldi, 1970);

Anopheles punctipennis (Narang & Kitzmiller, 1971 a,b e 1973); *A. albimanus* (Ved Brat & Whitt, 1975; Narang et al., 1981) e *Anopheles aquasalis* (Narang et al., 1979b).

Comparando os resultados das frequências observadas e esperadas, para todos os loci analisados, verificamos que a população não está em equilíbrio segundo a distribuição de Hardy-Weinberg. Os valores de qui-quadrado foram altamente significativos (Tabelas 1 e 2). Para as esterases 1 e 4, os alelos EST1*F e EST4*F são os que apresentam as frequências maiores, enquanto que para a esterase 2, é o alelo EST2*S. Os valores dos alelos EST3*M e EST5*M (Tabela 2) são os mais elevados para ambos os loci (0,481 e 0,409, respectivamente). As frequências dos alelos EST3*F e EST3*S - EST5*F e EST5*S mostraram valores muito próximos (0,264 e 0,255 - 0,293, respectivamente). Variações nas frequências gênicas de esterases de populações de *Anopheles* da Amazônia foram relatadas por Contel et al. (1984) em *A. darlingi* dos Estados do Pará (PA-422) e de Rondônia (Ariquemes); por Narang et al. (1979) em populações de *A. darlingi* e *A. nuñez-tovari* da BR-174 (Manaus-Boa Vista) e de Manaus. Santos (1979) e Santos et al. (1985), também em *A. darlingi* de duas localidades da BR-174, mostram uma variação de frequências.

Em relação às frequências das classes genótípicas, verifica-se que para todos loci estudados a população não está em equilíbrio e as classes homozigotas estão em frequências maiores que as esperadas. Resultados semelhantes foram observados por Scarpassa (1988), para uma população de *A. nuñez-tovari* do Estado do Pará, em que verificou também as classes dos homozigotos mais frequentes para as esterases 1, 2 e 6. Esses resultados são indicativos de uma adaptabilidade maior dos indivíduos portadores desses genótipos. O fato da população não estar em equilíbrio poderia ser explicado com base nas alterações ambientais introduzidas no local, uma vez que as amostragens foram obtidas em áreas de desmatamento nas proximidades do Canteiro de Obras do reservatório. Estes dados devem refletir significativas alterações ecológicas que foram introduzidas no ambiente, tendo, possivelmente, influenciado nas frequências genótípicas detectadas, com diferentes valores adaptativos para as classes homozigotas.

Comparando-se as esterases entre as diferentes espécies de *Anopheles*, verifica-se que existem diferenças quanto ao nível de variação e quanto à ocorrência de mais de dois alelos para locus específico. Assim, podemos constatar que no subgênero *Nyssorhynchus*, *A. triannulatus* apresenta um nível maior de variação em relação a *A. darlingi*. Por outro lado, esta última é altamente polimórfica em populações do eixo central da Amazônia, para inversões cromossômicas no estado heterozigoto (Kreutzer et al., 1972; Tadei et al., 1982; Tadei & Santos, 1982). Incluindo os dados de esterase de *A. nuñez-tovari*, verifica-se que esta apresenta um nível elevado de variação semelhante à *A. triannulatus*. Considerando-se a ocorrência de alelos para locus específico, constatamos que estas duas últimas, novamente, são mais semelhantes por apresentarem três alelos em dois loci (*A. triannulatus*: EST3 e EST5; *A. nuñez-tovari*: EST5 e EST7); *A. darlingi* mostra três alelos em apenas um locus (EST5).

Ainda, torna-se relevante analisar a capacidade de infecção das espécies de *Anopheles* pelos plasmódios humanos. Este fato é especialmente verdadeiro para *A. darlingi*, que apresenta elevado polimorfismo cromossômico, cujo aspecto da infecção diferencial foi aventado por Tadei (1980), Tadei et al. (1982) e Tadei & Santos (1982). Desde que genótipos específicos podem não ser susceptíveis à infecção por *Plasmodium vivax* e *P. falciparum*, como relatam Warren, et al. (1977) em *Anopheles albimanus* e também a outras espécies de *Plasmodium*, como em Frizzi et al. (1975) para *Anopheles stephensi* com o *Plasmodium gallinaceum* e Wing et al. (1985) para *Anopheles quadrimaculatus* com o *Plasmodium yoelii*. Desta forma, a análise da variabilidade

enzimática em populações de anofelinos é de fundamental importância para se avaliar a diferenciação geográfica de populações e suas correlações com a capacidade de infecção das espécies por *Plasmodium*.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Professor Jorge Arturo Lobo pelas sugestões e leitura do manuscrito e ao José Marinho Correia pela ajuda nos trabalhos de campo e de laboratório.

SUMMARY

The esterase system of populations of *Anopheles triannulatus* from the Balbina hydroelectric project were studied by polyacrylamide gel electrophoresis, using α -naphthyl propionate as enzyme substrate. The analysis revealed six zones of activity, and the mechanism of inheritance was studied for five polymorphic loci. Two alleles were detected for esterases 1, 2 and 4, and three for esterases 3 and 5, all being co-dominant. Genetic frequency data were different for the alleles at each locus, chi-squared values for genotypic frequencies indicated that the population is not in equilibrium for all the loci, as homozygote frequencies were higher than expected. This was interpreted as being the result of environmental changes occurring in the study area.

Referências bibliográficas

- Arruda, M.; Carvalho, M. B.; Nassenzweig, R. S.; Maracic, M.; Ferreira, A. W. & Cochrane, A. H. - 1986. Potencial vectors of malaria and their different susceptibility to *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* in Northern Brazil identified by immunassay. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.*, 35:873-881.
- Benarroch, E. I. - 1931. Studies on malaria in Venezuela. *Am. J. Hyg.*, 14:690-693.
- Bianchi, U. & Rinaldi, A. - 1970. New gene - enzyme system in *Anopheles atroparvus*: occurrence and frequencies of four alleles at the EST6 locus. *Can. J. Genet. Cytol.*, 12:325-330.
- Contel, E. P. B. - 1980. **Variabilidade protéica em populações naturais de abelhas da Amazônia.** Tese de Livre Docência. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. 120 pp.
- Contel, E. P. B.; Santos, J. M. M. & Tadei, W. P. - 1984. Biologia de Anofelinos Amazônicos. VI. Variabilidade Enzimática de *Anopheles darlingi* Root (Diptera, Culicidae). *Acta Amazonica*, 14(1-2):238-243.
- Faran, M. E. - 1980. **Mosquitos Studies** (Diptera, Culicidae) XXXIV. A revision of the *Albimanus* section of the subgenus *Nyssorhynchus* of *Anopheles*. *Contrib. Amer. Ent. Inst.*, 15(7):1-215.
- Faran, M. E. & Linthicum, K. J. - 1981. A handbook of the Amazonian species of

- Anopheles (Nyssorhynchus)** (Diptera, Culicidae). **Mosq. Syst.**, 13:1-81.
- Falcão, T. M. M. A. - 1984. **Polimorfismos proteicos em populações naturais de abelhas brasileiras. Tese doutorado.** Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. 231 pp.
- Forattini, O. P. - 1962. **Entomologia Médica.** V. 1. Parte Geral. **Diptera Anophelini.** São Paulo, Faculdade de Higiene e Saúde Pública.
- Freyvogel, T. A.; Hunter, R. L.; Smith, E. M. - 1968. Non specific esterases in mosquitos. **J. Histochem. Cytochem.** 16:765-790.
- Frizzi, G.; Rinaldi, A. & Bianchi, U. - 1975. Genetic studies on mechanisms influencing the susceptibility of Anopheline mosquitoes to plasmodial infection. **Mosquito News**, 35(4):505-508.
- Gabaldon, A. & Cova-Garcia, P. - 1946. Zoogeografia de los anofelinos in Venezuela. I. Los dos Vectores principales. **Tijeretazos sobre malar.**
- Gorhan, J. R.; Stojanovich, C. J. & Scott, H. G. - 1967. **Clave ilustrada para los mosquitos anofelinos de Sudamerica Oriental.**, Department of Health, Education and Welfare. Public Health Service. 64 pp.
- - 1973. **Clave ilustrada para los mosquitos anofelinos da Sudamerica Occidental.** **Mosq. Syst.**, 5:97-156.
- Kreutzer, R. D.; Kitzmiller, J. B. & Ferreira, E. - 1972. Inversion polymorphism in the salivary gland chromosomes of **Anopheles darlingi** Root. **Mosq. News**, 32:355-365.
- Lane, J. - 1953. **Neotropical Culicidae.** V. 1. **Dixinae, Chaoborinae and Culicinae,** tribes **Anophelini, Toxorhynchitini and Culicini** (genus **Culex** only). São Paulo, Universidade de S. Paulo.
- Narang, S. & Kitzmiller, J. B. - 1971a. Esterase polymorphism in a natural population of **Anopheles punctipennis**. II. Analysis of the EST - C System. **Can. J. Genet. Cytol.**, 13:771-776.
- - 1971b. Esterase polymorphism in a natural population of **Anopheles punctipennis**. I. Genetic analysis of the esterase. A -B Systems. **J. Hered.** 62(5):259-264.
- - 1973. Esterase polymorphism in a natural population of **Anopheles punctipennis**. IV. Genetic analysis of the EST F System. **Ciênc. Cult.** 25(11):1085-1088.
- Narang, S.; Santos, J. M. M.; Garcia, J. C.; Cristakou, H. D. & Narang, N. - 1979a. Genética de populações de anofelinos. IV. Estudos eletroforéticos das populações naturais de **Anopheles nuñez-tovari** e **Anopheles darlingi**. Correlação genética entre espécies. **Acta Amazonica**, 9(3):529-542.
- Narang, S.; Kitzmiller, J. B.; Galler, R.; Rios, R. I. & Narang, N. - 1979b. Genética de populações de anofelinos. III. Análise eletroforética de **Anopheles aquasalis** (Diptera: Culicidae). **Rev. Bras. Pesq. Med. Biol.**, 12(4-5):303-309.
- Narang, S.; Seawright, J. A. & Kitzmiller, J. B. - 1981. Linkage relationships and assignment of esterase - 4 and esterase - 8 loci to chromosome 3 in **Anopheles albimanus**. **J. Hered.**, 72:157-160.
- Rabbani, M. G.; Seawright, J. A. & Leatherwood, L. B. - 1976. A method for culturing single families of **Anopheles albimanus**. **Mosq. News**, 36:100-102.
- Santos, J. M. M. - 1979. **Aspectos Biológicos e Isoenzimáticos de Anopheles (N.) darlingi** Root, 1926 (Diptera: Culicidae). **Dissertação de Mestrado.** INPA/FUA, Manaus, AM. 87 pp.

- Santos, J. M. M.; Contel, E. P. B. & Kerr, W. E. - 1981. Biologia de Anofelinos Amazônicos. I. Ciclo biológico, postura e estádios larvais de *Anopheles darlingi* Root, 1926 (Diptera: Culicidae) da Rodovia Manaus-Boa Vista. *Acta Amazonica*, 11(4):789-797.
- - 1985. Biology of Amazonian Mosquitoes. III. Esterase Isozymes in *Anopheles darlingi*. *Acta Amazonica*, 15(1-2):161-177.
- Saul, S. H.; Guptavanij, P. & Craig Jr. G. B. - 1976. Genetic variability at an esterase locus in *Aedes aegypti*. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 69(1):73-79.
- Scarpassa, V. M. - 1988. Estudos do ciclo biológico e de isoenzimas na ontogênese de *Anopheles (Nyssorhynchus) nuñez-tovari* Gabaldon, 1940 (Diptera, Culicidae). *Dissertação de Mestrado*. INPA/FUA. 172 pp.
- Simon, J. P. - 1969. Esterase isozymes in the mosquito *Culex pipiens fatigans*. Developmental and genetic variation. *Ann Entomol. Soc. Am.*, 62(6):1307-1311.
- Steiner, W. W. M. & Joslyn, D. J. - 1979. Electrophoretic techniques for the genetic study of mosquitoes. *Mosq. News*, 39(1):35-54.
- Tadano, T. - 1982. Linkage on an esterase Locus in the Mosquito *Aedes togoi*. *Biochem. Genet.*, 20(7-8):711-721.
- - 1987. Genetic studies on two carboxylesterase loci in *Aedes albopictus*. *J. Am. Mosq. Control. Assoc.*, 3(2):137-141.
- Tadei, W. P. - 1980. Diferenças cromossômicas entre espécies e populações de *Anopheles*. *Acta Amazonica*, 10(2):369-377.
- Tadei, W. P.; Santos, J. M. M. & Rabbani, M. G. - 1982. Biologia de anofelinos amazônicos. V. Polimorfismo cromossômico de *Anopheles darlingi* Root (Diptera, Culicidae). *Acta Amazonica*, 12(2):353-369.
- Tadei, W. P. & Santos, J. M. M. - 1982. Biologia de anofelinos amazônicos. VII. Estudo da variação de frequências das inversões cromossômicas de *Anopheles darlingi* Root (Diptera, Culicidae). *Acta Amazonica*, 12(4):759-785.
- Tadei, W. P.; Santos, J. M. M.; Costa, W. L. S. & Scarpassa, V. M. - 1988. Biologia de anofelinos amazônicos. XII. Ocorrência de espécies de *Anopheles*, dinâmica da transmissão e controle da malária na zona urbana de Ariquemes (Rondônia). *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, 30(3):221-251.
- Trebatoski, A. M. & Haynes, J. F. - 1969. Comparison of enzymes of twelve species of mosquitoes. *Ann. Entomol. Amer.*, 62(2):327-335.
- Warren, M.; Collins, W. E.; Richardson, B. B. & Skinner, J. C. - 1977. Morphologic variants of *Anopheles albimanus* and susceptibility to *Plasmodium vivax* and *P. falciparum*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 26(4):607-611.
- Vedbrat, S. S. & Whitt, G. S. - 1975. Isozyme ontogeny of the mosquito *Anopheles albimanus*. In: *Isozymes III. Developmental Biology*. C. L. Markert, ed. Academic Press. 131-143
- Wing, S. R.; Young, M. D.; Mitchell, S. E. & Seawright, J. A. - 1985. Comparative susceptibilities of *Anopheles quadrimaculatus* of mutants to *Plasmodium yoelii*. *J. Am. Mosq. Control Assoc.*, 1(4):511-513.

(Aceito para publicação 19.06.1990)