

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA - INPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENTOMOLOGIA

**“CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS E MOLECULARES NA OVOGÊNESE DE
Anopheles darlingi ROOT, 1926 (DIPTERA, CULICIDAE)”**

CAROLINE DANTAS DE OLIVEIRA

Manaus, Amazonas

Fevereiro, 2011

CAROLINE DANTAS DE OLIVEIRA

**CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS E MOLECULARES NA OVOGÊNESE DE
Anopheles darlingi ROOT, 1926 (DIPTERA, CULICIDAE)**

ORIENTADOR: DR. WANDERLI PEDRO TADEI

CO-ORIENTADOR: DR. OSVALDO MARINOTTI

Tese apresentada ao Insitudo Nacional de Pesquisas da Amazônia como parte dos requisitos para obtenção do título dse Doutor em Entomologia.

Manaus – Amazonas

Fevereiro 2011

FICHA CATALOGRÁFICA

048 Oliveira, Caroline Dantas de
Características biológicas e moleculares na ovogênese de *Anopheles darlingi* Root (Diptera Culicidae)/Caroline Dantas de Oliveira - 2011. --- Manaus : [s.n.], 2011.
Xvii, 113 f.: il.13 Color

Tese (Doutorado em Entomologia) -- INPA, Manaus, 2011.
Orientador: Wanderli Pedro Tadei
Área de Concentração: Entomologia

1.*Anopheles darlingi* - Genética 2.Ovogênese 3.Morfologia
I.Título

CDD 19ª ed. 595.7704332

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

SINOPSE

Nos estudos das características biológicas e moleculares na ovogênese de *A. darlingi* foram examinados ovários de fêmeas nulíparas não grávidas para verificar a morfologia, a diferença no número de ovos após o repasto sanguíneos em diferentes vertebrados, o perfil protéico e a expressão do gene da vitelogenina. Considerando que *A. darlingi* é um importante vetor de malária na Amazônia cuja a colonização em laboratório ainda não foi estabelecida, tornando-se trabalhoso o agrupamento de dados biológicos e moleculares dessa espécie.

Palavras-chave: 1. *Anopheles darlingi*-Genética 2. Ovogênese 3. Morfologia

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Sr. Luiz Carlos Costa Oliveira e a Sra. Hilda Farias Dantas, aos meus tios Sr. José Ribamar do Nascimento Araújo e a Sra. Maria do Carmo Oliveira Araújo e à minha tia Sra. Maria de Lourdes da Costa Oliveira de quem recebo ensinamentos de amor, amizade e respeito.

AGRADECIMENTOS

À Deus pela vida e por permitir a manutenção da mesma em todos os momentos difíceis.

Ao Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia – INPA pela possibilidade de realizar o curso de pós-graduação.

Ao CNPq Programa de financiamento pela concessão da Bolsa de doutorado.

Ao meu orientador Dr. **Wanderli Pedro Tadei**, pelas sugestões, incentivo em todas as etapas do trabalho e por acreditar no meu potencial.

Ao meu co-orientador Dr. **Oswaldo Marinotti** pela paciência nos ensinamentos moleculares em todas as etapas deste tão importante trabalho.

Aos pesquisadores Dr. **Paulo F. Pimenta** e Dra. **Nágila F. C. Secundino**, do Instituto René Rachou - FIOCRUZ que foram orientadores e possibilitaram a realização dos experimentos no laboratório em Belo Horizonte.

Ao pesquisador **Prof. Dr. Jorge Luis López Lozano** da Fundação de Medicina Tropical do Amazonas que teve a paciência de ensinar tudo sobre o estado conformacional das proteínas.

Aos pesquisadores Dra. **Ana Paula Marques Duarte** e Dr. **Breno de Mello Silva** do Instituto René Rachou - FIOCRUZ que me auxiliaram diariamente e possibilitaram a realização dos experimentos.

Aos pesquisadores Dra. **Iléa Brandão**, Msc. **Carlos Praia**, Msc **Juracy Maia** do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia – INPA pela amizade, incentivo e auxílio no laboratório de Malária e Dengue.

À minha família: mãe - **Hilda Dantas**, pai - **Luiz Carlos Oliveira**, irmã - **Carla D. Oliveira**, irmã - **Carine D. Oliveira**, tio - **José Ribamar Araújo**, tia - **Maria do Carmo o Oliveira** e tia - **Maria de Lourdes Oliveira** por estarem torcendo pelo meu sucesso profissional.

Ao meu namorado **Bruno Coelho Rocha** por acreditar no meu trabalho e pela paciência e carinho nos momentos mais tensos.

Aos técnicos **Gláubio** e **Antônio Francisco (Catita)** pelo suporte de campo nas coletas e esforços sem eles não seria possível nenhum dos experimentos desse trabalho.

Às eternas amigas Msc. **Viviane Oliveira** e Msc. **Valéria Pinto** por estarem sempre presentes nas alegrias e nas derrotas. Com a amizade dessas meninas que consegui viver melhor na biologia.

Aos amigos da turma de Mestrado de Entomologia do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia – INPA Msc. **Annelyse R. Figueiredo**, Msc. **Camila Dasmaceno**,

Msc. **Waldete C. Lourenço**, Msc. **Ricardo T. Scherer** e Msc. **Yanna Karlla L. A. Dantas** por estarem sempre presentes para aconselhar e criticar nas horas de dúvidas.

Aos amigos do Instituto René Rachou - FIOCRUZ do laboratório de Entomologia Médica (LEM) –Dra. **Luciana da C. Pinto**, Msc. **Ana Carolina B. Anhê**, Msc. **Andrezza C. Chagas**, Msc. **Bruno A. M. Guedes**, Msc. **Helena R. C. de Araújo**, Msc. **Marcele Neves Rocha**, Dra. **Vanessa C. de Freitas**, Msc. **Caroline M. Gonçalves**, Msc. **Rafael R. de Assis**, Msc. **Rafael N. Pimenta**, Msc. **Maira N. Santos**, **Junara M. Coelho**, **Alessandra da S. Orfanó**, **Ana Flávia E. Costa**, **Felipe A. D. M.e Castro**, **Igor A. de O. S. Pereira**, **Klívya P. Parreiras**, **Fernanda G. de Oliveira** e **Erika Sorrentino** que me ajudaram e auxiliaram no laboratório.

Aos amigos integrantes da Peteca do Instituto René Rachou - FIOCRUZ do laboratório de Malária (LAMAL)– Msc. **Armando de M. Neto**, Msc. **Sabrina B. de Oliveira**, Msc. **Antônio M. Rezende**, Msc. **Tatiana M. Teodoro**, Msc. **Daniela C. Costa** e **Izabela C. Ibraim**, pelos momentos de descontração após o expediente.

Aos colegas de trabalho e técnicos do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia – INPA laboratório de Malária e Dengue.

FRASE

"Nós, cientistas, acreditamos que o que nós e nossos semelhantes fizermos ou deixarmos de fazer nos próximos anos determinará o destino da nossa civilização. E consideramos como nossa tarefa explicar incansavelmente a verdade, e ajudar as pessoas a perceber tudo o que está em jogo, e trabalhar, não para contemporizar, mas para aumentar o entendimento e conseguir, finalmente, a harmonia entre os povos e nações de diferentes pontos de vista."

Albert Einstein, físico teórico alemão.
Fonte: www.planetaeducacao.com.br

RESUMO

O mosquito *Anopheles darlingi* é o principal vetor da malária humana no Brasil. Apesar disso, existem poucas informações sobre o ciclo gonotrófico desse importante vetor, cujo conhecimento é importante para uma eficiente estratégia de controle. Por esse motivo, neste trabalho essa espécie é alvo do estudo da ovogênese. Para tanto, fêmeas de *A. darlingi* foram coletadas na periferia da cidade de Manaus e Coari para estudar os aspectos biológicos, morfológicos e moleculares do processo da ovogênese antes e após o repasto sanguíneo (RS). Antes do repasto sanguíneo os ovários das fêmeas de *A. darlingi* são pequenos e contêm algumas vesículas de lipídios. Nesta fase o mRNA do gene da vitelogenina (Vg) é ausente. Após o RS, ocorrem acentuadas mudanças internas e externas nos ovários devido à estocagem das vitelinas nos ovócitos. Pequenos grânulos de vitelinas são observados a partir de 3h após o RS, embora a expressão do gene Vg só é detectável a partir de 6h. A expressão e a estocagem da Vg é mais evidente após 24h do RS, mantendo-se constante entre 36h e 48h após o RS. As dimensões definitivas do ovo são alcançadas após 72h do RS quando a expressão do gene Vg diminui. A oviposição ocorreu após 96h do RS quando a expressão de Vg é ausente. Nas análises de múltiplos repastos sanguíneos, 80% das fêmeas de *A. darlingi* tiveram dois repastos sanguíneos dentro de 24h e 75% delas alimentaram três vezes num período de três dias, mostrando a capacidade dessa espécie de se alimentar por mais de uma vez durante um único ciclo gonotrófico. Nestas fêmeas foi verificado um aumento aparente na expressão do gene Vg de acordo com um número maior de alimentações sanguíneas.

ABSTRACT

The mosquito *Anopheles darlingi* is the main vector of human malaria in Brazil. Nevertheless, little information exists on the gonotrophic cycle of this important vector, whose knowledge is important for an efficient control strategy. Therefore, this work studied the oogenesis in this mosquito species. Molecular, biologic and morphological aspects of oogenesis, before and after the blood meal (BM), were investigated in female *A. darlingi* collected at the suburb of Manaus and Coari city to study the. Before the BM, ovaries of female *A. darlingi* are small and contain few lipid vesicles. At this stage the expression of vitellogenin (Vg) gene is absent. After the BM, there were marked internal and external changes in the ovaries due to storage of yolk in the oocytes. Small granules of yolk are already observed at 3h post BM, although the expression of Vg gene was only detected at 6h post BM. The expression of Vg and their storage in the ovaries are more evident after 24 hours of BM, remaining constant between 36 to 48 hours post BM. The final dimensions of the egg are reached at 72 hours post BM when Vg gene expression decreased. Oviposition occurred at 96 hours post BM when the expression of Vg is absent. In the analyses of the frequency of blood meals taken by female *A. darlingi*, 80% ingested two blood meals within 24h and 75% fed three times in a period of three days, showing the ability of this species to feed more than once during a single gonotrophic cycle. An apparent increase in Vg gene expression was noticed in females taking multiple BMs.

SUMÁRIO

FICHA CATALOGRÁFICA	III
AGRADECIMENTOS	V
FRASE	VII
RESUMO	VIII
ABSTRACT	IX
LISTA DE FIGURAS	XII
LISTA DE TABELAS	XV
LISTA DE ABREVIATURAS	XVI
1 INTRODUÇÃO	18
1.1 Importância médica e sanitária dos mosquitos vetores	18
1.2 Situação atual da malária	18
1.2.1 <i>Ciclo da malária</i>	19
1.2.2 <i>Espécies vetoras</i>	22
1.3 Influência da alimentação no ciclo biológico dos mosquitos	23
1.4 Vitelogênese	26
1.4.1 <i>Vitelogênese em mosquito</i>	27
2 OBJETIVOS	30
2.1 Objetivo geral	30
2.2 Objetivos específicos	30
3 MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1 Descrição da área de estudo	31
3.2 Coleta e manutenção das larvas e adultos	31
3.3 Observação do repasto sanguíneo	32
3.3.1 <i>Fêmeas nulíparas oriundas de larvas do criadouro natural</i>	32
3.3.2 <i>Influência do tamanho das fêmeas nulíparas no desenvolvimento ovariano após o repasto sanguíneo</i>	33
3.3.3 <i>Múltiplos repastos sanguíneos</i>	34
3.4 Determinação do número de ovos após o repasto sanguíneo em diferentes hospedeiros vertebrados	37

3.5	Morfologia do desenvolvimento ovariano.....	38
3.5.1	<i>Microscopia Eletrônica de Varredura</i>	39
3.5.2	<i>Microscopia Laser Confocal</i>	39
3.5.3	<i>Microscopia de Luz</i>	40
3.5.4	<i>Análise das imagens</i>	40
3.6	Determinação do perfil protéico e quantificação das proteínas totais dos ovários.....	40
3.6.1	<i>Determinação das proteínas totais</i>	41
3.6.2	<i>Perfil protéico SDS-PAGE</i>	41
3.7	Extração do DNA genômico e PCR específico	42
3.8	Extração do RNA total e obtenção do cDNA de Vg	44
3.9	Dosagem do RNA	45
3.10	Síntese de cDNA.....	45
3.11	Amplificação por RT-PCR.....	46
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
4.1	Observação do repasto sanguíneo	48
4.1.1	<i>Fêmeas nulíparas emergidas de larvas do criadouro natural e influência do tamanho do adulto no desenvolvimento ovariano após o repasto sanguíneo</i>	48
4.1.2	<i>Múltiplos repastos sanguíneos com e sem indução a oviposição</i>	52
4.2	Determinação do número de ovos após o repasto sanguíneo em diferentes hospedeiros vertebrados.....	55
4.3	Morfologia do desenvolvimento ovariano.....	61
4.3.1	<i>Desenvolvimento ovariano antes do repasto sanguíneo</i>	61
4.3.2	<i>Desenvolvimento ovariano após o repasto sanguíneo</i>	70
4.3.3	<i>Ovo</i>	83
4.4	Determinação do perfil protéico e das proteínas totais dos ovários	87
4.5	Obtenção de oligonucleotídeos específicos do gene da vitelogenina.....	90
4.6	RT – PCR dos múltiplos repastos sanguíneos.....	92
5	CONCLUSÃO	97
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo assexual do <i>Plasmodium</i> no hospedeiro vertebrado. Adaptado de www.imm.ul.pt por Rocha (2010).	20
Figura 2. Ciclo sexual do <i>Plasmodium</i> no hospedeiro invertebrado. Adaptado de Vlachou <i>et al.</i> (2006), por Rocha (2010)	21
Figura 3. Esquema da ativação do processo da vitelogênese após a alimentação de sangue. *PPV = proteínas precursora de vitelo – Vitelogenina (Vg), carboxipeptidase vitelogênica (VCP), catepsina B vitelogênica (VCB), lipoforina (Lp). Adaptado Attardo <i>et al.</i> , (2005).	28
Figura 4. Desenho experimental de múltiplos repastos sanguíneos de fêmeas nulíparas de <i>A. darlingi</i> da primeira geração sem a presença do papel filtro umedecido com água oriundas das amostras da Comunidade do Inajá em Coari – Amazonas.	35
Figura 5. Desenho experimental de múltiplos repastos sanguíneos de fêmeas nulíparas de <i>A. darlingi</i> não grávidas da primeira geração na presença de papel filtro umedecido com água para induzir a oviposição oriundas das amostras da Comunidade do Inajá em Coari – Amazonas.....	37
Figura 6. Múltiplos repastos sanguíneos das fêmeas nulíparas de <i>A. darlingi</i> sem papel filtro umedecido com água oriundas das amostras de Coari - Amazonas. (....	53
Figura 7. Múltiplos repastos sanguíneos das fêmeas nulíparas de <i>A. darlingi</i> com papel filtro umedecido com água para indução da oviposição oriundas das amostras de Coari - Amazonas.....	54
Figura 8. Representação gráfica das médias obtidas de fêmeas nulíparas de <i>A. darlingi</i> da primeira geração oriundas das amostras do Ramal do Brasileirinho-Km 7 no Sítio Raifran e Ramal do Puraquequara - Km 9 em Manaus – Amazonas após o repasto sanguíneo em pato ($34,54 \pm 5,84$) e hamster ($54,62 \pm 5,53$).	56
Figura 9. Frequência de ovos das fêmeas nulíparas de <i>A. darlingi</i> oriundas das amostras do Ramal do Brasileirinho-Km 7 no Sítio Raifran e Ramal do Puraquequara - Km 9 em Manaus – Amazonas alimentadas com: (A) sangue de pato e (B) sangue de hamster.	60

Figura 10. Amostras Controle: Ovários de fêmeas nulíparas de <i>A. darlingi</i> da não grávidas primeira geração oriundas de criadouro natural da localidade da Estrada do Puraquequara - Indústria Portela, verificação natural da autofluorescência.	64
Figura 11. Ovários de fêmeas nulíparas <i>A. darlingi</i> não grávidas da primeira geração oriundas de criadouro natural da localidade da Estrada do Puraquequara - Indústria Portela após 24h e 48h do repasto com solução de sacarose 10%	66
Figura 12. Ovário de fêmeas nulíparas de <i>A. darlingi</i> não grávidas da primeira dgeração oriundas de criadouro natural da localidade da Estrada do Puraquequara - Indústria Portela após 72h do repasto de sacarose 10%.	68
Figura 13. Ovário de fêmeas nulíparas de <i>A. darlingi</i> não grávidas primeira da geração oriundas de criadouro natural da localidade da Estrada do Puraquequara - Indústria Portela após 3h e 12h do repasto sanguíneo.	73
Figura 14. Ovário de fêmeas nulíparas de <i>A. darlingi</i> não grávidas da geração oriundas de criadouro natural da localidade da Estrada do Puraquequara - Indústria Portela após 24 e 36h do repasto sanguíneo.....	75
Figura 15. Ovário fêmeas nulíparas de <i>A. darlingi</i> não grávidas da geração oriundas de criadouro natural da localidade da Estrada do Puraquequara - Indústria Portela após 36 e 48h do repasto sanguíneo.	77
Figura 16. Ovário de fêmeas nulíparas <i>A. darlingi</i> não grávidas da geração oriundas de criadouro natural da localidade da Estrada do Puraquequara - Indústria Portela após 60h e 72h do repasto sanguíneo.	79
Figura 17. Ovário de fêmeas nulíparas <i>A. darlingi</i> não grávidas da geração oriundas de criadouro natural da localidade da Estrada do Puraquequara - Indústria Portela após 72h do repasto sanguíneo.	81
Figura 18. Ovo maduro de fêmeas nulíparas de <i>A. darlingi</i> não grávida da geração oriundas de criadouro natural da localidade da Estrada do Puraquequara - Indústria Portela após 96h do repasto sanguíneo.....	85
Figura 19. Curva de BSA (Soro de Albomina Bovina). Curva de calibração utilizada nos ensaios de quantificação de proteínas dos ovários de fêmeas nulíparas de <i>A. darlingi</i> não grávidas da primeira geração oriundas de criadouro natural da localidade da Estrada do Puraquequara - Indústria Portela.	88

Figura 20. Quantidade proteína por par de ovários de fêmeas nulíparas de <i>A. darlingi</i> não grávidas da geração oriundas de criadouro natural da localidade da Estrada do Puraquequara - Indústria Portela..	89
Figura 21. Perfil de proteínas em condições desnaturantes (SDS-PAGE) de ovário de fêmeas nulíparas de <i>A. darlingi</i> não grávidas da primeira geração oriundas de criadouro natural da localidade da Estrada do Puraquequara - Indústria Portela.. ...	90
Figura 22. PCR específico usando DNA genômico de fêmeas nulíparas de <i>A. darlingi</i> não grávidas da primeira geração oriundas da Comunidade do Inajá em Coari – Amazonas..	91
Figura 23. Expressão do gene Vg entre 0 e 72h após o repasto sanguíneo de fêmeas de <i>A. darlingi</i> da primeira geração oriundas de criadouro natural da localidade da Estrada do Puraquequara - Indústria Portela..	93
Figura 24. Expressão do gene Vg após o 1º e 2º repasto sanguíneo de fêmeas nulíparas de <i>A. darlingi</i> da primeira geração oriundas de criadouro natural da localidade da Estrada do Puraquequara - Indústria Portela..	94
Figura 25. Expressão de RNA mensageiro do gene Vg em fêmeas nulíparas da primeira geração oriundas do criadouro aquático natural da Indústria Portela localizada na Estrada do Puraquequara em Manaus – Amazonas.	95
Figura 26. Expressão de RNA mensageiro do gene Vg em fêmeas nulíparas da primeira geração oriundas de populações coletadas na comunidade do Inajá em Coari – Amazonas.....	95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Oligonucleotídeos desenhados a partir de áreas conservadas observadas no alinhamento dos genes da Vg de <i>Anopheles</i> spp. Sequências de oligonucleotídeos do gene Vg de anofelinos (Marinotti-comunicação pessoal, oligonucleotídeos não publicados).	43
Tabela 2. Combinações aleatórias dos oligonucleotídeos utilizadas nos PCRs para verificação do gene da vitelogenina em fêmeas nulíparas de <i>A. darlingi</i> da não grávidas primeira geração oriunda da Comunidade do Inajá em Coari – Amazonas.	44
Tabela 3. Oligonucleotídeos utilizados nas reações de RT-PCR para amplificação das amostras de cDNA molde de fêmeas de <i>A. darlingi</i> da primeira geração oriunda da Comunidade do Inajá em Coari – Amazonas. Oligonucleotídeos AndaVgRev1 e AndaVgFor1 utilizados para amplificar o gene Vg em fêmeas de <i>A. darlingi</i> da primeira geração oriunda da Comunidade do Inajá em Coari – Amazonas e para controle os 18S For e 18S Ver (Marinotti-comunicação pessoal, oligonucleotídeos não publicados).	46
Tabela 4. Estágios do desenvolvimento ovariano após o 1º repasto sanguíneo de fêmeas nulíparas de <i>A. darlingi</i> da primeira geração emergidas de larvas de criadouro natural da localidade da Estrada do Puraquequara - Indústria Portela.	48
Tabela 5. Análise de variância (ANOVA) das fêmeas nulíparas <i>A. darlingi</i> da primeira geração oriundas das amostras do Ramal do Brasileirinho-Km 7 no Sítio Raifran e Ramal do Puraquequara - Km 9 em Manaus – Amazonas após o repasto sanguíneo em pato e hamster.	57
Tabela 6. Teste de Tukey das fêmeas nulíparas <i>A. darlingi</i> da primeira geração oriundas das amostras do Ramal do Brasileirinho-Km 7 no Sítio Raifran e Ramal do Puraquequara - Km 9 em Manaus – Amazonas após o repasto sanguíneo em pato e hamster.	57

LISTA DE ABREVIATURAS

AOV: ampola ovariana
BSA: Albumina de soro bovino
CC: células coriônicas
CCR: colar da micrópila
cDNA: DNA complementar
CN: células nutridoras
CO: coroa
CV: convés
DAPI: 4'6'-Diamidino-2-fenilindolo cloridrato
DCR: Disco da micrópila
DEPC: Dietilpirocarbonato
DNA: Ácido Desoxirribonucléico
dNTPs: Desoxirribonucleotídeos Trifosfatados
DTT: Ditioneitol
ECO: esculturaexocorial da coroa
EDTA: Ácido etilenodiaminotetracético
ENC: endocório
EPF: epitélio folicular
F1: Folículo primário
F2: Folículo secundário
FL: flutuador;
G: germário
GM: gomo do flutuador
kDa: Kilodaltons
M: margem
M: Molar
MM: Massa Molecular
mM: Milimolar
MO: membrana ovariana
MOR: membrana ovariolar
NCN: núcleo das células nutridoras
NEP: núcleo do epitélio folicular

NOO: núcleo do ovócito
OV: ovário
OVL: oviduto lateral
p/v: Razão peso volume
PAGE: Eletroforese em gel de poliacrilamida
Pb: Pares de base
PBS: Tampão salino fosfatado
PCR: Reação em Cadeia da Polimerase
pH: Potencial hidrogeniônico
PPV: Proteínas precursoras de vitelo
PSA: Persulfato de amônio
RNA: Ácido Ribonucléico
RNAm: Ácido Ribonucléico mensageiro
RPM: Rotação por minuto
RS: repasto sanguíneo
RT-PCR: Reação em Cadeia da Polimerase conjugada com a transcriptase reversa
SDS: Dodecil sulfato de sódio
SS: solução de sacarose
TEMED: N,N,N',N',- tetrametil etilenodimetilamina
Tm – Temperatura de anelamento
TR: Traquéias
TRE: Traqueolas.
Tris: Tri(hidroximetil)aminometano
v/v: Razão volume/volume
V: vitelo
V: Volume
v1: vesícula de proteína
v2: vesícula de lipídios
Vg: Vitelogenina
Vn: Vitelina

1 INTRODUÇÃO

1.1 Importância médica e sanitária dos mosquitos vetores

Dentre os grupos pertencentes à ordem Diptera, subordem Nematocera, destaca-se a família Culicidae, cujos representantes são conhecidos popularmente como “mosquitos ou pernilongos” e são encontrados em todo globo terrestre (Lozovei 2001; Brasil 2002). Os mosquitos são holometábolos e passam por quatro estágios de desenvolvimento sequenciais: ovo, larva, pupa e adulto. As fases de ovo, larva e pupa são encontradas nos ambientes aquáticos tais como: criadouros naturais e artificiais permanentes ou temporários com tipos diferentes de volumes e tamanhos (Tadei 1993; Consoli e Lorenço-de-Oliveira 1994; Tadei *et al.* 1998). Os adultos, após emergirem, procuram abrigos em vegetações, criadouros de animais e habitações humanas (Forattini *et al.* 1981).

Dentro da família Culicidae existem algumas espécies de mosquitos que apresentam importância médica devido a capacidade vetorial de transmitirem doenças que prejudicam a saúde humana tais como a malária, filariose, febre amarela, dengue entre outras (Forattini 2002; Nelson *et al.* 2003; Taípe-Lagos e Natal 2003). O conhecimento da biologia dessas espécies vetoras é importante para a compreensão da epidemiologia das parasitoses e viroses transmitidas.

1.2 Situação atual da malária

A malária é uma doença infecciosa, potencialmente grave, causada por protozoários unicelulares do gênero *Plasmodium* spp, transmitidos aos seus hospedeiros vertebrados através da picada das fêmeas de *Anopheles* spp (Forattini 2002; WHO 2010). Cinco espécies de *Plasmodium* são parasitos do homem: *Plasmodium falciparum* Welch, *Plasmodium vivax* Grassi e Feletti, *Plasmodium malariae* Feletti e Grassi, *Plasmodium ovale* Stephens (Garnham 1966) e *Plasmodium knowlesi* Sinton e Mulligan (Yakob *et al.* 2010).

A malária é endêmica em cerca de 90 países onde residem 2,4 bilhões de pessoas, dos quais quase metade está localizada na África, ao sul do Deserto do Saara. Mais de 90% das mortes por malária ocorrem na África, principalmente entre as crianças (Garcia 2010).

Nas Américas, aproximadamente 2/3 das infecções por malária, ocorrem na bacia amazônica. O número elevado de casos está associado aos seguintes fatores: (1) a capacidade das espécies de *Anopheles* detectar os hospedeiros vertebrados; (2) densidade populacional das espécies vetoras; (3) o ciclo de reprodução na natureza; (4) as inter-relações dessas espécies com o homem; (5) a presença de pacientes infectados com malária e os assintomáticos; (6) as condições ambientais favoráveis à proliferação dos mosquitos; e os (7) diferentes tipos de ecossistemas presentes na Amazônia (Rodrigues 2006).

O controle da doença, a cada ano, vem se tornando mais complicado devido ao aumento da resistência dos parasitos às drogas antimaláricas disponíveis, da resistência dos mosquitos vetores aos inseticidas, além da ausência de uma vacina eficaz (Hartl 2004; Winstanley *et al.* 2004; Rocha 2010). Mas apesar das dificuldades, a Fundação de Vigilância em Saúde da Amazônia – FVS recebeu prêmio por seus esforços para a prevenção e controle integrados da malária no estado do Amazonas. Trabalhando através de parcerias com todos os níveis do governo brasileiro, bem como com organizações não-governamentais e empresas privadas, a Fundação tem apoiado a formação de mais de 7.000 profissionais, a criação de 231 laboratórios, a distribuição de mais de 75.000 mosquiteiros, a pulverização de mais de 350 mil casas e os testes em mais de 2,7 milhões de exames de diagnóstico. Esses esforços contribuíram para uma redução de 60% projetados em casos entre 2007 eo final de 2010, e uma redução de 60% das mortes entre 2008 e 2009 (OPAS 2011).

1.2.1 Ciclo da malária

Os parasitos *Plasmodium* spp causadores da malária humana possuem um ciclo heteroxênico necessitando, obrigatoriamente, de um hospedeiro vertebrado, o homem, e um invertebrado, o mosquito *Anopheles* spp. A fase assexuada ocorre nos hospedeiros vertebrados, enquanto a reprodução sexuada ocorre nos hospedeiros invertebrados (Hall *et al.* 2005; Rocha 2010).

No homem, a infecção malárica inicia-se quando esporozoítos infectantes são inoculados nos humanos pelo inseto vetor (Fig. 1). Durante um repasto sanguíneo infectante, esporozoítos são inoculados sob a pele do hospedeiro, e alcançam a corrente sanguínea. Após invadir o hepatócito, os esporozoítos se diferenciam em trofozoítos pré-eritrocíticos. Estes se multiplicam por reprodução assexuada do tipo esquizogonia, dando origem aos esquizontes teciduais e posteriormente a milhares de merozoítos que invadirão os eritrócitos. O ciclo eritrocítico inicia-se quando os merozoítos tissulares invadem os eritrócitos. O desenvolvimento intra-eritrocítico do parasito se dá por esquizogonia, com conseqüente formação de merozoítos que invadirão novos eritrócitos. Depois de algumas gerações de merozoítos sanguíneos, ocorre a diferenciação em estágios sexuais, os gametócitos, que não mais se dividem e que seguirão o seu desenvolvimento no mosquito vetor, dando origem aos esporozoítos (Braga e Fontes 2005).

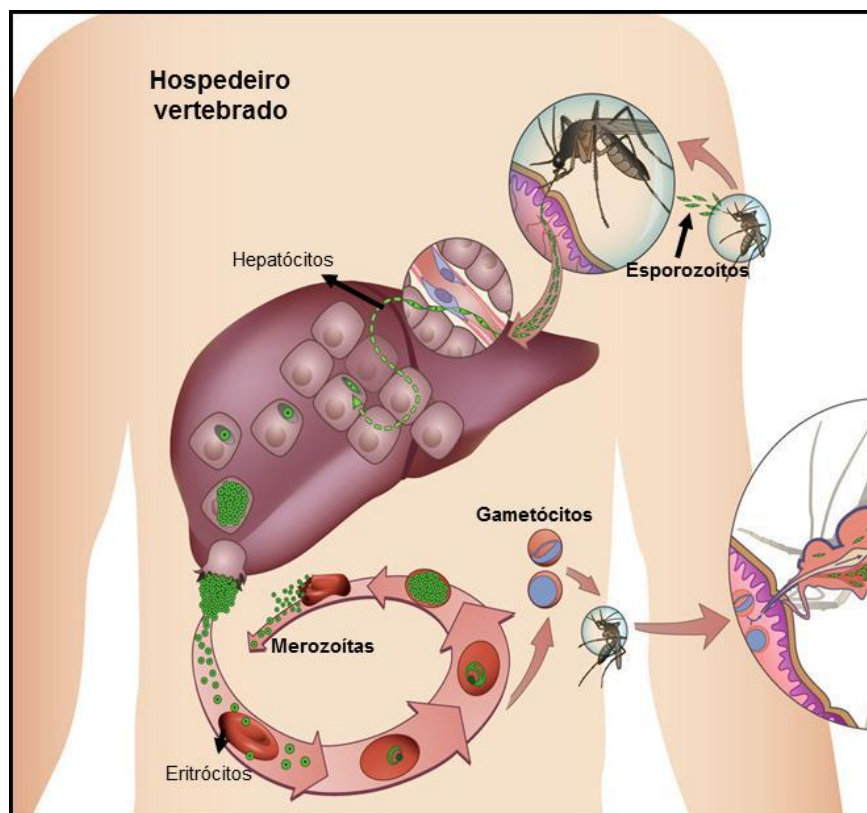


Figura 1. Ciclo assexual do *Plasmodium* no hospedeiro vertebrado. Adaptado de www.imm.ul.pt por Rocha (2010).

No mosquito, durante o repasto sanguíneo, a fêmea do anofelino ingere as formas sanguíneas do parasito, mas somente os gametócitos serão capazes de se

desenvolver no inseto, dando origem ao ciclo sexuado ou esporogônico (Fig. 2). No intestino médio do mosquito, os gametócitos se transformam em gametas extracelulares. O gametócito feminino transforma-se em macrogameta e o gametócito masculino, por um processo denominado exflagelação, dá origem a oito microgametas. Em minutos, um microgameta fecunda um macrogameta, formando o ovo ou zigoto. Após a fecundação, o zigoto passa a movimentar-se por contrações do corpo, sendo denominado oocineto. Este atravessa a matriz peritrófica e atinge a parede do intestino médio, onde se encista na camada epitelial do órgão, passando a ser chamado oocisto. Inicia-se então o processo de divisão esporogônica e, mais tarde ocorre a ruptura da parede do oocisto, sendo liberados os esporozoítos formados durante a esporogonia. Estes são disseminados por todo o corpo do inseto através da hemolinfa até atingir as Mglândulas salivares. Estes esporozoítos atingirão o canal central da glândula e ingressarão no ducto salivar para serem injetados no hospedeiro vertebrado, juntamente com a saliva, durante o repasto sanguíneo infectante (Braga e Fontes 2005).

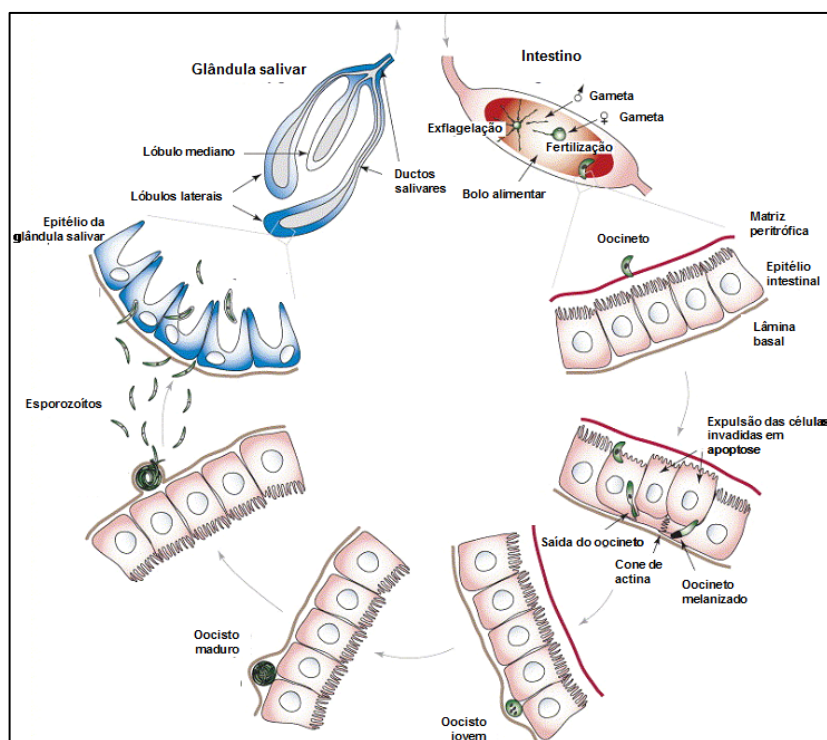


Figura 2. Ciclo sexual do *Plasmodium* no hospedeiro invertebrado. Adaptado de Vlachou *et al.* (2006), por Rocha (2010)

1.2.2 Espécies vetoras

Os mosquitos transmissores da malária humana são insetos da ordem Diptera da família Culicidae pertencente a subfamília Anophelinae onde está inserido o gênero *Anopheles*, do qual compreende em seis subgêneros: *Anopheles* Meigen, *Cellia* Theobald, *Kerteszia* Theobald, *Lophopodomyia* Antunes, *Nyssorhynchus* Blanchard e *Stethomyia* Theobald (Ferreira e Alvarado 1991). O subgênero *Cellia* é composto pelos principais vetores de malária humana nos continente africano e asiáticos enquanto na América do Sul os principais vetores pertencem aos subgêneros *Nyssorhynchus* e *Kerteszia* (Consoli e Lorenço-de-Oliveira, 1994; Deane, 1986).

Na África, o subgênero *Cellia* é representado pelo mosquito *Anopheles gambiae* Giles sendo o principal vetor da malária humana, atuando na transmissão do *P. falciparum* que causa a forma mais grave da doença (Gwadz e Collins 1996), na Ásia e no Oriente Médio o vetor de maior importância é *Anopheles stephensi* Liston.

Na América, no subgênero *Nyssorhynchus* os mosquitos vetores são representados por *Anopheles darlingi* Root, *Anopheles nuneztovari* Galbadon, *Anopheles albimanus* Wiedemann, *Anopheles aquasalis* Curry (Consoli e Lorenço-de-Oliveira 1994; Tadei e Duraty-Thatcher 2000) e por representantes do complexo Albitarsis (Motoki *et al.*, 2009), dentre outros e além deles, reconhece também o papel de transmissores os anofelinos do subgênero *Kerteszia* *Anopheles cruzii* Dyar et Knab, *Anopheles bellator* e *Anopheles humunculus* humunculus, vetores da "malária de bromélias" (Consoli e Lorenço-de-Oliveira 1994).

No Brasil, o *A. aquasalis* é considerado vetor primário da malária nas zonas áridas do Nordeste, em Belém, Amapá e Amazônia, além de ter sido várias vezes detectado com infecção natural nos Estados do Rio de Janeiro e São Paulo (Consoli e Lorenço-de-Oliveira 1994), bem como foi considerado vetor de malária importada no estado do Espírito Santo (Meneguzzi *et al.* 2009). Ao contrário do *A. darlingi*, cuja colonização em laboratório ainda não foi possível, os procedimentos de manutenção da colônia para *A. aquasalis* já estão bem estabelecidos, possibilitando estudos com essa espécie (Silva *et al.* 2006).

Anopheles albitarsis Lynch- Arribáizaga, que também possui um importante papel na transmissão da malária, é um complexo de várias espécies crípticas que não podem ser distinguidas morfologicamente na fase adulta. Fazem parte deste complexo: *Anopheles albitarsis* s.s., *Anopheles oryzalimnetes*, *Anopheles marajoara*, *Anopheles deaneorum*, *Anopheles janconnae*, *Anopheles albitarsis* G e *Anopheles albitarsis* F, sendo que algumas destas já foram encontradas infectadas com *P. falciparum* ou *P. vivax* (Li e Wilkerson 2005; Lehr *et al.* 2005; Motoki *et al.* 2009).

O principal vetor da malária humana no Brasil é o *Anopheles darlingi* (Rachou 1958; Deane 1986; Tadei *et al.* 1998; Tadei e Dutary Thatcher 2000). É um anofelino que tem alta capacidade de adaptação ao ambiente amazônico, hábito de realizar a endofagia e exofagia, elevada antropofília e se beneficia das alterações que o homem produz no ambiente, como: a substituição da floresta por plantações, habitações precárias, pastagens, garimpos, entre outras atividades (Boyd 1949; Meira *et al.* 1980; Tadei *et al.* 1988)

Em situação de intensa transmissão da malária, os estudos entomológicos proporcionam informações sobre parâmetros do contato homem/vetor, cujo conhecimento é importante no estabelecimento das estratégias de controle, específicas para cada localidade. Considerando-se que a malária é uma doença focal, dados sobre incidência e distribuição das espécies, aspectos ecológicos, sazonalidade, preferências alimentares, conhecimento da atividade hematofágica, estrutura etária, estudos genéticos entre outros, são fundamentais para uma melhor implementação das medidas de controle (Tadei *et al.* 1993).

1.3 Influência da alimentação no ciclo biológico dos mosquitos

Mosquitos são classificados com base no tipo de estratégia reprodutiva que realizam (Vinogradova 1965; Rioux *et al.* 1975). Em vista disso os mosquitos que são capazes de realizar o primeiro ciclo gonotrófico sem repasto sanguíneo são chamados autógenos, em contrapartida os mosquitos que necessitam ingerir sangue são denominados anautógenos (Forattini 1992; Attardo *et al.* 2005). No entanto, diferentes espécies de mosquitos tem desenvolvido variações na procura por sangue para iniciar e manter o desenvolvimento dos ovos (Attardo *et al.* 2005). Algumas das espécies consideradas anautógenas apresentam cepas autógenas, ou com a

capacidade de serem autógenas sobre pressão seletiva. Um exemplo deste fenômeno é encontrado no vetor da febre amarela e da dengue, o *Aedes aegypti* Linnaeus, que é anautógeno, alimentando-se quase que exclusivamente em seres humanos. Uma cepa autógena “selvagem” da espécie foi encontrada na África, habitando a floresta longe de seu hospedeiro humano (Trpis 1977).

O fotoperíodo e temperatura também são importantes reguladores da reprodução autogênica, como é visto em *Culex tarsalis* Linnaeus. Para esses mosquitos variações no fotoperíodo e temperatura iniciam adaptações que promovem a sobrevivência da espécie por alguns meses, assegurando o sucesso reprodutivo. Por exemplo, mudanças metabólicas ocorrem durante o outono e inverno quando as condições são desfavoráveis e os recursos são escassos (Attardo *et al.* 2005). Os fatores ambientais como a nutrição das larvas e o stress pode também afetar o estado reprodutivo (Reisen e Milby 1987). Em *A. gambiae* a alimentação pobre das larvas resulta em mosquitos que requerem dois repastos sanguíneos para iniciar o primeiro ciclo gonotrófico (Gillies 1955; Takken *et al.* 1998). Finalmente, o status de acasalamento das fêmeas de mosquitos também pode ter um efeito sobre a capacidade de desenvolver os ovos sem que ocorra o repasto sanguíneo (O'Meara e Evans 1976).

Independentemente do tipo de estratégia reprodutiva dos mosquitos, o metabolismo energético da grande maioria dos adultos, machos e fêmeas, depende inicialmente da ingestão de carboidratos, provenientes de seivas, néctar das flores e frutos. Os açúcares são ingeridos pelos mosquitos adultos através da probóscide, sugando-os sem retrair o lábio (Foster 1995). Os adultos basicamente devem adquirir água e açúcar em quantidade suficiente para possibilitar o desempenho de algumas funções primordiais a sua existência, como o voo, a dispersão e as múltiplas atividades biológicas, com exceção da maturação dos ovos (Clements 1992). O acúmulo de glicogênio e triglicerídios, que é determinante para o potencial de atividade e longevidade, dependem diretamente desses carboidratos (Nayar e Sauerman 1975).

Numerosos carboidratos naturais podem participar da nutrição de mosquitos, sendo a glicose, sacarose, maltose e frutose entre os mais eficientes. Os açúcares ingeridos são armazenados no divertículo ventral que funciona como reservatório, e transferidos lentamente ao intestino onde a digestão dos açúcares e absorção da

água ocorrem. Este processo permite à fêmea manter o estômago vazio e pronto para receber o repasto sanguíneo (Foster 1995). Esse tipo de alimentação e o da hematofagia, apesar de inteiramente distintos, encontram-se relacionados (Forattini 2002).

A hematofagia, ingestão de sangue pelas fêmeas dos mosquitos é decorrente de vários estímulos, incluindo a presença de CO₂, umidade, ácido láctico e estímulos visuais (Edman e Spielman, 1988; Cabrini e Andrade 2006). O sangue dos vertebrados contém aminoácidos e outros nutrientes que são utilizados na manutenção do metabolismo dos mosquitos, mas que na sua maioria são convertidos em substâncias integrantes de vitelo.

O repasto sanguíneo realizado pelas fêmeas está relacionado primordialmente ao desenvolvimento dos ovos (Klowden e Lea 1980) e a hematofagia contribui para o aumento do “valor líquido de reprodução” desses insetos. Existe uma associação entre a hematofagia e o comportamento de cópula dos mosquitos, mas essa associação é dependente dos fatores específicos de cada espécie. De maneira geral, as fêmeas de anofelinos iniciam a hematofagia nos dois primeiros dias após a emergência, independentes de terem sido ou não copuladas (Forattini 2002). A hematofagia também contribui para aumentar a longevidade dos mosquitos, refletindo diretamente na dinâmica de transmissão de doenças. Quanto mais longa a vida do mosquito, maior é a oportunidade do mosquito entrar em contato com o agente infeccioso e destes completarem o seu ciclo biológico reprodutivo (Clements 1963; Nayar e Sauerman 1975; Consoli 1982).

A produção de ovos em mosquitos é um processo cíclico. O ciclo gonotrófico começa com a procura pelo hospedeiro, ingestão de sangue e termina com a maturação dos ovócitos e oviposição (Clements 1992; Barros *et al.* 2007). Cada ciclo gonotrófico deixa pequenas dilatações nos ovariolos que podem ser observadas e por observações microscópicas e o número de dilatações corresponde ao número de ciclos gonotróficos na fêmea do mosquito.

No ciclo gonotrófico, a maturação dos ovos pode ser dividida em cinco fases usando a fisiologia e critérios anatômicos (Clements e Boocock 1984). As modificações morfológicas decorrentes do ciclo gonotrófico podem revelar a frequência de contato do vetor com o hospedeiro e, assim, fornecer estimativas da oportunidade para aquisição e transmissão do parasito (Kakitani e Forattini 2000).

Nos trópicos, o ciclo gonotrófico em anofelinos é geralmente completado após dois ou três dias, nas espécies *A. gambiae*, *A. darlingi*, *Chagasia bonnea* Root e *Anopheles bellator* Dyar e Knab (Chadee 1992; Charlwood e Wilkes 1979; Forattini 2002).

Em mosquitos, o ovário é meroístico politrófico e cada um dos dois ovários contém em torno de 75 ovariolos. Cada ovariolo é composto por folículo primário, secundário, germário (células germinativas), e filamento terminal. Cada folículo consiste de um ovócito e sete células nutridoras, as quais são interconectadas por pontes citoplasmáticas. As células germinativas são circundadas por uma camada de células epiteliais somáticas foliculares (Forattini 1996; Raikhel 2004).

Em cada ciclo somente um folículo em cada ovariolo madura. O folículo secundário se separa do germário durante a maturação do folículo primário, mas o seu desenvolvimento é interrompido na fase inicial e este não se desenvolve até depois da oviposição e o próximo repasto sanguíneo. Durante o processo de maturação dos ovos são depositadas quantidades consideráveis de vitelo (vitelinas) dentro dos ovócitos culminando em formas maduras prontas para oviposição (Raikhel 2004).

1.4 Vitelogenese

A vitelogenese é o processo pelo qual reservas nutricionais são progressivamente armazenadas nos ovócitos de animais ovíparos, originando o vitelo, sendo este o evento central da maturação dos ovos (Raikel 2004). Os nutrientes acumulados nos ovos, que incluem proteínas, lipídios e carboidratos, fornecem o material necessário para o futuro desenvolvimento embrionário (Brock e Shapiro 1983).

O processo de desenvolvimento embrionário é semelhante em todos os animais analisados até o momento, existindo muitos pontos em comum durante a vitelogenese de vermes, insetos e vertebrados tais como anfíbios, répteis e pássaros: (1) a maior parte das reservas alimentares é produzida fora dos ovócitos e transportada através dos fluidos corporais (líquido pseudocelômico nos nematóides, hemolinfa nos insetos ou plasma nos vertebrados) por proteínas solúveis; (2) a tomada destas proteínas pelos ovócitos é mediada por receptores específicos; (3) a síntese destas proteínas é controlada por hormônios (exceto nos nematóides); (4) as

principais proteínas envolvidas no processo são chamadas vitelogeninas (Vg), que são proteínas com grande massa molecular e possuem lipídios, carboidratos e fosfatos associados a elas; (5) as vitelogeninas, são consideradas proteínas de transporte, mas apesar disso têm seqüências bastante conservadas (Skipper e Hamilton 1977; Browder 1980; Brock e Shapiro 1983).

Na maioria dos insetos, a vitelogenina (Vg) é sintetizada abundante e especificamente nos corpos gordurosos das fêmeas vitelogênicas. Os estudos das proteínas envolvidas no processo de síntese dessa proteína possibilitaram grandes avanços na compreensão da fisiologia dos insetos, da atuação de hormônios sobre a expressão gênica e dos elementos promotores de genes dos insetos e seus respectivos fatores de transcrição. Além disso, os promotores da Vg são considerados ferramentas relevantes para desenvolver tecnologias genéticas e direcionadas para resolver problemas no campo da saúde pública (Collins e James 1996; Kokoza *et al.* 2001; Ahmed *et al.* 2001).

1.4.1 Vitelogênese em mosquito

Os mosquitos considerados vetores de doenças possuem grande capacidade reprodutiva resultando em um número considerável de descendentes gerados em um curto período de tempo. A espécie *A. aegypti*, por exemplo, produz até 150 ovos por ciclo reprodutivo, que estão prontos para serem colocados em 72 horas após o repasto sanguíneo (Clements 1992).

A ingestão de sangue pelos mosquitos resulta em um sinal nutricional do intestino para o cérebro. O cérebro, em resposta a esse sinal, libera um hormônio (OEH), o qual estimula os ovários a sintetizar e liberar a ecdisona. A ecdisona entra no corpo gorduroso e é convertida a 20-hidroxiecdisona (20E) e este ativa a expressão do gene das proteínas precursoras de vitelo (PPV). As PPV então são sintetizadas no corpo gorduroso, secretadas para a hemolinfa e transportadas para o ovário para estocagem em vesículas dentro dos ovócito (Fig. 3) (Attardo *et al.* 2005).

As estratégias dos mosquitos para obter sangue e o constante contato com os vertebrados, associado às adaptações dos parasitos facilitam a transmissão de doenças. Em *A. gambiae* o principal vetor de *P. falciparum* na África foram estudados o efeito da infecção por parasitos sobre a vitelogênese (Ahmed *et al.* 1999; Ahmed *et al.* 2001). Uma diminuição significativa na síntese da vitelogenina e

no acúmulo dessa proteína nos ovários foi observado em mosquitos infectados, ocorrendo uma produção menor de ovos férteis. Estudos bem sucedidos foram realizados com mosquitos transgênicos dessa espécie, com o intuito de interromper o ciclo de transmissão da malária (Grossman *et al.* 2001; Ito *et al.* 2002). As moléculas efetoras anti-parasitas, tais como anticorpos monoclonais e de cadeia simples, toxinas anti-parasitas e as moléculas envolvidas no processo de imunoresposta e síntese de peptídeos são candidatos para interferir no desenvolvimento do parasito no mosquito (Nirmala e James, 2003).

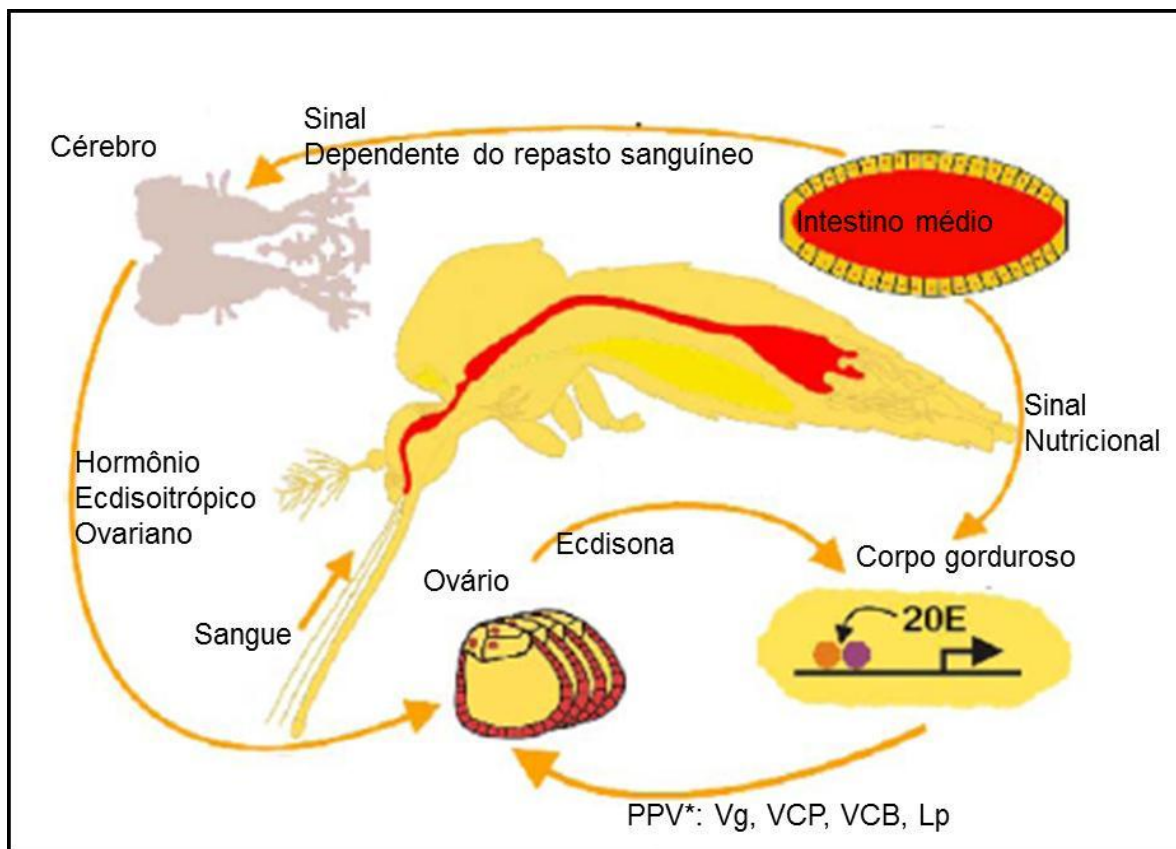


Figura 3. Esquema da ativação do processo da vitelogenese após a alimentação de sangue. *PPV = proteínas precursora de vitelo – Vitelogenina (Vg), carboxipeptidase vitelogenica (VCP), catepsina B vitelogenica (VCB), lipoforina (Lp). Adaptado Attardo *et al.*, (2005).

No entanto, o desenvolvimento dos mosquitos geneticamente modificados dependem, entre outros fatores, da identificação de promotores endógenos no mosquito, tais como os derivados dos genes da Vg, para direcionar a expressão das moléculas efetoras anti-parasitas, especificamente no local e período em que os parasitos estão presentes no tecido, estágio e no sexo específico. Exemplos disso estão nos estudos de Kokoza *et al.* (2000; 2001) e Shin *et al.* (2003) que usaram um fragmento do promotor do gene da Vg de *A. aegypti* para direcionar a expressão de

proteínas efetoras anti-microbiana em transgênicos, demonstrando que o aumento da expressão do gene cecropina no corpo gorduroso de *A. aegypti* resultou em uma redução entre 65 e 70% do número de oocistos de *Plasmodium gallinaceum* formados no trato digestivo de mosquitos alimentados em hospedeiros infectados. Entre estes e outros avanços torna-se necessária a caracterização dos promotores homólogos que forneçam o controle preciso da expressão dos genes (Nirmala e James 2003; Christophides 2005; James 2005).

Anopheles darlingi é, sem dúvida, o principal vetor de malária no Brasil. É vetor primário, altamente susceptível aos plasmódios humanos e capaz de transmitir malária dentro e fora das casas, mesmo quando sua densidade é baixa. O insucesso na manutenção de colônias provavelmente contribuiu para não realização de alguns experimentos em laboratório com o objetivo de tentar entender mecanismos sobre a biologia desse mosquito. Nesse sentido *A. darlingi* tem-se constituído um desafio para pesquisadores brasileiros. Desta forma este trabalho contribuiu para reunir mais informações sobre as modificações morfológicas do ovário e a expressão do gene da vitelogênese em fêmeas nulíparas de *A. darlingi* não grávidas da primeira geração.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Estudar as características biológicas e moleculares durante a ovogênese de fêmeas de *Anopheles darlingi*, principal vetor de malária no Brasil.

2.2 Objetivos específicos

- Verificar se há influência do tamanho das fêmeas oriundas de criadouros aquáticos no desenvolvimento ovariano;
- Quantificar os ovos das fêmeas após o repasto sanguíneo em diferentes hospedeiros;
- Observar as mudanças morfológicas no desenvolvimento ovariano antes e depois do repasto sanguíneo;
- Determinar a quantidade de proteínas totais acumuladas nos ovócitos durante o desenvolvimento ovariano;
- Analisar o perfil protéico em diferentes estágios de desenvolvimento ovariano;
- Verificar a expressão do gene Vg e o acúmulo do seu respectivo RNAm antes e após múltiplos repastos sanguíneos;

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Descrição da área de estudo

Fêmeas de *A. darlingi* foram capturados no intra e extradomicílio nas paredes das casas localizadas no Ramal do Brasileirinho-Km 7 no Sítio Raifran (S 03° 03 67' 7" e W 05° 98 70' 19") e Ramal do Puraquequara - Km 9 (S 03° 05 05' 9" e W 05° 98 67' 91") em Manaus - Amazonas e nas paredes das casas da Comunidade do Inajá (S 04° 03 42' 4" e W 63° 29 51' 3") em Coari – Amazonas.

Larvas e pupas de *Anopheles* spp foram coletadas em um criadouro aquático natural localizado na Estrada do Puraquequara - Indústria Portela (S 03° 05 19' 5" e W 05° 98 92' 62") em Manaus – Amazonas.

3.2 Coleta e manutenção das larvas e adultos

Os adultos foram coletados com auxílio do capturador entomológico nas paredes das casas entre 18h e 21h, e transportados em copos parafinados de 1000 mL cobertos com filó preso com liga de borracha para o insetário do Laboratório de Malária e Dengue no INPA. Um repasto sanguíneo em pato doméstico *Cairina moschata* foi oferecido para as fêmeas. Somente as fêmeas totalmente ingurgitadas foram colocadas para ovipor em copos individuais coberto com filó e preso com liga de borracha contendo no fundo do copo um papel filtro umedecido com água destilada e acondicionado em isopor por três dias (Santos *et al.* 1981). Ovos e as fêmeas de *Anopheles* spp. foram identificados usando as chaves de Faran e Linthicum (1981) e Linthicum (1988).

Larvas e pupas de *Anopheles* spp foram capturadas com auxílio de conchas de alumínio pela manhã nos horários entre 9h e 12h e a tarde entre 15h e 17h nas margens do criadouro. Com o conta gotas as forma imaturas de *Anopheles* spp foram armazenadas em vasilhas plásticas de 1000 mL e transportadas para insetário do Laboratório de Malária e Dengue no INPA. No insetário, a água do criadouro foi parcialmente trocada por água de poço e as pupas foram transferidas para os potes das gaiolas. As fêmeas nulíparas não grávidas da primeira geração emergidas foram separadas dos machos e colocadas em copos de 1000 mL, para em seguida serem

identificadas usando as chaves de Faran e Linthicum (1981) e Linthicum (1988). Os machos emergidos foram descartados.

Em laboratório as fêmeas nulíparas de *A. darlingi* não grávidas da primeira feração foram alimentados com solução de sacarose 10% e as larvas foram mantidas em bandejas com alimento moído a pó da mistura de Tetra Marine Saltware granules (Tetra[®]) 1:1 Gold Fish Colour (Alcon[®]).

Todos os experimentos deste trabalho foram realizados em laboratório com fêmeas nulíparas não grávidas da primeira geração de *A. darlingi*. Os estágios de ovo, larva, pupa e adulto foram mantidos no insetário com fotoperíodo 12D:12N, umidade relativa 70-80% e temperatura 26±2°C.

3.3 Observação do repasto sanguíneo

3.3.1 Fêmeas nulíparas oriundas de larvas do criadouro natural

As pupas de *Anopheles* spp coletadas em criadouros naturais da localidade da Estrada do Puraquequara - Indústria Portela em Manaus – Amazonas foram colocadas em potes nas gaiolas. Após 3 e 4 dias da emergência os machos foram retirados da gaiola e as fêmeas nulíparas não grávidas emergidas foram identificadas e colocadas em copos parafinados de 1000 mL para acesso ao 1º repasto sanguíneo. As fêmeas ficaram sem acesso a solução de sacarose por 6h e depois foram colocadas no hospedeiro vertebrado hamster *Mesocricetus auratus*.

As fêmeas nulíparas não grávidas foram colocadas para picar diretamente no hospedeiro vertebrado por 10 a 20 min ou até que a maioria delas estivessem ingurgitadas de sangue. As fêmeas totalmente ingurgitadas foram determinadas a olho nú pela presença de abome dilatado, repleto de sangue de tonalidade avermelhada (Sella 1920; Charlwood *et al.* 1980). Imediatamente após o repasto sanguíneo as fêmeas não alimentadas foram descartadas e somente as fêmeas totalmente ingurgitadas foram deixadas no copo em repouso por 72h para digestão do sangue ingerido e com acesso a solução de sacarose 10%. Após o tempo de repouso, de 72h, as fêmeas foram dissecadas em tampão salino fosfato PBS 1X (Gibco) sob microscópio-esterioscópico (ZEISS) pressionando a cutícula do mosquito entre o quinto e sexto segmento do esternito abdominal com auxílio de um estilete (Detinova 1962).

Durante a dissecação foi verificada a fase de desenvolvimento dos folículos, de acordo com Christophers (1911) e Clements (1992), descritos em Forattini (1996). Assim sendo os ovários de *A. darlingi* foram verificados de acordo com a fase sendo: G – o folículo incompleto; Ia – folículo com oito células nutridoras não diferenciadas; Ib - ovócito evidente; IIa – citoplasma com grânulos de lipídios. IIb – grânulos de lipídios mais evidentes; IIIa – ovócito existem com grânulos de lipídios; IIIb ovócito adquire maior tamanho com uma massa de vitelo; IVa - folículo estreito e alongado; IVb – folículo com forma de ovócito maduro e com as células nutridoras degeneradas; V – ovócito com dimensões definitivas, o epitélio folicular degenerado e aparecimento das estruturas do córion.

3.3.2 *Influência do tamanho das fêmeas nulíparas no desenvolvimento ovariano após o repasto sanguíneo*

Larvas de 1º e 2º estádios oriundas de criadouro natural da localidade da Estrada do Puraquequara - Indústria Portela em Manaus – Amazonas foram colocadas em vasilhas plásticas (30 cm de comprimento, 21 cm de largura e 5,5 cm de profundidade) com 1000 mL de água. Um número de 250 larvas foram submetidas a cada um de dois tratamentos com alimento Tetramim e Gold fish (1:1) macerado em pó: (1) alimentadas uma vez ao dia e, (2) alimentada 3 vezes ao dia. As pupas dos dois tratamentos foram colocadas em gaiolas identificadas e após a emergência dos adultos os machos foram retirados das gaiolas. As 10 primeiras fêmeas emergidas foram destinadas as medições das asas e 91 fêmeas restantes foram colocada para acesso ao repasto sanguíneo em hamster.

As fêmeas emergidas oriundas dos dois tratamentos foram aleatoriamente separadas em grupos com acesso ao 1º, 2º, ou 3º repastos sanguíneos. No 1º repasto sanguíneo as fêmeas se alimentaram uma única vez de sangue de hamster e foram dissecadas após 72h. No 2º repasto sanguíneo as fêmeas tiveram acesso ao sangue por dois dias a cada 24h e foram dissecadas após 72h a partir do segundo dia de repasto. No 3º repasto sanguíneo as fêmeas tiveram acesso ao sangue por 3 dias a cada 24h e dissecadas após 72h do terceiro dia.

Para cada grupo de fêmeas, após 72h, foi observado os estágios de Christophers (1911) e Clements (1992) descritos em Forattini (1996).

3.3.3 Múltiplos repastos sanguíneos

Até seis repastos sanguíneos foram oferecidos por 10 a 20 min ou até todas as fêmeas nulíparas de *A. darlingi* não grávidas da primeira geração oriunda das amotras coletadas na Comunidade do Inajá em Coari – Amazonas estivessem alimentadas, com intervalo de 24h entre um repasto sanguíneo e outro. Nos dois experimentos continham 200 fêmeas nulíparas com 3 e 4 dias de vida: experimento sem a presença papel filtro umedecido para impedir a oviposição (Fig. 4) e o experimento com a presença de um papel filtro umedecido para induzir a oviposição (Fig. 5).

Na figura 4 mostra o experimento sem a presença do papel filtro umedecido, no primeiro dia foi oferecido o 1º repasto sanguíneo e em seguida as fêmeas nulíparas não grávidas da primeira geração foram separadas em copos diferentes e identificadas como alimentadas com o sinal positivo (+) e não alimentadas com o sinal negativo (-). Após 24h do 1º repasto sanguíneo, no segundo dia, foi oferecido um 2º repasto sanguíneo tanto para as fêmeas alimentadas quanto para as não alimentadas. Em seguida as fêmeas foram novamente separadas em grupos de alimentadas duas vezes (++), alimentadas uma vez (+ -) e (- +) e fêmeas não alimentadas (- -). E novamente após 24h do 2º repasto sanguíneo, no terceiro dia, foi oferecido o 3º repasto sanguíneo e separadas as fêmeas em grupos de alimentadas três vezes (+++), fêmeas alimentadas duas vezes (+ - + / + + - / - + +), fêmeas alimentadas uma vez (+ - - / - + - / - - +) e fêmeas não alimentadas (- - -) durante todo o experimento. Após o último repasto sanguíneo foi dado um intervalo de 24h e então as fêmeas foram colocadas em tubos de 1,5 mL contendo 1 mL de RNA *late*[®](Ambion). Em seguida estes materiais foram estocados a -20°C para posterior análise da expressão do gene da vitelogenina.

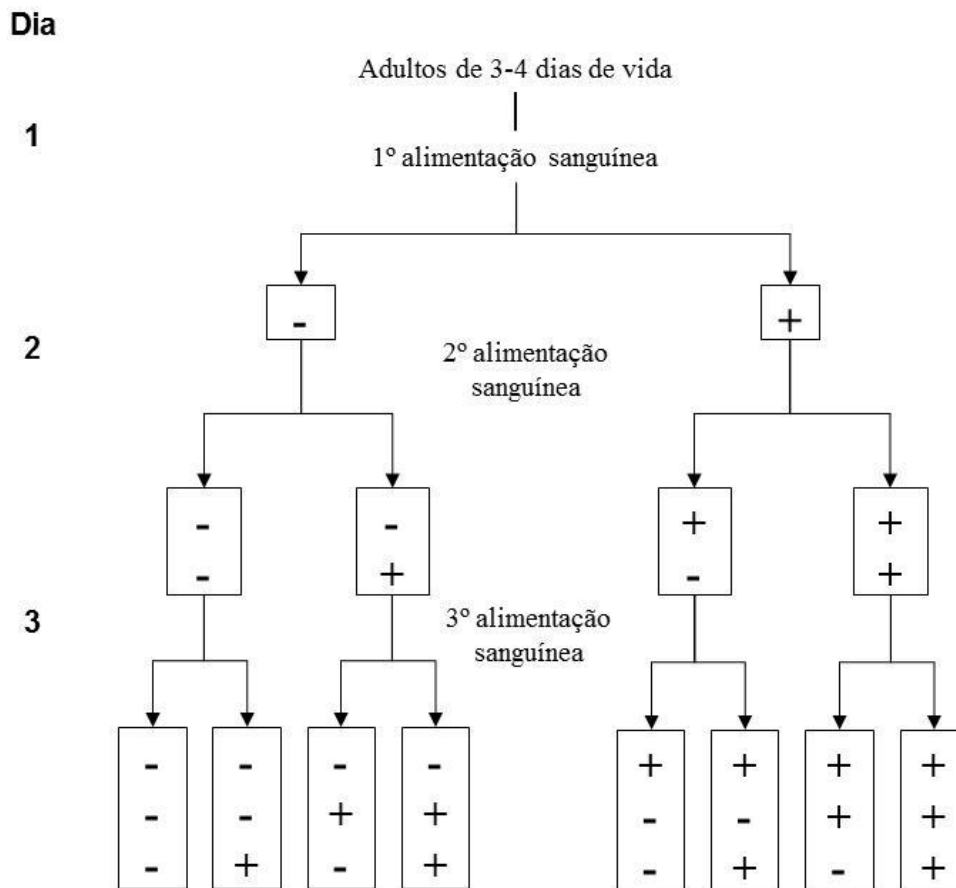


Figura 4. Desenho experimental de múltiplos repastos sanguíneos de fêmeas nulíparas de *A. darlingi* da primeira geração sem a presença do papel filtro umedecido com água oriundas das amostras da Comunidade do Inajá em Coari – Amazonas. As fêmeas de *Anopheles darlingi* foram divididas em grupos após o repasto sanguíneo. (+) fêmeas que realizaram o repasto sanguíneo; (-) fêmeas que não realizaram o repasto sanguíneo.

Na figura 5 mostra o experimento com presença de papel filtro umedecido para indução da oviposição, foi oferecido às 200 fêmeas nulíparas não grávidas da primeira geração o 1º repasto sanguíneo e em seguida as fêmeas foram separadas em copos diferentes e identificadas em fêmeas alimentadas (+) e não alimentadas (-). As fêmeas não alimentadas foram descartadas e o experimento seguiu somente com fêmeas alimentadas. Então, no segundo dia, após 24h do 1º repasto sanguíneo foi oferecido o 2º repasto sanguíneo e as fêmeas foram separadas em copos e identificadas em fêmeas alimentadas duas vezes (+ +) e alimentadas uma vez (+ -). E após o no terceiro dia, 24h do 2º repasto sanguíneo, foi oferecido o 3º repasto sanguíneo e as fêmeas foram separadas e identificadas em fêmeas alimentadas três vezes (+ + +), alimentadas duas vezes e alimentadas uma vez (+ + -). Após o 3º repasto sanguíneo as fêmeas foram colocadas em copos individuais contendo no fundo um papel filtro úmido, e acondicionado em isopor por três dias com umidade relativa 70-80% e temperatura $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$. A cada 24h, no quarto, quinto e sexto dias,

as fêmeas foram observadas individualmente, verificando a presença ou ausência de ovo posto no fundo do copo. Em cada dia para as fêmeas não ovipostas foi oferecido o 4º repasto sanguíneo e o mesmo procedimento foi feito até completar o 6º repasto sanguíneo. Após os repastos sanguíneos foram retiradas aleatoriamente 10 fêmeas de cada grupo ou em alguns casos as fêmeas que sobravam e foram colocadas em tubos de 1,5 mL contendo 1 mL de RNA *later*[®](Ambion). Em seguida estes materiais foram estocados a -20°C para posterior análise da expressão do gene da vitelogenina.

Alternativamente também foram oferecidos até cinco repastos sanguíneos em hamster para 100 fêmeas nulíparas de *A. darlingi* da primeira geração emergidas de larvas do criadouro aquático natural localizado na Estrada do Puraquequara - Indústria Portela em Manaus – Amazonas. Após os repastos sanguíneos foram retiradas aleatoriamente 10 fêmeas e colocadas 5 fêmea nulíparas de *A. darlingi* não grávidas da primeira geração em tubos de 1,5 mL contendo 1 mL de RNA *later*[®](Ambion). Em seguida estes materiais foram estocados a -20°C para posterior análise da expressão do gene Vg.

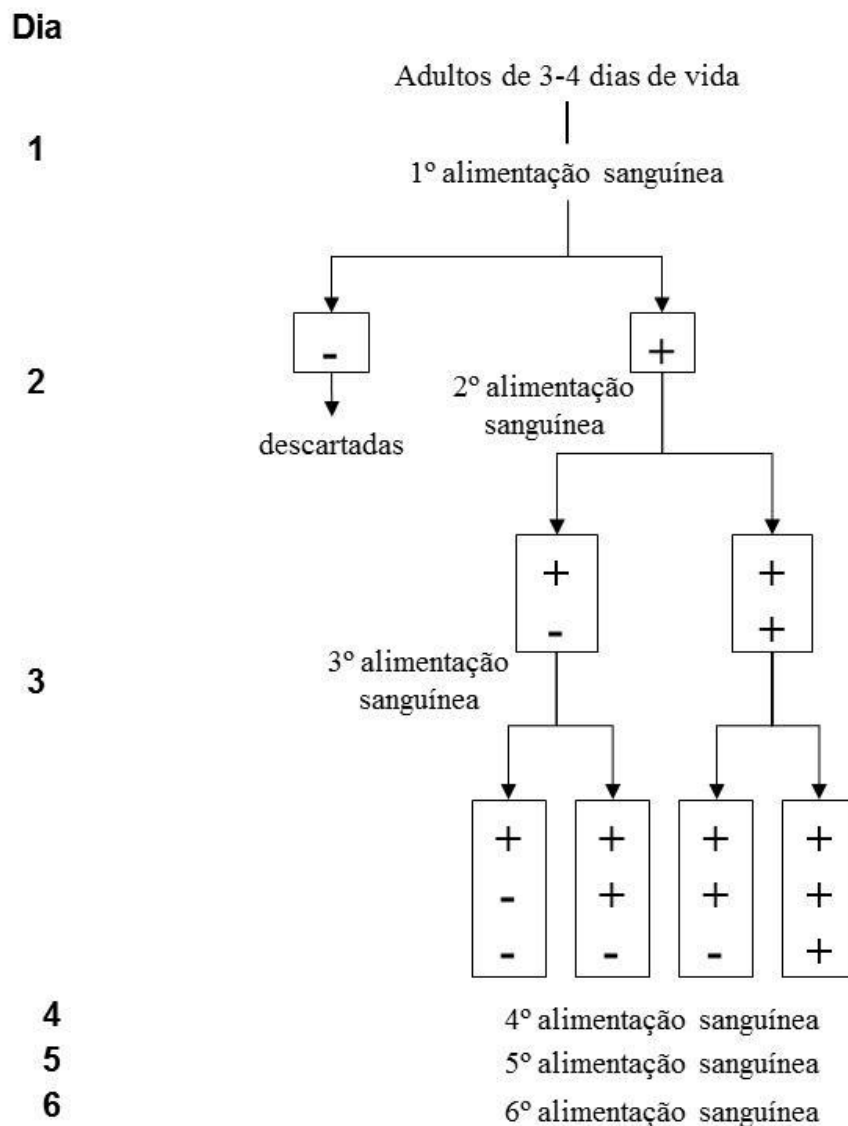


Figura 5. Desenho experimental de múltiplos repastos sanguíneos de fêmeas nulíparas de *A. darlingi* não grávidas da primeira geração na presença de papel filtro umedecido com água para induzir a oviposição oriundas das amostras da Comunidade do Inajá em Coari – Amazonas. As fêmeas de *A. darlingi* foram divididas em grupos após o repasto sanguíneo e colocadas para ovipor. (+) fêmeas que realizaram o repasto sanguíneo; (-) fêmeas que não realizaram o repasto sanguíneo.

3.4 Determinação do número de ovos após o repasto sanguíneo em diferentes hospedeiros vertebrados

A quantidade de ovos produzidos pelas fêmeas nulíparas foram determinadas a partir da dissecação de 50 fêmeas da primeira geração de *A. darlingi* oriundas do Ramal do Brasileirinho-Km 7 no Sítio Raifran e Ramal do Puraquequara - Km 9 em Manaus – Amazonas. As fêmeas de *A. darlingi* foram separadas aleatoriamente em três grupos: dois com 16 fêmeas e um grupo de 17 fêmeas. Cada grupo de fêmeas teve acesso ao sangue em contato direto ao hospedeiro vertebrado

por 10 a 20 min ou até que todas as fêmeas se alimentassem. Todas as fêmeas tiveram três repastos sanguíneos sucessivos com intervalo de 24h de um para o outro. A solução de sacarose 10% foi removida 6h antes de cada exposição das fêmeas aos hospedeiros.

Os dois exemplares de hospedeiros vertebrados utilizados no experimento foram: (A) três hamsters *Mesocricetus auratus* proveniente da Coordenação em Pesquisa de Ciências da Saúde – CPCS do INPA alimentados com ração Labina para animais de laboratório; (B) três patos domésticos *Cairina moschata* proveniente Laboratório de Malária e Dengue alimentados com grãos de milho e girassol.

Após o 3º repasto sanguíneo as fêmeas foram colocadas em copos individuais para repouso contendo no fundo papel filtro úmido, tela de filó e um chumaço de algodão embebido com solução de sacarose 10%, acondicionado em caixas de isopor. Após 24h, 48h e 72h, do 3º repasto sanguíneo, as fêmeas foram observadas individualmente, verificando a presença ou ausência de ovos postos no fundo do copo. Após 72h, todas as fêmeas foram dissecadas em tampão salino fosfato PBS 1X (Gibco) sob microscópio-esteroscópico da ZEISS pressionando a cutícula do mosquito entre o quinto e sexto segmento do esternito abdominal com um estilete (Detinova 1962), e os ovos foram contados com a ajuda de um contador manual.

Os resultados do número de ovos no estágio V produzidos pelas fêmeas nulíparas de *A. darlingi* não grávidas da primeira geração nos diferentes hospedeiros vertebrados - sangue de pato e hamster - foram analisados pela análise de variância (ANOVA) utilizando o software Biostat 5.0 (Ayres *et al.* 2007).

3.5 Morfologia do desenvolvimento ovariano

As análises de microscopia foram realizadas no Laboratório de Entomologia Médica do Centro de Pesquisas René Rachou-CPqRR/Fiocruz. As fêmeas nulíparas de *A. darlingi* não grávidas da primeira geração oriundas de criadouro natural da localidade da Estrada do Puraquequara - Indústria Portela foram mantidas com acesso a solução de sacarose 10% e dissecadas às 24h, 48h e 72h após a emergência. Alternativamente, no terceiro ou quarto dia após emergência, foram oferecidos as fêmeas repastos sanguíneos hamster e foram dissecadas a 3, 6, 12,

24, 36, 48 e 72 horas após o repasto sanguíneo. O açúcar foi removido 6h antes da exposição ao hospedeiro. Para realização das análises de microscopia foram dissecados 3 pares de ovários das fêmeas nulíparas e a dissecação ocorreu em tampão salino fosfato PBS 1X (Gibco) sob microscópio-esteroscópio da ZEISS e os pares ovários foram isolados pressionando a cutícula do mosquito entre o quinto e sexto segmento do esternito abdominal com um estilete (Detinova 1962).

3.5.1 Microscopia Eletrônica de Varredura

Os pares de ovários foram fixados por 12h em glutaraldeído 2,5% tampão cacodilato 0,1M, temperatura ambiente, hidratados em PBS 1x e pós-fixados em tetróxido de ósmio plus 1% ferricianida de potássio 0,8%. Em seguida, as amostras foram desidratadas numa série de acetona, secas em ponto crítico de CO₂ e metalizadas em ouro. As imagens foram analisadas ao microscópio eletrônico de varredura (Jeol JSM5600), 6-7kV de aceleração tensão.

3.5.2 Microscopia Laser Confocal

Em temperatura ambiente, os ovários foram fixados por 12h em paraformaldeído 4%, lavados em PBS 1x por 3 vezes a cada 5 min e incubados em meio RPMI por 2 horas. Entre cada um desses passos, os ovários foram lavados 2 vezes, por 5 min, com PBS, seguido de incubação com PBS/BSA (1% soro de albumina bovina, Triton 0,02% em PBS pH7,5 plus 1% BSA), por 30min. No escuro, os ovários ficaram imersos em Isotiocianato de fluoresceína (FITC) por 24h e em 4',6-diamidino-2-fenilindole (DAPI), por 30 min. Em seguida, as amostras foram montadas em Mowiol e analisadas por Microscopia laser confocal (LSM510, ZEISS). Como controle foi preparado uma réplica de ovário a 36h de desenvolvimento após o repasto sanguíneo apenas com PBS/BSA/Triton 0,02% e aplicado o filtro verde para verificar a existência natural de autofluorescência do material.

3.5.3 *Microscopia de Luz*

Os ovários foram fixados em glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato 0,1% pH 7,2, por 12h, sob temperatura ambiente. Em seguida lavados em PBS 1X por 5 vezes, desidratado em etanol e embebido em historesina. Posteriormente, as amostras foram cortadas em micrótomo semi-automático da ZEISS com secção de 1µm, coradas em azul de toluidina e montadas com Entellan. As imagens foram obtidas usando o microscópio sem o laser (LSM 510 ZEISS).

3.5.4 *Análise das imagens*

As dimensões das estruturas morfológicas dos ovários de *A. darlingi* foram obtidas através do Software Zeiss LSM Image Browser. Todos os estágios de desenvolvimento dos ovócitos durante o repasto com sacarose e de sangue das fêmeas foram comparados com aqueles apresentados por de Christophers (1911) e Clements (1992), descritos em Forattini (1996).

3.6 Determinação do perfil protéico e quantificação das proteínas totais dos ovários

Os experimentos de perfil protéico em eletroforese de SDS-PAGE foi realizado no Laboratório de Entomologia Médica do Centro de Pesquisas René Rachou-CPqRR/Fiocruz e no Laboratório de Malária e Dengue no Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia - INPA e a quantificação das proteínas totais foram realizados no Instituto Leônidas e Maria Deane – CPqLMD/Fiocruz. Para determinação do perfil protéico em eletroforese em SDS – PAGE e quantificação das proteínas dos ovários fêmeas nulíparas de *A. darlingi* da primeira geração oriundas de criadouro natural da localidade da Estrada do Puraquequara - Indústria Portela foram mantidas com acesso a solução de sacarose 10% e dissecadas 72h após a emergência. Alternativamente, no terceiro ou quarto dia após emergência, foram oferecidos as fêmeas repastos sanguíneos hamster e dissecadas 3, 6, 12, 24, 36, 48 e 72 horas após o repasto sanguíneo. O açúcar foi removido 6 h antes da exposição ao hospedeiro. A dissecação dos mosquitos ocorreu de acordo com Detinova (1962)

em tampão salino fosfato PBS 1X (Gibco) com inibidor de protease (Roche) sob microscópio-esterioscópico da ZEISS.

3.6.1 *Determinação das proteínas totais*

As proteínas totais solúveis presentes nos ovários das fêmeas *A. darlingi* foram determinadas de acordo com o microensaio como descrito por Bradford (1976). Onze pares de ovários foram colocados em tubo de plástico de 0,6 mL contendo 60 µL de tampão de Lise (Uréia 4M, Thiouréia 1M, Chaps 4%) com inibidor de protease, macerados com pistilo e levado ao congelador a -20°C. No ensaio, inicialmente foi utilizada uma curva de calibração como padrão a BSA (Albumina de soro bovino) que apresentaram as concentrações (32 - 16 - 8 - 4 - 2 - 1 mg/mL). E para cada tempo, foram retirados 10µL da amostra e misturada a 200µL do corante G-250 e 790 µl de água ultra pura. Como controle foi realizado o branco misturando 800 µL de tampão de lise e 200 µL do corante G-250. Em seguida as cubetas foram levadas ao espectrofotômetro Cary 50 Conc versão 3,0 e as absorbâncias foram determinadas em 595 nm.

3.6.2 *Perfil protéico SDS-PAGE*

No perfil protéico os ovários foram analisadas em condições desnaturantes. As proteínas de três pares de ovários foram dissolvidas em 30µl de tampão de amostra comercial Biorad (LaemmLi Sample Buffer) de composição 62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8, 25% glycerol, 2% SDS, 0,01% azul de Bromofenol e 50 µL de β-Mercaptoetanol, maceradas e aquecidas a 100°C por 5 min.

No gel de poliacrilamida foi aplicada 10 µL de cada amostra de ovário. O gel de poliacrilamida consistia de duas fases: a concentradora a 4% e a separadora a 10% e a eletroforese ocorreu numa cuba do tipo Mini Protean II (Biorad), mantendo a voltagem inicial 60V por 15 min e depois constante e igual a 90V por 1h e 45 min, até que o marcador de frente Azul de Bromofenol se aproxime do final do gel (LaemmLi 1970). Terminada a eletroforese, as proteínas foram fixadas e coradas por Coomassie blue R 0,2%, dissolvido em etanol: ácido acético: água (45: 10: 45, v:v:v)

durante duas horas. A descoloração dos géis para visualização das bandas coradas foi realizada em etanol: ácido acético: água (30: 7: 63, v:v:v).

As massas moleculares dos polipeptídeos foram determinadas a partir do marcador de massa molecular (Biorad) que contem Miosina (200 kDa), β galactosidase (116 kDa), fosforilase B (97 kDa), albumina de soro (66 kDa), albumina de ovo (45 kDa), anidrasecarbonica (31 kDa), inibidor de tripsina (22 kDa), Lisozima (15 kDa) e aprotinina (7 kDa).

3.7 Extração do DNA genômico e PCR específico

Os experimentos de extração de DNA genômico foi realizado no Laboratório de Malária e Dengue no Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia – INPA. Para a obtenção do DNA genômico, no microtubo de 1,5 mL um mosquito inteiro de fêmea nulípara de *A. darlingi* da primeira geração oriunda da Comunidade do Inajá em Coari – Amazonas foi macerado com 240 μ L de solução Chelex[®]100 5% pré-aquecida a 100°C por 10 min. Em seguida a solução com mosquito macerado foi centrifugado 12000 rpm por 10 min, o sobrenadante foi retirado e transferido para um novo tubo e estocado a -20°C até o PCR específico.

O PCR seguiu utilizando oligonucleotídeos conservados obtidos a partir do alinhamento do gene da vitelonenina (Vg) de outros anofelinos (Tabela 1).

Inicialmente, foram feitas combinações com os oligonucleotídeos (Tabela 2) e o PCR utilizou um Kit puReTag Ready-to-Go PCR Beads (GE Healthcare) com componentes do kit nas seguintes concentrações: 200 μ M de dNTP em 10 mM Tris – HCl, (pH 9,0 temperatura ambiente), 50mM KCl e 1,5 mM MgCl₂. Em tubos de 0,2 mL foram adicionados 1 μ L de cada oligonucleotídeos 5pMol/ μ l, 23 μ l de H₂O e 1 μ L de DNA molde de *A. darlingi*. As amostras foram submetidas ao sistema de ciclo: desnaturação inicial a 94°C por 30s, seguido de 36 ciclos de desnaturação a 94°C por 30s, anelamento a 68°C por 15s e polimerização a 72°C por 2 min. No final dos ciclos foi realizada uma extensão a 72°C por 2 min.

Tabela 1. Oligonucleotídeos desenhados a partir de áreas conservadas observadas no alinhamento dos genes da Vg de *Anopheles* spp. Sequências de oligonucleotídeos do gene Vg de anofelinos (Marinotti-comunicação pessoal, oligonucleotídeos não publicados).

Oligonucleotídeos	Sequência
Vg3070	F 5'CTGCCCAAGACCATCCGCTACCCGACC3'
	R 3'GACGGGTTCTGGTAGCGATGGGCTGG5'
Vg5500	F 5'GGCAAGCAGTTCCAGATGTGCTTCTCGGCCACC3'
	R 3'CCGTTTCGTCAAGGTCTACACGAAGAGCCGGTGG5'
Vg4150	F 5'GGCAAGCAGTTCCAGATGTGCTTCTCGGCCACC3'
	R 3'GCTCGTCAAGCCTTCTTGGTCCTCC5'
Vg1380	F 5'CTGCCGGACCTCGAGGACTACTGGACCGGCAT3'
	R 3'GACGGCCTGGAGCTCCTGATGACCTGGCCGTA5'
Vg7320	F 5'GTCGGTCACCAAGACCGTCAAG3'
	R 3'CTTGACGGTCTTGGTGACCGAC5'
Vg7200	F 5'GTACGTCGATGTTCACTGCCGTGAC3'
	R 3'CATGCAGCTACAAGTGACGGCACTG5'
Vg1730	F 5'GAGTTCAACCAGTTCCCGGAGAACAACACCCTCACCGGTGTG
	R 3'CACACCGGTGAGGGTGTGTTCTCCGGGAACCTGGTTGAACTC
Vg3550	F* 5'CTGTTCAAGGTGTACCAGAACACCGGAGATGC CCATGAGG
	R** 3'CCTCATGGGCATCTCCGGTGTCTGGTACACCTTGAACAG

*F= forward
**R = reverse

Tabela 2. Combinações aleatórias dos oligonucleotídeos utilizadas nos PCRs para verificação do gene da vitelogenina em fêmeas nulíparas de *A. darlingi* da não grávidas primeira geração oriunda da Comunidade do Inajá em Coari – Amazonas.

Oligonucleotídeos	pb***
1380 F* e 1730 R**	350
1730 F e 3070 R	1340
1730 F e 1380 R	350
3070 F e 3550 R	480
1730 F e 3550 R	1820
3070 F e 4150 R	1080
5500 F e 4150 R	1820
3550 F e 4150 R	600
4150 F e 5500 R	1350
5500 F e 7200 R	1700
7200 F e 7320 R	120
1380 F e 3070 R	1690

*F= forward

**R = reverse

***pb = pares de bases do produto de PCR esperado

O resultado do PCR foi verificado em gel de agarose 1% a 100V e para a marcação da massa molecular foi utilizado 100pb DNA Ladder (Invitrogen).

Após as análises do gel foram selecionadas as amostras com os resultados positivos para o gene Vg e enviadas para o sequenciamento na Universidade da Califórnia Irvine - EUA. Após o sequenciamento foram desenhados os oligonucleotídeos Anda Vg Forward 1 e Anda Vg Reverse 1 (Tabela 3) para utilização no RT-PCR.

3.8 Extração do RNA total e obtenção do cDNA de Vg

Os experimentos de extração de RNA total foi realizado no Laboratório de Malária e Dengue no Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia – INPA e no Laboratório de Entomologia Médica do Centro de Pesquisas René Rachou-CPqRR/Fiocruz. O RNA total foi extraído de uma fêmea nulíparas de *A. darlingi* da não grávida primeira geração oriunda da Comunidade do Inajá em Coari – Amazonas antes e após o repasto sanguíneo, usando Trizol (Invitrogen). As

amostras de mosquitos coletadas foram maceradas em 500µL de Trizol com o auxílio de um pistilo de plástico. Após homogeneização e incubação por 5 min à temperatura ambiente, 100µL de clorofórmio foram acrescentados à mistura, seguido de vigorosa agitação e incubação à temperatura ambiente, por 3 min. As amostras foram centrifugadas a 12000 rpm por 15min a 4°C, sendo a fase aquosa, contendo o RNA, cuidadosamente transferida para microtubos estéreis de 1,5 mL, resfriados em gelo. O RNA foi precipitado adicionando-se à fase aquosa 250µL de álcool isopropílico, seguido de incubação à temperatura ambiente por 10 min e centrifugação a 12000 rpm, por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e ao precipitado foram adicionados 500µL de etanol 75% seguido pela centrifugação a 7500 rpm por 5min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi seco ao ar. O RNA total foi ressuscitado em 30µL de água tratada com DEPC (Dietilpirocarbonato) comercial (Invitrogen), sendo posteriormente armazenado a -70°C.

3.9 Dosagem do RNA

Logo após a extração do RNA total, uma alíquota de 2µL de cada amostra foi retirada e diretamente dosada em um leitor NanoDrop ND-1000. A pureza do RNA total foi determinada pelo valor da razão dos valores de leitura das absorvâncias a 260/280 nm e consideramos um RNA puro quando esta razão variou de 1,7 a 2,0.

3.10 Síntese de cDNA

Amostras de RNA total (2µg) foram, inicialmente, tratadas com a enzima RQ1 RNase-Free DNase 1000u da Promega. Foram utilizadas 2U/µL (unidade por µL) da enzima, 2µL do tampão da enzima (400mM Tris-HCl pH 8,0, 100mM MgSO₄, 10mM CaCl₂) e água DEPC (Invitrogen) para completar um volume final de 20 µL. Essas reações foram incubadas a 37°C por 30 minutos, em seguida foram adicionados 2µL de solução de parada da reação (*Stop Solution*) e as amostras foram incubadas por 10 minutos a 65°C para inativação da DNase.

Após o tratamento com DNase, foram acrescentados a cada reação 2µL de uma solução de dNTPs (10 mM) (Promega) e 2 µL do iniciador Oligo dT (10 µM) (Sigma). As reações foram incubadas a 65°C por 2 minutos, colocadas em gelo, acrescidas de 8µL de tampão 5x (TRIS-HCl 250 mM, KCl 375 mM, MgCl₂ 15 mM, DTT 50 mM, pH 8,0) para a enzima M-MLV RT e de 4µL de DTT (100 mM) e os tubos foram homogeneizados, incubados por 2 min a 42°C e divididos em dois tubos contendo 19µL em cada. Para a síntese do cDNA foi adicionado a um dos tubos 200U (1µL) da enzima *M-MLV Reverse Transcriptase* (Promega), enquanto no outro tubo foi adicionado 1µL de água tratada DEPC (Invitrogen) para a verificação de possíveis contaminações com DNA gênomico. As amostras foram incubadas por 50 minutos a 42°C e em seguida, a transcriptase reversa foi inativada a 70°C por 15 minutos. O material foi estocado a -20°C.

3.11 Amplificação por RT-PCR

As reações de amplificação foram realizadas a partir das diferentes amostras de cDNA (RT-PCR) utilizando os iniciadores AndaVgFor1 e AndaVgRev1 para o gene da Vg e como controle foram usados os oligonucleotídeos 18S For e 18S Rev que amplificam um fragmento da região 18S do RNA ribossomal (rRNA) (Tabela 3). As amplificações foram realizadas em um termociclador automático (Eppendorf) em 30 ciclos (30 segundos a 95°C, 20 segundos para anelamento dos iniciadores a 60°C, 30 segundos a 72°C para extensão dos fragmentos) precedidos por 2 minutos de aquecimento a 95°C e seguidos por uma etapa de extensão final de 4 minutos a 72°C.

Tabela 3. Oligonucleotídeos utilizados nas reações de RT-PCR para amplificação das amostras de cDNA molde de fêmeas de *A. darlingi* da primeira geração oriunda da Comunidade do Inajá em Coari – Amazonas. Oligonucleotídeos AndaVgRev1 e AndaVgFor1 utilizados para amplificar o gene Vg em fêmeas de *A. darlingi* da primeira geração oriunda da Comunidade do Inajá em Coari – Amazonas e para controle os 18S For e 18S Ver (Marinotti-comunicação pessoal, oligonucleotídeos não publicados).

Primer	Sequência
AndaVgRev1	5'CCGGCCTCCAGCTCGCTAAT3'
AndaVgFor1	5'GATACCGTGCGCGTGTGTTTC3'
*18SF	5'GTCTCAAAGGTTAAGCCATGCATGTCTAAG3'
*18SRev	5'CGGAATCGAACCCTGATTCCCCGTTACCCG3'

* oligonucleotídeos utilizado como controle positivo.

Os seguintes componentes foram adicionados a todas as reações: tampão 1x PCR Buffer (20mM Tris-HCl pH 8,0, 0,1 mM EDTA, 1mM DTT, 50% glycerol), 0,2 mM dNTPs, 1,5mM MgCl₂, 5pMol/μl de cada iniciador e 1U de Platinum[®] Taq DNA polimerase recombinante (Invitrogen) e H₂O estéril para completar o volume de 25μl. Foram utilizados como molde 1 μg de cDNA ou controles negativos de acordo com o gene a ser amplificado.

Os produtos das amplificações foram visualizados em géis de agarose 1% corados com GelRed[™] 3X para gel de ácido nucléico (Biotium) 1: 1000 μL em tampão de carregamento da amostra 5x (Biorad).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Observação do repasto sanguíneo

4.1.1 Fêmeas nulíparas emergidas de larvas do criadouro natural e influência do tamanho do adulto no desenvolvimento ovariano após o repasto sanguíneo

De 183 fêmeas nulíparas de *A. darlingi* da primeira geração emergidas de larvas de criadouro natural da localidade da Estrada do Puraquequara - Indústria Portela apresentaram 51,9% dos ovários com folículos no estágio V, seguido dos estágios I – II (20,8%), III (13,7%) e IV (10,9%) após o primeiro repasto sanguíneo (Tabela 4).

Tabela 4. Estágios do desenvolvimento ovariano após o 1º repasto sanguíneo de fêmeas nulíparas de *A. darlingi* da primeira geração emergidas de larvas de criadouro natural da localidade da Estrada do Puraquequara - Indústria Portela.

Estágio de desenvolvimento ovariano	N	%
I	0	0
I – II	38	20,8
III	25	13,7
IV	20	10,9
V	95	51,9
*III– V	5	2,7
Total	183	

* ovários com folículos em estágios de III a V juntos.

Para verificar a influência do alimento durante o desenvolvimento larval no tamanho do adulto mediu-se o comprimento das asas das fêmeas nulíparas de *A. darlingi* da primeira geração que emergiram de larvas, da localidade da Estrada do Puraquequara - Indústria Portela, alimentadas 1 e 3 vezes ao dia em laboratório (Tabela 5). A pulverização de alimento na lâmina d'água de 1 e 3 vezes ao dia geraram adultos com tamanho mínimo da asa igual a 2,17 mm e máximo de 3,2 mm. O valor da média de tamanho de asa das fêmeas emergidas das larvas alimentadas 1 vez ao dia foi de 2,8 mm enquanto que a pulverização por 3 vezes ao dia resultou em adultos com valor de média de tamanho da asa de 2,9 mm. Não foi observada diferença estatística entre os tamanhos das asas nos dois tratamentos, por ANOVA $p = 0,5033$ e $f = 0,4971$.

Tabela 5. Tamanho da asa das fêmeas nulíparas de *Anopheles darlingi* da primeira geração emergidas de larvas, da localidade da Estrada do Puraquequara - Indústria Portela, alimentadas 1 e 3 vezes ao dia em laboratório.

Fêmea	Tamanho da asa (mm)	
	♀ de L1x*	♀ de L3x**
1	3,05	3,1
2	2,75	2,3
3	3,15	2,8
4	2,17	3,15
5	3	3,2
6	2,65	2,4
7	2,95	2,45
8	2,75	2,95
9	2,5	3
10		3,15
Média	2,8	2,9

*Fêmeas emergidas de larvas alimentadas uma vez ao dia.

**Fêmeas emergidas de larvas alimentadas três vezes ao dia.

As 40 fêmeas de *A. darlingi* da primeira geração emergidas a partir de larvas alimentadas 1 vez ao dia em laboratório da localidade da Estrada do Puraquequara - Indústria Portela apresentaram estágio de desenvolvimento ovariano entre II e V após o 1º repasto sanguíneo com porcentagens de folículos no estágio II e V de 26,6%, III de 13,3% e IV 33,3%. No 2º e 3º repastos sanguíneos foram encontradas porcentagens de folículos no estágio III com 14,28% e 5,55% e V com 85,7% e 94,4%, respectivamente. Em 51 fêmeas de *A. darlingi* da primeira geração emergidas a partir de larvas alimentadas 3 vezes ao dia em laboratório da localidade da Estrada do Puraquequara - Indústria Portela apresentaram estágio de desenvolvimento ovariano entre I e V após o 1º repasto sanguíneo com porcentagens de folículos no estágio I, III e IV com 4,16% e V com 87,5%. No 2º e 3º repastos sanguíneos foram encontradas 100% de folículos no estágio V (Tabela 6).

Em geral num total de 183 fêmeas nulíparas de *A. darlingi* da primeira geração emergidas de larvas de criadouro natural e de 91 fêmeas nulíparas emergidas de larvas com pulverização de alimento 1 e 3 vezes ao dia em laboratório ambas oriundas da localidade da Estrada do Puraquequara - Indústria Portela

apresentaram estágios de desenvolvimento ovariano entre I e V após o primeiro repasto sanguíneo (Tabela 4 e 6).

Tabela 6. Estágio de desenvolvimento ovariano após o 1º, 2º e 3º repasto sanguíneo das fêmeas nulíparas de *Anopheles darlingi* emergidas a partir das larvas, da localidade da Estrada do Puraquequara - Indústria Portela, alimentadas 1 e 3 vezes ao dia em laboratório.

Estágio de desenvolvimento ovariano	♀ de L1x*			♀ de L3x**		
	Repasto sanguíneo			Repasto sanguíneo		
	1º	2º	3º	1º	2º	3º
I				4,16%		
II	26,6%					
III	13,3%	14,28%	5,55%	4,16%		
IV	33,3%			4,16%		
V	26,6%	85,7%	94,4%	87,5%	100%	100%

*Fêmeas nulíparas emergidas de larvas alimentadas uma vez ao dia em laboratório.

**Fêmeas nulíparas emergidas de larvas alimentadas três vezes ao dia em laboratório.

A importância do tamanho do corpo na reprodução e fisiologia dos mosquitos tem sido reconhecida e enfatizada por muitos autores (Briegel *et al.* 2001a; Briegel e Timmermann 2001; Briegel *et al.* 2002; Fernandes e Briegel 2005). O tamanho do corpo é determinado pelas condições ambientais, incluindo disponibilidade de alimento durante a fase larval (Briegel 1990 a e b, Lyimo e Koëlla 1992, Timmermann e Briegel 1993, 1999, Briegel *et al.*, 2001a, Briegel e Timmermann 2001, Briegel *et al.*, 2001b). Mosquitos pequenos têm várias desvantagens em relação aos grandes, incluindo a redução da sobrevivência, as menores reservas nutricionais, e fecundidade reduzida (Takken *et al.* 1998). O volume de sangue ingerido durante o repasto sanguíneo e a fecundidade também são aumentados com um maior tamanho do corpo (Hogg *et al.*, 1996). Um exemplo foi encontrado em *Anopheles tessellatus* com um efeito positivo do tamanho do corpo sobre as reservas nutricionais e o número de folículos ovarianos (Ramasamy *et al.* 2000). Em relação à associação do parasita com o vetor o tamanho do corpo do mosquito também pode afetar as taxas de infecção por *Plasmodium falciparum* (Lyimo e Koëlla 1992). Seguindo essa linha de raciocínio Lyimo e Takken (1993) relataram que as fêmeas de campo de *A. gambiae* com comprimentos de asa superior a 3 mm, foram capazes de desenvolver os ovos após o 1º repasto sanguíneo, enquanto as fêmeas menores necessitavam dois ou três repastos

sanguíneos para iniciar o primeiro o ciclo gonotrófico. Em *A. gambiae* esse resultado foi posteriormente confirmado sob condições de laboratório (Takken *et al.* 1998). Neste trabalho as fêmeas nulíparas de *A. darlingi* da primeira geração da localidade da Estrada do Puraquequara - Indústria Portela emergidas a partir de larvas alimentadas 1 e 3 vezes ao dia em laboratório tiveram um tamanho máximo de asa em 3,2 mm. Corroborando com os resultados de Fernandes e Briegel (2005) em *A. gambiae*, com comprimentos de asa na faixa de 2,3 e 3,2 mm. E que para Lyimo e Takken (1993) todas as fêmeas de mosquitos com comprimentos de asa de até 3mm são consideradas pequenas. E desta forma podendo ser uma explicação para a variação em estágio I e V após 1º repasto sanguíneo em fêmeas nulíparas de *A. darlingi* da primeira geração oriundas da localidade da Estrada do Puraquequara - Indústria Portela emergidas a partir de larvas alimentadas 1 e 3 vezes ao dia em laboratório. Mas essa variação no estágio do folículo após o 1º repasto sanguíneo também foi encontrada em fêmeas nulíparas de *A. darlingi* da primeira geração emergidas de larvas de criadouro natural da mesma localidade indicando que pode ser uma característica genética da população de *A. darlingi* desta localidade e que precisa realizar mais de um repasto sanguíneo para completar o primeiro ciclo gonotrófico.

As fêmeas nulíparas *A. darlingi* emergidas de larvas de criadouro natural e emergidas das larvas alimentadas em laboratório 1 vez ao dia da localidade da Estrada do Puraquequara - Indústria Portela apresentaram 20,8% de ovário no estágio I – II e 26,6% no estágio II, respectivamente após o primeiro repasto sanguíneo. E só desenvolveram o ovário até o estágio V após o segundo repasto sanguíneo. Esse resultado é semelhante ao observado por Barros *et al.* (2007) em fêmeas de *A. darlingi* e *A. albipennis* de populações de campo durante a estação chuvosa e seca no norte da bacia Amazônica. Os autores observaram que poucas fêmeas nulíparas estavam em estágios IV e V e que a maioria das fêmeas de *A. darlingi* e *A. albipennis* alimentadas com sangue tinham ovários em estágios II e somente duas fêmeas de *A. albipennis* e uma de *A. darlingi* apresentaram ovário totalmente desenvolvido em estágio V, na estação seca.

Em teoria as fêmeas nulíparas de anofelinos não desenvolvem ovários na fase II, sem realizar o 1º repasto sanguíneo (Detinova 1962) como sugerido por Mer (1936), onde o autor explica que a concordância gonotrófica é aplicável somente

para as fêmeas cujos ovários estão em fase II no momento do repasto sanguíneo. Mais Barros *et al.* (2007) encontrou no campo grande parte das fêmeas de *A. darlingi* e *A. albitalis* com estágio II de desenvolvimento ovariano realizando repasto sanguíneo. No entanto, as fêmeas de mosquitos podem fazer uso de outras fontes de energia, além de sangue para o desenvolvimento inicial de seus ovos (Forattini *et al.* 1993). Desta forma, fêmeas *A. darlingi* alimentadas exclusivamente com açúcar podem desenvolver seus ovários para a fase III (Charlwood 1980), mas raramente para estágios III e V (Lounibos *et al.* 1998). Além disso, nos estudos em laboratório com fêmeas de *A. gambiae* foram observados que as pequenas fêmeas não grávidas realizaram repasto sanguíneo por três dias consecutivos e que a quantidade de sangue ingerido foi relativamente menor afetando por sua vez na ovogênese. Então, embora as fêmeas tivessem realizados três repastos sanguíneos, a fecundidade apareceu reduzida (Fernandes e Brielgel 2005). E em nosso estudo as fêmeas nulíparas de *A. darlingi* da primeira geração não realizaram cópula portanto tratavam-se de fêmeas não grávidas e precisaram realizar dois ou mais repastos sanguíneos antes de completar o primeiro ciclo gonotrófico. No entanto, a relação entre o tamanho das fêmeas e a quantidade de sangue ingerido por fêmea deve ser investigado.

4.1.2 Múltiplos repastos sanguíneos com e sem indução a oviposição

Vários repastos sanguíneos foram oferecidos a 200 fêmeas nulíparas de *A. darlingi* oriundas das amostras da Comunidade Inája em Coari - Amazonas, em intervalos de 24h. O número de dias decorrido correspondeu à quantidade de repastos sanguíneos consumidos pelos mosquitos. O 2º e 3º repastos sanguíneos foram determinados pela transferência dos mosquitos para um novo copo e promovendo o acesso ao sangue a cada 24h.

Foi observado 80% das fêmeas nulíparas de *A. darlingi* não grávidas sem papel filtro umedecido com água oriundas das amostras da Comunidade Inája em Coari - Amazonas tiveram dois repastos sanguíneos dentro de 24h, e até 69% delas se alimentaram três vezes em três dias consecutivos (Fig. 6).

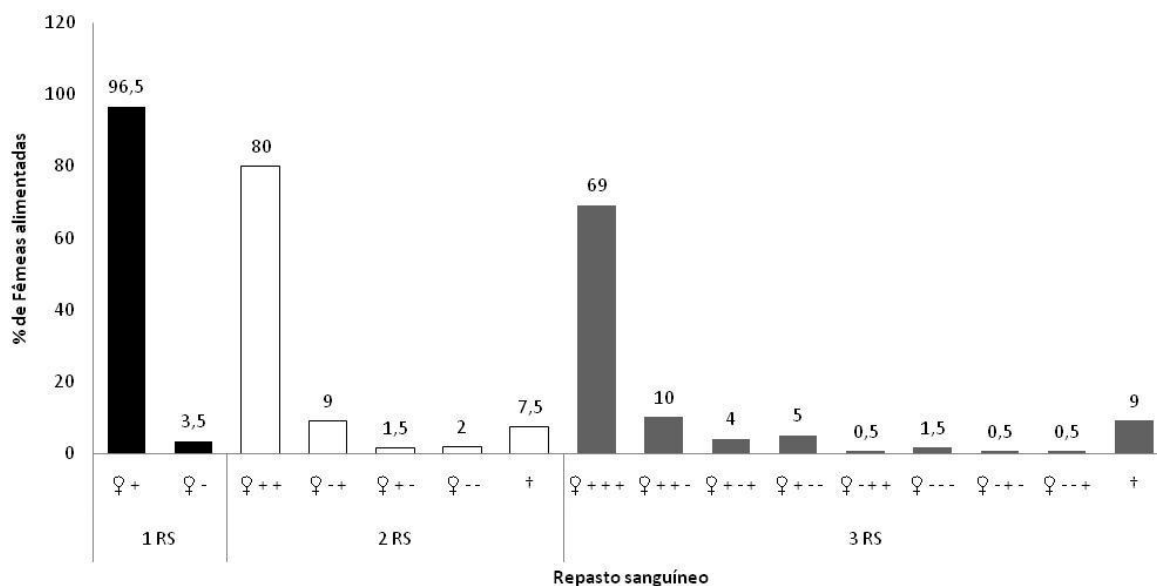


Figura 6. Múltiplos repastos sanguíneos das fêmeas nulíparas de *A. darlingi* sem papel filtro umedecido com água oriundas das amostras de Coari - Amazonas. (+) fêmeas alimentadas; (-) fêmeas não alimentadas; (†) fêmeas mortas. 1RS – primeiro repasto sanguíneo; 2RS – segundo repasto sanguíneo; 3RS – terceiro repasto sanguíneo.

Resultado semelhante foi observado em fêmeas nulíparas de *A. darlingi* com a presença de papel umedecido com água oriundas das amostras da Comunidade Inája em Coari – Amazonas apresentando 78% de fêmeas que tiveram dois repastos sanguíneos dentro de 24h e 75% delas se alimentaram três vezes em três dias consecutivos e 43,5% se alimentaram continuamente por quase uma semana. Mesmo após o sexto repasto sanguíneo foram observados 49% de mortalidade das fêmeas (Figura 7).

O ciclo gonotrófico inicia com a busca por um hospedeiro e em seguida pelo repasto de sanguíneo e posteriormente com a digestão, a maturação dos ovários e oviposição (Klowden e Briegel, 1994, Nirmala *et al.*, 2005). Mosquitos anautógenos, por exemplo, *A. Gambiae* e *A. darlingi*, requerem pelo menos um repasto sanguíneo para dar início ao primeiro ciclo gonotrófico. No entanto, estudos anteriores, realizados com colônias de laboratório e com mosquitos capturados em campo, mostraram que algumas espécies de anofelinos, realizam vários repastos sanguíneos durante cada ciclo gonotrófico (Boreham e Garrett-Jones, 1973; Burkot

et al., 1988; Klowden e Briegel, 1994; Fernandes e Briegel, 2004). Uma possível explicação para isto seria a utilização destes vários repastos sanguíneos como fonte energética além da maturação dos ovos (Fernandes e Briegel 2004).

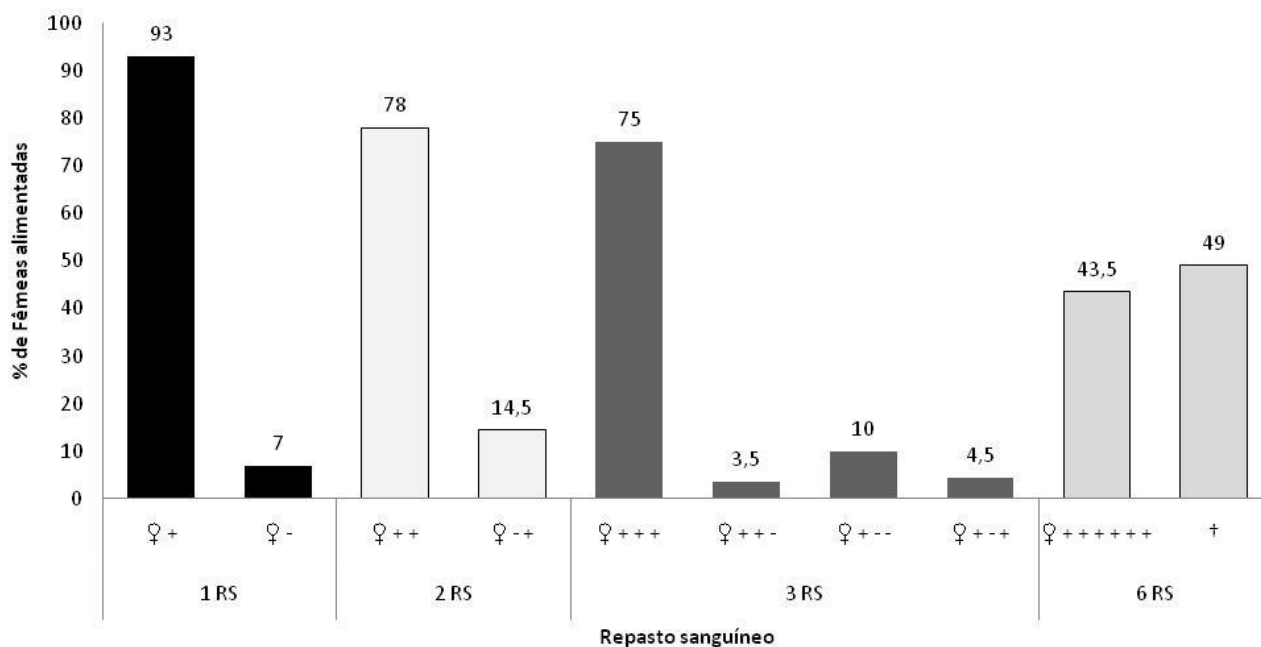


Figura 7. Múltiplos repastos sanguíneos das fêmeas nulíparas de *A. darlingi* com papel filtro umedecido com água para indução da oviposição oriundas das amostras de Coari - Amazonas. (+) fêmeas alimentadas; (-) fêmeas não alimentadas; (†): fêmeas mortas. 1RS – primeiro repasto sanguíneo; 2RS – segundo repasto sanguíneo; 3RS – terceiro repasto sanguíneo; 6RS – sexto repasto sanguíneo.

Fêmeas nulíparas de *A. darlingi* não grávidas da primeira geração com e sem a presença de papel filtro umedecido com água oriundas das amostras da Comunidade Inája em Coari – Amazonas realizaram três repastos sanguíneos em dias consecutivos. Resultado semelhante foi observado em laboratório por Fernandes e Briegel (2005) em fêmeas de *A. gambiae* após a eclosão. Amerasinghe e Amerasinghe (1999) encontraram 34% das fêmeas de *Anopheles culicifacies* coletadas do campo estavam alimentadas com sangue. E destas fêmeas 93% tinham realizados dois repastos sanguíneos e 7% realizaram três repastos. Significativamente 54% das fêmeas de *A. culicifacies* alimentavam-se várias noites diferentes e 46% na mesma noite. Entretanto, para Nirmala et al. (2005) os mosquitos que realizam um segundo repasto sanguíneo podem corresponder a uma pequena parcela da população que não foi bem sucedida em ingurgitamento completo durante o primeiro repasto. Assim sendo, um segundo repasto é

necessário para adquirir mais nutrientes para completar a ovogênese. Os autores no entanto descreveram que em condições de laboratório a maioria dos mosquitos procura sangue a cada 24 horas, mesmo quando totalmente ingurgitadas após o primeiro repasto sanguíneo. O mesmo foi observado em fêmeas nulíparas *A. darlingi* não gravidas com e sem a presença de papel filtro umedecido com água oriundas das amostras da Comunidade Inája em Coari – Amazonas (Fig. 6 e 7).

4.2 Determinação do número de ovos após o repasto sanguíneo em diferentes hospedeiros vertebrados

Anopheles darlingi é o anofelino mais antropofílico e de comportamento endófilo mais acentuado. Costuma atacar o homem, dentro e fora das casas, nas baixas e altas horas da noite, principalmente em áreas onde as habitações são borrifadas com inseticidas, em elevada densidade. Mas existem áreas no país, que correspondem à minoria, onde *A. darlingi* pode ser preferentemente exófago (Guedes *et al.* 1953; Forattini 1987; Lourenço-de-Oliveira, 1989). No entanto, apesar do comportamento antropofílico do mosquito, nas áreas rurais da Amazônia pode atacar mamíferos de grande porte quando estes pernoitam no peridomicílio, mas o faz em número comparativamente menor que em relação ao homem (Deane *et al.* 1949; Oliveira-Ferreira *et al.* 1992).

O sangue dos vertebrados constitui uma fonte rica em aminoácidos para os mosquitos. Fêmeas de mosquitos anautógenos necessitam da ingestão dessas proteínas, encontradas no sangue de vertebrados para produção de ovos (Forattini, 1992). A produção de ovos nos mosquitos constitui um fenômeno cíclico que necessita a ingestão de pelo menos dez aminoácidos essenciais (arginina, isoleucina, leucina, lisina, fenilalanina, treonina, triptofano, valina, histidina e metionina) na sua dieta. Em algumas espécies de mosquitos o tipo de sangue ingerido pode influenciar no tamanho da postura (Clements 1963; Consoli *et al.* 1981). Mas, de modo geral, nos culicídeos em condições naturais, o tamanho da postura das fêmeas de mosquitos oscila de 50 a 500 ovos (Forattini 2002).

Rotineiramente para manutenção de colônias de *A. aquasalis* em laboratório são oferecidas às fêmeas sangue de vertebrados mamíferos geralmente de camundongos *Mus musculus* Linnaeus. Os procedimentos de manutenção de colônia dessa espécie em laboratório já são bem estabelecidos e possibilita os

estudos com as mesmas (Silva *et al.* 2006). Assim, a colonização de *A. darlingi* ainda não existe e muitos aspectos biológico da espécie ficam sem respostas. Então com o intuito de colaborar com os estudos da principal espécie vetora de malária no Brasil neste trabalho foi quantificada a produção de ovos de fêmeas nulíparas de *A. darlingi* da primeira geração emergidas em laboratório oriundas do Ramal do Brasileirinho-Km 7 no Sítio Raifran e Ramal do Puraquequara - Km 9 em Manaus – Amazonas após o repasto sanguíneo em hamster e pato. Os resultados das médias e erro padrão da produção de ovos após o repasto sanguíneo nos hospedeiros vertebrados estão representados na figura 8.

Verifica-se que após o repasto sanguíneo em hamster foram produzidos em média $54,62 \pm 5,53$ ovos por fêmea, e após o repasto sanguíneo em pato a média obtida foi de $34,54 \pm 5,84$.

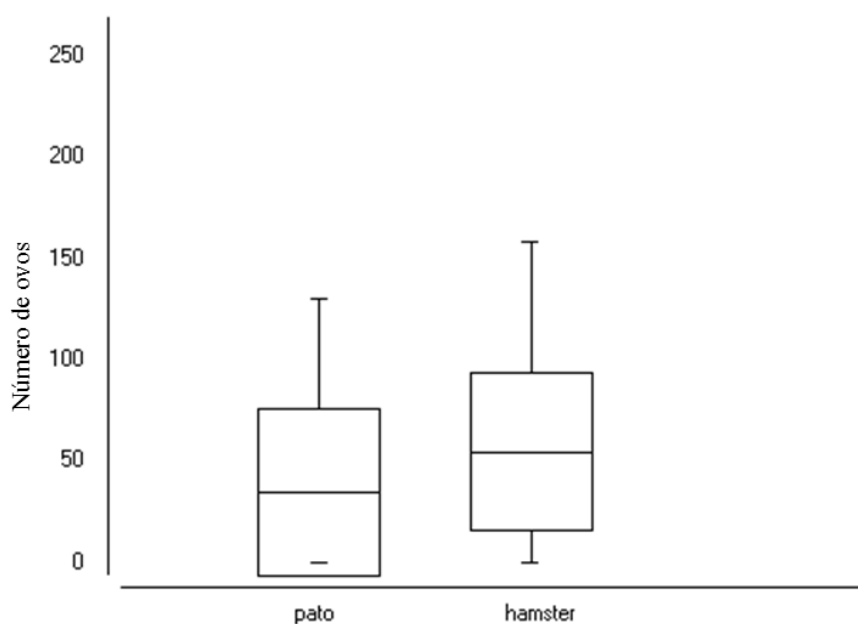


Figura 8. Representação gráfica das médias obtidas de fêmeas nulíparas de *A. darlingi* da primeira geração oriundas das amostras do Ramal do Brasileirinho-Km 7 no Sítio Raifran e Ramal do Puraquequara - Km 9 em Manaus – Amazonas após o repasto sanguíneo em pato ($34,54 \pm 5,84$) e hamster ($54,62 \pm 5,53$).

Na comparação das magnitudes das produções de ovos em hamster e pato a análise de variância (ANOVA) mostrou valor de $F = 6,2189$ e valor $p > 0,0137$, para 1 grau de liberdade. O valor de P não foi significativo entre as produção de ovo em hamster e pato.

Tabela 5. Análise de variância (ANOVA) das fêmeas nulíparas *A. darlingi* da primeira geração oriundas das amostras do Ramal do Brasileirinho-Km 7 no Sítio Raifran e Ramal do Puraquequara - Km 9 em Manaus – Amazonas após o repasto sanguíneo em pato e hamster.

Hospedeiro	Média de ovos	F	SQ	QM	(p)
Pato	34,54	6,2189	10,1 e+03	10,1 e+03	0,0137
Hamster	54,62		15,9 e+04	16,2 e+02	

Apesar do $p > 0,0137$ não ser significativo para simples confirmação dos dados foi realizado a comparação entre as médias aplicando o teste de *Tukey*. Os dados estão representados na tabela 8 e verifica-se que o valor de $p < 0,05$ não foi significativo entre hamster e pato. Portanto não foi encontrada diferença estatística entre as duas formas de alimentação de sangue por fêmeas nulíparas de *A. darlingi* da primeira geração oriundas das amostras do Ramal do Brasileirinho-Km 7 no Sítio Raifran e Ramal do Puraquequara - Km 9 em Manaus – Amazonas .

Tabela 6. Teste de Tukey das fêmeas nulíparas *A. darlingi* da primeira geração oriundas das amostras do Ramal do Brasileirinho-Km 7 no Sítio Raifran e Ramal do Puraquequara - Km 9 em Manaus – Amazonas após o repasto sanguíneo em pato e hamster.

Tukey:	Diferença	Q	P
Hamster/pato	20.0800	3.5267	< 0,05

Os resultados, médias e erro padrão das 50 posturas das fêmeas de *A. darlingi* estudadas com alimentação de sangue de pato e hamster, estão apresentados nas tabelas 9 e 10, enquanto a figura 9 consta da representação gráfica das frequências. Para interpretação dos resultados obtidos, as posturas foram agrupadas com intervalo de classe de 10 ovos. Nos resultados para a distribuição dos dados com alimentação de sangue de pato as frequências das posturas situam-se entre 21 a 70 ovos com 5 classes, concentrando 32% do total de 1.727 ovos estudados (Tabela 9).

Tabela 9. Média, erro padrão e distribuição das frequências de ovos por postura de fêmeas nulíparas de *A. darlingi* oriundas das amostras do Ramal do Brasileirinho-Km 7 no Sítio Raifran e Ramal do Puraquequara - Km 9 em Manaus – Amazonas alimentadas com sangue pato.

Sangue	Total de postura analisadas	Número de ovos estudados	Postura		Classe de ovos	Frequência	
			Mínima	Máxima		Número	(%)
Pato	50	1.727	0	130	0 - 10	24	48
					11 - 20	0	0
					21 - 30	4	8
					31 - 40	2	4
					41 - 50	6	12
					51 - 60	2	4
					61 - 70	2	4
					71 - 80	1	2
					81 - 90	1	2
					91 - 100	3	6
					101 - 110	1	2
					111 - 120	2	4
					121 - 130	2	4
					50	100	
				X±EP	34,54 ± 5,84		

Considerando os dados com a alimentação com sangue de hamster (tabela 10), foi observado 8 classes com frequência entre 31 a 110 ovos, concentrando 64% do total de 2.731 ovos. Observa-se uma diferença de resultados de frequência de ovos postos desses dois tipos de alimentação, o que também se estende para o Coeficiente de Variação-CV, dessas distribuições para pato = 119,76% e hamster = 71,63%, indicando que as posturas positivas são mais variáveis no pato que em hamster. Quanto a amplitude foi observada proximidade entre as duas alimentações pato e hamster com 130 ovos e 158 ovos, respectivamente.

Diferentes parâmetros do ciclo biológico foram estudados em populações de *A. darlingi* por Santos *et al.* (1981) e em *A. nuneztovari* por Scarpassa e Tadei (1990) e por Paraluppi (1978). Santos *et al.* (1981) estudando a frequência de ovos em 229 fêmeas nulíparas e/ou paridas de *A. darlingi* oriundas do campo alimentadas em *Gallus gallus* encontraram uma média de 110 ovos postos por fêmea e uma distribuição de frequência entre 10 a 246 ovos.

Tabela 10. Média, erro padrão e distribuição das frequências de ovos por postura de fêmeas nulíparas de *A. darlingi* oriundas das amostras do Ramal do Brasileirinho-Km 7 no Sítio Raifran e Ramal do Puraquequara - Km 9 em Manaus – Amazonas alimentadas com sangue de hamster.

Sangue	Total de postura analisadas	Número de ovos estudados	Postura		Classe de ovos	Frequência	
			Mínima	Máxima		Número	(%)
Hamster	50	2.731	0	158	0 - 10	11	22
					11 - 20	0	0
					21 - 30	2	4
					31 - 40	4	8
					41 - 50	5	10
					51 - 60	5	10
					61 - 70	8	16
					71 - 80	3	6
					81 - 90	2	4
					91 - 100	3	6
					101 - 110	4	8
					111 - 120	0	0
					121 - 130	1	2
					131 - 140	0	0
					141 - 150	0	0
					151-160	1	2
		50	100				
				X±EP	54,62 ±5,53		

Scarpassa e Tadei (1990) verificaram em 108 fêmeas de *A. nuneztovari* uma amplitude foi entre 61 a 180 ovos por fêmea, com uma média de ovos por postura igual a $128,83 \pm 4,85$ ovos. Paraluppi (1978) verificou em 33 posturas de *A. nuneztovari* uma amplitude entre 40 a 288, com número médio de ovos igual a $153,1 \pm 63,02$. Os dados aqui obtidos com fêmeas nulíparas de *A. darlingi* da primeira geração não grávidas oriundas das amostras do Ramal do Brasileirinho-Km 7 no Sítio Raifran e Ramal do Puraquequara - Km 9 em Manaus – Amazonas apresentaram médias de ovos por postura menores que as observadas por Santos *et al.* (1981), Scarpassa e Tadei (1990) e Paraluppi (1978), possivelmente essa diferença pode ter ocorrido devido ao tamanho da amostra e ao estado reprodutivo das fêmeas de *Anopheles* spp. utilizadas nos estudos.

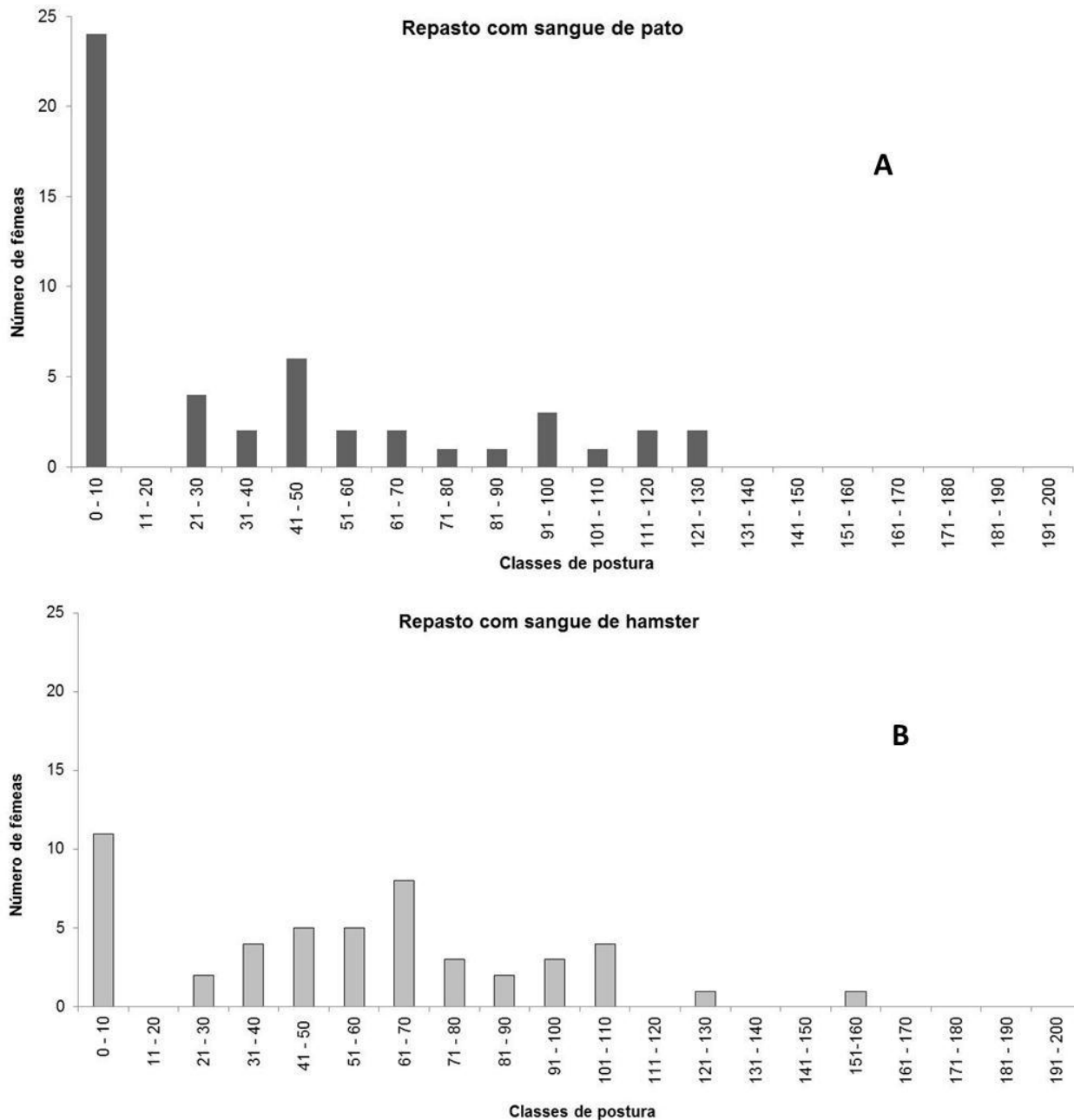


Figura 9. Frequência de ovos das fêmeas nulíparas de *A. darlingi* oriundas das amostras do Ramal do Brasileirinho-Km 7 no Sítio Raifran e Ramal do Puraquequara - Km 9 em Manaus – Amazonas alimentadas com: (A) sangue de pato e (B) sangue de hamster.

Além disso, essas fêmeas de *A. darlingi* precisam do estímulo dos hospedeiros, que produzem compostos voláteis que quando emanados provocam a atração dos mosquitos. E por sua vez os mosquitos conseguem detectar o calor e a umidade fazendo com que elas encontrem o hospedeiro específico. A detecção pelo mosquito desse hospedeiro potencial é percebida à medida que o inseto se aproxima da fonte alimentar (Cabrini e Andrade 2006). Ao contrário disso, as fêmeas de *A. darlingi* aqui estudadas tratavam-se de um número pequeno de fêmeas nulíparas e sem nenhum tipo de estímulos para cópula.

Apesar do sangue de pato e hamster não terem mostrado diferença estatística entre as posturas, o sangue do mamífero foi quem apresentou acentuado número de classe e amplitude na postura. Além disso, o sangue de hamster não foi suficiente para desenvolver 22% dos ovários até o estágio V enquanto para o sangue de pato esse valor aumentou para 48% (Tabela 9 e Figura 9 A). De fato naturalmente a preferência pela ingestão de sangue de mamíferos parece ter um valor nutricional para as fêmeas, e possivelmente influencia na frequência da postura, explicando a atração mais acentuada desses mosquitos para os humanos (Consoli e Lorenço-de-Oliveira 1994). Uma alta especificidade ao hospedeiro humano também é observada em *A. aegypti* e *A. gambiae* que são atraídos pelos odores emanados pelos humanos (Pates *et al.* 2001a; Pates *et al.* 2001b; Cabrini e Andrade 2006). Uma outra possibilidade que ainda precisa ser investigada é o volume de sangue ingerido de cada hospedeiro pelas fêmeas, onde pode também está determinando o número de ovos produzidos, além da composição diferente do sangue.

4.3 Morfologia do desenvolvimento ovariano

Não foram encontrados autofluorescência natural nas amostra controle da Microscopia Laser Confocal realizada com ovários de fêmeas nulíparas *A. darlingi* da primeira geração oriundas de criadouro natural da localidade da Estrada do Puraquequara - Indústria Portela com 36h após o repasto sanguíneo em hamster (Fig.10). As amostras que foram lavadas somente com PBS/BSA/Triton 0,02% e aplicado o filtro verde LP 505-530 nm apresentaram de cor totalmente negra conforme na figura 10 B e D. Quando nas amostras não se aplicava o laser, isto é em DIC, os ovários foram observados sem apresentar cor alguma (Fig.10 A e B)

4.3.1 Desenvolvimento ovariano antes do repasto sanguíneo

Antes do repasto sanguíneo, após a emergência, o abdome do mosquito apresenta-se longo e delgado (Sella, 1920; Charlwood *et al.* 1980; Foratini 2002). Durante este período, o folículo primário separa-se do germário, as células tornam-se diferenciadas e o ovócito passa a ter a capacidade de incorporar o vitelo (Foratini

1996). Nessa primeira fase, o ovário da maioria das fêmeas de mosquito é muito pequeno e com folículo contendo 8 células não diferenciadas (Mer 1936). Em fêmeas nulíparas de *A. darlingi* da primeira geração oriundas de criadouro natural da localidade da Estrada do Puraquequara - Indústria Portela não há folículo, somente germário com cistos ou fusomas ovarianos (um cisto = um conjunto de rosetas). Como a mitose não é completa existe ausência de citodierese, a região central da roseta é chamada fusoma. Um exemplo disso está na figura 11 D em *A. darlingi* alimentadas com sacarose, após 24h de emergência. Neste intervalo notou-se ovário (OV) compactado, com muitas traquéias (TR) e ramificações traqueolares (RTE) e uma ampola ovariana (AOV) bem desenvolvida com 248 μm de largura e 148 μm de comprimento (Fig. 11 A e B). As rosetas são pequenas medindo em torno de 31,4 μm com núcleos próximos (Fig. 11 C D). Essas rosetas são em número de sete células, localizadas centralmente (Fig. 11 C) e são delimitadas por um epitélio folicular (EPF) (Fig. 11 D). Não foi possível distinguir o ovócito (OO). O ovário de *A. darlingi*, nessas primeiras horas de vida, apresentou semelhança com o estágio I descrito por Adham *et al.* (2009) e com a fase G descrita por Clements e Boocock (1984). O tamanho e o número das células nutridoras também foram similares ao descrito por Fill (1976) em *A. gambiae*. Ultraestruturalmente em ovários de fêmeas de *Culex quiquefasciatus* Say pré-ingurgitadas revelam folículos formados por um conjunto de células não diferenciadas, exibindo proeminentes nucléolos (Cardoso *et al.* 2010), essa descrição é muito similar com o folículo de *A. darlingi* (Fig. 11 C).

Em fêmeas de *Culex pipiens quinquefasciatus* Say, 48h após a emergência, o ovócito apresenta citoplasma granular e está delimitado por células epiteliais diferenciando-se das células nutridoras (Adham *et al.* 2009). Em *A. darlingi* nesse intervalo não foi possível observar o núcleo do ovócito apenas são notados os núcleos das células nutridoras e os núcleos do epitélio (Fig. 11 E F). Notou-se apenas um aumento do tamanho das células nutridoras e dos núcleos (NCN) medindo em torno de 54,5 e 11,6 μm , respectivamente (Fig. 11 E F). O conjunto de células nutridoras continua circundado pelo epitélio folicular e separado do germário. O surgimento dos folículos ovarianos em *A. darlingi*, deveriam se observados após 48h (Figura 11 E). Nesta figura as células nutridoras estão perfeitamente discerníveis. Provavelmente não se observou o folículo inteiro devido ao corte histológico não estar nivelado e nesta fase o ovócito é muito pequeno. Acredito que

até 24h os mosquitos *A. darlingi* só apresentam germário, e que após 48h já apresentam folículos ovarianos primordiais. Vários estudos observaram que em *A. aegypti* antes do repasto sanguíneo, a diferenciação do ovócito foi iniciado e tornou-se distinguível das outras células, devido à seu menor núcleo com nucléolo proeminente e a presença de inclusões lipídicas em seu citoplasma (Roth e Porter 1964, Raikhel e Lea 1983, Clements e Boocock 1984). Diferenciação notada no folículo de *A. darlingi* após 72h de emergência. E em *C. quinquefasciatus* essa diferenciação inicial não ocorreu e os folículos ovarianos consistiam de um conjunto de oito células não diferenciadas (Cardoso *et al.* 2010).

Após 72h, fêmeas de *A. darlingi*, alimentadas com sacarose, apresentaram ovário externamente revestido por uma densa e compacta membrana ovariolar (MO) (Fig. 12 C). É possível notar a presença do folículo primário (F1) oval com tamanho aumentado em torno de 64,6 μm (Fig. 12 A) e do folículo secundário (F2) com pequenas células nutridoras diferenciando-se do germário (Fig. 12 A B). O ovócito (OO) do folículo primário (F1) é diferenciado tem citoplasma granular com pequenos grânulos (GL) próximo ao núcleo (NOO) centralizado (Fig. 12 B). As células nutridoras são grandes (12,4 μm) de citoplasma não granular e localizada na porção apical do folículo (Fig. 12 B). Essas descrições concordam com os trabalhos de Christophers (1911), Bertram (1962), Ahmed (1983), Clements e Boocock (1984) e Adham *et al.* (2009), onde os folículos de outras espécies de mosquitos, porém nesta fase os autores relatam a presença de pequenas gotículas lipídicas no citoplasma. Em *A. darlingi* esse grânulo ou vesícula precisa se investigada pois também pode ser estruturas chamadas “núcleos acessórios”. Os núcleos acessórios são produzidos das vesículas germinativas de núcleos de ovócitos jovens pré- vitelogênicos, e são transportados para a periferia do ovócito. Não se sabe a função exata destas estruturas, mas por serem RNA positivos, acredita-se que desempenhem função homóloga a dos micronúcleolos de alguns vertebrados basais. A designação “ovo” é somente utilizada após o ovócito ser fecundado.

Figura 10. Amostras Controle: Ovários de fêmeas nulíparas de *A. darlingi* da não grávidas primeira geração oriundas de criadouro natural da localidade da Estrada do Puraquequara - Indústria Portela, verificação natural da autofluorescência.

Microscopia laser confocal:

- A. Folículo primário (F1) aumento 20X, 36h após o repasto sanguíneo observação aplicando o DIC, sem laser;
- B. Folículo primário aumento 20X, 36h após o repasto sanguíneo observação aplicando o laser verde / ArgonLP 505-530 nm;
- C. Folículo primário aumento 40X, 36h após o repasto sanguíneo observação aplicando o DIC, sem laser;
- D. Folículo primário aumento 40X, 36h após o repasto sanguíneo observação aplicando o laser verde / ArgonLP 505-530 nm.

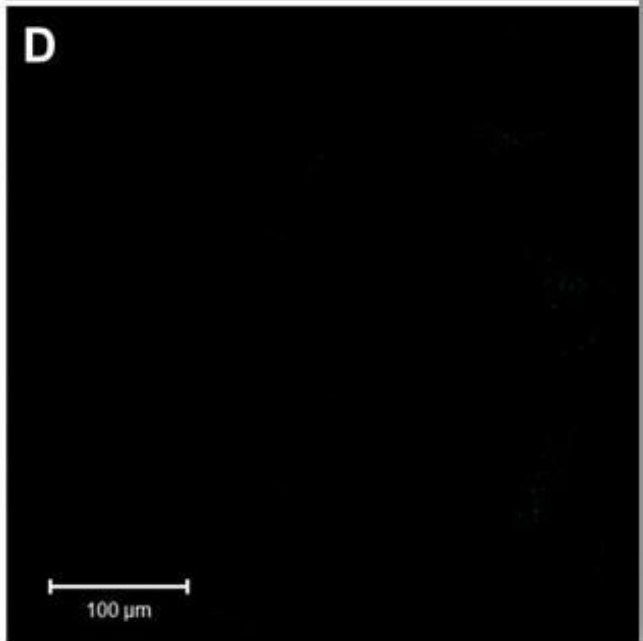
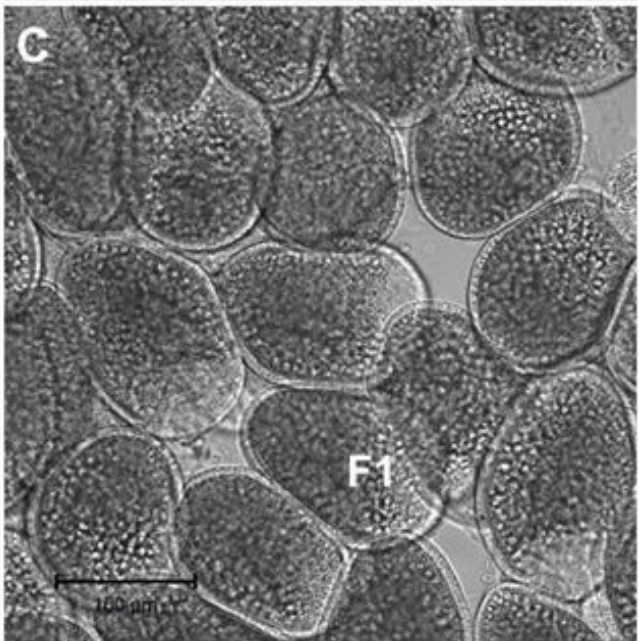
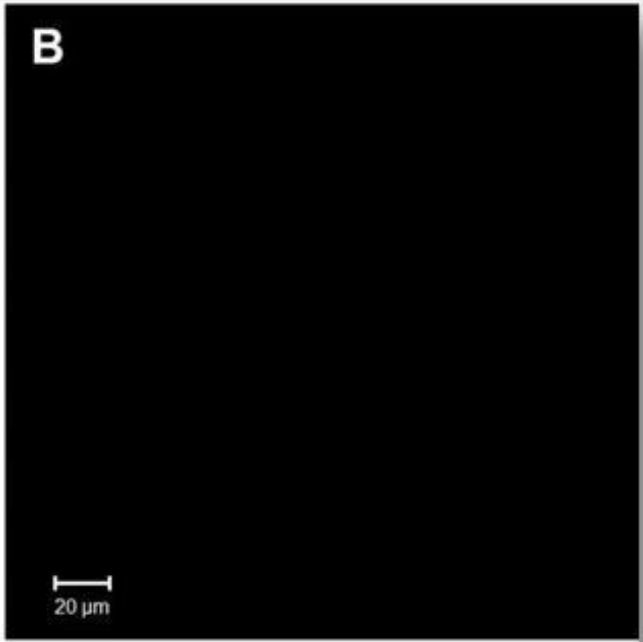
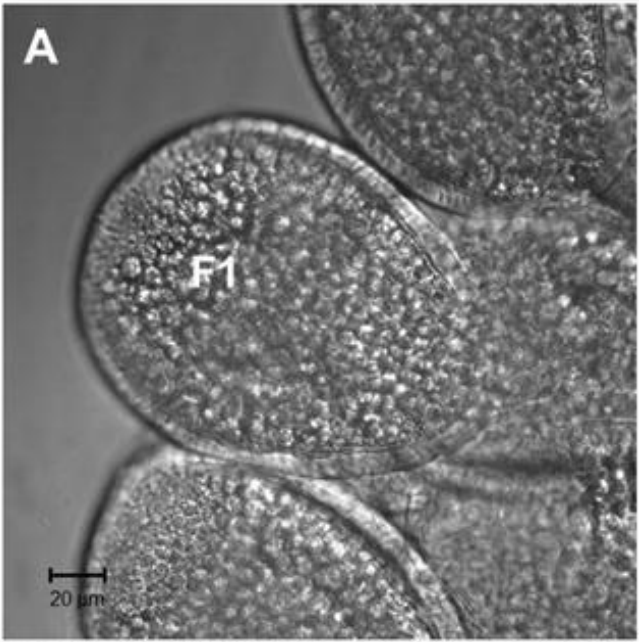


Figura 11. Ovários de fêmeas nulíparas *A. darlingi* não grávidas da primeira geração oriundas de criadouro natural da localidade da Estrada do Puraquequara - Indústria Portela após 24h e 48h do repasto com solução de sacarose 10% .

Microscopia laser confocal:

- A. Ovário de fêmea após 24h de alimentação com solução de sacarose 10%, aumento 20x, tratado com FITC laser verde/Argon LP 505-530 nm e DAPI;
- B. Ovário de fêmea após 24h de alimentação com solução de sacarose 10%, aumento 20x, tratado com FITC laser verde/Argon LP 505-530 nm e DAPI;

Microscopia de luz:

- C. Ovário de fêmeas após 24h de alimentação com solução de sacarose 10%, aumento 63x;
- D. Ovário de fêmeas após 24h de alimentação com solução de sacarose 10%, aumento 63x;
- E. Folículos de fêmeas após 48h de alimentação com solução de sacarose 10%, aumento 63x;

Microscopia laser confocal:

- F. Núcleo das células nutridoras e Núcleo do epitélio folicular dos ovários das após 48h de alimentação com solução de sacarose 10%, aumento 20x, tratado com DAPI.

AOV - ampola ovariana; **CN** – células nutridoras; **EPF** – epitélio folicular; **G** – germário; **MO** – membrana ovariana; **MOR** – membrana ovariolar; **NCN** – núcleo das células nutridoras; **NEP** – núcleo do epitélio folicular; **NOO** – núcleo do ovócito; **OV**-ovário; **OVL** – oviduto lateral; **TR** – Traquéias; **TRE** – Traqueolas.

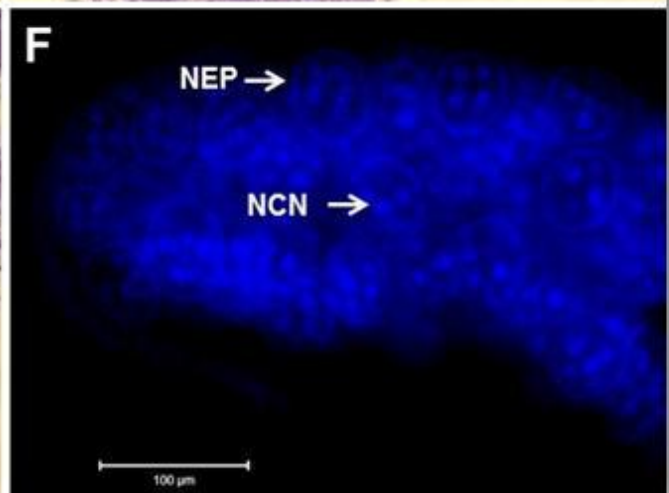
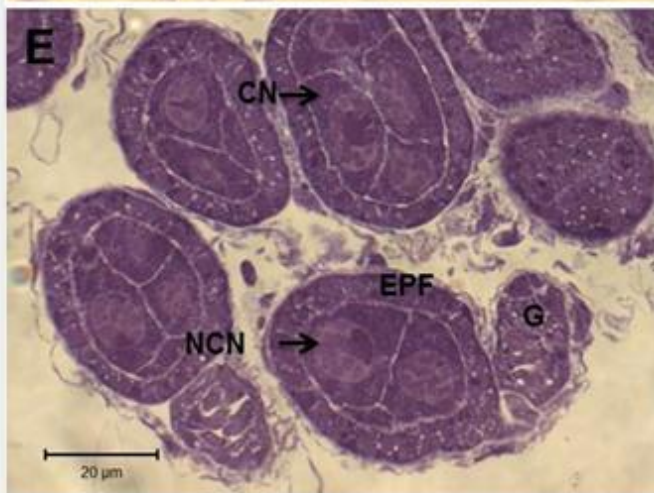
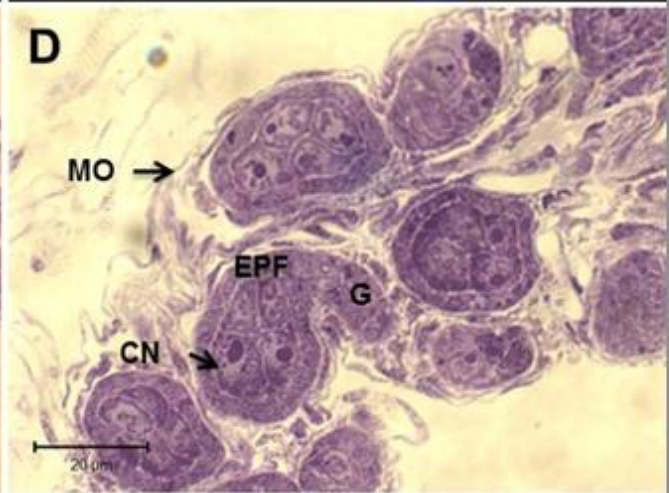
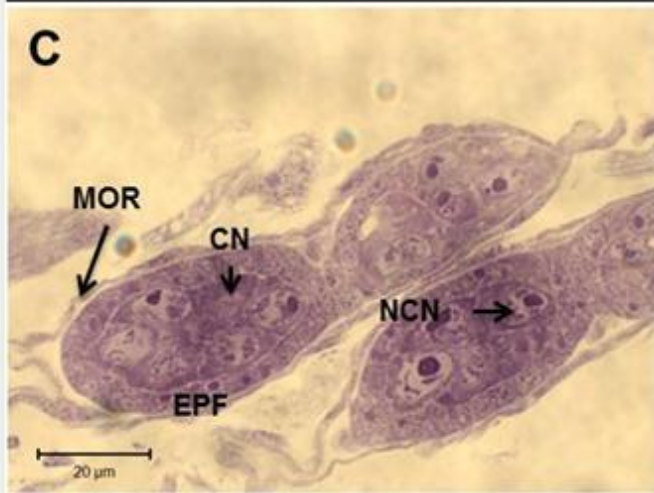
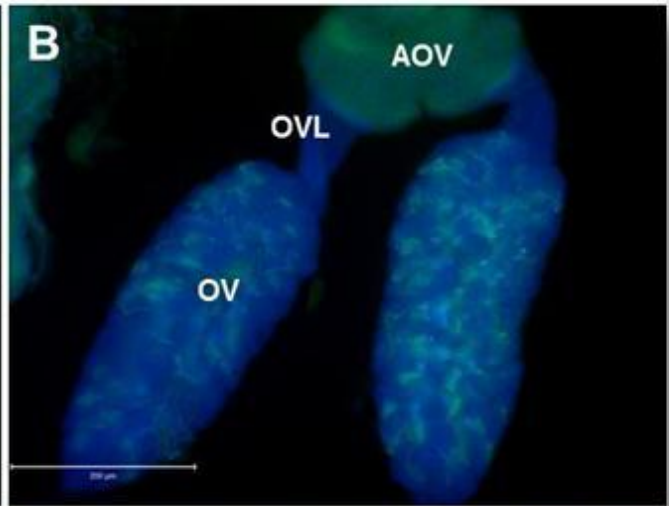
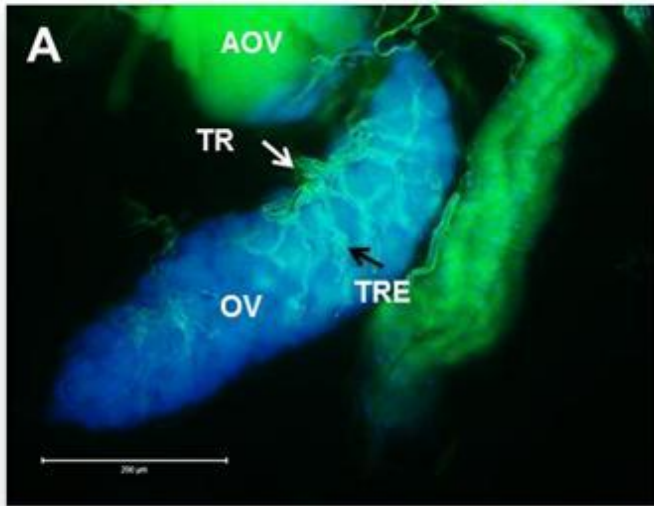


Figura 12. Ovário de fêmeas nulíparas de *A. darlingi* não grávidas da primeira geração oriundas de criadouro natural da localidade da Estrada do Puraquequara - Indústria Portela após 72h do repasto de sacarose 10%.

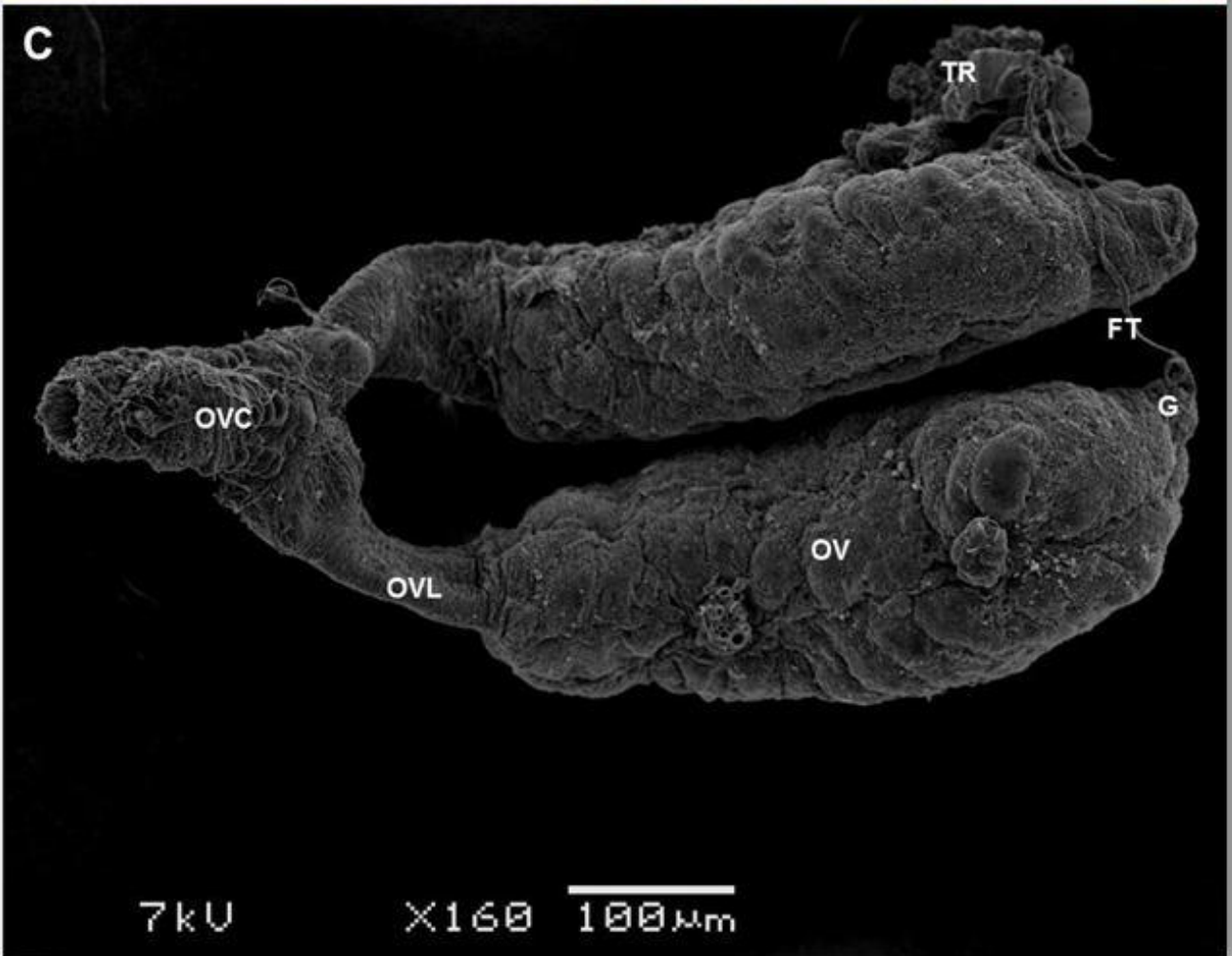
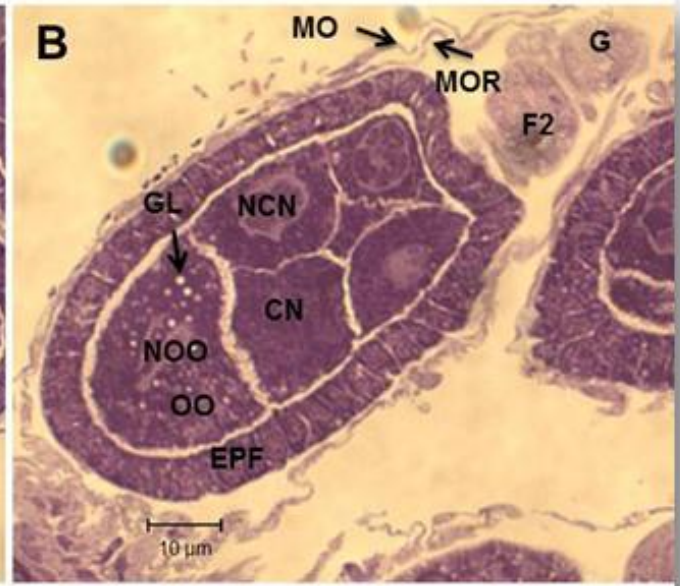
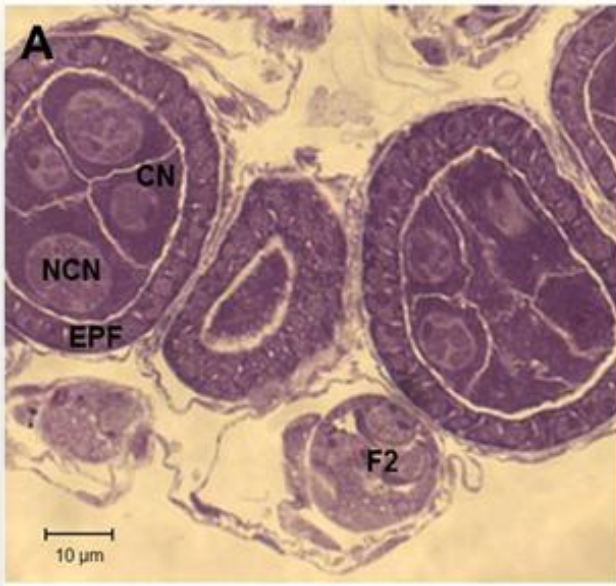
Microscopia de luz:

- A. Folículo primário e folículo secundário, aumento 63x
- B. Folículo primário e folículo secundário, aumento 63x;

Microscopia de varredura:

- C. Ovário.

CN – células nutridoras; **EPF** – epitélio folicular; **F2** – Folículo secundário; **FT** – filamento terminal; **G** – germário; **GL** – grânulos; **MO** – membrana ovariana; **MOR** – membrana ovariolar; **NCN** – núcleo das células nutridoras; **NEP** – núcleo do epitélio folicular; **NOO** – núcleo do ovócito; **OV**- ovário; **OVC** - oviduto comum; **OVL** – oviduto lateral; **TR** – Traquéias; **TRE** – T **G** – germário; raqueolas.



4.3.2 Desenvolvimento ovariano após o repasto sanguíneo

O primeiro ciclo gonotrófico em anofelinos geralmente é completado após a ingestão de um ou múltiplos repastos sanguíneos (Gillies 1954, Charlwood e Wilkes 1979, Chadee 1992). Em *A. darlingi* foi necessário oferecer até três repastos de sangue de hamster para iniciar o desenvolvimento ovariano de algumas fêmeas. As fêmeas com ovários não correspondentes ao estágio de Christophers foram descartadas.

Segundo Raikhel (2004) após o repasto sanguíneo, o ovócito acumula maciças quantidades de proteínas precursoras de vitelo (PPV) e as estocam em vesículas no citoplasma do ovócito. As estocagens das proteínas em *A. darlingi* foram observadas a partir de 3h. Externamente o ovário de *A. darlingi* entre 3, 6 e 12h após o repasto sanguíneo, é um pouco compactado com a membrana ovariana (MO) espessa (Fig. 13 A). O epitélio folicular do folículo primário apresenta células cúbicas com núcleos redondos e centralizados (Fig 13 C). As células nutridoras ocupam a maior parte do folículo e os tamanhos dos núcleos das células nutridoras (NCN) variaram entre 7,9 μ m e 11,6 μ m (3h), 9,3 μ m e 12,9 μ m (6h), 11,8 μ m e 17,1 μ m (12h) (Fig. 13 C E F). Nestas fases fica evidenciado o grande desenvolvimento das células nutridoras e das células do epitélio folicular, características descritas por Ronchi-Teles *et al.* (1988).

Vinte quatro horas após o repasto sanguíneo, o folículo primário torna-se ainda maior com ovócito preenchido por numerosos pequenos e grandes grânulos de vitelo (Fig. 14 C D) e os núcleos das células nutridoras são grandes localizados na porção central das células nutridoras (Fig. 14 C). A membrana ovariana forma uma rede de fios interligados sobre o folículo. O folículo secundário (F2) é pequeno, mas proeminente (Fig. 14 A B). Clements e Boocock (1984) ressaltaram que após 18h do repasto sanguíneo os folículos apresentaram ovócito com muitos grânulos de vitelo e Adham *et al.* (2009) comentam que a deposição de vitelo proporciona algumas mudanças estruturais internas e externas no folículo após 24h e 34h do repasto sanguíneo. Concordando também com Cardoso *et al.* (2010) que comentaram que a estocagem de vitelina e lipídios em 24h após o repasto de sangue os grânulos de vitelo ocupam maior parte do citoplasma.

No citoplasma do ovócito do folículo foi notada uma variação no tamanho das vesículas de vitelo estocadas em *A. darlingi*. Essa variação foi também observada por Laurence e Roshdy (1963) em ovário de outros mosquitos. Os autores caracterizaram as grandes partículas (macroesferas) como vesículas de proteínas e carboidratos e as pequenas (microesferas) como vesículas de lipídios. Adham *et al.* (2009) descreveram essas vesículas pelo tamanho e coloração onde as grandes vesículas correspondem as proteínas e são escuras e as pequenas vesículas, às lipídicas e são de cor clara transparente. Em *A. darlingi* a diferença entre as vesículas foi verificada pela intensidade da cor do FITC no citoplasma do ovócito, onde as vesículas de lipídios apresentaram brilho intenso e as vesículas de proteínas não apresentaram brilho. Atella *et al.* (2006) avaliaram que as vesículas de lipídios se movem para o centro do ovócito, e as vesículas de proteínas crescem até alcançar um tamanho ótimo, mas a distribuição do tamanho dentro do ovócito não é claro. Os autores, ainda especularam que uma vesícula pequena de proteína permite a mosquito de processar nutrientes mais rapidamente, acelerando o desenvolvimento ovariano.

A estocagem das proteínas precursoras de vitelo é finalizada entre 30 e 36h após o repasto sanguíneo e são notadas mudanças bruscas no folículo (Raikhel 2004). Essa fase ficou muito evidente em *A. darlingi*, após 36h do repasto sanguíneo, onde os folículos iniciaram mudanças na forma estreitando e alongando-se. As células nutridoras diminuíram em número e tamanho. O córion (C) é evidente revestindo todo o ovócito logo abaixo do epitélio. O folículo secundário parece ter cinco células nutridoras (Fig. 14 E F). No citoplasma do ovócito as vesículas grandes e sem brilho são mais numerosas (v1) do que e pequenas brilhantes (v2) (Fig. 15 A). As células do epitélio folicular possuem núcleos arredondados (Fig. 15 B). Em *A. aegypti* dados de ultraestrutura indicaram o declínio de produção de vitelo entre 30 e 40h após o repasto sanguíneo (Raikhel e Lea 1983). Em *C. quinquefasciatus* a redução na produção foi entre 48 e 72h (Cardoso *et al.* 2010).

No folículo de *A. darlingi* ocorre alongação e alcançando aparência de ovo após 48h do repasto sanguíneo (Fig. 15 E F). As células do epitélio folicular formam uma camada acima da dos gomos dos flutuadores (Fig. 15 D). Nessa fase observou-se a degeneração das células nutridoras (Fig. 15 F). A degeneração das células nutridoras no folículo primário caracteriza um ovócito maduro, porém não se trata de

um ovo pronto para postura (Clements e Boocock 1984; Adham *et al.*, 2009). Em *C. quinquefasciatus* o processo de degeneração das células nutridoras no folículo primário é iniciado após 60h e com 84h após o repasto sanguíneo as células estão completamente degeneradas (Cardoso *et al.*, 2010).

As estruturas externas necessárias para sobrevivência do futuro embrião, em *A. darlingi* ficaram mais evidentes após 60h (Fig. 16 A B C), porém o ovócito é maduro após 72h do repasto sanguíneo (Fig. 16 D E F e Fig 17). Em 60h notou-se uma diminuição na camada de epitélio folicular que envolve o ovo (Fig. 16 C). Nas figuras 16 E e 17 C E e F mostram o futuro ovo de *A. darlingi* com flutuador, a coroa e tímida micrópila após 72h do repasto sanguíneo. Externamente o ovário (Fig. A) ainda está revestido pela membrana ovariana que está no estiramento máximo (Fig. 17 D) juntamente com a membrana ovariolar (Fig 17 B). Esses resultados são similares com o estágio V segundo Christopher (1911), onde o ovócito alcança dimensões definitivas.

Figura 13. Ovário de fêmeas nulíparas de *A. darlingi* não grávidas primeira da geração oriundas de criadouro natural da localidade da Estrada do Puraquequara - Indústria Portela após 3h e 12h do repasto sanguíneo.

Microscopia de varredura:

A. Membrana ovariana e ovaríolar após 3h;

Microscopia de Luz:

B. Folículo primário após 3h, aumento 63x;

Microscopia laser confocal:

C. Folículo primário após 3h;

Microscopia de luz:

D. Ovaríolo após 6h, aumento 63x;

Microscopia de varredura

E. Membrana ovariana após 12h;

Microscopia de luz

F. Folículo primário após 12h, aumento 63x;

CN – células nutridoras; **EPF** – epitélio folicular; **F1**- Folículo primário; **F2** – Folículo secundário; **FO** – folículo; **G** – germário; **GM** – gomo do flutuador; **MO** – membrana ovariana; **MOR** – membrana ovaríolar; **NCN** – núcleo das células nutridoras; **NEP** – núcleo do epitélio folicular; **NOO** – núcleo do ovócito; **OO**–Ovócito; **V** – vitelo; **v1** – vesícula de proteína; **v2** – vesícula de lipídeo.

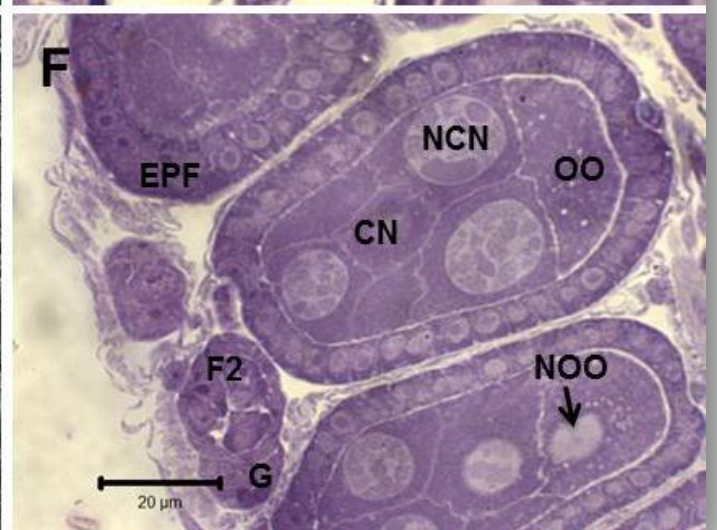
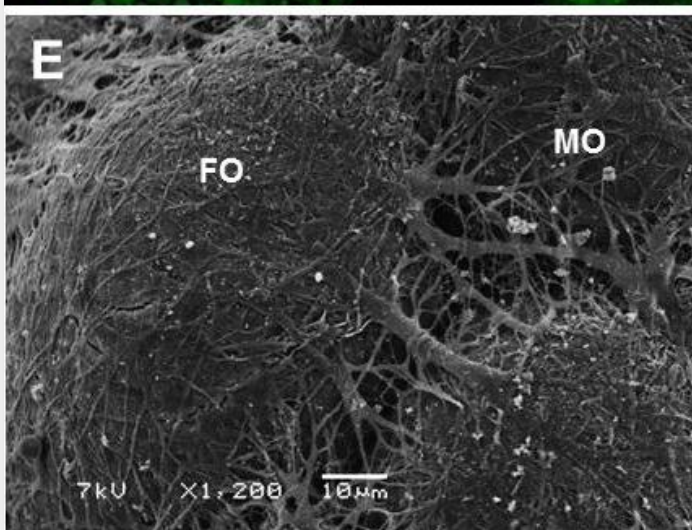
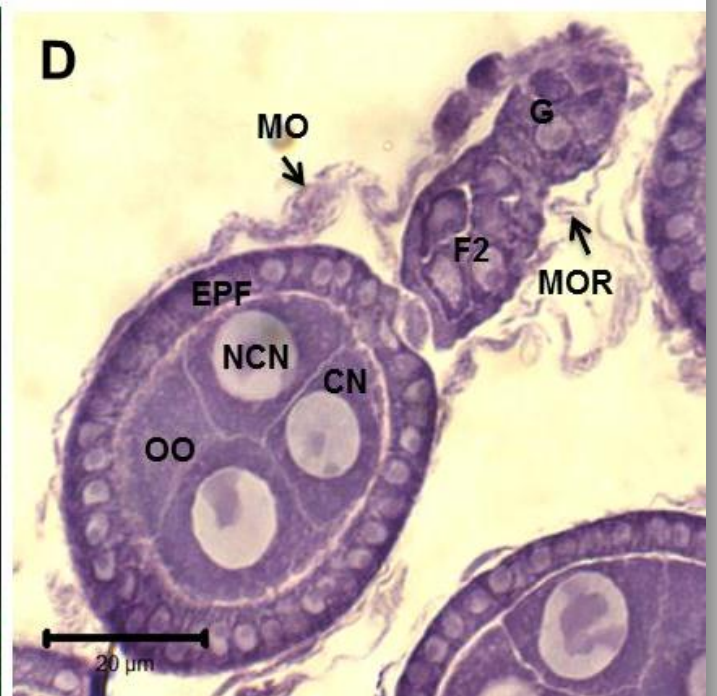
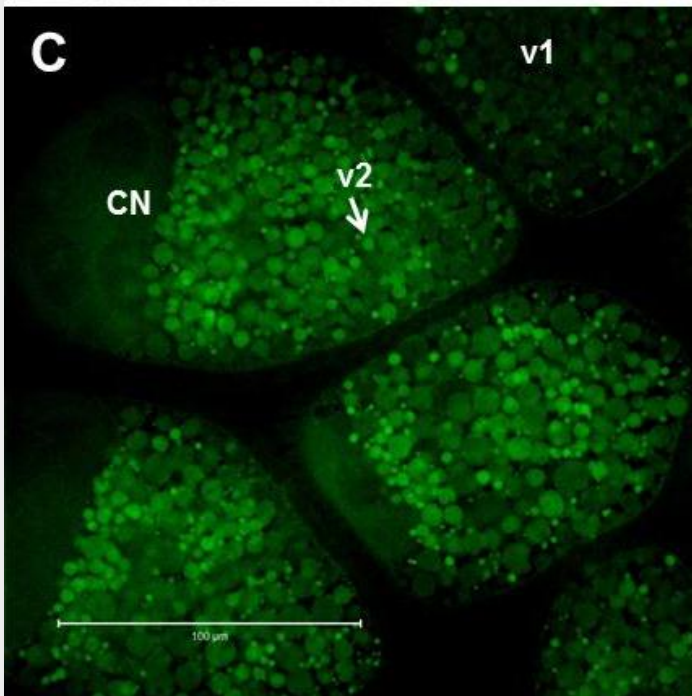
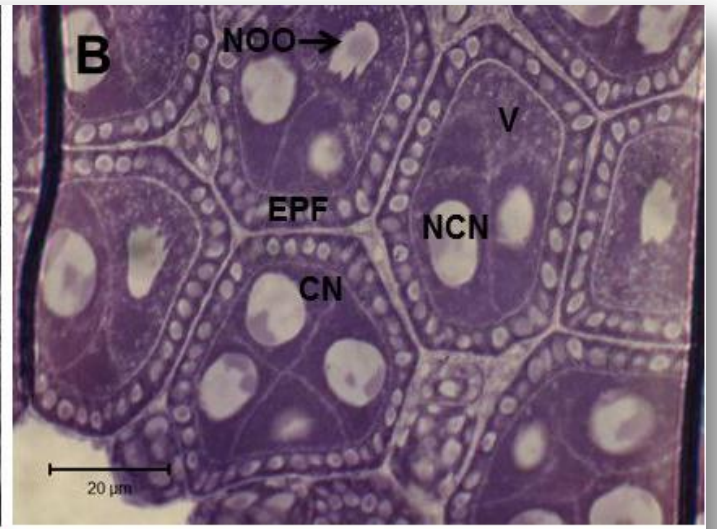
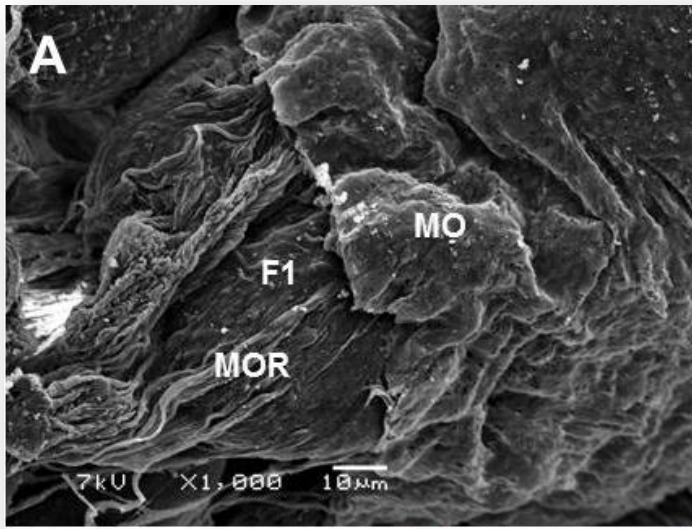


Figura 14. Ovário de fêmeas nulíparas de *A. darlingi* não grávidas da geração oriundas de criadouro natural da localidade da Estrada do Puraquequara - Indústria Portela após 24 e 36h do repasto sanguíneo.

Microscopia de varredura:

- A. Membrana ovariana e ovariolar após 24h;
- B. Folículos primários e secundários após 24h;

Microscopia de luz:

- C. Folículo primário após 24h;

Microscopia laser confocal:

- D. Vitelo após 24h, aumento 40x;

Microscopia de luz:

- E. Folículo após 36h, aumento 63x;
- F. Folículo após 36h, aumento 63x;

CN – células nutridoras; **ENC** – endocório; **EPF** – epitélio folicular; **F1**- Folículo primário; **F2** – Folículo secundário; **FO** – folículo; **G** – germário; **MO** – membrana ovariana; **MOR** – membrana ovariolar; **NCN** – núcleo das células nutridoras; **NEP** – núcleo do epitélio folicular; **NOO** – núcleo do ovócito; **OO**–Ovócito;**V** – vitelo; **v1** – vesícula de proteína; **v2** – vesícula de lipídeo.

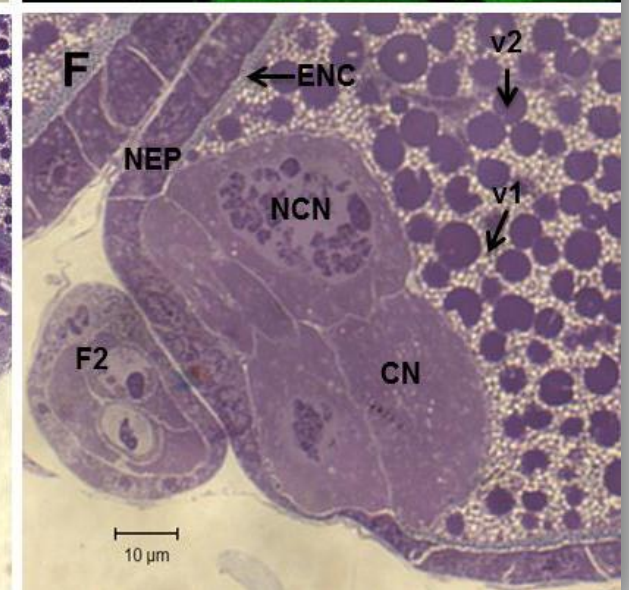
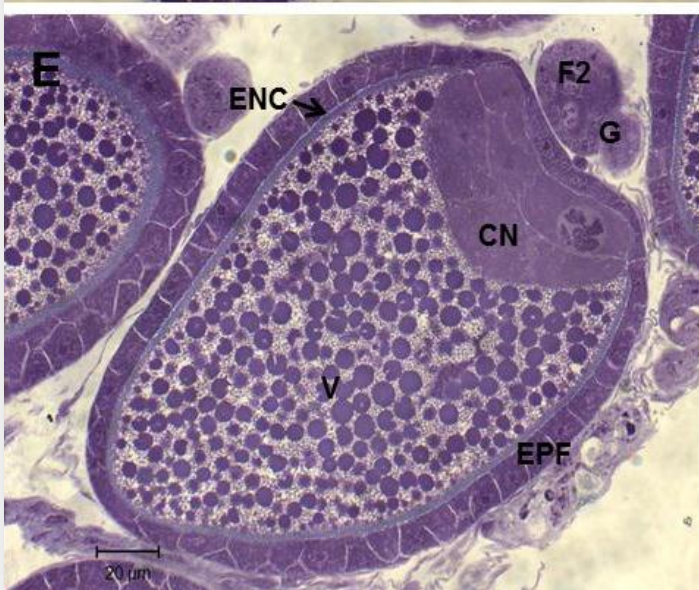
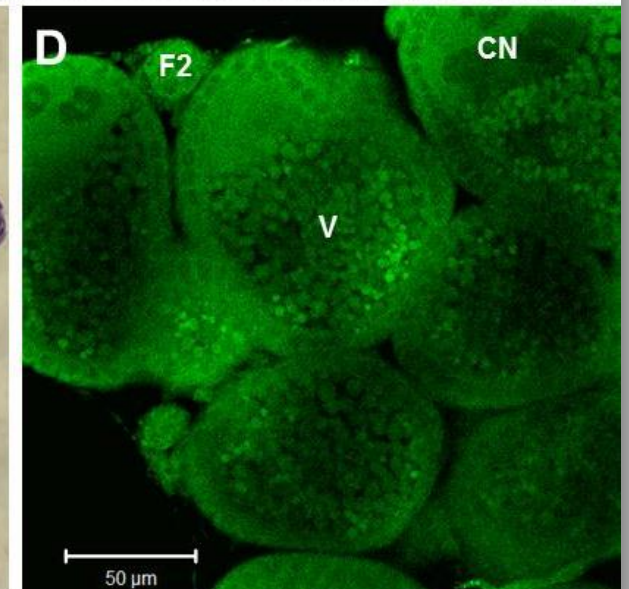
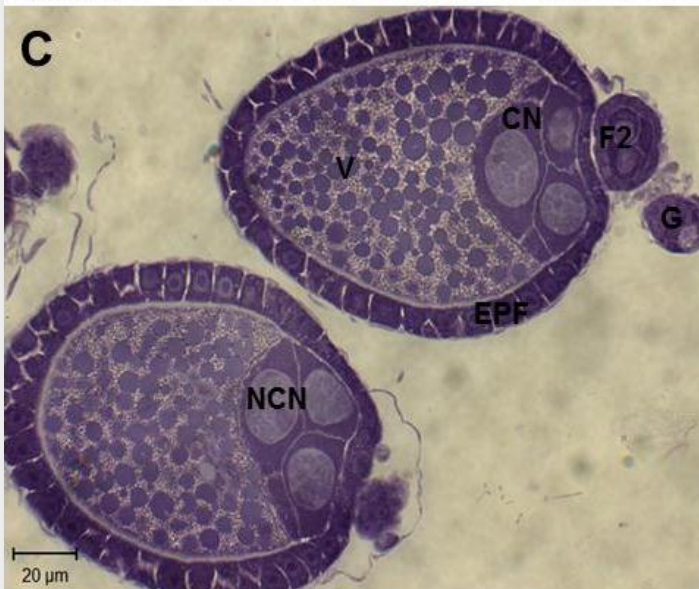
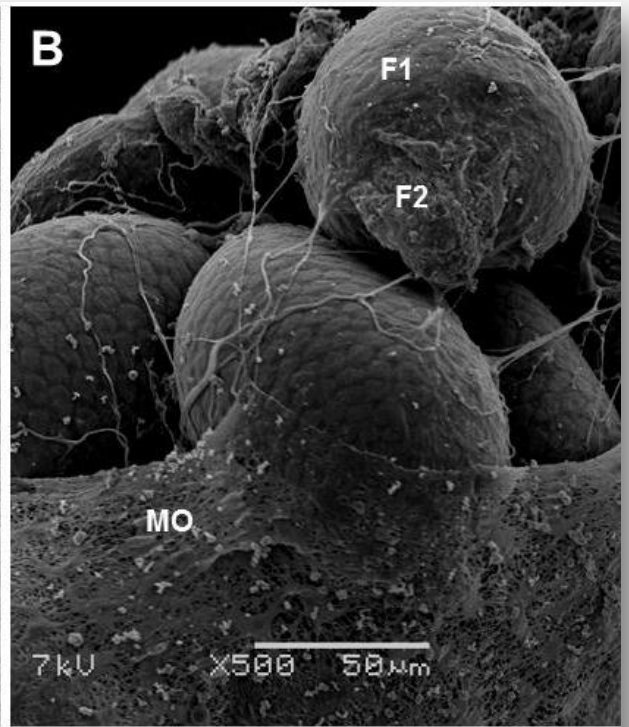
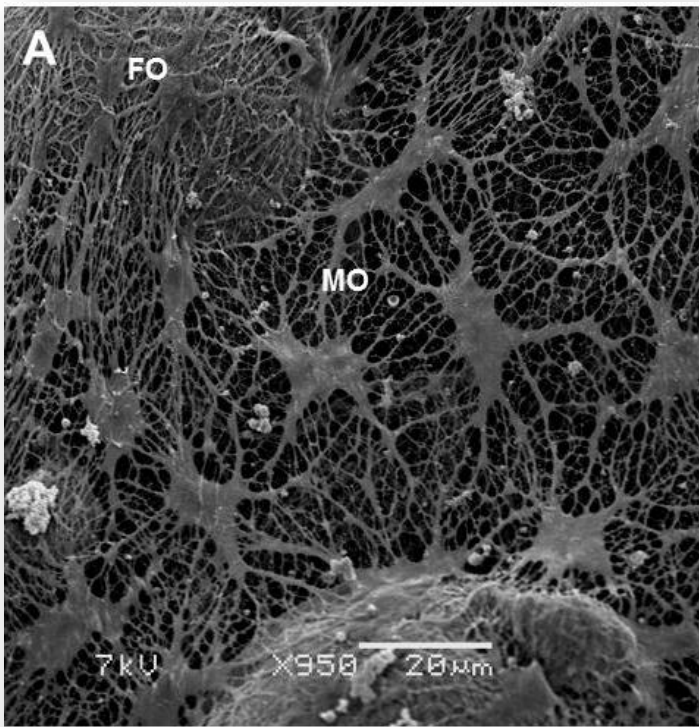


Figura 15. Ovário fêmeas nulíparas de *A. darlingi* não grávidas da geração oriundas de criadouro natural da localidade da Estrada do Puraquequara - Indústria Portela após 36 e 48h do repasto sanguíneo.

Microscopia laser confocal:

- A. Vitelo após 36h, aumento 40x e 50 μm ;
- B. Núcleo das células do epitélio folicular após 36h, aumento 40x e 50 μm ;
- C. Células e folículo secundário após 36h, aumento 40x e 20 μm ;

Microscopia de Luz

- D. Região mediana do folículo primário após 48h, aumento 63x e 10 μm ;

Microscopia de varredura:

- E. Exocório do folículo primário após 48h;

Microscopia de luz:

- F. Região anterior do folículo primário após 48h, aumento 63x e 10 μm .

CN – células nutridoras; **CO**–coroa;**ENC** – endocório; **EPF** – epitélio folicular; **F2** – Folículo secundário; **G** – germário;**GM** – gomo do flutuador; **MO** – membrana ovariana; **MOR** – membrana ovariolar;**NCN** – núcleo das células nutridoras; **NEP** – núcleo do epitélio folicular;**NOO** – núcleo do ovócito;**V** – vitelo;**v1** – vesícula de proteína.

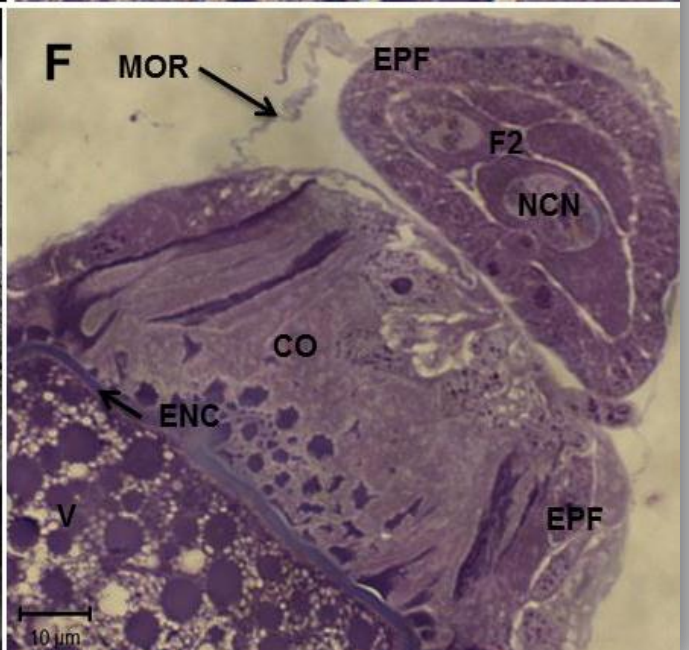
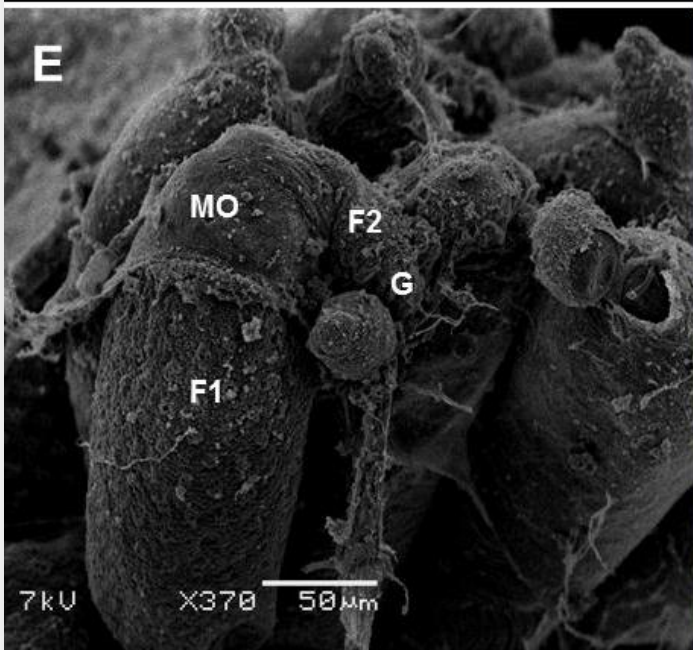
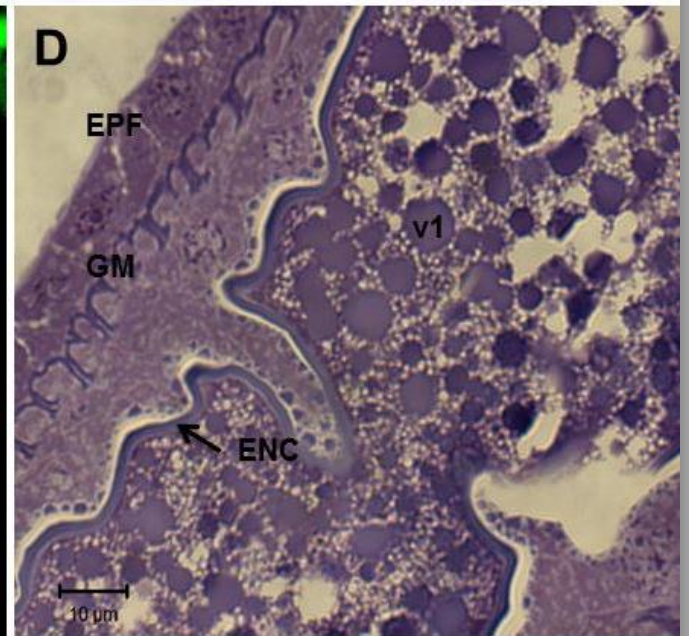
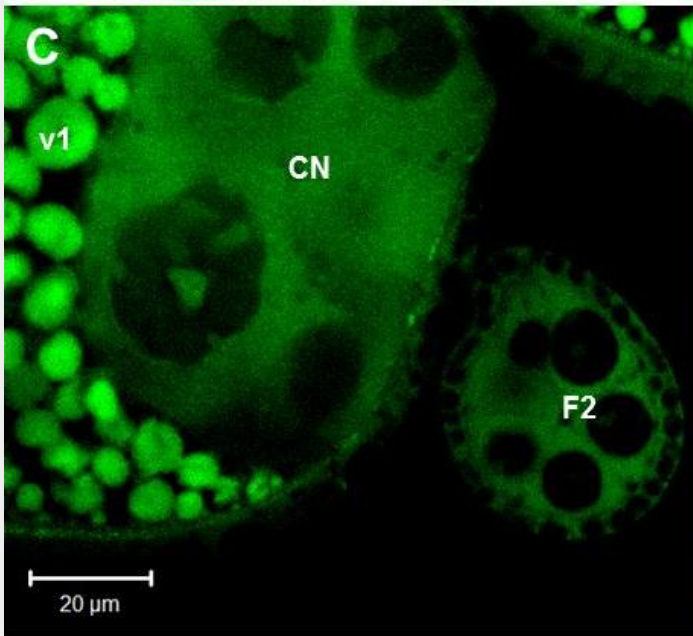
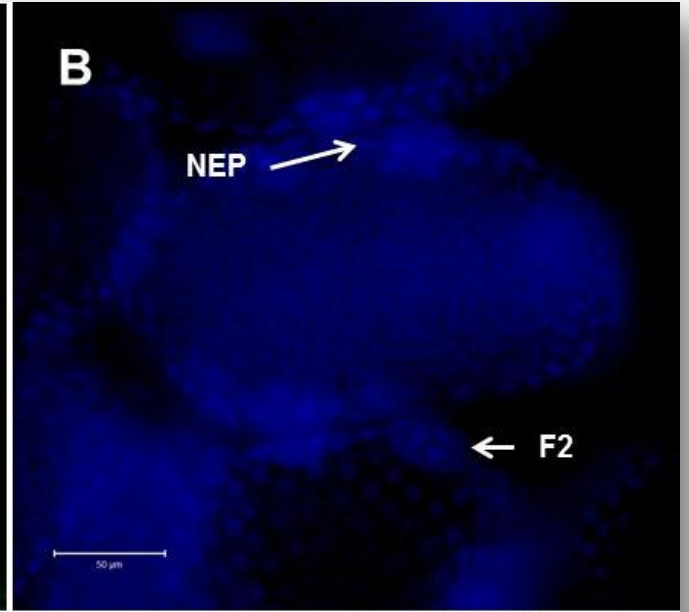
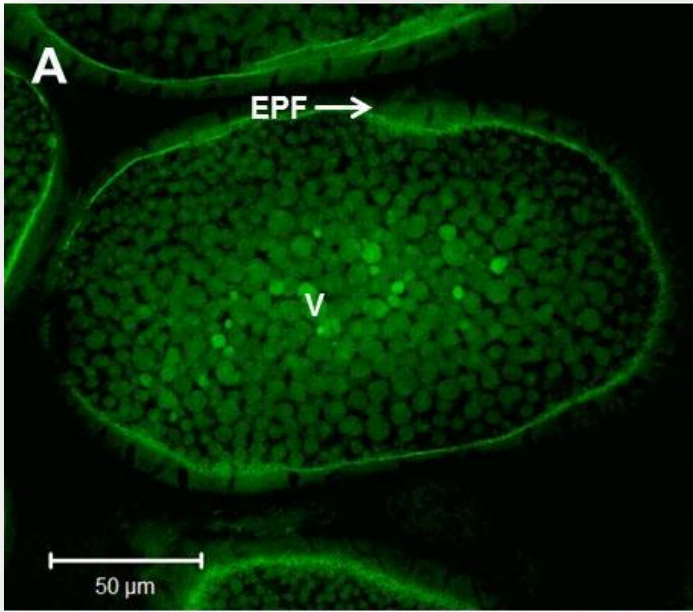


Figura 16. Ovário de fêmeas nulíparas *A. darlingi* não grávidas da geração oriundas de criadouro natural da localidade da Estrada do Puraquequara - Indústria Portela após 60h e 72h do repasto sanguíneo.

Microscopia de Luz:

- A. Região anterior do folículo primário após 60h, aumento 63x e 10 μm ;
- B. Folículo secundário após 60h, aumento 63x e 10 μm ;
- C. Região posterior do folículo primário após 60h, aumento 63x e 20 μm ;
- D. Região mediana do folículo primário após 72h, aumento 63x e 20 μm ;
- E. Vista total do folículo primário após 72h, aumento 40x e 20 μm ;
- F. Região anterior do folículo primário após 72h, aumento 63x e 20 μm .

CN – células nutridoras; **CO** – coroa; **ENC** – endocório; **EPF** – epitélio folicular; **F1** – Folículo primário; **F2** – Folículo secundário; **G** – germário; **GM** – gomo do flutuador; **MO** – membrana ovariana; **MOR** – membrana ovarioelar; **NCN** – núcleo das células nutridoras, **NU** – nucléolo.

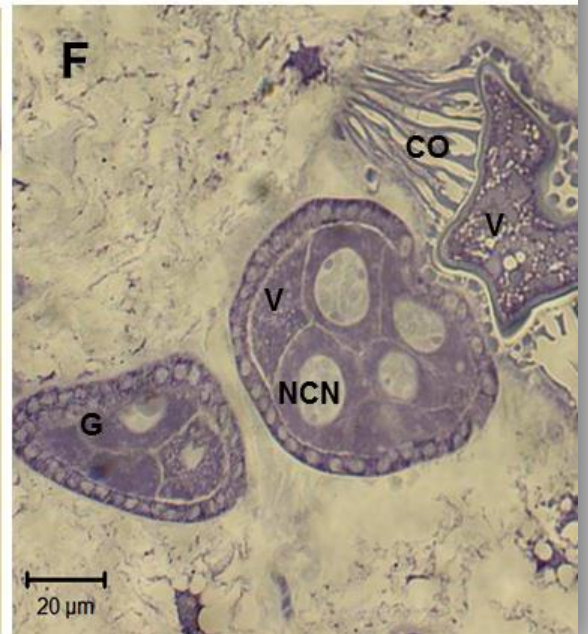
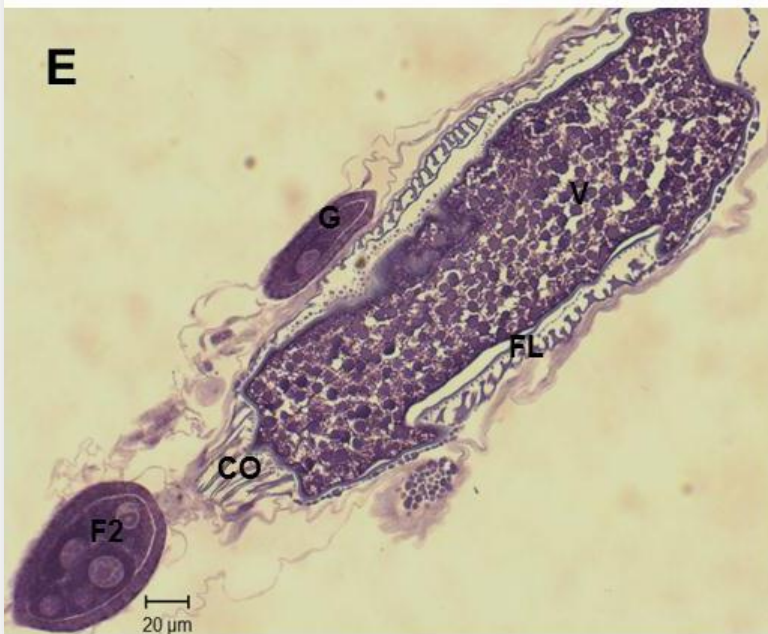
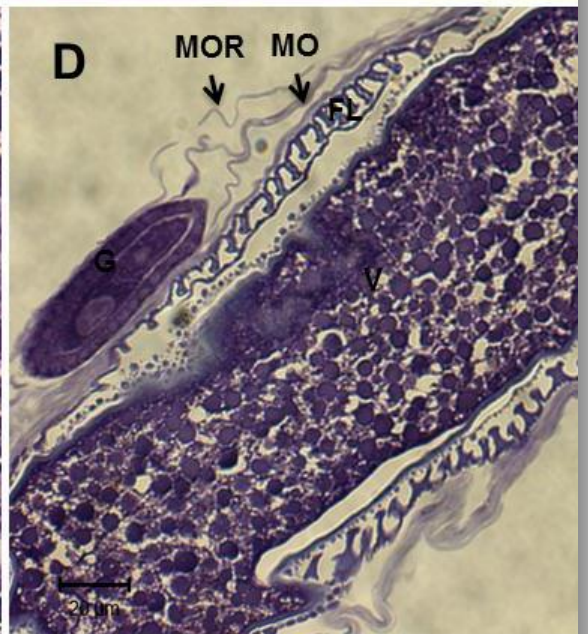
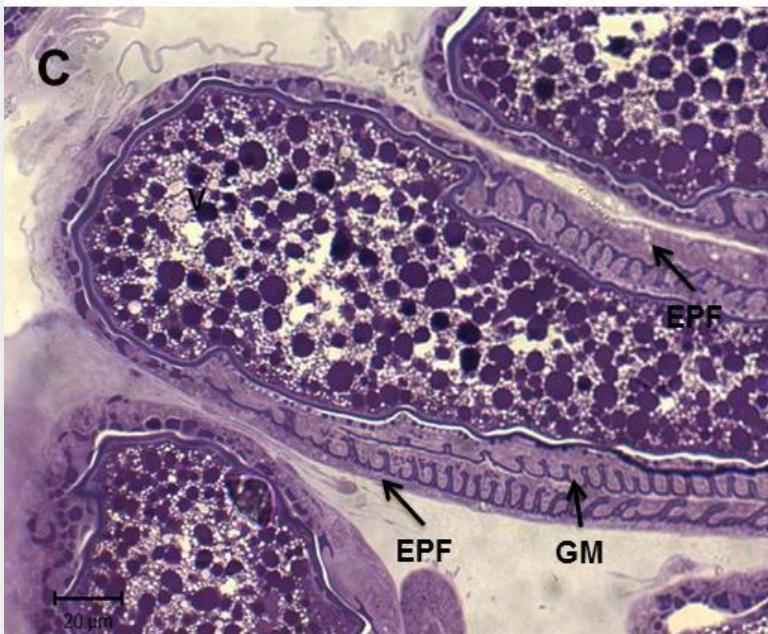
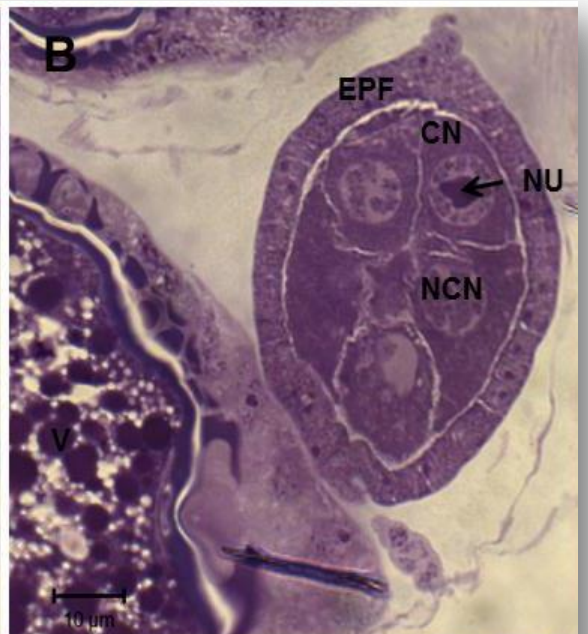


Figura 17. Ovário de fêmeas nulíparas *A. darlingi* não grávidas da geração oriundas de criadouro natural da localidade da Estrada do Puraquequara - Indústria Portela após 72h do repasto sanguíneo.

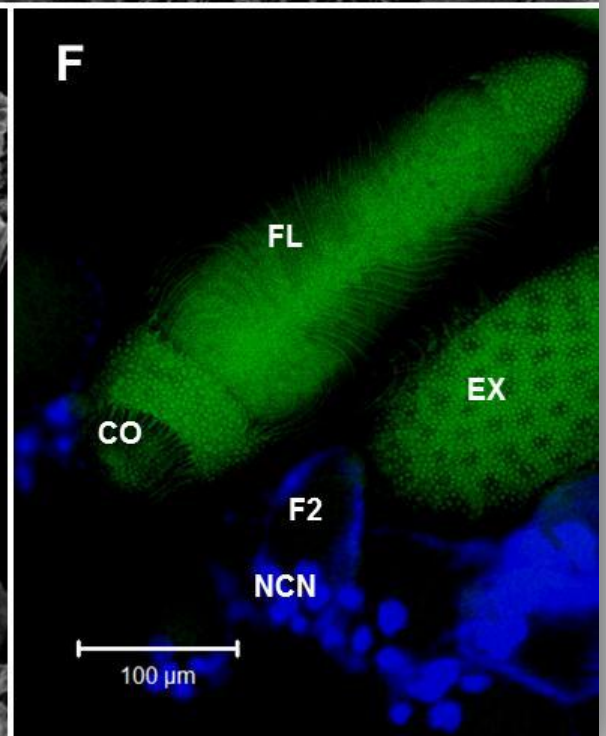
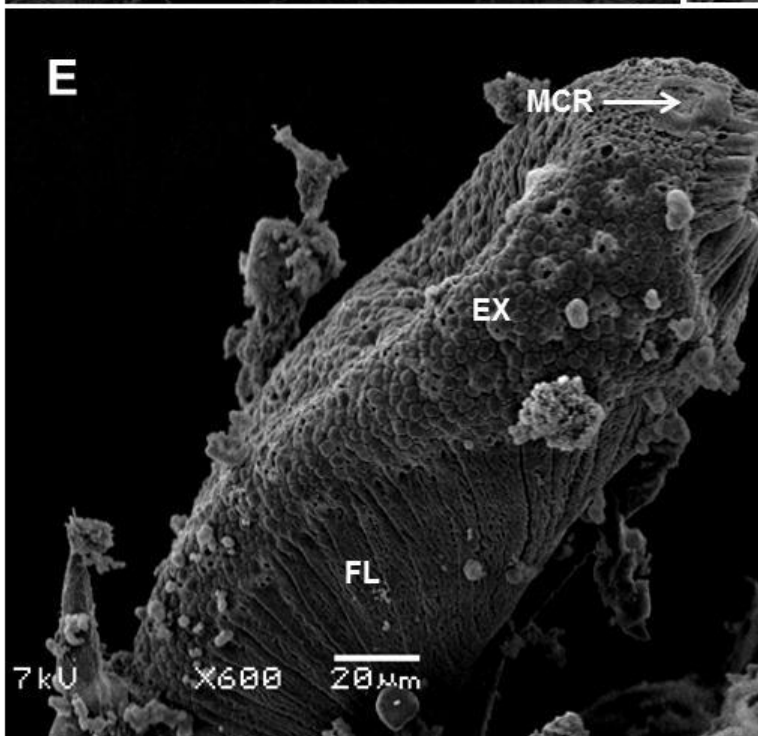
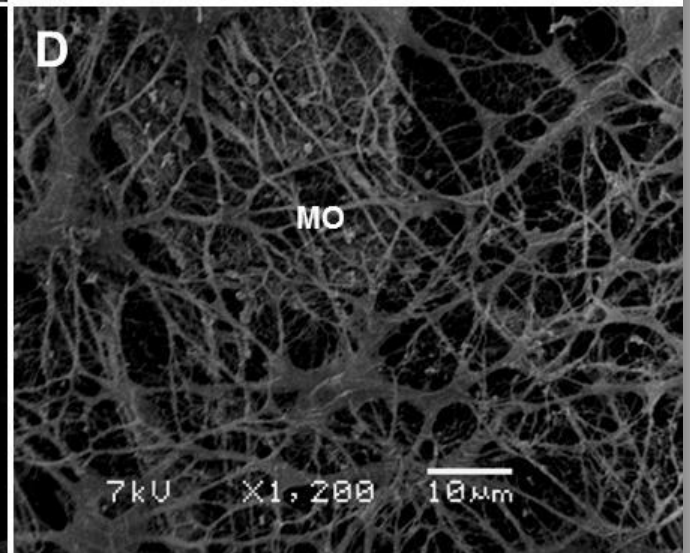
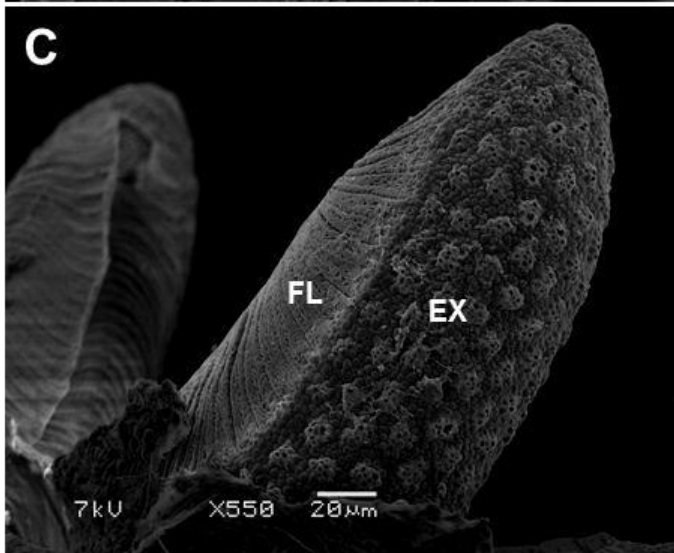
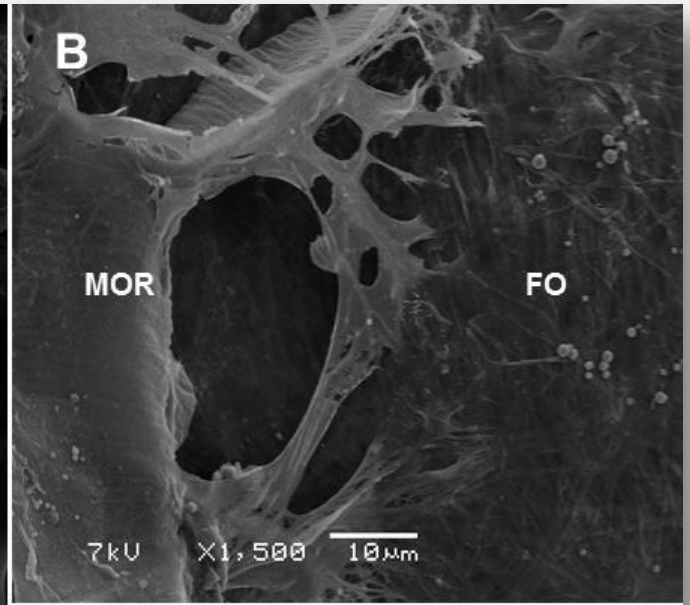
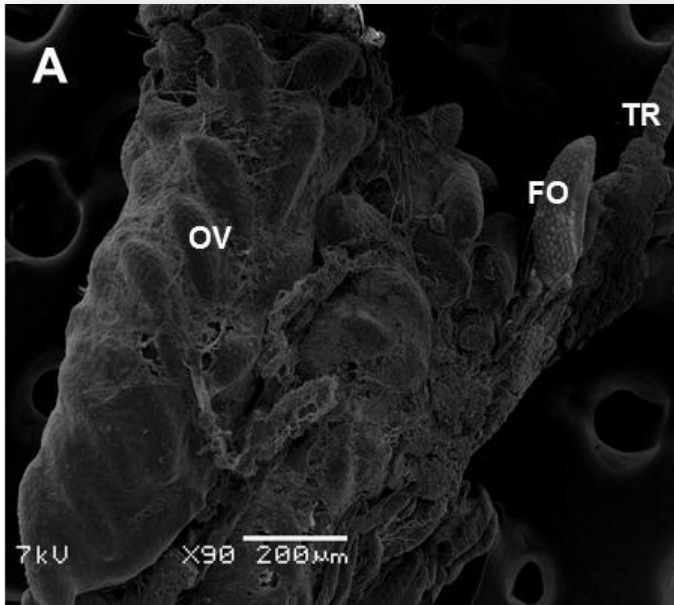
Microscopia de varredura:

- A. Ovário, aumento 90x, 200 μm e 7v;
- B. Membrana ovariolar 1,500x, 10 μm e 7v;
- C. Exocório 550x, 20 μm e 7v;;
- D. Membrana ovariana 1,200x, 10 μm e 7v;
- E. Folículo primário 600x, 20 μm e 7v;

Microscopia laser confocal

- F. Folículo primário, aumento 20x e 100 μm .

CO–coroa;**EX** – exocório; **F2** – Folículo secundário; **FL** - flutuador;**FO** – folículo; **MO** – membrana ovariana; **MCR** – micrópila; **MOR** – membrana ovariolar;**NCN** – núcleo das células nutridoros.



4.3.3 Ovo

Em fêmeas nulíparas de *A. darlingi* da primeira geração oriundas de criadouro natural da localidade da Estrada do Puraquequara - Indústria Portela a oviposição ocorreu 96h após o repasto sanguíneo, o invólucro exterior dos ovos tornou-se rígido e negro. Resultado parecido foi encontrado em *C. quinquefasciatus* onde a oviposição ocorreu aproximadamente 90h após o repasto sanguíneo concluindo o ciclo gonotrófico (Cardoso *et al.* 2010).

Na face ventral do ovo de *A. darlingi* podemos ver o convés (CV), a coroa (CO) e os flutuadores (FL). Logo abaixo da coroa nota-se tubérculos do exocório (EXO) que margeiam os flutuadores (Fig. 18 A). Na região mediana do ovo, na face ventral, entre os flutuadores está o convés (CV) que possui pequenos tubérculos identificados como escultura exocorial do convés. Na região anterior, encontra-se a coroa (CO) que possui reentrâncias colunares contínuas e dentro da coroa aparecem tubérculos identificados como estrutura exocorial da coroa (ECO) (Fig. 18 G). Essas reentrâncias colunares contínuas e a estrutura exocorial na coroa foram retratados por Root (1926), Causey *et al.* (1942) e Linley (1992), que comentaram que a coroa é uma característica marcante dos ovos de *A. darlingi*, e podem apresentar estruturas e diâmetros diferente entre as populações. A região posterior é marcado pelo encontro dos flutuadores com exocório (EXO).

Na face dorsal logo atrás da coroa, nota-se a micrópila (MCR) composta de colar da micrópila (CCR) e disco da micrópila (DCR) (Fig. 18 B e F). Por quase todo ovo encontram-se os tubérculos do exocório (EXO) formando esculturas exocoriais (EC) contendo as células coriônicas (CC) (Fig.18 B e D). Essas esculturas exocoriais foram descritas por Linley (1992) como células formando um conjunto central de pequenos poros entre 1 e 7.

Na face dorso-lateral notam-se os gomos (GM) dos flutuadores e a margem do flutuador delimitando o limite entre os flutuadores e o exocório (Fig.18 C e E).

Os ovários de *A. darlingi* são semelhantes com os de outras espécies de mosquitos estudados por Clements (1992), Clements e Boocock (1984), Christophers (1911), Mer (1936), Bertram (1962), Adaham *et al.* (2009), Fill (1976) e Laurence e Roshdy (1963) mas existem algumas diferenças tais como: nas primeiras 24h de desenvolvimento ovariano de *A. darlingi* alimentadas com solução de sacarose 10% apresenta um conjunto de células chamadas de rosetas, desta

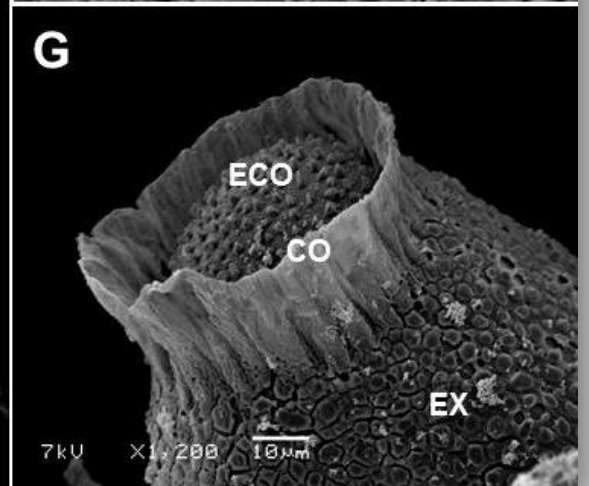
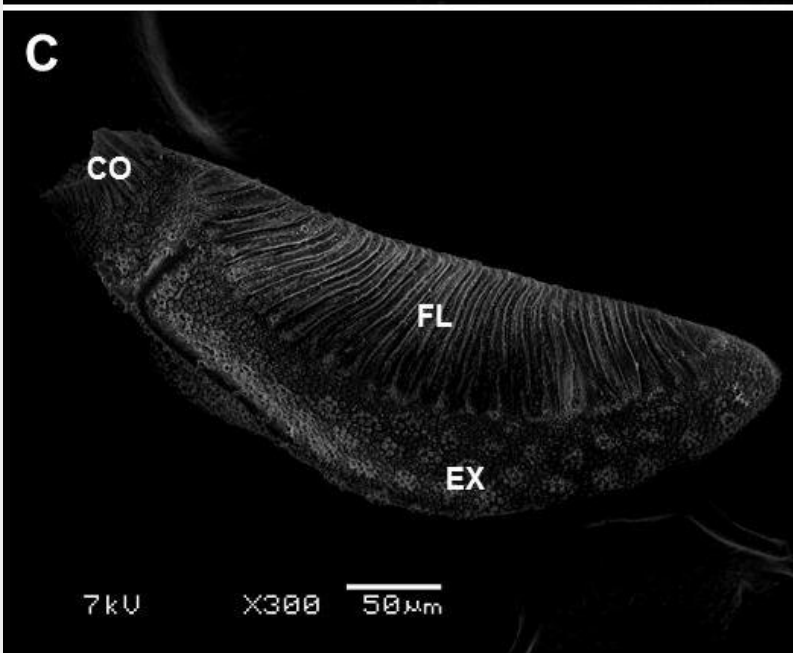
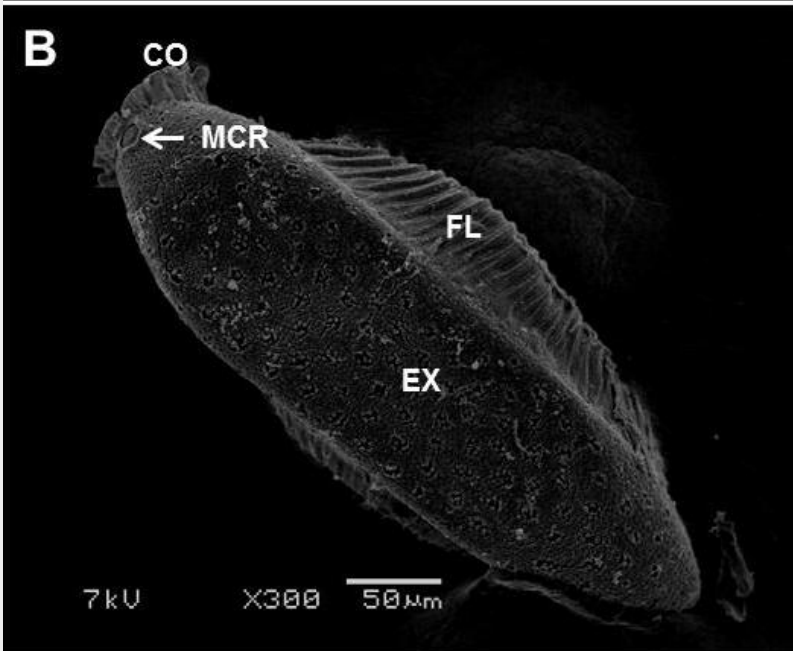
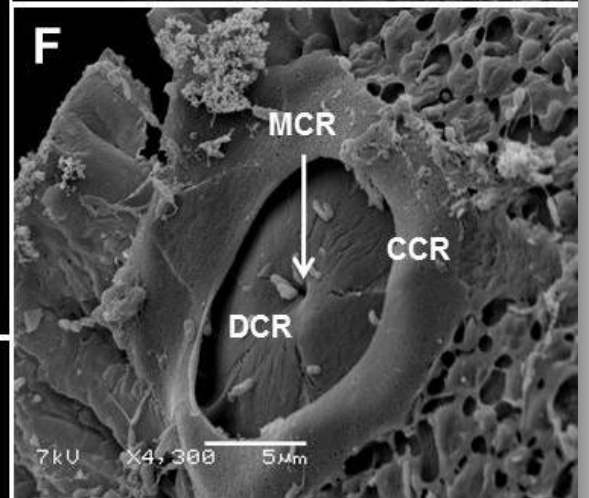
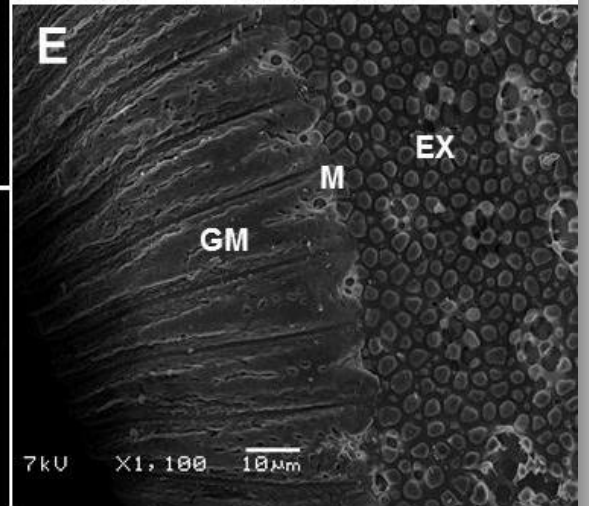
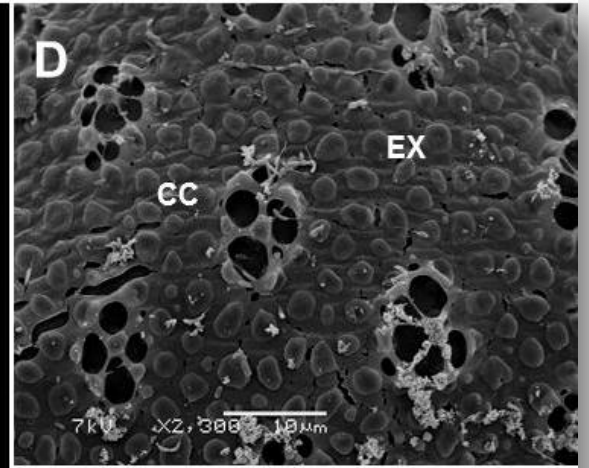
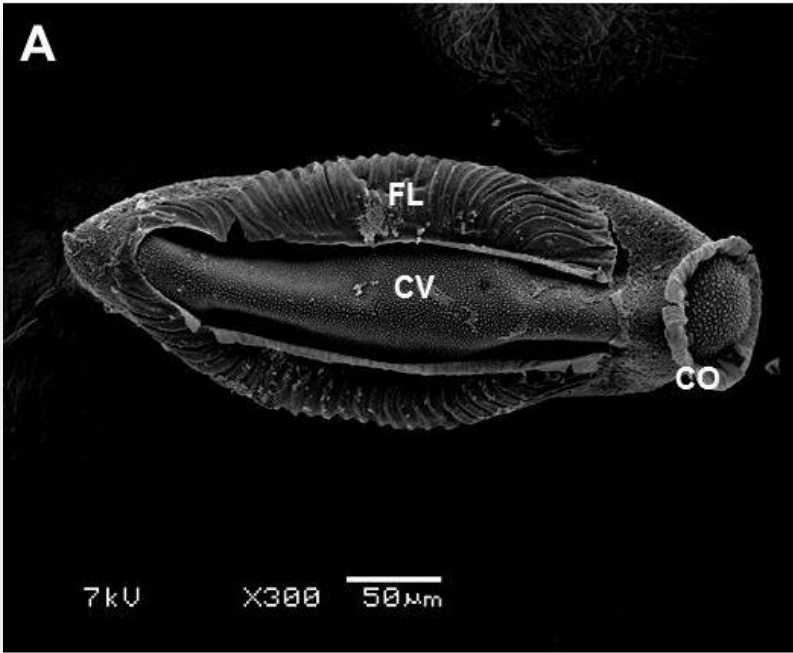
forma existe um germário com cistos ou fusomas ovarianos muito diferente do descrito por Christophers (1911) que chama essa fase de G apresentando folículo incompleto e parcialmente separado do germário. Além disso em *A. darlingi* foram encontradas 7 células não diferenciadas após 24h de alimentação com sacarose 10% o contrário foi relatado por Mer (1936) e Bertram (1962) que descreveram 8 células não diferenciadas em *Anopheles* spp. No desenvolvimento ovarino de *A. darlingi* após 48h do repasto sanguíneo foram notados degeneração total das células nutridoras em *C. quinquefasciatus* a degeneração dessas células só ocorreu após 84h do repasto de sangue (Cardoso *et al.* 2010).

Figura 18. Ovo maduro de fêmeas nulíparas de *A. darlingi* não grávida da geração oriundas de criadouro natural da localidade da Estrada do Puraquequara - Indústria Portela após 96h do repasto sanguíneo.

Microscopia de varredura:

- A. Face ventral do ovo, aumento 300x, 50 μm , 7v;
- B. Face dorsal do ovo, aumento 300x, 50 μm , 7v;
- C. Face dorso lateral do ovo, aumento 300x, 50 μm , 7v;
- D. Exocório, aumento 2,300x, 10 μm , 7v;
- E. Margem do ovo, aumento 1,100x, 10 μm , 7v;
- F. Micrópila, aumento 4,300x, 5 μm , 7v;
- G. Região anterior do ovo, aumento 1,200x, 10 μm , 7v.

CC –células coriônicas; **CCR** – colar da micrópila; **CN** – células nutridoras;**CO**– coroa;**CV**–convés;**DCR** – Disco da micrópila; **ECO** –esculturaexocorial da coroa; **ENC** – endocório; **EPF** – epitélio folicular;**F1**- Folículo primário; **F2** – Folículo secundário;**FL** – flutuador; **G** – germário;**GM** – gomo do flutuador; **M** – margem; **MO** – membrana ovariana; **MOR** – membrana ovariolar;**NCN**– núcleo das células nutridoras; **NEP** – núcleo do epitélio folicular;**NOO** – núcleo do ovócito;**V** – vitelo;**v1** – vesícula de proteína.



4.4 Determinação do perfil protéico e das proteínas totais dos ovários

As proteínas desempenham papéis extremamente importantes, na maioria dos processos biológicos, atuando como enzimas, hormônios, neurotransmissores, transportadores através das membranas celulares bem como macromoléculas de reserva (Zaia *et al.* 1998).

A reprodução dos mosquitos tem como característica marcante a larga produção de ovos num curto espaço de tempo, tornando-se assim um dos maiores desafios metabólicos. É característica de todas as espécies ovíparas, incluindo os insetos, ter a capacidade para incorporar nos ovócitos em desenvolvimento carboidratos, lipídios e proteínas que constituirão o vitelo, que vem a ser uma reserva nutricional para desenvolvimento do embrião (Chino *et al.* 1977; Kunkel e Nordin 1985; Kawooya *et al.* 1988; Ramos 2006). A formação dos ovos se caracteriza pela captação das vitelinas (Vn) que é originada a partir da vitelogenina (Vg), sintetizada pelo corpo gorduroso e secretada na hemolinfa e transportada para dentro dos ovócitos por endocitose (Raikhel e Dhadialla, 1992; Tufail e Takeda, 2008).

As vitelogeninas dos insetos são fosfolipoglicoproteínas sintetizadas por precursores de 200-kDa derivados de um mRNA 6–7-kb Vg (Tufail e Takeda, 2008). No modelo *A. aegypti* da biossíntese da vitelogenina, o RNAm transcrito traduz no retículo endoplasmático rugoso uma pré-pro-vitelogenina de 224kDa. A pré-pro-vitelogenina é glicosilada e depois fosforilada para produzir uma pró-vitelogenina intermediária de 250 kDa. A pró-vitelogenina é rapidamente clivada no retículo endoplasmático rugoso em dois fragmentos de 190 KDa e 62 KDa pela enzima convertase vitelogenina. Essas duas moléculas sofrem sulfatação dando origem a duas subunidade (apoproteínas) da vitelogenina grande (200 kDa) e uma pequena (66 kDa) (Raikhel 2004).

Em A. darlingi, o principal vetor de malária na região Amazônica (Tadei e Duraty-Thatcher 2000), a quantidade de proteína solúvel nos ovários, analisada pelo método de Bradford estimou $124,90 \pm 2,18$ μ g de proteína por par de ovário das fêmeas. O método de Bradford é a técnica para a determinação de proteínas totais que utiliza o corante de “Coomassie brilliant blue” G-250. Este método é baseado na interação entre o corante G-250 e macromoléculas de proteínas que contém

aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas. A interação entre a proteína de alta massa molecular e o corante provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, que é absorvida fortemente em 595 nm.

Com base nas absorbâncias obtidas no espectrofotômetro a 595 nm foi construída uma curva de albumina bovina (BSA). A equação foi ajustada para a curva de calibração utilizada nos ensaios de quantificação de proteína: $y = 0,0484x + 0,0564$ $R^2 = 0,9868$ (Fig. 19).

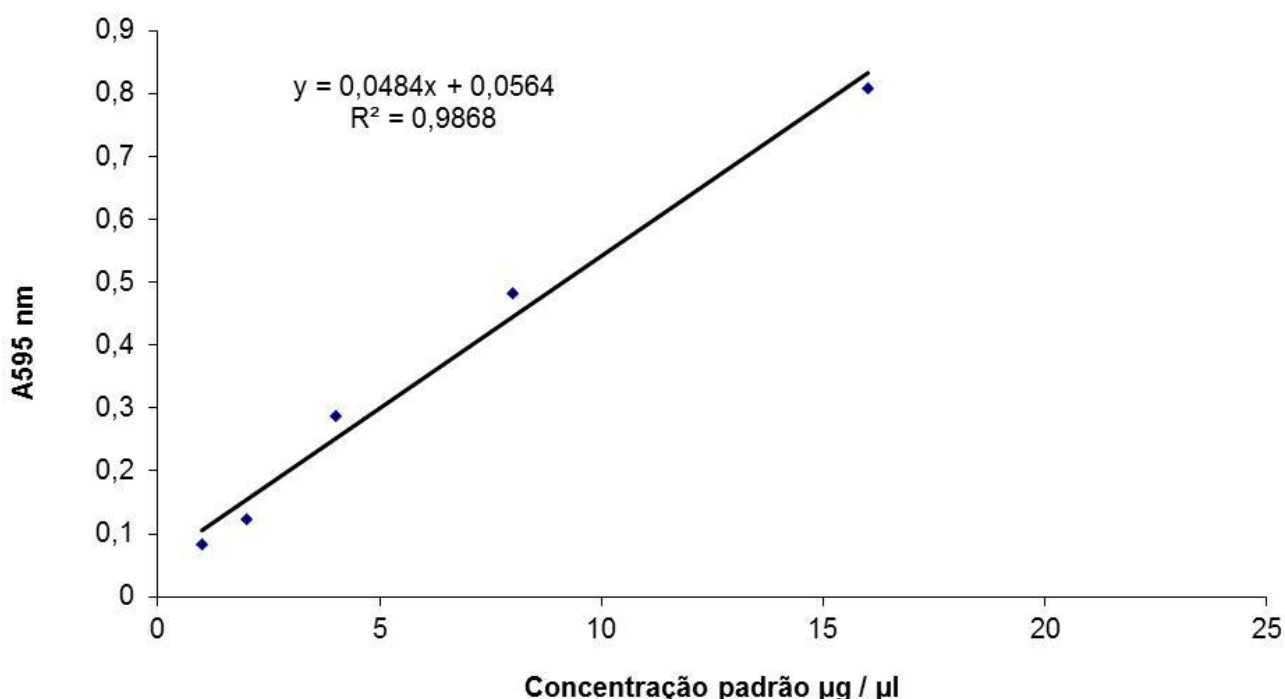


Figura 19. Curva de BSA (Soro de Albumina Bovina). Curva de calibração utilizada nos ensaios de quantificação de proteínas dos ovários de fêmeas nulíparas de *A. darlingi* não grávidas da primeira geração oriundas de criadouro natural da localidade da Estrada do Puraquequara - Indústria Portela.

Antes do repasto sanguíneo, fêmeas nulíparas de *A. darlingi* da primeira geração oriundas de criadouro natural da localidade da Estrada do Puraquequara - Indústria Portela alimentadas com solução de sacarose 10% apresentaram 2,18 µg de quantidade de proteína. Após o repasto sanguíneo entre 3h e 12h foram observadas poucas quantidades de proteínas variando entre 8,72 e 16,9 µg. Em 24h após o repasto sanguíneo, observou-se um aumento da quantidade de proteínas acumuladas dos ovários de *A. darlingi*. Nos tempos de 36h e 48h, as quantidades de proteínas nos ovários foram próximas, variando entre 66,54 e 78,54 µg. Em 72h foi

observado a maior quantidade de proteínas acumulada nos ovários das fêmeas nulíparas *A. darlingi* não grávidas da primeira geração com 124,9 µg. (Fig. 20)

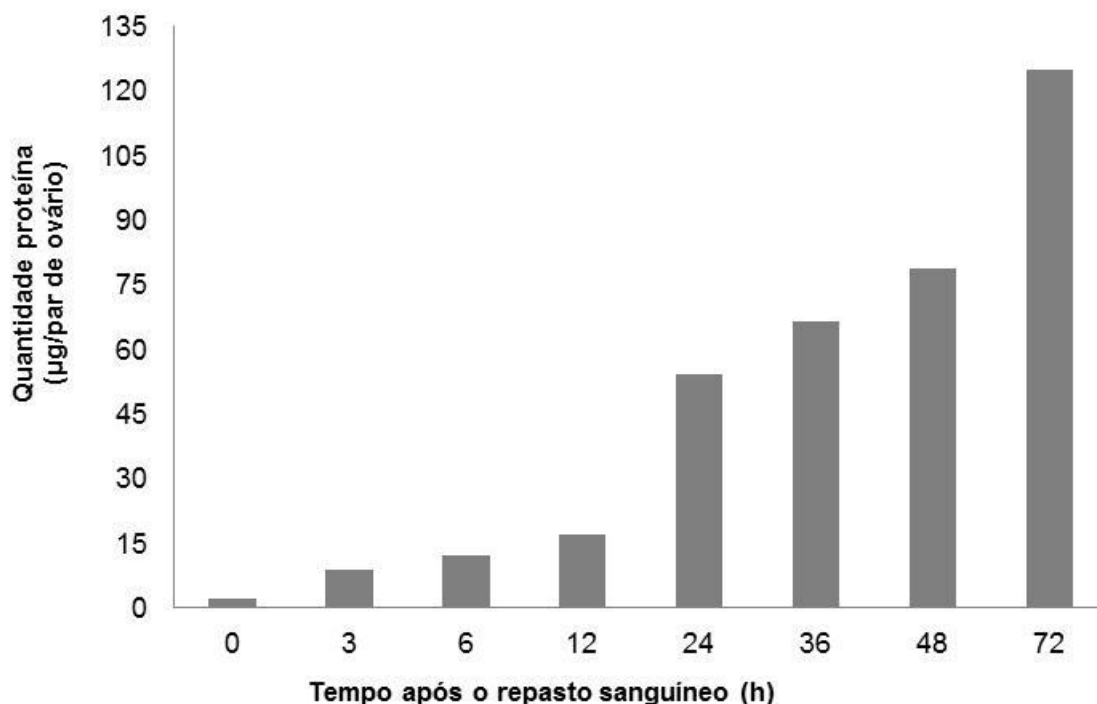
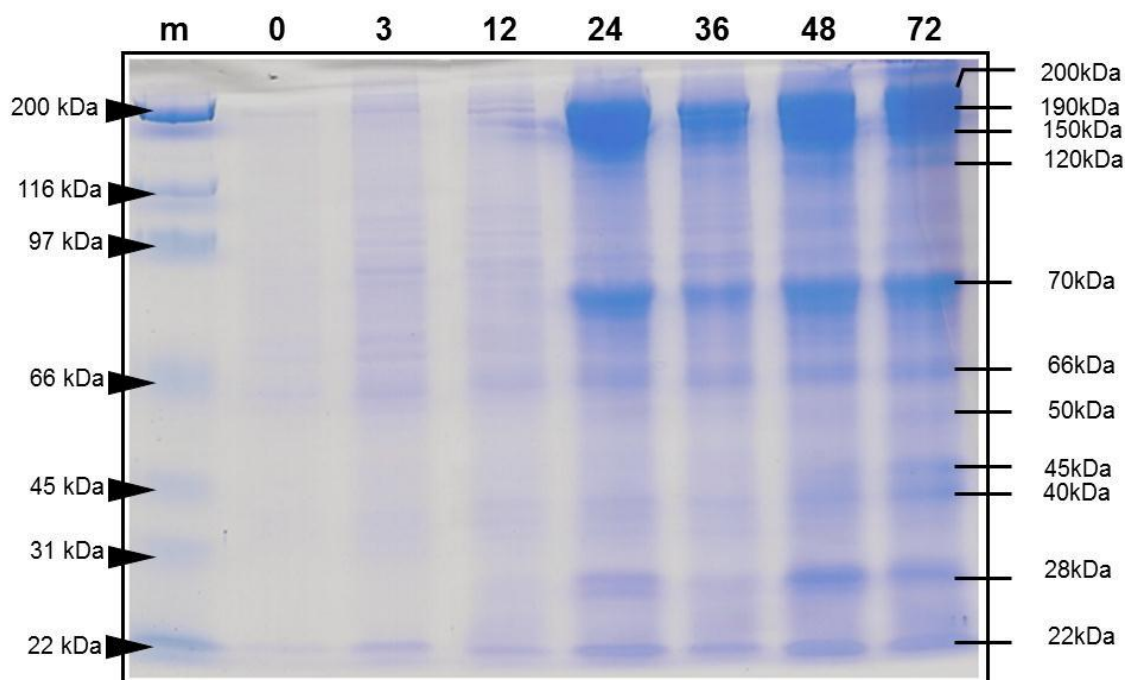


Figura 20. Quantidade proteína por par de ovários de fêmeas nulíparas de *A. darlingi* não grávidas da geração oriundas de criadouro natural da localidade da Estrada do Puraquequara - Indústria Portela. Os ovários foram dissecados em diferentes tempos para a determinação da quantidade de proteínas.

No gel de poliacrilamida SDS – PAGE nas amostras dos ovários de fêmeas nulíparas de *A. darlingi* da primeira geração oriundas de criadouro natural da localidade da Estrada do Puraquequara - Indústria Portela foi verificada proteínas com massas moleculares entre ~200 kDa e ~22 kDa (Fig. 21). As proteínas mais expressas são as de ~200 kDa e ~70 kDa que estão presentes somente nos intervalos de 24h a 72h no ovário de *A. darlingi*. Os ovários das fêmeas de *A. darlingi* alimentadas apenas com solução de sacarose apresentam quantidades pequenas de proteínas (Fig. 21). Segundo Raikhel (2004) os polipeptídeos de ~200kDa e ~66kDa correspondem as duas subunidades da Vg para o modelo *A. aegypti*. Em *C. quinquefasciatus* foram encontrados polipeptídeos da Vg com 192 kDa e 86 kDa no ovário após a alimentação de sangue (Cardoso *et al.* 2010). As massas moleculares de ~200 kDa e ~70 kDa das proteínas encontradas no gel indicam que a

vitelogenina de *A. darlingi* é similar às proteínas da Vg de *A. aegypti* (Borvoski e Whitney 1987) e *C. quinquefasciatus* (Cardoso *et al.* 2010). Outros polipeptídeos minoritários observados nos ovários de *A. darlingi* provavelmente correspondem a



outros componentes protéicos do ovo, tais como aqueles que compõe o cório.

Figura 21. Perfil de proteínas em condições desnaturantes (SDS-PAGE) de ovário de fêmeas nulíparas de *A. darlingi* não grávidas da primeira geração oriundas de criadouro natural da localidade da Estrada do Puraquequara - Indústria Portela. O gel de poliacrilamida foi corado com Comassie blue. M- marcador molecular (kDa) SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Broad Range Biorad; 0 - ovários após 72h do repasto com solução de sacarose à 10%; 3 - ovário com 3h após o repasto sanguíneo; 12 - ovário com 12h após o repasto sanguíneo; 24 - ovário com 24h após o repasto sanguíneo; 36 - ovário com 36h após o repasto sanguíneo; 48 - ovário com 48h após o repasto sanguíneo; 72 - ovário com 72h após o repasto sanguíneo.

4.5 Obtenção de oligonucleotídeos específicos do gene da vitelogenina

O BLAST das sequências de nucleotídeos dos genes de vitelogenina de *A. gambiae*, *A. stephensi* e *A. albimanus* possibilitou a identificação de sequências nucleotídicas conservadas entre esses anofelinos (Marinotti, dados não publicados). Oligonucleotídeos com sequências correspondentes a essas regiões conservadas foram sintetizados e utilizados na tentativa de amplificar fragmentos do gene de vitelogenina de nulíparas de *A. darlingi* da primeira geração oriundas da Comunidade do Inajá em Coari – Amazonas. Na Figura 22 A e B estão os resultados dos PCRs

utilizando as combinações dos oligonucleotídeos de *Anopheles* spp e o DNA molde de fêmeas nulíparas de *A. darlingi* da primeira geração oriundas da Comunidade do Inajá em Coari – Amazonas. Não foram observados ampliações na utilização das combinações de oligonucleotídeos p1 (Vg3070 F e Vg3550 R), p2 (Vg3550 F e Vg4150 R), p3 (Vg4150 F e Vg5500 R), p4 (Vg7200 F e Vg7320 R) como mostra a figura 22 A e também nas combinações p7 (Vg3550 F e 4150 R), p8 (Vg4150 F e 5500 R), p9 (Vg7200 F e 7320 R) e p10 (Vg1730 F e 1380 R) na figura 22 B. Amplificações positivas foram encontradas nas combinações de oligonucleotídeos dos PCRs p5 (1380 R e 1730 F), p6 (3070 F e 3550 R) e p11 (1380 F e 1730 R). Nos fragmentos de DNA amplificados nas amostras de PCRs p5, p6 e p11 após o BLAST foram verificados que as sequências obtidas no sequenciamento tinham 97% de identidade com o gene da vitelogenina Vg-C de *Anopheles albiamnaus* (Isoe e Hagedorn 2007) e 87% com VgT1 de *Anopheles gambiae* e 86% com Vg1 *Anopheles stephensi* (Nirmala et al. 2006).

O sequenciamento dessas amostras validou a sua identidade como Vg cDNA e possibilitou a geração dos oligonucleotídeos específicos do gene da vitelogenina de *A. darlingi* utilizados para realização dos RT-PCRs

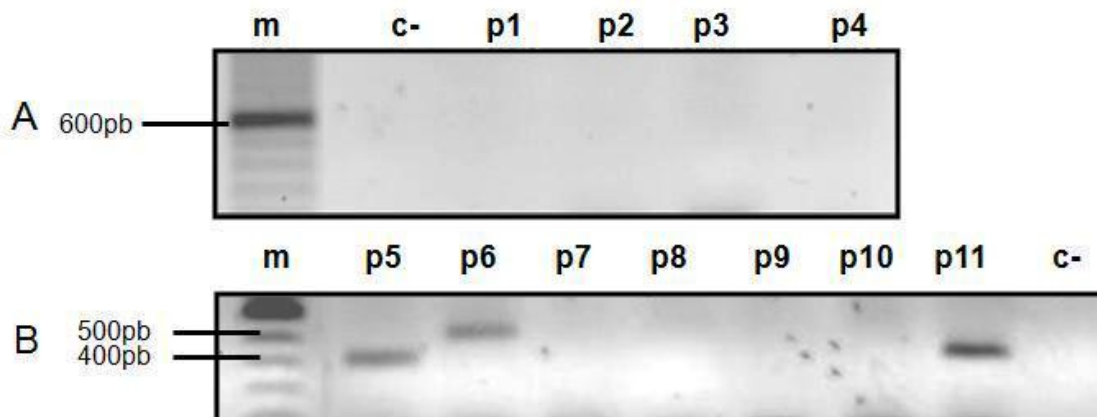


Figura 22. PCR específico usando DNA genômico de fêmeas nulíparas de *A. darlingi* não grávidas da primeira geração oriundas da Comunidade do Inajá em Coari – Amazonas. Combinações aleatórias dos oligonucleotídeos do gene Vg de *Anopheles* spp. c-: controle negativo sem DNA; p1-: 3070 F e 3550 R; p2-3550 F e 4150 R; p3-4150 F e 5500 R; p4-7200 F e 7320 R; p5-1380 R e 1730 F; p6-3070 F e 3550 R; p7- 3550 F e 4150 R; p8- 4150 F e 5500 R; p9-7200 F e 7320 R; p10-1730 F e 1380 R; p11- 1380 F e 1730 R.

4.6 RT – PCR dos múltiplos repastos sanguíneos

Os genes da vitelogenina (Vg) dos insetos são codificados por um RNAm de 6-7 kb. Porém as diferentes espécies de insetos apresentam vários genes da Vg (Tufail e Takeda 2008) que já foram sequenciados e estudados tais como de *Locusta migratoria* (Wyatt *et al.* 1984), *Riptortus clavatus* (Hirai *et al.* 1998), *Plautia stali* (Lee *et al.* 2000), *Solenopsis invicta* e *A. aegypti* Linnaeus (Romans *et al.* 1995). O motivo pelo qual alguns insetos têm vários genes da Vg não é claro, porém nesses casos os genes mantiveram sequências de nucleotídeos muito conservadas, e apresentam padrões de expressão idênticos ou similares. Neste trabalho foi possível verificar que os oligonucleotídeos AndaVg For1 e Rev1 amplificaram fragmentos de um gene da Vg em fêmeas nulíparas de *A. darlingi* da primeira geração oriundas da Comunidade do Inajá em Coari e do criadouro natural da localidade da Estrada do Puraquequara - Indústria Portela em Manaus similares as sequências do gene Vg-C *Anopheles albimanus* (Isoe e Hagedorn 2007) e VgT1 de *Anopheles gambiae* e Vg1 de *Anopheles stephensi* (Nirmala *et al.* 2006). Desta forma são necessários outros estudos para verificar se existem outras sequências dos genes de Vg em fêmeas de *A. darlingi*. Independente disso o gene que codifica a Vg, a principal proteína precursora de vitelo (PPV) na maioria dos animais ovíparos, é expresso em tecidos extraovarianos em um estágio, sexo e tecido específico (Raikhel e Dhadialla, 1992).

Em estudos genéticos com anofelinos, a clonagem do gene Vg de *A. gambiae* por Romans *et al.* (1998) possibilitou a constatação de que todos os genes Vg estavam localizados na mesma região 18A/B do cromossomo 2R. Análise de *Southern blot* da família do gene e sequências em tandem indicaram que o gene Vg são quase idênticos nas regiões que codificam as proteínas. Além disso, as proteínas preditas do gene Vg de *A. gambiae* apresentam alto grau de similaridade com a proteína codificada pelo gene VgA1 de *A. aegypti* (Romans *et al.* 1995; Ahmed *et al.* 2001).

Antes do repasto sanguíneo em fêmeas nulíparas de *A. darlingi* da primeira geração oriundas de criadouro natural da localidade da Estrada do Puraquequara - Indústria Portela não foram observadas expressões do gene Vg (Fig. 23 A). Isso pode ser explicado com o que ocorre no modelo *A. aegypti* durante a pré vitelogênese, onde apresenta duas proteínas envolvidas na ativação do gene Vg

localizados no núcleo das células do corpo gorduroso. Nessa fase a proteína encontram-se na forma heterodímera associadas à proteína repressora impedindo a expressão do gene da vitelogênese. E somente após a alimentação sanguínea irá induzir a formação de outro heterodímero composto de uma proteína indutora somado à presença do hormônio 20E (20-hidroxiecdisona) que irá se ligar a um receptor na região 5' não traduzida ativando o gene da Vg (Raikhel *et al.* 2002). Outro elemento de repressão do gene Vg é representado pelo fator de transcrição GATA que reconhece sítios de ligação a GATA na região regulatória do gene. Após o repasto sanguíneo os sítios de ligação GATA são liberados e outro fator de transcrição GATA se liga nesta região ativando o gene Vg (Park *et al.* 2006).

Em fêmeas nulíparas de *A. darlingi* da primeira geração oriundas de criadouro natural da localidade da Estrada do Puraquequara - Indústria Portela após a alimentação sanguínea foram encontrados expressões do gene Vg nos intervalos entre 6h e 72h, com expressões mais intensas na eletroforese entre 24h e 48h (Fig. 23 A). Esse mesmo padrão de expressão de RNAm da Vg foi demonstrado por Marinotti *et al.* (2006) em *A. gambiae* e Kokoza *et al.* (2001) em *Aedes aegypti*. Em *A. darlingi* 3h após o repasto sanguíneo não foi observada a expressão do gene Vg corroborando com o resultado de Kokoza *et al.* (2001).

Não foram notadas diferenças nas expressões do gene Vg em fêmeas nulíparas de *A. darlingi* da primeira geração oriundas de criadouro natural da localidade da Estrada do Puraquequara - Indústria Portela com ovário desenvolvido e não desenvolvido (Fig. 24 A), indicando que a alimentação sanguínea das fêmeas de *A. darlingi* provocou a expressão do gene da Vg independentemente do desenvolvimento do ovário.

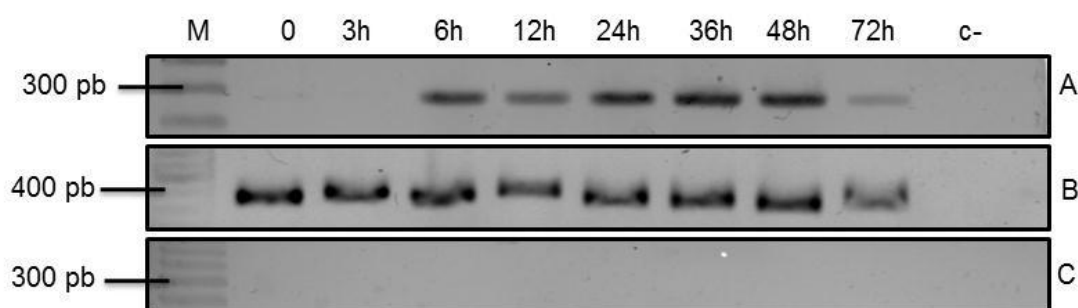


Figura 23. Expressão do gene Vg entre 0 e 72h após o repasto sanguíneo de fêmeas de *A. darlingi* da primeira geração oriundas de criadouro natural da localidade da Estrada do Puraquequara - Indústria Portela. (A) gene Vg; (B) gene RNAr 18S; (C) controle sem a adição da enzima transcriptase reversa. M: marcador de DNA 100pb (Promega); c-: ausência de cDNA.

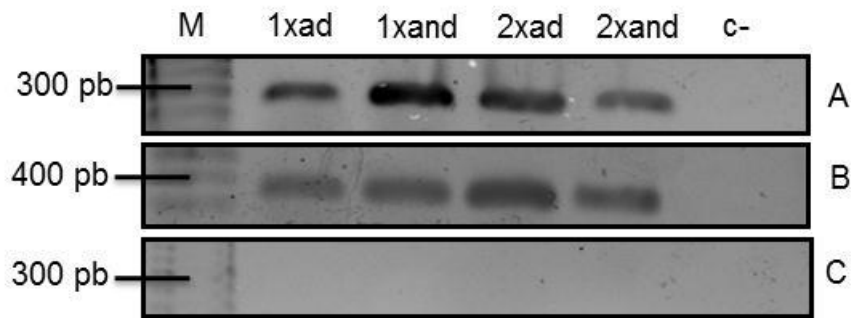


Figura 24. Expressão do gene Vg após o 1º e 2º repasto sanguíneo de fêmeas nulíparas de *A. darlingi* da primeira geração oriundas de criadouro natural da localidade da Estrada do Puraquequara - Indústria Portela. Amostras de RNA total de mosquitos após o repasto sanguíneo foram submetidas à RT-PCR utilizando iniciadores específicos para amplificação do gene Vg e 18S. **1xad** – fêmea com 1º repasto sanguíneo com ovário desenvolvido; **1xand** - fêmea com 1º repasto sanguíneo com ovário não desenvolvido; **2xad** - fêmea com 2º repasto sanguíneo com ovário desenvolvido; **2xand** - fêmea com 2º repasto sanguíneo com ovário não desenvolvido - **(A)** gene Vg; **(B)** gene rRNA 18S; **(C)** controle sem a adição da enzima transcriptase reversa. M: marcador de DNA 100pb (Promega); c-: ausência de cDNA.

Na Figura 25 A mostra as expressões do gene Vg das fêmeas nulíparas de *A. darlingi* da primeira geração oriundas do criadouro aquático natural localizado na Estrada do Puraquequara - Indústria Portela em Manaus após 1º e 5º repastos sanguíneos e na figura 26 A mostra as expressões das fêmeas nulíparas de *A. darlingi* da primeira geração oriundas de populações coletadas na comunidade do Inajá em Coari após o 1º e 6º repastos sanguíneos. Durante os múltiplos repastos sanguíneos não foram observadas diferenças nas expressões do gene Vg em fêmeas nulíparas de *A. darlingi* da primeira geração de ambas localidades. Mas nas fêmeas nulíparas de *A. darlingi* da primeira geração oriundas de populações coletadas na comunidade do Inajá em Coari foi verificada que houve um aumento crescente na expressão do gene Vg de acordo com o número de repastos sanguíneos oferecidos (Fig. 26 A). No entanto a determinação final da relação entre o número de repastos sanguíneos e a expressão de Vg deverá ser comprovada com a realização de RT-PCR quantitativo em tempo real.

Os controles de todos os RT-PCR realizados em todas as amostras de fêmeas nulíparas de *A. darlingi* da primeira geração oriundas de populações coletadas na comunidade do Inajá em Coari e do criadouro aquático natural da Indústria Portela localizada na Estrada do Puraquequara em Manaus estão nas figuras 23, 24, 25 e 26 B e C. Nas figuras 23, 24, 25 e 26 B estão os controles positivos na expressão do RNA ribossomal que apresentaram-se constante em todas as amostras. No controle negativo nas figuras 23, 24, 25 e 26 C não foram detectados contaminações com DNA genômico.

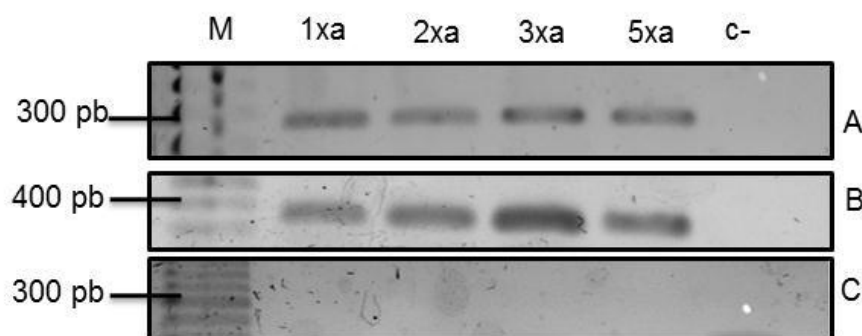


Figura 25. Expressão de RNA mensageiro do gene Vg em fêmeas nulíparas da primeira geração oriundas do criadouro aquático natural da Indústria Portela localizada na Estrada do Puraquequara em Manaus – Amazonas. Amostras de RNA total após o repasto sanguíneo foram submetidas à RT-PCR utilizando iniciadores específicos para amplificação do gene VG e 18S. **(A)** gene VG; **(B)** gene rRNA 18S; **(C)** controle sem a adição da enzima transcriptase reversa. M: marcador de DNA 100pb (Promega); c-: ausência de cDNA. 1xa: fêmea com um repasto sanguíneo; 2xa: fêmea com dois repastos sanguíneos; 3xa: fêmea com três repastos sanguíneos; 5xa: fêmea com cinco repastos sanguíneos.

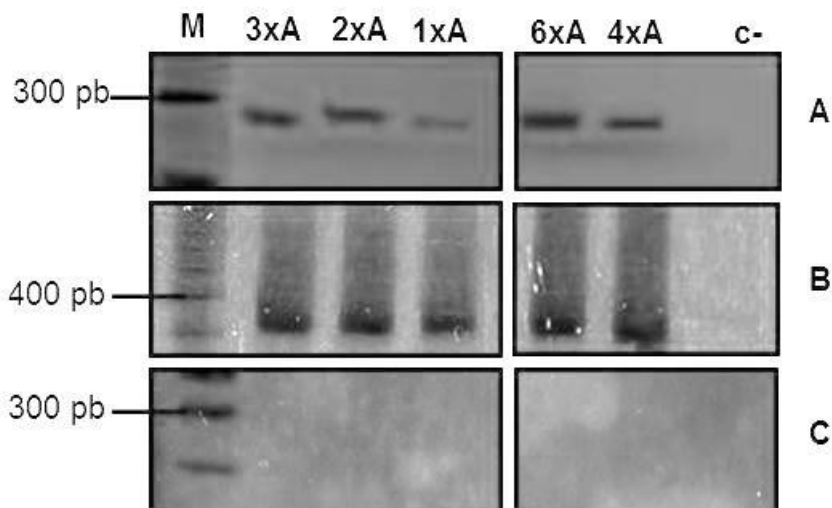


Figura 26. Expressão de RNA mensageiro do gene Vg em fêmeas nulíparas da primeira geração oriundas de populações coletadas na comunidade do Inajá em Coari – Amazonas. Amostras de RNA total de mosquitos após o repasto sanguíneo foram submetidas à RT-PCR utilizando iniciadores específicos para amplificação do gene VG e 18S. **(A)** gene VG 30 ciclos; **(B)** gene rRNA 18S; **(C)** controle sem a adição da enzima transcriptase reversa. M: marcador de DNA 100pb (Promega); c-: ausência de cDNA. 1xa: fêmea com um repasto sanguíneo; 2xa: fêmea com dois repastos sanguíneos; 3xa: fêmea com três repastos sanguíneos; 4xa: fêmea com quatro repastos sanguíneos; 6xa: fêmea com seis repastos sanguíneos.

Os estudos de laboratório e de campo com *A. darlingi* e outros anofelinos indicam, um comportamento de constantes alimentações dos mosquitos em seus hospedeiros vertebrados. Portanto foi sugerido que em mosquitos transgênicos a expressão de moléculas efetoras sustentáveis pode ser alcançada usando promotores induzidos por alimentações de sangue, tal como o gene da vitelogenina. Além disso, Koëlla *et al.* (1998) ressaltaram a probabilidade de um mosquito

infectado com *Plasmodium* se alimentar de sangue várias vezes pode ser maior do que mosquito não infectados, indicando que as várias alimentações sanguínea podem ser usadas como uma vantagem para dirigir a expressão de moléculas efectoras em mosquitos transgênicos.

5 CONCLUSÃO

- O tipo de nutrição larval não influenciou no desenvolvimento ovariano das fêmeas nulíparas de *A. darlingi* da primeira geração não grávidas emergidas do criadouro natural e após a pulverização de alimento 1 e 3 vezes ao dia em laboratório ambas da localidade da Estrada do Puraquequara - Indústria Portela em Manaus pois apresentaram o mesmo padrão de desenvolvimento ovariano entre I e V após o 1º repasto sanguíneo. Provavelmente na natureza essa espécie deve procurar mais de um repasto sanguíneo antes de completar o primeiro ciclo gonotrófico. No entanto, deve ser investigada a relação entre o tamanho das fêmeas e a quantidade de sangue ingerido.
- As fêmeas nulíparas de *A. darlingi* não grávidas da primeira geração das amostras localidade da Estrada do Puraquequara - Indústria Portela em Manaus e da Comunidade do Inajá de Coari realizaram múltiplos repastos sanguíneos num único ciclo gonotrófico podendo ser um indício de que essa espécie na natureza tenha esse mesmo comportamento o que aumenta as chances de contaminação por *Plasmodium*.
- Não existe diferença entre o número de ovos postos por fêmeas nulíparas de *A. darlingi* não grávidas da primeira geração oriundas do Ramal do Brasileirinho-Km 7 no Sítio Raifran e Ramal do Puraquequara - Km 9 em Manaus após o repasto sanguíneo em hamster e pato. No entanto o sangue de pato não foi suficiente para desenvolver o ovário no estágio V de quase metade das fêmeas estudadas. Sugerindo uma preferência pelo hospedeiro vertebrado mamífero e possivelmente uma influência nutritiva do sangue no desenvolvimento ovariano das fêmeas estudadas. Mas a quantidade de sangue ingerido por fêmea também precisa ser investigada.
- Morfologicamente os ovários de fêmeas nulíparas de *A. darlingi* não grávidas da primeira geração oriundas de criadouro natural da localidade da Estrada do Puraquequara - Indústria Portela em Manaus são semelhantes às espécies de fêmeas nulíparas e paridas de mosquitos estudados até o momento.

- Antes do repasto sanguíneo não existe expressão do gene da vitelogenina, acúmulo e estocagens de vitelinas nos ovários nas fêmeas nulíparas de *A. darlingi* não grávidas da primeira geração oriundas das amostras da comunidade do Inajá em Coari e do criadouro aquático natural da Indústria Portela localizada na Estrada do Puraquequara em Manaus.
- Depois do repasto sanguíneo a expressão do gene da vitelogenina, estocagens de vitelinas e acúmulo de proteínas totais nos ovários de fêmeas nulíparas de *A. darlingi* não grávidas da primeira geração oriundas das amostras da comunidade do Inajá em Coari e do criadouro aquático natural da Indústria Portela na Estrada do Puraquequara em Manaus são mais intensas a partir de 24h.
- A expressão do gene da vitelogenina, estocagens de vitelinas e acúmulo de proteínas totais nos ovários antes e depois do repasto sanguíneo das fêmeas nulíparas de *A. darlingi* não grávidas da primeira geração oriundas da comunidade do Inajá em Coari e do criadouro aquático natural da Indústria Portela localizada na Estrada do Puraquequara em Manaus seguem o mesmo padrão apresentado em outras espécies de culicídeos estudadas.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adham, F.; Mehlhorn, H.; El-Basheir, Z.; Yamany, A. 2009. Light and electron microscopic studies on the development of the ovaries of *Culex pipiens quinquefasciatus* (Say) (Diptera: Culicidae). *Parasitology Research*, 105: 939-948.
- Ahmed, A.M.; Maingon, R.; Romans P.; Hurd H. 2001. Effects of malaria infection on vitellogenesis in *Anopheles gambiae* during two gonotrophic cycle. *Insect Molecular Biology*, 10: 347–356.
- Ahmed, A.S. 1983. *Cytological and cytochemical studies in Culex pipiens molestus (Forsk.)*. Oocyte differentiation and vitellogenesis. MSc Thesis. Fac Science, Alexandria University.
- Amerasinghe, P.H.; Amerasinghe F.P. 1999. Multiple host feeding in field populations of *Anopheles culicifacies* and *A. subpictus* in Sri Lanka. *Medical and Veterinary Entomology*, 13: 124-131.
- Atella, G.; Silva-Neto, M.; Golodne, D.; Arefin, S.; Shahabuddin, M. 2006. *Anopheles gambiae* lipophorin: characterization and role in lipid transport to developing oocyte. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 36: 375-386.
- Attardo, G.M.; Hansen, I.A.; Raikhel, A.S. 2005. Nutritional regulation of vitellogenesis in mosquitoes: Implications for anautogeny. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 35: 661 – 675.
- Ayres, M; Jr. M. A.; Ayres, D. L.; Santos, A. A. S. 2007. Bioestat – aplicações estatísticas nas áreas das ciências bio-médicas. Bélem: Sociedade Civil Mamirauá. CNPq. 324p.
- Barros, F.S. de; Arruda, M.E.; Vasconcelos, S.D.; Luitgards-Moura, J.F.; Confalonieri, U.; Rosa-Freitas, M.G.; Tsouris, P.; Lima-Camara, T.N.; Honório, N.A. 2007. Parity and age composition for *Anopheles darlingi* Root (Diptera: Culicidae) and *Anopheles albitarsis* Lynch-Arribálzaga (Diptera: Culicidae) of the northern Amazon Basin, Brazil. *Journal of Vector Ecology*, 32(1): 54 - 68.

- Bertram, D. S. 1962. The ovary and ovarioles of mosquitos. Monogr Ser World Health Organ, 47: 195-210.
- Boreham, P.F.L.; Garrett-Jones, C. 1973. Prevalence of mixed blood meals and double feeding in a malaria vector (*Anopheles sacharovi* Favre). *Bulletin of the World Health Organization*, 48: 605±614.
- Borovoski D.; Whitney, P. L. 1987. Biosynthesis, Purification, and characterization of *Aedes aegypti* vitellin and vitellogenin. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 4: 81-99.
- Boyd, M.F. 1949. Epidemiology of malaria: factors related to the intermediate host. p. In: Boyd, M.F. (Ed) *Malariology*. W.B. Saunders. Vol. I, p. 551-607.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-54.
- Braga, E.M.; Fontes, C.J.F. 2005. Plasmodium – Malária. p, 143 – 161. In: Neves, D. P. *Parasitologia Humana*. 11ª Ed. Atheneu. São Paulo, SP.
- Brasil, 2002. Guia de vigilância epidemiológica. Influenza/varíola. Brasília: Ministério da Saúde. Vol. II, 1-12 pp.
- Briegel H, Knüsel I, Timmermann S.E. 2001b. *Aedes aegypti*: size, reserves, survival, and flight potential. *Journal Vector Ecology*, 26: 21-31.
- Briegel, H. 1990a. Metabolic relationship between female body size, reserves, and fecundity of *Aedes aegypti*. *Journal Insect Physiology*, 36: 165 - 172.
- Briegel, H. 1990b. Fecundity, metabolism, and body size in *Anopheles* (Diptera: Culicidae), vectors of malaria. *Journal of Medical Entomology*, 27: 839-850.
- Briegel, H.; Timmermann, S.E. 2001. *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae): Physiological Aspects of Development and Reproduction. *Journal of Medical Entomology*, 38: 566-571.
- Briegel, H.; Waltert, A.; Kuhn. R. 2001a. Reproductive physiology of *Aedes (Aedimorphus) vexans* (Diptera: Culicidae) in relation to flight potential. *Journal of Medical Entomology*, 38: 557-565.

- Briegel, H.; Hefti, M.; DiMarco, E. 2002. Lipid metabolism during sequential gonotrophic cycles in large and small female *Aedes aegypti*. *Journal Insect Physiology*, 48: 547-554.
- Briegel, H.; Hörler, E. 1993. Multiple blood meals as a reproductive strategy in *Anopheles* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, 30:975-85.
- Brock, M. L.; Shapiro, D. J. 1983. Estrogen stabilizes vitellogenin mRNA against cytoplasmic degradation. *Cell*, 34: 207- 214.
- Browder, L. 1980. *Developmental Biology*. Saunders, Philadelphia.
- Burkot, T. R.; Graves P. M.; Paru R.; Wirtz R. A.; Heywood P. F. 1988. Human malaria transmission studies in the *Anopheles punctulatus* complex in Papua New Guinea: sporozoite rates, inoculation rates, and sporozoite densities. *American Journal Tropical Medicine Hygiene*, 39: 135-44.
- Cabrini, I.; Andrade, C.F.S. 2006 - Resposta de Fêmeas de Mosquitos ao Hospedeiro – Busca por Alimentação. Disponível em: [http://www2.ib.unicamp.br/profs/eco_aplicada/arquivos/artigos_tecnicos/Atraca oFêmeasMosquitos.pdf](http://www2.ib.unicamp.br/profs/eco_aplicada/arquivos/artigos_tecnicos/Atraca%20oFêmeasMosquitos.pdf) em: 07/12/2010.
- Cardoso, A. F.; Cres, R. L.; Moura, A. S.; Almeida, F. de; Bijovsky, A. T. 2010. *Culex quinquefasciatus* vitellogenesis: morphological and biochemical aspects. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 105: 254-262.
- Causey, O.R.; Deane, L.M.; Deane, M.P.; Sampaio, M.M. 1942. Note clarifying the status of *Anopheles albitarsis* and *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae)*. *Proceedings of the Entomological Society of Washington*, 44: 122 – 126.
- Chadee, D.D. 1992. Indoor and outdoor host-seeking rhythms of *Anopheles albistarsis* (DipteraCulicidae) in Trinidad, West Indies. *Journal Medical entomology*, 29: 567 - 9
- Charlwood J.D.; Wilkbes T.J. 1979. Studies on the age-composition of samples of *Anopheles darlingi* Root (Diptera: Culicidae) in Brazil. *Bulletin of Entomological Reseach*, 69: 337-342.

- Charlwood, I.D. 1980. Observations on the bionomics of *Anopheles darlingi* Root (Diptera, Culicidae) from Brazil. *Bulletin of Entomological Research*, 70: 685-692.
- Charlwood, J.D.; Rafael, J.A.; Wilkes, T.J. 1980. Métodos de determinar idade fisiológica em Diptera de importância médica. Uma revisão com especial referência aos vetores de doenças na América do Sul. *Acta Amazonica*, 10: 311-33.
- Chino, H.; Downer, R.G.H.; Takahashi, K. 1977. The role of Diacylglycerol carryn glipoprotein in lipid transport during insect vitellogenesis. *Biochimimica et Biophysica Acta*, 487: 508-516.
- Christophers, S.R. 1911. The development of the egg follicle in Anophelines. *Paludism*, 2: 73–88
- Christophides, G.K. 2005. Transgenic mosquitoes and malaria transmission. *Cell Microbiology*, 7: 325-333.
- Clements, A.N. 1963. *The physiology of mosquitoes*. Macmillan, New York p. 393.
- Clements, A.N. 1992. *The Biology of mosquitoes, Volume 1. Development and Nutrition, Reproduction*. London, Chapman e Hall, 509 pp.
- Clements, A.N., Boocock, M.R. 1984. Ovarian development in mosquitoes: stages of growth and arrest, and follicular resorption. *Physiological Entomology*, 9: 1-8.
- Collins, F.H.; James, A.A. 1996. Genetic modification of mosquitoes. *Science and Medicine*, 3: 52-61.
- Consoli, R.A.G.B. 1982. Longevidade dos adultos de *Aedes fluviatilis*(Lutz, 1904) quando submetidos a diversas dietas de carboidratos e de sangue (Diptera: Culicidae). *Revista Brasileira de Biologia*, 42: 303-310.
- Consoli, R.A.G.B.; Andrade, A.C.B.; Silva, E.C. 1981. Influência da idade cronológica sobre a produção de ovos e o número de dias que antecedem a postura em fêmeas de *Aedes fluviatilis* (Lutz, 1904) alimentadas em vários hospedeiros. *Revista Brasileira de Biologia*, 41:829-832

- Consoli, R.A.G.B.; Lourenço-de-Oliveira, R. 1994. *Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil*. Fundação Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 228 pp.
- Deane L.M. 1989. A Cronologia da descoberta dos transmissores da malária na Amazônia brasileira. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 84: 149-56.
- Deane, L.M. 1986. Malaria Vectors in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 81, Suppl. II.
- Deane, L.M.; Vedrnin, C.S.; Damasceno, R.G. 1949. Avaliação das preferências alimentares das fêmeas de *Anopheles darlingi* e *Anopheles aquasalis* em Belém, Pará, por meio de provas de precipitina. *Revista de Saúde Pública*, 2: 793-808.
- Detinova, T.S. 1962. *Age-Grouping methods in Diptera of medical importance*. WHO, Monograph series nº. 47, 215 pp.
- Detinova, T.S. 1962. Age-grouping methods in Diptera of medical importance with special reference to some vectors of malaria. *Monograph Series World Health Organization*, 47: 13-191.
- Edman, J.D.; Spielman, A. 1988. Blood-feeding by vectors: physiology, ecology, behavior, and vertebrate defense. In: Monath TP, ed. *The arboviruses: epidemiology and ecology*. Vol I. Boca Raton, FL: CRC Press 153-89 pp.
- Faran, M.E.; Linthicum, K.J. 1981. A handbook of the Amazonian species of *Anopheles* (Diptera: Culicidae). *Mosquito Systematics*, 13: 1–81.
- Fernandes, L.; Briegel, H. 2005. Reproductive physiology of *Anopheles gambiae* and *Anopheles atroparvus*. *Journal Vector Ecology*, 30: 11-26.
- Ferreira, M.S.; Alvarado, C.A. 1991. Malária, p. 753-779. In: Veronesi, R. *Doenças infecciosas e parasitárias*. Rio de Janeiro, 8ª edição Guanabara Koogan 1082 pp.
- Fill, A. 1976. Oogenesis in Malaria Mosquito *Anopheles gambiae*. *Cell Tissue Research*, 167: 23- 35.
- Forattini, O.P. 1992. *Ecologia, epidemiologia e sociedade*. São Paulo: Artes Médicas/Editora da Universidade de São Paulo, 529p.

- Forattini, O.P. 1996. *Culicidologia médica*. Universidade de São Paulo Edusp. 548 p.
- Forattini, O.P. 2002. *Culicidologia médica. Identificação, biologia e epidemiologia*. Universidade de São Paulo. São Paulo. Vol. 2. 860 pp.
- Forattini, O.P.; Gomes, A.C.; Santos, J.L.F.; Galati, E.A.B.; Rabello, E.X.; Natal, D. 1981. Observações sobre atividade de mosquitos Culicidae, em mata residual no Vale do Ribeira, S. Paulo, Brasil. *Revista de Saúde Pública*, 5:557-86.
- Forattini, O.P.; Kakitani, I.; Massad, E.; Gomes, A.C. 1993. Studies on mosquitoes (Diptera, Culicidae) and anthropic environment. 1- Parity of blood seeking *Anopheles* (Kerteszia) in South-eastern Brazil. *Revista de Saúde Pública*, 27: 1-8.
- Foster, W. A. 1995. Mosquito sugar feeding and reproductive energetics. *Annual Review Entomology*, (40): 443 - 474.
- Garcia, L.S. 2010. Malaria. *Clinics in Laboratory Medicine*, 30: 93–129.
- Garnham, P.C.C. 1966. Malaria parasites and other haemosporidia. University of London. *Blackwell Scientific Publications*, Oxford. 1114 p.
- Gillies, M.T. 1954. The recognition of age groups within populations of *Anopheles gambiae* by the pre-gravid and the sporozoite rate. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 48: 58-74.
- Gillies, M.T. 1955. The pre-gravid phase of ovarian development in *Anopheles funestus*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 49: 320 – 325.
- Grossman, G.L.; Rafferty, C.S.; Clayton, J.R.; Stevens, T.K.; Mukabayire, O.; Benedict, M.Q. 2001. GermLine transformation of the malaria vector, *Anopheles gambiae*, with the piggyBac transposable element. *Insect Molecular Biology*. 10: 597-604.
- Gwadz R.; Collins F.H. 1996. Anopheline mosquitoes and the agents they transmit. *In: Beaty, B. J., Marquardt, W.C. The biology of disease vectors*. Ed. University Press of Colorado, 73-84.
- Hall N.; Karras M.; Raine J.D.; Carlton J.M.; Kooij T.W.; Berriman M.; Florens L.; Janssen C.S.; Pain A.; Christophides G.K.; James K.; Rutherford K.; Harris B.; Harris D.; Churcher C.; Quail M.A.; Ormond D.; Doggett J.; Trueman H.E.;

- Mendoza J.; Bidwell S.L.; Rajandream M.A.; Carucci D.J.; Yates J.R 3rd.; Kafatos F.C.; Janse C.J.; Barrell B.; Turner C.M.; Waters A.P.; Sinden R.E. 2005. A comprehensive survey of the *Plasmodium* life cycle by genomic, transcriptomic, and proteomic analyses. *Science*, 307: 82-6.
- Hartl, D.L. 2004. The origin of malaria: mixed messages from genetic diversity. *Nature Reviews Microbiology*, 2: 15–22.
- Hirai, M.; Watanabe, D.; Kiyota, A.; Chinzei, Y. 1998. Nucleotide sequence of vitellogenin mRNA in the bean bug, *Riptortus clavatus*: analysis of processing in the fat body and ovary. *Insect Biochemistry Molecular Biology*, 28: 537-47.
- Hogg, J.C.; Thomson, M.C.; Hurd, H. 1996. Comparative fecundity and associated factors for two sibling species of the *Anopheles gambiae* complex occurring sympatrically in The Gambia. *Medical and Veterinary Entomology*, 10: 385-91.
- Isoe J.; Hagedorn H.H. 2007. Mosquito vitellogenin genes: Comparative sequence analysis, gene duplication, and the role of rare synonymous codon usage in regulating expression. *Journal of Insect Science*, 7: 1536-2442.
- Ito, J.; Ghosh, A.; Moreira, L.A.; Wimmer, E.A.; Jacobs-Lorena, M. 2002. Transgenic anopheline mosquitoes impaired in transmission of a malaria parasite. *Nature*, 417: 452 - 455.
- James, A.A. 2005. Gene drive systems in mosquitoes: rules of the road. *Trends in Parasitology*, 21: 64 - 67.
- Kakitani I.; Forattini O.P. 2000. Parity and ovarian development of *Anopheles albitalis* s.l. in irrigated agroecosystem field. *Revista de Saúde Pública*, 34 : 33-38.
- Kawooya, J.K.; Osir, E.O.; Law, J.H. 1988. Uptake of the major hemolymph lipoprotein and its transformation in the insect egg. *Journal of Biological Chemistry*, 263: 8740 - 8747.
- Klowden M.J.; Briegel H. 1994. Mosquito gonotrophic cycle and multiple feeding potential: contrasts between *Anopheles* and *Aedes* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, 31: 618-22.

- Klowden, M.J.; Lea, A.O. 1980. Physiologically old mosquitoes are not necessarily old physiologically. *American Journal Tropical Medicine Hygiene*, 29: 1460-1464.
- Kokoza, V.A.; Ahmed, A.; Cho, W.L.; Jasinskiene, N.; James, A.A.; Raikhel, A.; 2000. Engineering blood meal-activated systemic immunity in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Proceedings of the National Academy of Science*, 97: 9144 - 9149.
- Kokoza, V.A.; Martin, D.; Mienaltowski, M.J.; Ahmed, A.; Morton, C.M.; Raikhel, A.S. 2001. Transcriptional regulation of the mosquito vitellogenin gene via a blood meal-triggered cascade. *Gene*, 274: 47 - 65.
- Kunkel, J.G., Nordin, J.H. 1985. Yolk proteins. In: *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. Kerkut G.A., Gilbert L.I., eds. Pergamon Press, Oxford. v.1, 83-111 pp.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680 - 685.
- Laurence, B.R.; Roshdy, M. A. 1963. Ovary Development in Mosquitoes. *Nature*, 200: 495-496.
- Lee, J.M., Hatakeyama, M., Oishi, K., 2000. A simple and rapid method for cloning insect vitellogenin cDNAs. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 30: 189 - 194.
- Lehr M.A.; Kilpatrick C.W.; Wilkerson R.C.; Conn, J.E. 2005. Cryptic species in the *Anopheles (Nyssorhynchus) albitarsis* (Diptera: Culicidae) complex: Incongruence between Random Amplified Polymorphic DNA-Polymerase Chain Reaction identification and analysis of mitochondrial DNA COI gene sequences. *Annal Entomology Society American*, 98: 908-917.
- Li C.; Wilkerson R.C. 2005. Identification of *Anopheles (Nyssorhynchus) albitarsis* complex species (Diptera: Culicidae) using rDNA internal transcribed spacer 2-based polymerase chain reaction primers. *Memorias Instituto Oswaldo Cruz*, 100: 495-500.
- Linley, J.R. 1992. The eggs of *Anopheles atropos* and *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae). *Mosquito systematics*, 24: 40 - 50.

- Linthicum, K.J. 1988. A revision of the *Argyritarsis* section of the subgenus *Nyssorhynchus* of *Anopheles* (Diptera, Culicidae). *Mosquito Systematics*, 20: 98 - 278
- Lounibos, L.P.; Couto-Lima, D.; Loureno-de-Oliveira, R.; Escher, R.L.; Nishimura, N. 1998. Egg maturation in Neotropical malaria vectors: One blood meal is usually enough. *Vector Ecology*. 23: 195-201.
- Lozovei, A.L. 2001. Culicídeos (Mosquitos). p. 50-103. In: Marcondes, C.B. *Entomologia médica e veterinária*. São Paulo. Ed. Atheneu. (In portuguese).
- Lyimo, E.O.; Koella, J.C. 1992. Relationship between body size of adult *Anopheles gambiae* s.l. and infection with the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Parasitology*, 104: 233 - 7.
- Lyimo, E.O.; Takken W. 1993. Effects of adult body size on fecundity and the pre-gravid rate of *Anopheles gambiae* females in Tanzania. *Medical and veterinary entomology*, 7: 328 - 32.
- Marinotti, O.; Calvo, E.; Nguyen, Q.K.; Dissanayake, S.; Ribeiro, J.M.C.; James, A. A. 2006. Genome-wide analysis of gene expression in adult *Anopheles gambiae*. *Insect Molecular Biology*, 15: 1-12.
- Meira, D.A.; Pita, H.J.; Banavieira, B. 1980. Malária no município de Humaitá, Estado do Amazonas, I. Alguns aspectos epidemiológicos e clínicos. São Paulo. *Revista do Instituto Medicina Tropical*, 22: 124-134.
- Meneguzzi, V.C.; dos Santos, C.B.; Pinto Ide S.; Feitoza L.R.; Feitoza H.N.; Falqueto A. 2009. Use of geoprocessing to define malaria risk areas and evaluation of the vectorial importance of anopheline mosquitoes (Diptera: Culicidae) in Espírito Santo, Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104: 570-5.
- Mer, G.G. 1936. Experimental study on the development of the ovary in *Anopheles elutus*, EDW. (Dipt. Culic.). *Bulletin of Entomological Research*, 27: 351-359
- Motoki M.T.; Wilkerson R.C.; Sallum M.A. 2009. The *Anopheles albitarsis* complex with the recognition of *Anopheles oryzalimnetes* Wilkerson and Motoki, n. sp. and *Anopheles janconnae* Wilkerson and Sallum, n. sp. (Diptera: Culicidae). *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104: 823-50.

- Nayar, J.K.; Sauerman, D.M. 1975. Physiological basis of host susceptibility of Florida mosquitoes to *Dirofilaria immitis*. *Journal Insect Physiology*, 21: 1965 - 1975.
- Nelson, F.F.; Barbosa, M.D.G.V.; Andrade, F.F.A.; Guerra, M.V.D.F.; Alecrim, W.D. 2003. Fauna de Culicidae em municípios da zona rural do estado do Amazonas, com incidência de febre amarela. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 36: 343-348.
- Nirmala, X.; James, A.A. 2003. Engineering Plasmodium-refractory phenotypes in mosquitoes. *Trends in Parasitology*, 19: 384 - 387.
- Nirmala, X.; Marinotti, O.; James, A. A. 2005. The accumulation of specific mRNAs following multiple blood meals in *Anopheles gambiae*. *Insect Molecular Biology*, 14: 95–103.
- Nirmala, X.; Marinotti, O.; Sandoval, J.M.; Phin, S.; Gakhar, S.; Jasinskiene, N., James, A.A. 2006. Functional characterization of the promoter of the vitellogenin gene, AsVg1, of the malaria vector, *Anopheles stephensi*. *Insect Biochemistry Molecular Biology*, 36: 694-700.
- O'Meara, G.F.; Evans, D.G. 1976. The influence of mating on autogenous egg development in the mosquito, *Aedes taeniorhynchus*. *Journal Insect Physiology*, 22: 613–617.
- Oliveira-Ferreira, J.; Lourenço -de-Oliveira, R.; Deane, L.M.; Daniel -Ribeiro, C.T. 1992. Feeding preference of *Anopheles darlingi* in malaria endemic áreas of Rondônia state - Northwestern Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 87: 601-602.
- Organização Pan americana de Saúde (OPAS). 2011. Brasil é reconhecido pelos esforços realizados para o controle da Malária. <http://new.paho.org/bra>. Fornecido por Joomla!. Produzido em: 5 Fevereiro 2011, 15:06.
- Paraluppi, N. D. 1978. Alguns aspectos da biologia e do comportamento de *Anopheles (N.) nuneztovari* Gabaldon (Diptera Culicidae) dos arredores da cidade de Manaus, Amazonas, Brasil. Dissertação de Mestrado do Instituto Nacional de pesquisa da Amazônia e Universidade Federal do Amazonas. 62p.

- Park, J.H.; Attardo, G. M.; Hansen, I. A.; Raikhel A. S. 2006. GATA Factor Translation Is the Final Downstream Step in the Amino Acid/Target-of-Rapamycin-mediated Vitellogenin Gene Expression in the Anautogenous Mosquito *Aedes aegypti**. *The Journal of Biological Chemistry*, 281: 11167 - 11176.
- Pates, H.V.; Takken, W.; Curtis, C.F.; Huisman, P.W.; Akinpelu, O.; Gill, G.S. 2001a. Unexpected anthropophagic behaviour in *Anopheles quadriannulatus*. *Medical and Veterinary Entomology*, 15: 293 - 298.
- Pates, H.V.; Takken, W.; Stuke, K.; Curtis, C.F. 2001b. Differential behaviour of *Anopheles gambiae* sensu stricto (Diptera: Culicidae) to human and cow odours in the laboratory. *Bulletin of Entomological Research*, 91: 289-296.
- Rachou, R.G. 1958. Anofelinos do Brasil: comportamento das espécies vetoras de malária. *Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais*. 10: 145-181.
- Raikhel, A. S.; Lea A.O. 1983. Previtellogenic development and vitellogenin synthesis in the fat body of a mosquito: an ultrastructural and immunocytochemical study. *Tissue Cell*, 15: 281 - 99.
- Raikhel, A.S. 2004. Vitellogenesis of disease vectors, from physiology to genes. 329 – 346. In: Marquardt, C. W. (Eds). *Biology of disease vectors*. 2ªEdi. Elsevier. (In English).
- Raikhel, A.S.; Dhadialla, T.S. 1992. Accumulation of yolk proteins in insect oocytes. *Annual Review of Entomology*, 37: 217–251.
- Raikhel, A.S.; Kokoza, V.A.; Zhu, J.; Martin, D.; Wang, S.F.; Li, C.; Sun, G.; Ahmed, A.; Dittmer, N.; Attardo, G. 2002. Molecular biology of mosquito vitellogenesis: from basic studies to genetic engineering of antipathogen immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32:1275-86.
- Ramasamy, M. S.; Srikrishnaraj, K. A.; Hadjirin, N.; Perera, S.; Ramasamy, R. 2000. Physiological aspects of multiple blood feeding in the malaria vector *Anopheles tessellatus*. *Journal of Insect Physiology*, 46: 1051-1059.
- Ramos I, 2006. Fusão de grânulos de vitelo durante a embriogênese inicial de insetos modulada por cálcio. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Rio de Janeiro. 95 pp (In Portuguese)

- Reisen, W.K.; Milby, M.M. 1987. Studies on eutogeny in *Culex tarsalis*: 3. Life table attributes of autogenous and anautogenous strains under laboratory conditions. *Journal of the American mosquito control association*, 3: 619-625.
- Rioux, J.A.; Crost, H.; Pech-Perieres, J.; Guilvad, E.; Belmonte, A. 1975. L'autogenese chez le moustique commun *Culex pipiens*. *Annales de parasitologie humaine et comparée*, 50: 134–140.
- Rocha, B.C. 2010. *Estudo da capacidade de infecção de Anopheles aquasalis com Plasmodium gallinaceum como um possível modelo experimental em malária*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais. 75 pp. (In portuguese).
- Rodrigues, I.B. 2006. *Controle da malária: Avaliação da efetividade em laboratório e em campo de formulados de Bacillus sphaericus 2362 nos municípios de Manaus, Iranduba e Novo Airão*. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas. 192 pp (In Portuguese).
- Romans, P.; Bhattacharyya, R.K.; Colavita, A. 1998. Ikirara, a novel transposon family from the malaria vector mosquito, *Anopheles gambiae*. *Insect Molecular Biology*, 7: 1 - 10.
- Romans, P.; Tu, Z.; Ke, Z.; Hagedorn, H.H. 1995. Analysis of a vitellogenin gene of the mosquito, *Aedes aegypti* and comparison to vitellogenins from other organisms. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 25: 939–958.
- Ronchi-Teles, B.; Tadei, W. P., Cruz-Landim, C.; Meirelles J. W. S. 1988. Estudo de mecanismos envolvidos na incorporação de proteínas durante a ovogênese em *Anopheles*. *Acta Amazonica*, 18: 105 – 118.
- Root, P.M. 1926. Studies on Brazilian mosquitoes. I. The anophelines of the Nyssorhynchus group. *American Journal of Hygiene*, 6: 684-717.
- Roth, T.F.; Porter, K.R. 1964. Yolk protein uptake in the oocyte of the mosquito *Aedes aegypti* L. *Journal of Cell Biology*, 20: 313 - 332.
- Santos, J.M.M.; Contel, E.P.B.; Ker, W.E. 1981. Biologia de Anofelinos Amazônicos. I. Ciclo biológico, postura e estádios larvais de *Anopheles darlingi* Root, 1926 (DipteraCulicidae) da Rodovia Manaus - Boa vista. *Acta Amazonia*, 11: 789 - 797.

- Scarpassa V. M.; Tadei, W. P. 1990. Biologia de anofelinos amazônicos. XIII. Estudo do ciclo biológico de *Anopheles nuneztovari* Gabaldon 1940 (Diptera Culicidae). *Acta Amazonia*, 20: 95 – 117.
- Sella, M. 1920. Relazione della campagna anti-anofelica di Fiumicino (1919) con speciale riguardo Allá biologia degli Anofeli Ed agli. Anofeli infetti. *Annal Igiene*, 30: 585.
- Shin, S.W.; Kokoza, V.A.; Raikhel, A.S. 2003. Transgenesis and reverse genetics of mosquito innate immunity. *Journal of Experimental Biology*, 206: 3835 - 3843.
- Silva A.N.M.; dos Santos C.C.B.; Lacerda R.N.L.; Santa Rosa E.P.; de Souza R.T.L.; Galiza D.; Sucupira I.; Conn J.E.; Póvoa M.M. 2006. Laboratory colonization of *Anopheles aquasalis* (Diptera: Culicidae) in Belém, Pará, Brazil. *Journal of Medical Entomology*, 43: 107-109.
- Skipper, J. K.; Hamilton, T. H. 1977. Regulation by estrogen of the vitellogenin gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of American*, 74: 2384-2388.
- Skipper, J.K.; Hamilton, T.H. 1977. Regulation by estrogen of the vitellogenin gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74: 2384 - 2388.
- Tadei, W.P. 1993. Biologia de anofelinos amazônicos. XVIII. Considerações sobre as espécies de *Anopheles* (Culicidae), transmissão e controle da malária na Amazônia. Manaus. *Revista da Universidade do Amazonas*, 2: 1 - 34.
- Tadei, W.P.; Duraty-Thatcher, B. 2000. Malaria vectors in the Brazilian Amazon: of the subgenus *Nyssorhynchus*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical*, 42: 87 - 94.
- 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)*. *Revista Instituto Medicina Tropical*, 30: 221-251.
- Tadei, W.P.; Thatcher, B.D.; Santos, J.M.; Scarpassa, V.M.; Rodrigues, I.B.; Rafael, M.S. 1998. Ecologic observations on *Anopheline* vectors of malaria in the Brazilian Amazon. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 59: 325 - 335.

- Taibe-Lagos, C.B.; Natal, D. 2003. Abundância de culicídeos em área metropolitana preservada e suas implicações epidemiológicas. *Revista Saúde Pública*, 37: 275 - 279.
- Takken, W.; Klowden, M.J.; Chambers, G.M. 1998. Effect of body size on host seeking and blood meal utilization in *Anopheles gambiae* sensu stricto (Diptera: Culicidae): the disadvantage of being small. *Journal Insect Physiology*, 47: 303-310.
- Timmermann, S.E.; Briegel, H. 1993. Water depth and larval density affect development and accumulation of reserves in laboratory populations of mosquitoes. *Bulletin of the Society of Vector Ecology*, 18: 174-187.
- Timmermann, S.E.; Briegel, H. 1999. Larval growth and biosynthesis of reserves in mosquitoes. *Journal of Insect Physiology*, 45: 461 - 470.
- Trpis, M. 1977. Autogeny in Diverse Populations of *Aedes aegypti* from East Africa. *Tropenmedizin und Parasitologie*, 28: 77-82.
- Tufail M.; Takeda, M. 2002. Vitellogenin of the cockroach, *Leucophaea maderae*: nucleotide sequence, structure and analysis of processing in the fat body and oocytes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32: 1469-1476.
- Tufail M.; Takeda, M. 2008. Molecular characteristics of insect vitellogenins. *Journal Insect Physiology*, 54: 1447 - 58.
- Vinogradova, E.B. 1965. Autogenous development of ovaries in blood-sucking mosquitoes. *Zoologische Zhurnal*, 44: 210–219.
- Vlachou D.; Schlegelmilch T.; Runn E.; Mendes A.; Kafatos F.C. 2006. The developmental migration of *Plasmodium* in mosquitoes. *Current Opinion in Genetics & Development*, 16: 384-91.
- Winstanley, P.; Ward, S.; Snow, R.; Brechenridge, A. 2004. Therapy of falciparum malaria in sub-saharan Africa: from molecule to policy. *Clinical Microbiology Reviews*, 17: 612 - 637.
- World Health Organization – WHO. 2010. Malaria. Acesso: <http://www.who.int/topics/malaria/en/>. Data do acesso 20/12/2010.

- Wyatt, G.R.; Locke, J.; Bradfield, J.Y. 1984. The vitellogeningenes for *Locusta migratoria* and other insects. In: Engles W. *Advances in invertebrate reproduction*, vol 3. Elsevier, Amsterdam, 73-80 pp.
- Yakob L.; Bonsall, M.B.; Yan, G. 2010. Modelling knowlesi malaria transmission in humans: vector preference and host competence. *Malaria Journal*, 16: 329.
- Zaia, D.A.M.; Zaia, C.T.B.V.; Lichtig, J. 1998. Determinação de proteínas totais via espectrofometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. *Química Nova*, 21: 787-793.