

ANDRÉ LUIS DA COSTA DA SILVA

**IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE MOLECULAR DE
GENES EXPRESSOS NO FINAL DO CICLO
GONOTRÓFICO DE *Aedes Aegypti***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Margareth de Lara Capurro Guimarães.

**São Paulo
2011**

RESUMO

COSTA-DA-SILVA, A. L. **Identificação e análise molecular de genes expressos no final do ciclo gonotrófico de *Aedes aegypti***. 2011. 186 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

As fêmeas da espécie *Aedes aegypti* apresentam enorme capacidade reprodutiva. Compreender a fisiologia da reprodução deste mosquito, vetor primário dos vírus causadores de dengue e de febre amarela, é uma etapa básica para o desenvolvimento de novos métodos de controle do vetor. Baseado nesta premissa, estudos de expressão gênica durante o ciclo gonotrófico de *Aedes aegypti* foram realizados neste trabalho e foram explorados genes ativados pelo repasto sanguíneo na fase de término do período vitelogênico, uma vez que modificações disparadas pela hematofagia na fase de síntese concentram a maioria dos estudos de expressão gênica diferencial. Depois de varredura em banco de dados, buscas por similaridade, análises comparativas *in silico* e experimentos de RT-PCR, foram encontrados seis genes com expressão elevada na fase de término do período vitelogênico e três deles são expressos em ovários 48 horas após o repasto. Interessantemente, foi mostrado que o gene AAEL01714, anotado *in silico* como codificante para uma proteína ligadora de odor atípica OBP45 (ZHOU et al., 2008), é transcrito nas células foliculares que envolvem os oócitos. Foram sequenciados 2.5 kb da região a montante deste gene e sítios preditos de ligação de fatores de transcrição foram detectados neste fragmento. A caracterização da sequência completa do cDNA do transcrito AAEL010714 levou a identificação de uma fase aberta de leitura (ORF) que, teoricamente traduzida, gera uma proteína com a região C-terminal mais longa em relação à proteína codificada pelo gene AAEL010714, anotada no VectorBase. Assim, a sequência protéica foi nomeada de OBP45B atípica. Experimentos de *Western blot* evidenciaram que esta proteína é sintetizada nos ovários. Este estudo descreve a primeira caracterização molecular de um gene de *Aedes aegypti* que codifica para uma OBP atípica, expressa em ovários.

Palavras-chave: *Aedes aegypti*. Ciclo gonotrófico. Vitelogênese. *In silico*. Expressão gênica. Ovários. OBPs. Mosquitos transgênicos.

ABSTRACT

COSTA-DA-SILVA, A. L. **Identification and molecular analysis of genes expressed at the end of *Aedes aegypti* gonotrophic cycle.** 2011. 186 p. Ph. D. Thesis (Science) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

The females of *Aedes aegypti* species have enormous reproductive capacity. Understanding reproductive physiology of this mosquito, the primary vector of the viruses that cause dengue and yellow fever, is a basic step to develop new vector control methods. Based on this premise, studies on gene expression during *Aedes aegypti* gonotrophic cycle were performed in this work and genes activated by blood meal at the end phase of vitellogenic period were explored, once modifications triggered by hematophagy at the synthesis phase comprise the majority of studies on differential gene expression. After scanning the database, similarity searches, *in silico* comparative analysis and RT-PCR experiments, we found six genes with high expression at the end phase of the vitellogenic period and three of them are expressed in ovaries 48 hours after blood meal. Interestingly, it was shown that the gene AAEL01714, *in silico* annotated as encoding for atypical odorant binding protein OBP45 (ZHOU et al., 2008), is transcribed in the follicle cells surrounding the oocyte. The 2.5 kb upstream region of this gene was sequenced and transcription factors binding sites were predicted in this fragment. Characterization of AAEL010714 full length cDNA led us to identify an open reading frame (ORF), which theoretical translation encodes for a protein with a C-terminal region longer in relation to a protein encoded by the gene AAEL010714, annotated in VectorBase. Thus, the protein sequence originated from ORF theoretical translation was named as atypical OBP45B. *Western blot* experiments showed that this protein is synthesized in the ovaries. This study describes the first molecular characterization of an *Aedes aegypti* gene encoding for an atypical OBP that is expressed in ovaries.

Key words: *Aedes aegypti*. Gonotrophic cycle. Vitellogenesis. *In silico*. Gene expression. Ovaries. OBPs. Transgenic mosquitoes

1 INTRODUÇÃO

1.1 Mosquitos – aspectos gerais

Mosquitos, também conhecidos popularmente como pernilongos são insetos dípteros pertencentes à família Culicidae (CONSOLI e OLIVEIRA, 1994). Esta família monofilética forma um dos grupos taxonômicos menos derivados da ordem Diptera e apresenta 3528 espécies formalmente reconhecidas, que estão classificadas filogeneticamente entre as subfamílias Anophelinae e Culicinae (HARBACH, 2007, 2011). Atualmente, os mosquitos são encontrados em abundância nas regiões tropicais e temperadas do planeta, mas também existem em regiões situadas além do círculo ártico (FANG, 2010; HARBACH, 2011). De fato, um gradiente latitudinal pode ser observado na biodiversidade destes insetos, sendo que a riqueza de espécies aumenta em direção ao equador (FOLEY; RUEDA; WILKERSON, 2007).

O pequeno tamanho e a fragilidade destes organismos são características que refletem na escassez de registros fósseis para o estabelecimento confiável das relações evolutivas da família Culicidae, porém, preservado em âmbar, o membro mais antigo já encontrado desta família possui datação entre 100 a 90 milhões de anos atrás (Figura 1) e estima-se que os culicídeos tenham uma origem ainda mais antiga, no período Jurássico, há cerca de 190 milhões de anos (BORKENT e GRIMALDI, 2004)

Os mosquitos são holometábolos, isto é, realizam metamorfose completa durante o ciclo de vida, que é dividido em fases de ovo, larva, pupa e adulto (Figura 2). De modo geral, a cada ciclo reprodutivo as fêmeas depositam entre 50 a 500 ovos na superfície de corpos de água ou em lugares úmidos potencialmente inundáveis. As larvas sempre aquáticas e com corpo vermiforme eclodem dos ovos submersos e, na maioria das espécies, utilizam material orgânico particulado ou microorganismos presentes na água como alimento. Durante o crescimento, passam por quatro estágios larvais até atingirem a fase de pupa. O processo de metamorfose ocorre nesta fase e o organismo não se alimenta até a emergência dos adultos alados, quando ocorre a transição do meio de vida aquático para o terrestre. Os adultos alados são delicados, possuem o corpo afilado, probóscide, antenas e apêndices compridos e escamas que recobrem quase todas as partes do corpo, muitas vezes formando ornamentações relevantes à identificação e taxonomia. Quando adultos, machos de todas as espécies

utilizam seivas vegetais como alimento exclusivo e o mesmo se aplica para fêmeas de um grande número de espécies. Porém, para fêmeas de muitas outras espécies a anautogenia é conservada, isto é, a alimentação com sangue obtido em vertebrados é imprescindível para produção de ovos. Em contrapartida, a autogenia também é observada em algumas espécies. Nestas, as fêmeas que normalmente realizam repasto sanguíneo podem produzir ovos sem hematofagia. A atividade copulatória pode ser efetuada antes ou após o repasto sanguíneo das fêmeas, e os espermatozoides são armazenados na espermateca para posterior fertilização dos oócitos que acontece durante a oviposição. (CLEMENTS, 1992; CONSOLI e OLIVEIRA 1994, HARBACH, 2007).

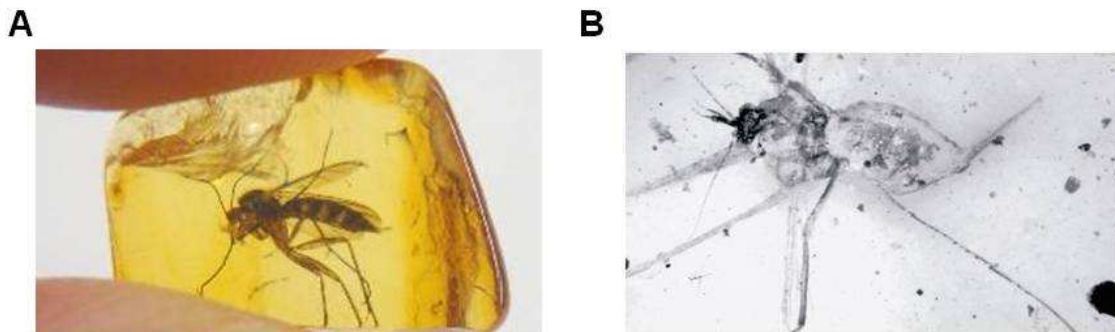


Figura 1 - Preservação de insetos em resina vegetal fossilizada denominada âmbar. **A.** Âmbar contendo inseto é vendido como artigo decorativo. **B.** *Burmaculex antiquus*, o membro mais antigo da família Culicidae foi encontrado preservado em âmbar de Burmese (Myanmar), com datação estimada entre 100 a 90 milhões de anos atrás.
FONTES: **A.** Idigdinos (2011). **B.** Grimaldi; Engel e Nascimbene (2002).

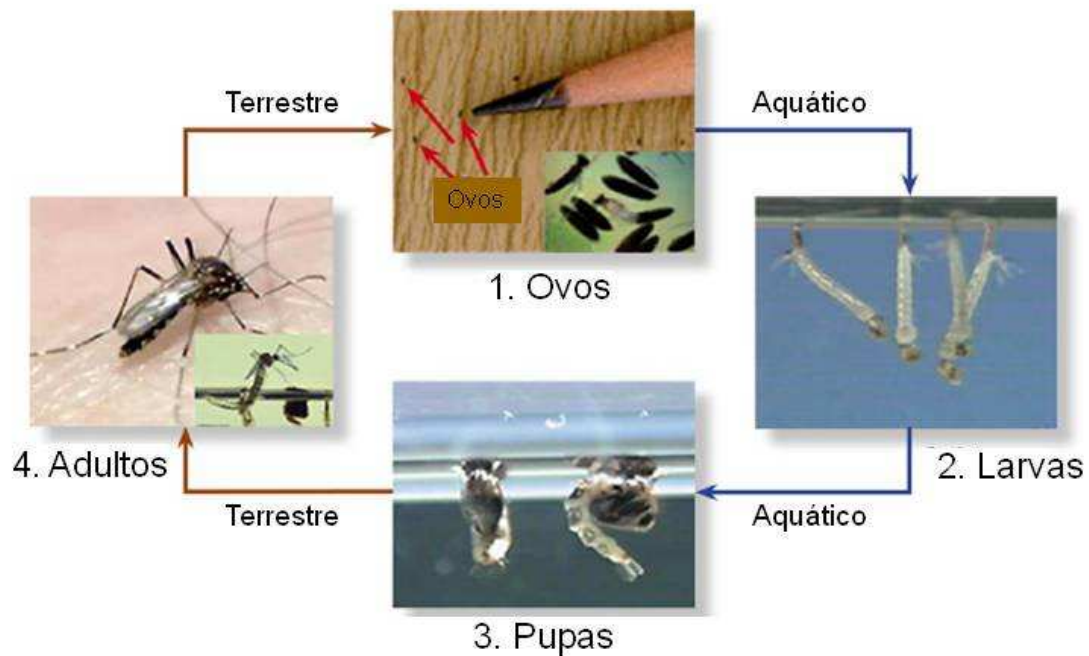


Figura 2 - Ciclo de vida holometábolo de um mosquito, exemplificado pela espécie *Aedes aegypti*. As fêmeas colocam os ovos (1, indicados pelas setas vermelhas) em superfícies internas de recipientes com água. As larvas (2) eclodem quando os ovos entram em contato com a água. As larvas passam por 4 estágios de desenvolvimento (L1, L2, L3 e L4). As larvas L4 transformam-se em pupas (3) e a metamorfose é iniciada. Os adultos (4) emergem das pupas. O ciclo biológico consiste de 2 fases: aquática (larvas e pupas) e terrestre (adultos e ovos). FONTES: CDC (2009); Urdaneta-Marquez e Failloux (2010).

O conhecimento básico acumulado sobre a classificação, história natural, morfologia, fisiologia e ciclo biológico dos mosquitos são vastos nos dias atuais (REY, 2002), mas é interessante notar que uma grande lacuna seria observada se as mesmas informações fossem buscadas no início do século XIX. Decisivamente, a mudança deste paradigma acontece com a associação entre a ocorrência de doenças humanas e atividade hematofágica dos mosquitos, iniciada pela descoberta de Patrick Manson em 1878, que comprovou a transmissão do helminto *Wuchereria bancrofti*, agente etiológico da elefantíase em humanos, pela picada de mosquitos culicíneo do gênero *Culex*. Na última década do século XIX, os estudos de Ronald Ross forneceram as bases para um grupo italiano coordenado por Giovanni Battista Grassi confirmar a transmissão de protozoários do gênero *Plasmodium*, causadores da malária humana, por mosquitos anofelinos do gênero *Anopheles*. Nesta mesma década, Carlos Juan

Finlay e a equipe de Walter Reeds confirmaram a transmissão do vírus da febre amarela pelo mosquito culicíneo *Aedes aegypti*, inseto que também foi caracterizado também como vetor do vírus dengue na primeira década do século XX. Em períodos praticamente concomitantes, estas descobertas revelaram que helmintos, protozoários e vírus eram transmitidos aos humanos por mosquitos, sendo marcos cruciais que levaram ao surgimento da entomologia médica e posterior efervescência e expansão dos estudos científicos acerca da família Culicidae no século XX (CARDOSO, 2010, HENCHAL e PUTNAK, 1990; SANJAD, 2003;).

No início do século XXI, a comunidade científica especializada em mosquitos foi agraciada com a conclusão dos projetos de sequenciamento dos genomas de *Anopheles gambiae* no ano de 2002, *Aedes aegypti* em 2007 e *Culex quinquefasciatus* em 2010 (ARENSBURGER et al., 2010; HOLT et al., 2002; NENE et al., 2007), sendo respectivamente espécies representantes dos gêneros *Anopheles*, *Aedes* e *Culex*. Os três estudos que relatam a conclusão dos genomas das três espécies foram publicados no jornal acadêmico *Science*, um dos mais prestigiados do mundo. Destes, dois trabalhos foram capas de edição (Figura 3 A e B), simbolizando a importância das descobertas publicadas.

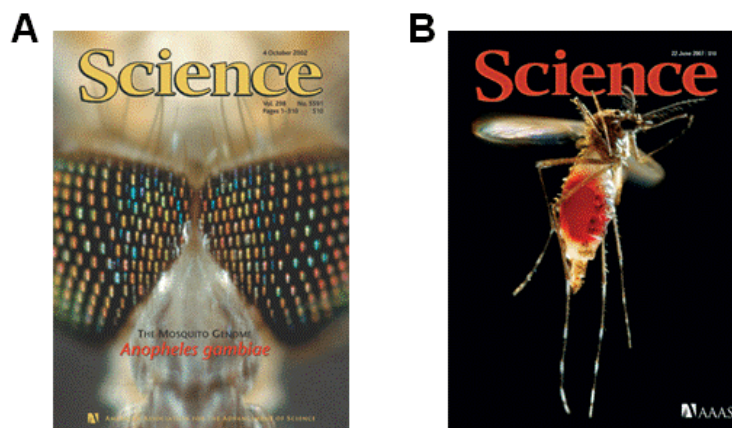


Figura 3 - Capas de 2 edições do jornal acadêmico *Science*, com destaque para a conclusão do sequenciamento dos genomas de duas espécies de mosquitos. **A.** Edição de outubro de 2002, publicando o artigo sobre o genoma de *Anopheles gambiae*. **B.** Edição de junho de 2007, publicando o artigo sobre o genoma de *Aedes aegypti*.
FONTE: Science AAAS (2011).

Assim, a disponibilidade das informações genômicas oferece para este século uma perspectiva incomparável para o estudo aprofundado da biologia básica e evolução dos organismos sequenciados e das outras espécies pertencentes aos três gêneros mais intensivamente estudados da família Culicidae (BESANSKY e COLLINS, 1992; WATERHOUSE; WYDER; ZDOBNOV, 2008). Segundo Harbach (2007), menos de 150 espécies contidas nestes três gêneros são as principais vetoras de agentes etiológicos causadores de doenças humanas, o que equivale a menos de 4% das espécies descritas da família Culicidae. Porém, as mesmas causam indiretamente mais morbidade e mortalidade em humanos se comparadas a qualquer outro grupo de organismos.

1.2 *Aedes aegypti*

O culicíneo *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) é autóctone do continente africano, mas atualmente está presente nas regiões tropicais e subtropicais do planeta (Figura 4) (CONSOLI e OLIVEIRA 1994; FORATTINI, 2002; REY, 2002). A expansão da distribuição geográfica desta espécie relaciona-se inicialmente ao crescimento das atividades comerciais nos séculos XVII e XVIII, fato que contribuiu para a dispersão passiva deste mosquito (GUBLER, 2004). Segundo Natal (2002) o comércio de pneus usados, os quais são utilizados como sítios para oviposição, também favorece a dispersão geográfica da espécie e as constantes reinfestações em países tropicais, sendo que estudos genéticos de populações de *Aedes aegypti* das Américas e do Brasil sugerem introduções múltiplas do mosquito no continente americano (BRACCO et al., 2007; DA COSTA-DA-SILVA; CAPURRO; BRACCO, 2005; URDANETA-MARQUEZ e FAILLOUX, 2010; PADUAN KDOS e RIBOLLA, 2008). Somado a estes fatores, as mudanças demográficas após intenso fluxo migratório rural-urbano nos países subdesenvolvidos após o fim da segunda guerra mundial, geraram processo desordenado de urbanização. A infra-estrutura e saneamento básico deficientes nestes ambientes modernos fornecem condições adequadas para a infestação do mosquito (TAUIL, 2001).

O adulto alado de *Aedes aegypti* exibe coloração escura, com listras e manchas brancas e é facilmente identificável através de uma ornamentação em forma de lira na região do escudo, composta por escamas branco-prateadas (Figura 5). É um mosquito domiciliado, antropofílico, que apresenta hábitos diurnos de atividade e está adaptado a viver em ambientes urbanos, sobretudo em grandes cidades com aglomerações populacionais. Esta espécie encontra em ambientes doméstico-urbanos uma variedade de criadouros artificiais para o desenvolvimento de suas formas imaturas e as fêmeas possuem preferência em realizar a alimentação sanguínea em humanos. Por estes aspectos biológicos e comportamentais, o mosquito *Aedes aegypti* é conhecido por ser o culicídeo mais fortemente associado e dependente do homem (CONSOLI e OLIVEIRA 1994; NATAL, 2002; REY, 2002; TAUIL, 2001).

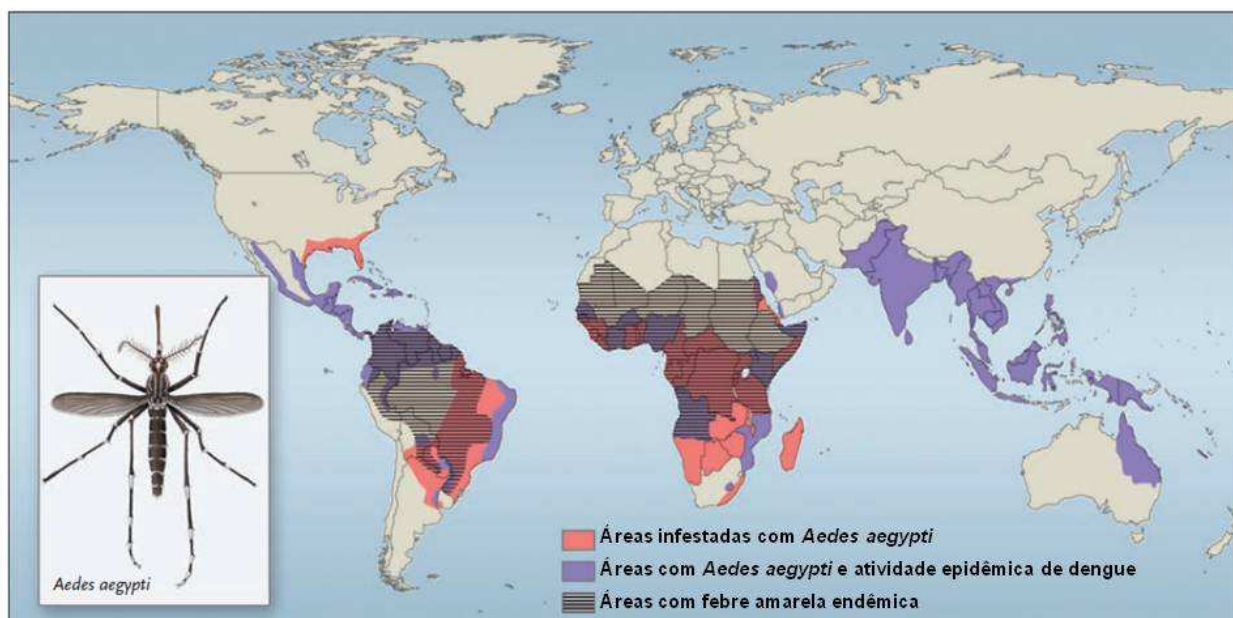


Figura 4 - Distribuição mundial de dengue, febre amarela e do mosquito *Aedes aegypti*, vetor principal dos agentes etiológicos de ambas as doenças.
FONTE: Modificado de Monath (2007).



Figura 5 - Identificação do mosquito adulto de *Aedes aegypti* através da ornamentação em forma de lira. **A.** Instrumento de corda denominado lira. **B.** Uma fêmea da espécie *Aedes aegypti*. A seta amarela indica a região do escudo, com escamas branco prateadas formando o desenho de uma lira. **C.** A figura mostra a região do escudo em detalhe. FONTES: **A.** University of South Dakota (USD) (1996). **B.** Lawson et al. (2009). **C.** Walker (2008).

Do ponto de vista humano, mais complexo que as interações sinantrópicas que *Aedes aegypti* estabelece, são os problemas indiretos que este mosquito causa à saúde da espécie *Homo sapiens*. Isto porque o mosquito *Aedes aegypti* é considerado o principal vetor urbano do vírus da febre amarela e dos 4 sorotipos do vírus dengue (GUBLER, 2002).

A febre amarela já provocou epidemias devastadoras nos séculos XVI, XVII e XVIII no mundo, culminando no aprofundamento dos estudos da doença e no desenvolvimento das primeiras vacinas na década de 30 do século passado (BARRETT e HIGGS, 2007). Muito embora atualmente a vacina 17D seja utilizada no mundo para prevenção da febre amarela (BARRETT e HIGGS, 2007; SELIGMAN e GOLD, 2004; VASCONCELOS, 2003;), as ocorrências de casos da doença cresceram nas duas últimas décadas, sendo relatados pequenos surtos epidêmicos nas regiões tropicais (Figura 4) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2011).

Já o dengue é considerado a mais grave arbovirose que afeta o homem e os casos da doença têm aumentado drasticamente nas últimas décadas no mundo. Estima-se que 2,5 bilhões de pessoas vivam em áreas de risco onde mais de 50

milhões de pessoas são infectadas anualmente (Figura 4). Destas, dezenas de milhares de casos são caracterizados por manifestações graves da doença (dengue hemorrágica/síndrome do choque da dengue) com consideráveis taxas de fatalidade (WHO, 2009). Atualmente, não há drogas antivirais disponíveis para o tratamento clínico desta doença (SAMPATH e PADMANABHAN, 2010), nem uma vacina tetravalente para prevenção. Contudo, nove vacinas candidatas estão em fase de desenvolvimento, com duas delas em estágios avançados de testes em humanos (GUZMAN et al., 2010).

Desta forma, o único elo vulnerável na cadeia epidemiológica de dengue é o vetor *Aedes aegypti*. Conseqüentemente, este mosquito é o principal alvo no controle da transmissão do agente etiológico da doença em busca da diminuição das epidemias no mundo.

Geralmente, as estratégias tradicionais usadas no combate ao mosquito resumem-se em atividades preventivas, como a eliminação de criadouros e adoção de medidas comunitárias de conscientização (manejo ambiental), utilização de predadores de larvas (controle biológico) e, principalmente, aplicação estratégica ou emergencial de inseticidas químicos (controle químico) (WHO, 2009).

Esses programas eventualmente não resultam num nível seguro de manutenção de baixas densidades populacionais do mosquito, devido à complexidade de fatores envolvidos na implementação operacional eficaz destas ações (TAUIL, 2001) e a problemas relacionados com a seleção e surgimento de linhagens de *Aedes aegypti* resistentes aos inseticidas utilizados maciçamente no combate (HEMINGWAY, 2000; RODRÍGUEZ et al., 2003; STRODE, 2008), havendo assim um constante risco de transmissão de dengue (MARÇAL JUNIOR e SANTOS, 2004). Além disso, o efeito residual dos inseticidas no meio ambiente e a ação em organismos não-alvos restringem a ampla utilização deste método (IYANIWURA, 1991).

Os inseticidas biológicos, compostos por toxinas da bactéria *Bacillus thuringiensis* subespécie *israelensis* (*Bti*), constituem alternativas seguras aos inseticidas químicos para uso no controle das larvas de *Aedes aegypti*. Entretanto, a persistência destas toxinas no ambiente favorece a seleção de linhagens resistentes do

mosquito e evidências deste processo começam a ser observadas para esta classe de inseticida (PARIS et al., 2011).

Métodos genéticos de supressão e substituição das populações do mosquito surgem como alternativas promissoras de controle e atualmente estão em etapas de aperfeiçoamento para a utilização em programas de manejo integrado de *Aedes aegypti* (JANSEN e BEEBE, 2010; SPERANÇA e CAPURRO, 2007). A estratégia genética de supressão de população utilizando mosquitos transgênicos é um aperfeiçoamento da técnica do inseto estéril (*sterile insect technique* - SIT) (KNIPLING, 1955), e consiste na liberação em massa de machos transgênicos que carregam um gene letal dominante (ALPHEY et al., 2010). Os machos transgênicos liberados cruzam com as fêmeas selvagens, e a prole gerada é inviável, levando a população alvo ao declínio (ALPHEY et al., 2010; HORN e WIMMER, 2003). Já a estratégia de substituição não objetiva a redução da população, mas em contrapartida, os mosquitos transgênicos liberados ao cruzarem com as fêmeas selvagens, transmitem a prole alelos que bloqueiam a infecção do mosquito pelo vírus dengue (SPERANÇA e CAPURRO, 2007).

Através de sistemas baseados em elementos de transposição (ADELMAN; JASINSKIENE; JAMES, 2002; CHEN; MATHUR; JAMES, 2008; SPERANÇA e CAPURRO, 2007), genes quiméricos com atividade antiviral para construção de linhagens transgênicas destinadas à substituição de populações (FRANZ et al., 2006; TRAVANTY et al., 2004), ou genes dominantes letais para produção de insetos para supressão populacional (ALPHEY, 2002; ALPHEY e ANDREASEN, 2002; HORN e WIMMER, 2003; PHUC et al., 2007) são incorporados ao genoma de *Aedes aegypti*, através da técnica de microinjeção (JASINSKIENE; JUHN; JAMES, 2007). Estas moléculas efetoras são controladas por promotores gênicos tecido- e/ou estágio-específico, que ativam os genes efetores em momentos precisos do estágio de vida do mosquito ou de interação do hospedeiro invertebrado e o patógeno (SPERANÇA e CAPURRO, 2007).

Além de linhagens transgênicas de *Aedes aegypti* supressoras de população (ALPHEY et al., 2010; PHUC et al., 2007), mosquitos transgênicos imunes à infecção pelo vírus dengue também já foram gerados (FRANZ et al., 2006; TRAVANTY et al., 2004), mas os denominados *gene drive mechanisms*, isto é, estratégias de introdução

dos mosquitos modificados e fixação dos alelos efetores nas populações naturais ainda estão em desenvolvimento (JAMES, 2005; MARSHALL, 2009; SINKINS e GOULD, 2006). Portanto, linhagens transgênicas de *Aedes aegypti* voltadas à supressão de populações constituem a mais proeminente alternativa genética para o controle deste mosquito, uma vez que esta estratégia não necessita de introdução e fixação de alelos na população a ser suprimida (PHUC et al., 2007), e testes estão sendo realizados em diversos países, com resultados promissores já obtidos nas ilhas Caiman (ENSERINK, 2010).

Mesmo com perspectivas promissoras para geração de novos métodos, o arsenal atual de ferramentas para o controle deste mosquito é bastante limitado e ineficiente. Como alternativa a este problema, aprofundar o conhecimento da biologia básica de *Aedes aegypti* é passo fundamental para o desenvolvimento e aprimoramento de alternativas inovadoras que possam ser aplicadas aos programas de controle do vetor (CHEN; MATHUR; JAMES, 2008; MEGY et al., 2009; WATERHOUSE; WYDER; ZDOBNOV, 2008).

1.3 Alimentação sanguínea, vitelogênese e produção de ovos

Ao contrário de mosquitos autógenos, capazes de realizar pelo menos um ciclo gonotrófico sem repasto sanguíneo (TELANG e WELLS, 2004), as fêmeas de *Aedes aegypti* são exclusivamente anautógenas, sendo a alimentação sanguínea obrigatória na obtenção de nutrientes necessários ao desenvolvimento dos ovários e maturação dos ovos. Assim, o repasto sanguíneo constitui um processo fisiológico essencial no ciclo de vida desta espécie. Em contrapartida, este modo alimentar acarreta na habilidade de transmissão de arboviroses e outros patógenos, obtidos de um vertebrado infectado (CONSOLI e OLIVEIRA, 1994; BRIEGEL, 2003).

Agravando esta situação, ao buscarem um repasto sanguíneo satisfatório, as fêmeas de *Aedes aegypti*, frequentemente fazem alimentações curtas em mais de um hospedeiro humano até o engurgitamento completo (Figura 6) (CONSOLI e OLIVEIRA, 1994). Embora Smith et al. (2004), utilizando modelos matemáticos, tenham demonstrado que a proporção de mosquitos infectados depende principalmente da

estrutura etária de suas populações, havendo taxas de infecções mais altas quando mosquitos mais velhos são encontrados, os autores consideraram que predições realísticas devem levar em conta o modo de procura por alimentação sanguínea. Como consequência, o comportamento alimentar das fêmeas de *Aedes aegypti* aumenta a probabilidade de contaminação do mosquito por um hospedeiro vertebrado reservatório, enquanto que fêmeas infectadas podem amplificar a disseminação de vírus em apenas uma investida alimentar completa.

Uma fêmea de *Aedes aegypti* pode ingerir de 3 a 5 vezes seu respectivo peso corpóreo em sangue durante o repasto no hospedeiro vertebrado (ALVARENGA, 2005; JONES e MADHUKAR, 1974) e muito mais do que a alteração morfológica que ocorre no abdômen (Figura 6), a alimentação sanguínea causa mudanças drásticas no metabolismo basal de fêmeas ingurgitadas (DISSANAYAKE et al., 2010; FEITOSA et al., 2006; SANDERS et al., 2003).

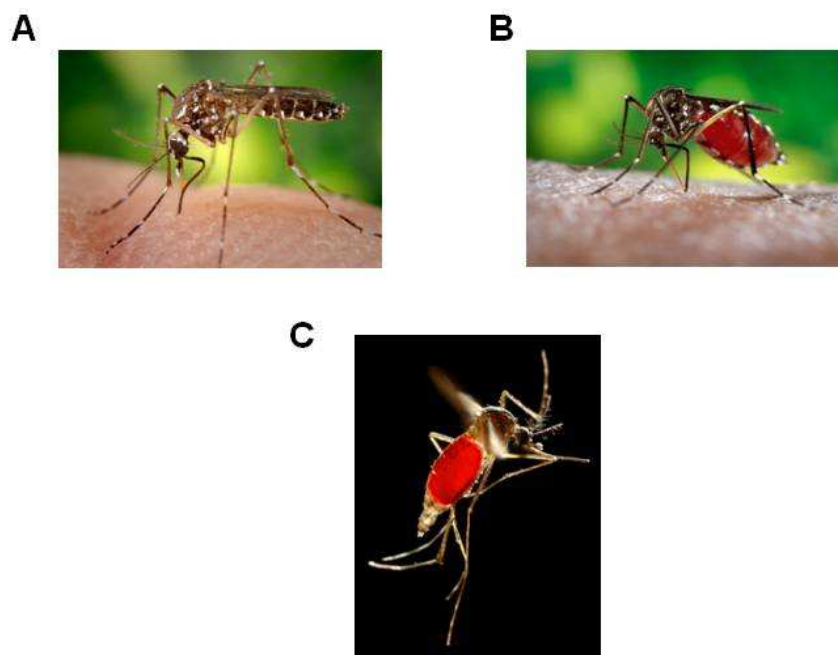


Figura 6 - Fêmeas de *Aedes aegypti* durante e após o processo de hematofagia, com marcante alteração morfológica no abdômen. **A.** A fêmea inicia o repasto sanguíneo em vertebrado. **B.** Fêmea ao final do repasto, com intestino repleto de sangue. **C.** Fêmea, voando após repasto sanguíneo e completo ingurgitamento.

FONTE: James Gathany, Center for Disease Control Public Health Image Library, 2008.

Processos fisiológicos desencadeados após o repasto sanguíneo e aspectos endócrinos envolvidos no ciclo gonotrófico foram estudados extensivamente em *Aedes aegypti* (KLOWDEN, 1997; RAIKHEL, 1987; 1992; RAIKHEL e DHADIALLA, 1992; SAPPINGTON et al., 1998) e trabalhos modernos vêm desvendando os mecanismos moleculares que regulam a produção de vitelo e desenvolvimento dos ovos nesta espécie (ATTARDO et al., 2006; ATTARDO; HANSEN; RAIKHEL, 2005; BRYANT; MACDONALD; RAIKHEL, 2010; CHEN et al., 2004; CRUZ et al., 2009; RAIKHEL et al., 2002; RIEHLE e BROWN, 2002; SUN et al., 2002; SUN; ZHU; RAIKHEL, 2004; ZHU; CHEN; RAIKHEL, 2007).

A vitelogênese, processo de síntese, transporte e acúmulo de proteínas precursoras de vitelo é fundamental para biologia reprodutiva do mosquito. Neste processo, o corpo gorduroso (tecido metabólico dos insetos, análogo ao tecido adiposo e ao fígado dos vertebrados) sintetiza e secreta vitelogenina, carboxipeptidase vitelogênica, catepsina B e lipoforina (as principais proteínas precursoras de vitelo) na hemolinfa, que são incorporadas nos ovócitos em desenvolvimento (Figura 7) (RAIKHEL et al., 2002). A vitelogênese é controlada pela ação do hormônio 20-hidroxiecdisona (RAIKHEL et al., 2002) e recentemente foi mostrado que o corpo gorduroso depende de sinais nutricionais provenientes de aminoácidos para produção das proteínas precursoras de vitelo (Figura 7) (HANSEN et al., 2004)

Resumidamente, a vitelogênese em *Aedes aegypti* pode ser dividida em dois períodos diferenciados: pré-vitelogênico e vitelogênico (Figura 7). O período pré-vitelogênico ocorre antes da ingestão de sangue pela fêmea adulta e corresponde a uma fase preparatória, quando o corpo gorduroso e os ovários são amadurecidos pela atuação do hormônio juvenil III (JH III) nos 3 primeiros dias após a emergência das fêmeas adultas (Figura 7). Após este período, o corpo gorduroso e ovários tornam-se competentes para o período vitelogênico, e a fêmea então entra em um estado de espera, passando para o período vitelogênico somente após a alimentação sanguínea (Figura 7).

O período vitelogênico pode ser subdividido em duas fases: síntese e terminação. A fase sintética é iniciada imediatamente após o repasto (Figura 7). A distensão abdominal causada pelo volume ingerido associada a fatores do sangue ainda não

completamente conhecidos estimulam células neurosecretoras cerebrais a liberarem o hormônio ecdisiotrópico ovariano (Figura 7). Este neuro-hormônio atua nos ovários e estimula as células foliculares epiteliais a produzirem o hormônio ecdisona, que é liberado na hemolinfa e atinge as células do corpo gorduroso. Neste tecido, ocorre a conversão de ecdisona na forma ativa 20-hidroxiecdisona (Figura 7). O hormônio 20-hidroxiecdisona liga-se em receptores nucleares, formando um complexo de transativação que regula hierarquicamente a expressão de fatores de transcrição e genes envolvidos na produção de proteínas precursoras de vitelo pelo corpo gorduroso (Figura 7 e Figura 8). Além disso, nesta fase acontece a ativação dos ovários, para captação dessas proteínas nos oócitos (Figura 7), através de endocitose mediada por receptor e armazenamento em forma de grânulos de vitelo. A fase de síntese do período vitelogênico ocorre durante as primeiras 30 horas após a ingestão de sangue, sendo que os maiores níveis de 20-hidroxiecdisona são detectados entre 18 a 20 horas após o repasto (Figura 8). A queda dos níveis de 20-hidroxiecdisona na hemolinfa leva à fase de término do período vitelogênico, que se inicia em torno de 30 horas após o repasto sanguíneo, culminando com a diminuição da expressão e síntese de proteínas precursoras de vitelo pelo corpo gorduroso (Figura 8). Nesta fase, ocorre produção do córion para maturação dos ovos e o corpo gorduroso volta ao seu estado pré-vitelogênico. A expressão das proteínas precursoras de vitelo atinge níveis basais 48 horas após o repasto (Figura 8) e as fêmeas tornam-se aptas à oviposição 72 horas após o repasto sanguíneo, quando o ciclo gonotrófico é finalizado (ATTARDO; HANSEN; RAIKHEL, 2005; RAIKHEL, 1992; RAIKHEL et al., 2002; RAIKHEL e DHADIALLA, 1992; KLOWDEN, 1997).

Ao final do ciclo gonotrófico, as fêmeas de *Aedes aegypti* podem produzir centenas de ovos (CLEMENTS, 1992). Esta alta capacidade reprodutiva em um curto período de tempo também resulta na dificuldade de controlar populações desta espécie (ATTARDO; HANSEN; RAIKHEL, 2005). Nesse sentido, afetar esta fase do ciclo de vida do mosquito constitui um ponto interessante para elaboração de novos métodos de controle (CHEN; MATHUR; JAMES, 2008) e implica primeiramente na identificação e caracterização de genes envolvidos na fisiologia reprodutiva de *Aedes aegypti*, constituindo etapas básicas na busca de alvos moleculares.

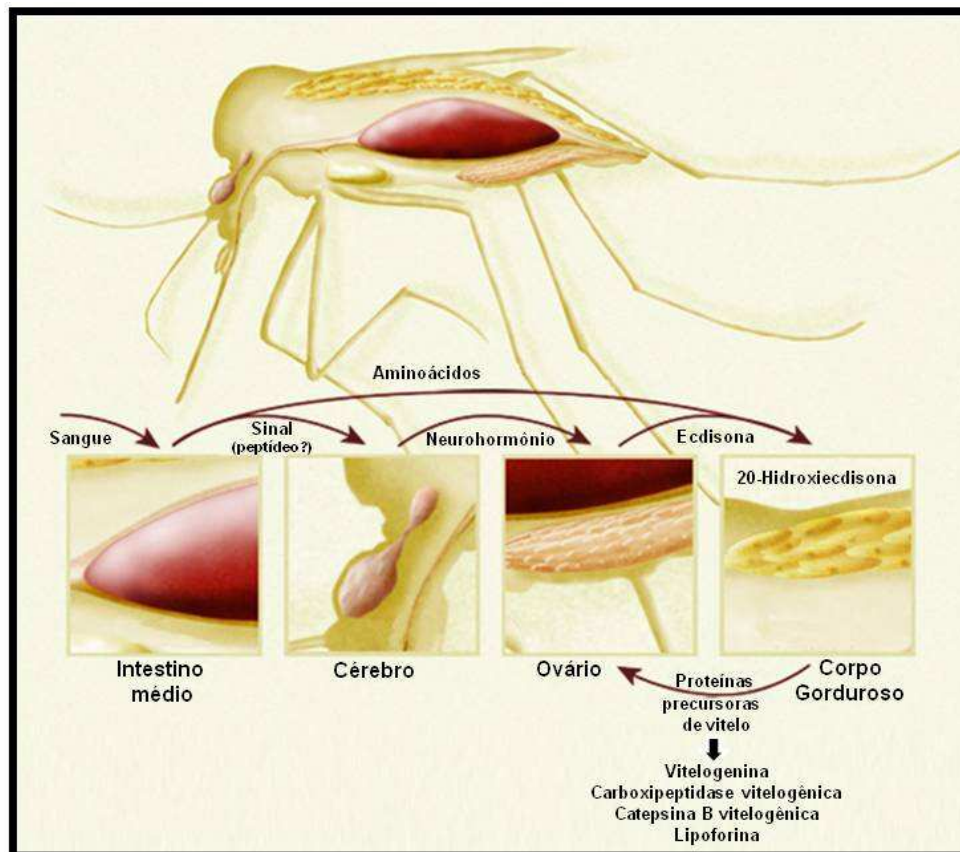


Figura 7 - Diagrama esquemático do processo de vitelogênese, disparado pelo repasto sanguíneo. Após ingestão do sangue, o cérebro recebe um sinal para secreção de um neuro-hormônio que estimula os ovários a produzirem ecdisona. A ecdisona é convertida em 20-hidroiecdisona no corpo gorduroso, e este hormônio ativa direta e indiretamente a expressão de genes que codificam as principais proteínas precursoras de vitelo. O corpo gorduroso também necessita de sinalização de aminoácidos livres para iniciar a síntese das proteínas.
 FONTE: Modificado de Attardo e D'Amico (2011).

Com esta perspectiva, a fase de síntese do período vitelogênico (Figura 8) tem sido bastante explorada em nível molecular. Além da caracterização dos perfis de expressão de genes imediatamente ativados no corpo gorduroso após o repasto sanguíneo (Figura 8, genes revisados em RAIKHEL et al., 2002), vários estudos têm investigado e caracterizado genes expressos restritamente (estágio-específicos) ou que tenham seus níveis transcricionais significativamente aumentados após a ingestão

sanguínea no intestino (NORIEGA e WHELLES, 1999, SMARTT et al., 1998; EDWARDS et al., 2000) e ovários (EDWARDS; SEVERSON; HAGEDORN, 1998; FERDIG et al., 1996, 2000), descrevendo seus respectivos padrões temporais e quantitativos de expressão ao longo da fase de síntese do período vitelogênico.

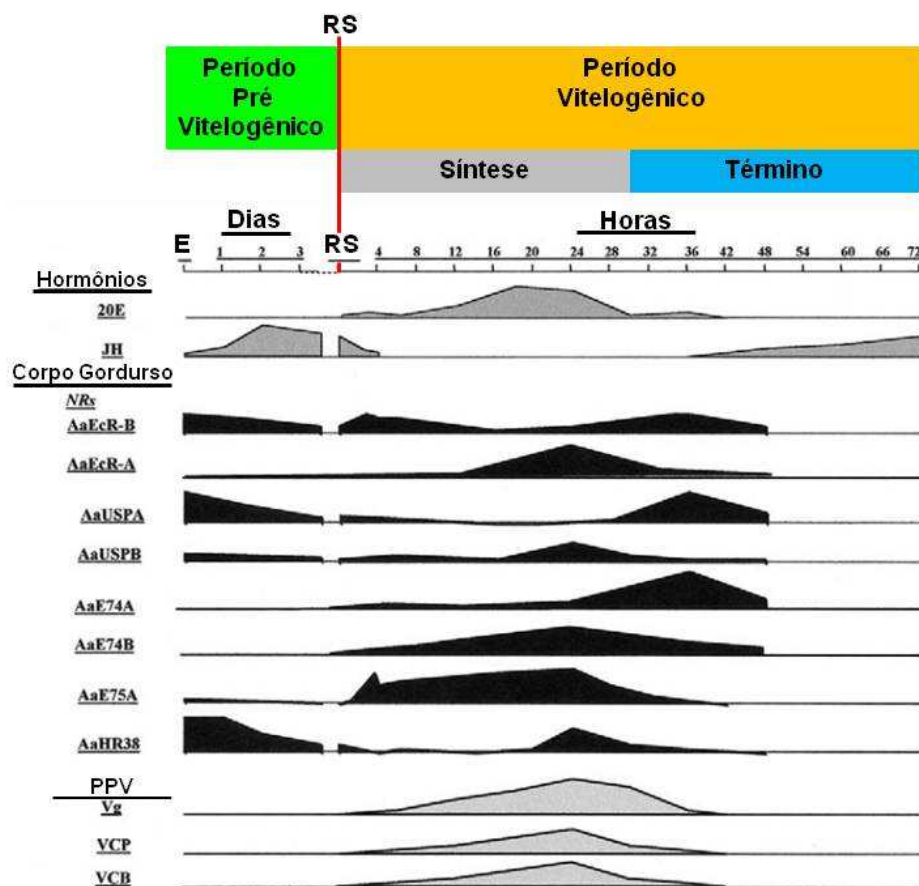


Figura 8 - Representação esquemática dos títulos de hormônios e níveis de transcrição de genes envolvidos na cascata hierárquica disparada pela alimentação sanguínea de *Aedes aegypti*, durante os períodos do processo de vitelogênese. Os títulos dos hormônios juvenil (JH) e 20-hidroxieclicidona (20E) estão representados em cinza-escuro. Os níveis de transcrição dos receptores nucleares (NRs) estão indicados em preto, e das principais proteínas precursoras de vitelo (PPV) vitelogenina (Vg), carboxipeptidase vitelogênica (VCP) e catepsina B vitelogênica (VCB) estão mostrados em cinza-claro. E: Emergência do adulto. RS: Repasto sanguíneo.

FONTE: Modificado de Raikhel et al. (2002).

Embora alguns trabalhos tenham explorado a expressão global de genes durante alguns intervalos durante o processo de vitelogênese em diferentes tecidos como o corpo gorduroso (FEITOSA et al., 2006), intestino médio (SANDERS et al., 2003) e glândula salivar (THANGAMANI e WIKEL, 2009), ainda existe considerável falta de informação acerca de genes restritamente ativados e altamente expressos na fase de término do período vitelogênico, sobretudo 48 horas após o repasto sanguíneo, quando os níveis de transcrição dos principais genes envolvidos na fase de síntese da vitelogênese retornam à patamares não detectáveis (Figura 8). Recentemente, Dissanayake et al. (2010) analisaram as mudanças de expressão de 16.222 transcritos de *Aedes aegypti* em fêmeas sem repasto ou após a alimentação sanguínea, através da técnica de microarranjo. Neste estudo global dos níveis de transcrição dos genes presentes no genoma do mosquito, além de mostraram que 30% destes transcritos variam seus níveis de acúmulo após o repasto, os autores concluíram que a maioria da variação ocorre 48 horas após o repasto.

Sendo assim, a proposta principal do presente estudo foi identificar genes com expressão tardia no ciclo gonotrófico de *Aedes aegypti* (48 horas após o repasto), assim como caracterizar os perfis de expressão dos respectivos transcritos. Sob a hipótese de que estes genes tardios tenham funções relacionadas à reprodução do mosquito, a identificação e caracterização dos mesmos, além de preencher uma lacuna de informação molecular no processo de vitelogênese, poderão fornecer conhecimento básico para o desenvolvimento de estratégias para interrupção do sucesso reprodutivo das fêmeas de *Aedes aegypti*.

6 CONCLUSÕES

A estratégia comparativa de busca *in silico*, delineada no início do projeto forneceu um método eficiente para identificação de genes expressos tardiamente no ciclo gonotrófico de *Aedes aegypti*. Seis genes foram identificados e exibem elevada transcrição 48 horas após o repasto sanguíneo. Três genes são ativados especificamente em fêmeas, com altos níveis de transcrição em ovários 48 horas após o repasto. Este trabalho também reportou a primeira caracterização molecular de uma proteína ligadora de odor (OBP) atípica de *Aedes aegypti*, através da obtenção da sequência completa do transcrito, da descrição do perfil de transcrição e da localização do RNAm. Além disso, foi demonstrada forte evidência da expressão desta proteína nos ovários durante a fase de término do período vitelogênico de *Aedes aegypti*. Embora estudos ainda sejam necessários para confirmação, o presente trabalho sugere que esta OBP atípica possa ter alguma função na formação da casca dos ovos (córion) de *Aedes aegypti*. Por fim, estes resultados fornecem uma grande contribuição para a compreensão molecular dos mecanismos reprodutivos básicos desta espécie, sobretudo durante o processo de vitelogênese, fundamental para a manutenção do ciclo de vida de *Aedes aegypti*.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS¹

ADELMAN, Z. N.; JASINSKIENE, N.; JAMES, A. A. Development and applications of transgenesis in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 121, n. 1, p. 1-10, 2002.

AHMED, A. M.; HURD, H. Immune stimulation and malaria infection impose reproductive costs in *Anopheles gambiae* via follicular apoptosis. **Microbes Infect.**, v. 8, n. 2, p. 308-315, 2006.

ALPHEY, L. Re-engineering the sterile insect technique. **Insect. Biochem. Mol. Biol.**, v. 32, n. 10, p. 1243-1247, 2002.

ALPHEY, L.; ANDREASEN, M. Dominant lethality and insect population control. **Mol. Biochem. Parasitol.** v. 121, n. 2, p. 173-178, 2002.

ALPHEY, L.; BENEDICT, M.; BELLINI, R.; CLARK, G. G.; DAME, D. A.; SERVICE, M. W.; DOBSON, S. L. Sterile-insect methods for control of mosquito-borne diseases: an analysis. **Vector Borne Zoonotic Dis.**, v. 10, n. 3, p. 295-311, 2010.

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **J. Mol. Biol.**, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.

ALVARENGA, P. H. **Estudo dos mecanismos de ligação de heme à matriz peritrófica de *Aedes aegypti***. 2005. 154 f. Tese (Doutorado em Química Biológica) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2005.

AMENYA, D. A.; CHOW, W.; LI, J.; YAN, G.; GERSHON, P. D.; JAMES, A. A.; MARINOTTI, O. Proteomics reveals novel components of the *Anopheles gambiae* eggshell. **J. Insect. Physiol.**, v. 56, n. 10, p. 1414-1419, 2010.

¹ De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

- ARAUJO, R. V.; MACIEL, C.; HARTFELDER, K.; CAPURRO, M. L. Effects of *Plasmodium gallinaceum* on hemolymph physiology of *Aedes aegypti* during parasite development. **J. Insect. Physiol.**, v. 57, n. 2, p. 265-273, 2011.
- ARENSBURGER, P.; MEGY, K.; WATERHOUSE, R. M.; ABRUDAN, J.; AMEDEO, P.; ANTELO, B.; BARTHOLOMAY, L.; BIDWELL, S.; CALER, E.; CAMARA, F.; CAMPBELL, C. L.; CAMPBELL, K. S.; CASOLA, C.; CASTRO, M. T.; CHANDRAMOULISWARAN, I.; CHAPMAN, S. B.; CHRISTLEY, S.; COSTAS, J.; EISENSTADT, E.; FESCHOTTE, C.; FRASER-LIGGETT, C.; GUIGO, R.; HAAS, B.; HAMMOND, M.; HANSSON, B. S.; HEMINGWAY, J.; HILL, S. R.; HOWARTH, C.; IGNELL, R.; KENNEDY, R. C.; KODIRA, C. D.; LOBO, N. F.; MAO, C.; MAYHEW, G.; MICHEL, K.; MORI, A.; LIU, N.; NAVEIRA, H.; NENE, V.; NGUYEN, N.; PEARSON, M. D.; PRITHAM, E. J.; PUIU, D.; QI, Y.; RANSON, H.; RIBEIRO, J. M.; ROBERSTON, H. M.; SEVERSON, D. W.; SHUMWAY, M.; STANKE, M.; STRAUSBERG, R. L.; SUN, C.; SUTTON, G.; TU, Z. J.; TUBIO, J. M.; UNGER, M. F.; VANLANDINGHAM, D. L.; VILELLA, A. J.; WHITE, O.; WHITE, J. R.; WONDJI, C. S.; WORTMAN, J.; ZDOBNOV, E. M.; BIRREN, B.; CHRISTENSEN, B. M.; COLLINS, F. H.; CORNEL, A.; DIMOPOULOS, G.; HANNICK, L. I.; HIGGS, S.; LANZARO, G. C.; LAWSON, D.; LEE, N. H.; MUSKAVITCH, M. A.; RAIKHEL, A. S.; ATKINSON, P. W. Sequencing of *Culex quinquefasciatus* establishes a platform for mosquito comparative genomics. **Science**, v. 330, n. 6000, p. 86-88, 2010.
- ARMBRUSTER, P.; WHITE, S.; DZUNDZA, J.; CRAWFORD, J.; ZHAO, X. Identification of genes encoding atypical odorant-binding proteins in *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). **J. Med. Entomol.**, v. 46, n. 2, p. 271-280, 2009.
- ATTARDO, G. M.; HANSEN, I. A.; SHIAO, S. H.; RAIKHEL, A. S. Identification of two cationic amino acid transporters required for nutritional signaling during mosquito reproduction. **J. Exp. Biol.**, v. 209, pt. 16, p. 3071-3078, 2006.
- ATTARDO, G. M.; HANSEN, I. A.; RAIKHEL, A. S. Nutritional regulation of vitellogenesis in mosquitoes: implications for anautogeny. **Insect. Biochem. Mol. Biol.**, v. 35, n. 7, p. 661-675, 2005.
- ATTARDO, G. M.; D'AMICO, V. **Key Point Graphics**. 2011. Disponível em: <http://www.keypointgraphics.com/portfolio/pf_blood_meal_activation.jpg>. Acesso em: 10 fev. 2011.
- BARRETT, A. D.; HIGGS, S. Yellow fever: a disease that has yet to be conquered. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 52, p. 209-229, 2007.

BESANSKY, N. J.; COLLINS, F. H. The mosquito genome: organization, evolution and manipulation. **Parasitol Today**, v. 8, n. 6, p. 186-192, 1992.

BOISSON, B.; JACQUES, J. C.; CHOUMET, V.; MARTIN, E.; XU, J.; VERNICK, K.; BOURGOUIN, C. Gene silencing in mosquito salivary glands by RNAi. **FEBS Lett.**, v. 580, n. 8, p. 1988-1992, 2006.

BORKENT, A.; GRIMALDI, D. A. The earliest fossil mosquito (Diptera : Culicidae), in mid-Cretaceous Burmese amber. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 97, n. 5, p. 882-886, 2004.

BRACCO, J. E.; CAPURRO, M. L.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R.; SALLUM, M. A. Genetic variability of *Aedes aegypti* in the Americas using a mitochondrial gene: evidence of multiple introductions. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 5, p. 573-580, 2007.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRIEGEL, H. Physiological bases of mosquito ecology. **J. Vec. Eco.**, v. 28, n. 1, p. 1-11, 2003.

BRYANT, B.; MACDONALD, W.; RAIKHEL, A. S. microRNA miR-275 is indispensable for blood digestion and egg development in the mosquito *Aedes aegypti*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v. 107, n. 52, p. 22391-22398, 2010.

BRYNE, J. C.; VALEN, E.; TANG, M. H.; MARSTRAND, T.; WINTHER, O.; DA PIEDADE, I.; KROGH, A.; LENHARD, B.; SANDELIN, A. JASPAR, the open access database of transcription factor-binding profiles: new content and tools in the 2008 update. **Nucleic Acids Res.**, v. 36, p. D102-D106, 2008.

CALVO, E.; WALTER, M.; ADELMAN, Z. N.; JIMENEZ, A.; ONAL, S.; MARINOTTI, O.; JAMES, A. A. Nanos (nos) genes of the vector mosquitoes, *Anopheles gambiae*,

Anopheles stephensi and *Aedes aegypti*. **Insect. Biochem. Mol. Biol.**, v.35, n.7, p. 789-798, 2005.

CARAGEA, C.; SINAPOV, J.; SILVESCU, A.; DOBBS, D.; HONAVAR, V. Glycosylation Site Prediction Using Ensembles of Support Vector Machine Classifiers. **BMC Bioinformatics**, v. 8, p. 438, 2007.

CARDOSO, J. C. **Vigilância Entomológica de mosquitos (Diptera, Culicidae) como estratégia de Vigilância Ambiental em Saúde no Rio Grande do Sul, Brasil**. 2010. 147 f. Tese (Doutorado em Saúde Pública) - Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Mosquito life cycle**. 2009. Disponível em: <http://www.cdc.gov/dengue/entomologyEcology/m_lifecycle.html>. Acesso em: 25 fev. 2011.

CHAPMAN, R. F. **The Insects: structure and function**. Cambridge: University Press, 1998. 770 p.

CHEN, L.; ZHU, J.; SUN, G.; RAIKHEL, A. S. The early gene Broad is involved in the ecdysteroid hierarchy governing vitellogenesis of the mosquito *Aedes aegypti*. **J. Mol. Endocrinol.**, v. 33, n. 3, p. 743-761, 2004.

CHEN, X. G.; MATHUR, G.; JAMES, A. A. Gene expression studies in mosquitoes. **Adv. Genet.**, v. 64, p. 19-50, 2008.

CHERBAS, L.; CHERBAS, P. The arthropod initiator: the capsite consensus plays an important role in transcription. **Insect. Biochem. Mol. Biol.**, v.23, n. 1, p. 81-90, 1993.

CLEMENTS, A. N. **The Biology of Mosquitoes**. London: Chapman & Hall, 1992. 509 p.

COATES, C. J.; TURNEY, C. L.; FROMMER, M.; O'BROCHTA, D. A.; ATKINSON, P. W. Interplasmid transposition of the mariner transposable element in non-drosophilid insects. **Mol. Gen. Genet.**, v. 253, n. 6, p. 728-733, 1997.

CONSOLI, R. A. G. B.; LOURENÇO DE OLIVEIRA, R. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 1994. 228 p.

CRUZ, J.; SIEGLAFF, D. H.; ARENSBURGER, P.; ATKINSON, P. W.; RAIKHEL, A. S. Nuclear receptors in the mosquito *Aedes aegypti*: annotation, hormonal regulation and expression profiling. **FEBS J.**, v. 276, n. 5, p. 1233-1254, 2009.

DA COSTA-DA-SILVA A. L.; CAPURRO, M. L.; BRACCO, J. E. Genetic lineages in the yellow fever mosquito *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera: Culicidae) from Peru. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 6, p. 539-544. 2005.

DALTON, J. E.; KACHERIA, T. S.; KNOTT, S.R.; LEBO, M.S.; NISHITANI, A.; SANDERS, L. E.; STIRLING, E. J.; WINBUSH, A.; ARBEITMAN, M. N. Dynamic, mating-induced gene expression changes in female head and brain tissues of *Drosophila melanogaster*. **BMC Genomics**, v. 11, p. 541, 2010.

DISSANAYAKE, S. N.; RIBEIRO, J. M.; WANG, M. H.; DUNN, W. A.; YAN, G.; JAMES, A. A.; MARINOTTI, O. aeGEPUCI: a database of gene expression in the dengue vector mosquito, *Aedes aegypti*. **BMC Res. Notes**, v. 3, p. 248, 2010.

EDWARDS, M. J.; MOSKALYK, L. A.; DONELLY-DOMAN, M.; VLASKOVA, M.; NORIEGA, F. G.; WALKER, V. K.; JACOBS-LORENA, M. Characterization of a carboxypeptidase A gene from the mosquito, *Aedes aegypti*. **Ins. Mol. Bio.**, v. 9, n. 1, p. 33-38, 2000.

EDWARDS, M.J.; SEVERSON, D. W.; HAGEDORN, H. H. Vitelline envelope genes of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v. 28, n. 12, p. 915-925, 1998.

ENSERINK, M. Science and society. GM mosquito trial alarms opponents, strains ties in Gates-funded project. **Science**, v. 330, n. 6007, p. 1030-1031, 2010.

FANG, J. Ecology: A world without mosquitoes. **Nature**, v. 466, n. 7305, p. 432-434, 2010.

FEITOSA, F. M.; CALVO, E.; MERINO, E. F.; DURHAM, A. M.; JAMES, A. A.; DE BIANCHI, A. G.; MARINOTTI, O.; CAPURRO, M. L. A transcriptome analysis of the *Aedes aegypti* vitellogenic fat body. **Journal of Insect Science**. v. 6, p. 1-26, 2006.

FERDIG, M. T.; LI, J.; SEVERSON, D. W.; CHRISTENSEN, B. M. Mosquito dopa decarboxylase cDNA characterization and blood-meal-induced ovarian expression. **Insect. Molecular Biology**, v. 5, p. 119-126, 1996.

FERDIG, M. T.; TAFT, A. S.; SMARTT, C. T.; LOWENBERGER, C. A.; LI, J.; ZHANG, J.; CHRISTENSEN, B. M. *Aedes aegypti* dopa decarboxylase: gene structure and regulation. **Insect. Mol. Biol.**, v. 9. n. 3, p. 231-239, 2000.

FIRE, A.; XU, S.; MONTGOMERY, M. K.; KOSTAS, S. A.; DRIVER S. E.; MELLO, C. C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 391, n. 6669, p. 806-811, 1998.

FOLEY, D. H.; RUEDA, L. M.; WILKERSON, R. C. Insight into global mosquito biogeography from country species records. **J. Med. Entomol**, v. 44, n. 4, p. 554-567, 2007.

FORATTINI, O. P. **Culicidologia médica: identificação, biologia, epidemiologia**. São Paulo: Edusp, 2002. v. 2. 864 p.

FRANZ, A. W.; SANCHEZ-VARGAS, I.; ADELMAN, Z. N.; BLAIR, C. D.; BEATY, B. J.; JAMES, A. A.; OLSON, K. E. Engineering RNA interference-based resistance to dengue virus type 2 in genetically modified *Aedes aegypti*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v. 103, n. 11, p. 4198-4203, 2006.

FRATUS, A. S. B. **Expressão e reconhecimento imune de alelos conservados de antígenos variantes de *Plasmodium falciparum***. 2008. 97 f. Dissertação (Mestrado em parasitologia) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

GALINDO, K.; SMITH, D. P. A large family of divergent *Drosophila* odorant-binding proteins expressed in gustatory and olfactory sensilla. **Genetics**, v. 159, n. 3, p. 1059-1072, 2001.

GRAY, E. M.; BRADLEY, T. J. Malarial infection in *Aedes aegypti*: effects on feeding, fecundity and metabolic rate. **Parasitology**, v. 132, p. 1-8, 2005.

GRIMALDI, D. A.; ENGEL, M. S.; NASCIMBENE, P. C. Fossiliferous Cretaceous amber from Burma (Myanmar): its rediscovery, biotic diversity, and paleontological significance. **Am. Mus. Novitates**, n. 3361, p. 1-71, 2002.

GUBLER, D. J. The changing epidemiology of yellow fever and dengue, 1900 to 2003: full circle? **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 27, n. 5, p. 319-330, 2004.

GUBLER, D. J. The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems. **Arch. Med. Res.**, v. 33, n. 4, p. 330-342, 2002.

GUZMAN, M. G.; HALSTEAD, S. B.; ARTSOB, H.; BUCHY, P.; FARRAR, J.; GUBLER D. J.; HUNSPERGER, E.; KROEGER, A.; MARGOLIS, H. S.; MARTÍNEZ, E.; NATHAN, M. B.; PELEGRINO, J. L.; SIMMONS, C.; YOKSAN, S.; PEELING, R. W. Dengue: a continuing global threat. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 8, n. 12, p. S7-S16, 2010. Supplement.

HACKER, C. S. The differential effect of *Plasmodium gallinaceum* on the fecundity of several strains of *Aedes aegypti*. **J. Invert. Pathol.**, v. 18, p. 373-377, 1971.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucl. Acids. Symp. Ser.**, v. 41, p. 95-98, 1999.

HANSEN, I. A.; ATTARDO, G. M.; PARK, J. H.; PENG, Q.; RAIKHEL, A. S. Target of rapamycin-mediated amino acid signaling in mosquito anautogeny. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v. 101, n. 29, p. 10626-10631, 2004.

HARBACH, R. E. **Mosquito Taxonomic Inventory**. 2011. Disponível em: <http://mosquito-taxonomic-inventory.info/>. Acesso em: 23 fev. 2011.

HARBACH, R. E. The Culicidae (Diptera): a review of taxonomy, classification and phylogeny. **Zootaxa**, v. 1668, p. 591-638, 2007.

HARLOW, E.; LANE, D. **Antibodies**: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor, 1988.

HEKMAT-SCAFE, D. S.; SCAFE, C. R.; MCKINNEY, A. J.; TANOUYE, M. A. Genome-wide analysis of the odorant-binding protein gene family in *Drosophila melanogaster*. **Genome Res.**, v. 12, n. 9, p. 1357-1369, 2002.

HEMINGWAY, J. The molecular basis of two contrasting metabolic mechanisms of insecticide resistance. **Insect. Biochem. Mol. Biol.**, v. 30, n. 11, p. 1009-1015, 2000.

HENCHAL, E. A.; PUTNAK, J. R. The dengue viruses. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 3, n. 4, p. 376-396, 1990.

HOLT, R. A.; SUBRAMANIAN, G. M.; HALPERN, A.; SUTTON, G. G.; CHARLAB, R.; NUSSKERN, D. R.; WINCKER, P.; CLARK, A. G.; RIBEIRO, J. M.; WIDES, R.; SALZBERG, S. L.; LOFTUS, B.; YANDELL, M.; MAJOROS, W. H.; RUSCH, D. B.; LAI, Z.; KRAFT, C. L.; ABRIL, J. F.; ANTHOUARD, V.; ARENSBURGER, P.; ATKINSON, P. W.; BADEN, H.; DE BERARDINIS, V.; BALDWIN, D.; BENES, V.; BIEDLER, J.; BLASS, C.; BOLANOS, R.; BOSCHUS, D.; BARNSTEAD, M.; CAI, S.; CENTER, A.; CHATURVERDI, K.; CHRISTOPHIDES, G. K.; CHRYSTAL, M. A.; CLAMP, M.; CRAVCHIK, A.; CURWEN, V.; DANA, A.; DELCHER, A.; DEW, I.; EVANS, C. A.; FLANIGAN, M.; GRUNDSCHOBBER-FREIMOSER, A.; FRIEDLI, L.; GU, Z.; GUAN, P.; GUIGO, R.; HILLENMEYER, M. E.; HLADUN, S. L.; HOGAN, J. R.; HONG, Y. S.; HOOVER, J.; JAILLON, O.; KE, Z.; KODIRA, C.; KOKOZA, E.; KOUTSOS, A.; LETUNIC, I.; LEVITSKY, A.; LIANG, Y.; LIN, J. J.; LOBO, N. F.; LOPEZ, J. R.; MALEK, J. A.; MCINTOSH, T. C.; MEISTER, S.; MILLER, J.; MOBARRY, C.; MONGIN, E.; MURPHY, S. D.; O'BROCHTA, D. A.; PFANNKUCH, C.; QI, R.; REGIER, M. A.; REMINGTON, K.; SHAO, H.; SHARAKHOVA, M. V.; SITTER, C. D.; SHETTY, J.; SMITH, T. J.; STRONG, R.; SUN, J.; THOMASOVA, D.; TON, L. Q.; TOPALIS, P.; TU, Z.; UNGER, M. F.; WALENZ, B.; WANG, A.; WANG, J.; WANG, M.; WANG, X.; WOODFORD, K. J.; WORTMAN, J. R.; WU, M.; YAO, A.; ZDOBNOV, E. M.; ZHANG, H.; ZHAO, Q.; ZHAO, S.; ZHU, S. C.; ZHIMULEV, I.; COLUZZI, M.; DELLA TORRE, A.; ROTH, C. W.; LOUIS, C.; KALUSH, F.; MURAL, R. J.; MYERS, E. W.; ADAMS, M. D.; SMITH, H. O.; BRODER, S.; GARDNER, M. J.; FRASER, C. M.; BIRNEY, E.; BORK, P.;

BREY, P. T.; VENTER, J.C.; WEISSENBACH, J.; KAFATOS, F. C.; COLLINS, F. H.; HOFFMAN, S. L. The genome sequence of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. **Science**, v. 298, n. 5591, p. 129-149, 2002.

HOPWOOD, J. A.; AHMED, A. M.; POLWART, A.; WILLIAMS, G. T.; HURD, H. Malaria-induced apoptosis in mosquito ovaries: a mechanism to control vector egg production. **J. Exp Biol.**, v. 204, p. 2773-2780, 2001.

HORN, C.; WIMMER, E. A. A transgene-based, embryo-specific lethality system for insect pest management. **Nat. Biotechnol.**, v. 21, n. 1, p. 64-70, 2003.

HORN, C.; WIMMER, E. A. A versatile vector set for animal transgenesis. **Dev. Genes Evol.**, v. 210, n. 12, p. 630-637, 2000.

HURD, H.; GRANT, K. M.; ARAMBAGE, S. C. Apoptosis-like death as a feature of malaria infection in mosquitoes. **Parasitology**, v. 132, p. S33-47, 2006. Supplement.

IDIGDINOS. **Fossils, minerals and dinosaur toys**. 2011. Disponível em: <<http://www.iddfossils.co.uk>>. Acesso em: 01 mar. 2011.

ISOE, J.; ZAMORA, J.; MIESFELD, R. Molecular analysis of the *Aedes aegypti* carboxipeptidase gene family. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v. 39, n. 1, p. 68-73, 2008.

IYANIWURA, T. T. Non-target and environmental hazards of pesticides. **Rev. Environ. Health**, v. 9, n. 3, p. 161-176, 1991.

JAMES, A. A. Gene drive systems in mosquitoes: rules of the road. **Trends Parasitol.**, v. 21, n. 2, p. 64-67, 2005.

JANSEN, C. C.; BEEBE, N. W. The dengue vector *Aedes aegypti*: what comes next. **Microbes Infect.**, v. 12, n. 4, 272-279, 2010.

JASINSKIENE, N.; JUHN, J.; JAMES, A. A. Microinjection of *A. aegypti* embryos to obtain transgenic mosquitoes. **J. Vis. Exp.**, n. 5, p. 219, 2007.

JONES, J. C.; MADHUKAR, B. V. Effect of weight on mosquito (*Aedes aegypti* L.) feeding. **Experientia**, v. 30, n. 11, p. 1255, 1974.

JUHN, J.; JAMES, A. A. Oskar gene expression in the vector mosquitoes, *Anopheles gambiae* and *Aedes aegypti*. **Insect Mol. Biol.**, v. 15, n. 3, p. 363–372, 2006.

MARÇAL JUNIOR, O; SANTOS, A. Infestação por *Aedes aegypti* (Diptera:Culicidae) e incidência do dengue no espaço urbano: um estudo de caso. **Caminhos de Geografia**, v. 15, n. 13, p. 241-251, 2004.

KLOWDEN, M. J. Endocrine aspects of mosquito reproduction. **Arch. Ins. Bio. Phys.**, v. 35, p. 491-512, 1997.

KNIPLING, E. F. Possibilities of insect control or eradication through the use of sexually sterile males. **J. Econ. Entomol.**, v. 48, p. 902-904, 1955.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LAWSON, D.; ARENSBURGER, P.; ATKINSON, P.; BESANSKY, N. J.; BRUGGNER, R. V.; BUTLER, R.; CAMPBELL, K. S.; CHRISTOPHIDES, G. K.; CHRISTLEY, S.; DIALYNAS, E.; EMMERT, D.; HAMMOND, M.; HILL, C. A.; KENNEDY, R. C.; LOBO, N. F.; MACCALLUM, M. R.; MADEY, G.; MEGY, K.; REDMOND, S.; RUSSO, S.; SEVERSON, D. W.; STINSON, E. O.; TOPALIS, P.; ZDOBNOV E. M.; BIRNEY, E.; GELBART, W. M.; KAFATOS, F. C.; LOUIS, C.; COLLINS, F. H. VectorBase: a home for invertebrate vectors of human pathogens. **Nucleic Acids Res.**, v. 35, p. D503-D505; 2007.

LAWSON, D.; ARENSBURGER, P.; ATKINSON, P.; BESANSKY, N. J.; BRUGGNER, R. V.; BUTLER, R.; CAMPBELL, K. S.; CHRISTOPHIDES, G. K.; CHRISTLEY, S.; DIALYNAS, E.; HAMMOND, M.; HILL C. A.; KONOPINSKI, N.; LOBO, N. F.;

MACCALLUM, R. M.; MADEY, G.; MEGY, K.; MEYER, J.; REDMOND, S.; SEVERSON, D. W.; STINSON, E. O.; TOPALIS, P.; BIRNEY, E.; GELBART, W. M.; KAFATOS, F. C.; LOUIS, C.; COLLINS, F. H. VectorBase: a data resource for invertebrate vector genomics. **Nucleic Acids Res.**, v. 37, p. D583-587, 2009.

LEE, Y.; TSAI, J.; SUNKARA, S.; KARAMYCHEVA, S.; PERTEA, G.; SULTANA, R.; ANTONESCU, V.; CHAN, A.; CHEUNG, F.; QUACKENBUSH, J. The TIGR Gene Indices: clustering and assembling EST and known genes and integration with eukaryotic genomes. **Nucleic Acids Res.**, v. 33, p. D71-74, 2005.

LI, J. S.; LI, J. Major chorion proteins and their crosslinking during chorion hardening in *Aedes aegypti* mosquitoes. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v. 36, n. 12, p. 954-964, 2006

LI, S.; PICIMBON, J. F.; JI, S.; KAN, Y.; CHUANLING, Q.; ZHOU, J. J.; PELOSI, P. Multiple functions of an odorant-binding protein in the mosquito *Aedes aegypti*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 372, n. 3, p. 464-468, 2008.

LI, Z. X.; PICKETT, J. A.; FIELD, L. M.; ZHOU, J. J. Identification and expression of odorant-binding proteins of the malaria-carrying mosquitoes *Anopheles gambiae* and *Anopheles arabiensis*. **Arch. Insect. Biochem. Physiol.**, v. 58, n. 3, p. 175-189, 2005.

MARSHALL, J. M. The effect of gene drive on containment of transgenic mosquitoes. **J. Theor. Biol.**, v. 258, n. 2, p. 250-265, 2009.

MATSUO, T.; SUGAYA, S.; YASUKAWA, J.; AIGAKI, T.; FUYAMA, Y. Odorant-binding proteins OBP57d and OBP57e affect taste perception and host-plant preference in *Drosophila sechellia*. **PLoS Biol.**, v. 5, n. 5, p. e118, 2007.

MCGRAW, L. A.; CLARK, A. G.; WOLFNER, M. F. Post-mating gene expression profiles of female *Drosophila melanogaster* in response to time and to four male accessory gland proteins. **Genetics**, v. 179, n. 3, p. 1395-1408, 2008.

MEGY, K.; HAMMOND, M.; LAWSON, D.; BRUGGNER, R.V.; BIRNEY, E.; COLLINS, F.H. Genomic resources for invertebrate vectors of human pathogens, and the role of VectorBase. **Infect. Genet. Evol.**, v. 9, n. 3, p. 308-313, 2009.

MONATH, T. P. Dengue and yellow fever--challenges for the development and use of vaccines. **N. Engl. J. Med.**, v. 357, n. 22, p. 2222-2225, 2007.

NATAL, D. Bioecologia do *Aedes aegypti*. **Biológico**, v. 64, p. 205-207, 2002.

NENE, V.; WORTMAN, J. R.; LAWSON, D.; HAAS, B.; KODIRA, C.; TU, Z. J.; LOFTUS, B.; XI, Z.; MEGY, K.; GRABHERR, M.; REN, Q.; ZDOBNOV, E. M.; LOBO, N. F.; CAMPBELL, K. S.; BROWN, S. E.; BONALDO, M. F.; ZHU, J.; SINKINS, S. P.; HOGENKAMP, D. G.; AMEDEO, P.; ARENSBURGER, P.; ATKINSON, P. W.; BIDWELL, S.; BIEDLER, J.; BIRNEY, E.; BRUGGNER, R. V.; COSTAS, J.; COY, M. R.; CRABTREE, J.; CRAWFORD, M.; DEBRUYN, B.; DECAPRIO, D.; EIGLMEIER, K.; EISENSTADT, E.; EL-DORRY, H.; GELBART, W. M.; GOMES, S. L.; HAMMOND, M.; HANNICK, L. I.; HOGAN, J. R.; HOLMES, M. H.; JAFFE, D.; JOHNSTON, J. S.; KENNEDY, R. C.; KOO, H.; KRAVITZ, S.; KRIVENTSEVA, E. V.; KULP, D. LABUTTI, K.; LEE, E.; LI, S.; LOVIN, D. D.; MAO, C.; MAUCELI, E.; MENCK, C. F.; MILLER, J. R.; MONTGOMERY, P.; MORI, A.; NASCIMENTO, A. L.; NAVEIRA, H. F.; NUSBAUM, C.; O'LEARY, S.; ORVIS, J.; PERTEA, M.; QUESNEVILLE, H.; REIDENBACH, K. R.; ROGERS, Y. H.; ROTH, C. W.; SCHNEIDER, J. R.; SCHATZ, M.; SHUMWAY, M.; STANKE, M.; STINSON, E. O.; TUBIO, J. M.; VANZEE, J. P.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; WERNER, D.; WHITE, O.; WYDER, S.; ZENG, Q.; ZHAO, Q.; ZHAO, Y.; HILL, C. A.; RAIKHEL, A. S.; SOARES, M. B.; KNUDSON, D. L.; LEE, N. H.; GALAGAN, J.; SALZBERG, S. L.; PAULSEN, I. T.; DIMOPOULOS, G.; COLLINS, F. H.; BIRREN, B.; FRASER-LIGGETT, C. M.; SEVERSON, D. W. Genome sequence of *Aedes aegypti*, a major arbovirus vector. **Science**, v. 316, n. 5832, p. 1718-1723, 2007.

NORIEGA, F. G.; WELLS, M. A. A molecular view of trypsin synthesis in the midgut of *Aedes aegypti*. **J. Insect. Physiol.**, v. 45, n. 7, p. 613-620, 1999.

NICHOLAS, K. B.; NICHOLAS H. B. JR.; DEERFIELD, D. W. II. GeneDoc: Analysis and Visualization of Genetic Variation. **EMBNEW. NEWS.**, v. 4, p. 14, 1997.

OSTA, M. A.; CHRISTOPHIDES, G. K.; KAFATOS, F. C. Effects of mosquito genes on *Plasmodium* development. **Science**, v. 303, n. 5666, p. 2030-2032, 2004.

PADUAN KDOS, S.; RIBOLLA, P. E. Mitochondrial DNA polymorphism and heteroplasmy in populations of *Aedes aegypti* in Brazil. **J. Med. Entomol.**, v. 45, n. 1, p. 59-67, 2008.

PARIS, M.; TETREAU, G.; LAURENT, F.; LELU, M.; DESPRES, L.; DAVID, J. P. Persistence of *Bacillus thuringiensis israelensis* (*Bti*) in the environment induces resistance to multiple *Bti* toxins in mosquitoes. **Pest Manag. Sci.**, v. 67, n. 1, p. 122-128, 2011.

PELLETIER, J.; LEAL, W. S. Genome analysis and expression patterns of odorant-binding proteins from the Southern House mosquito *Culex pipiens quinquefasciatus*. **PLoS One.** , v. 4, n. 7, p. e6237, 2009.

PELOSI, P.; CALVELLO, M.; BAN, L. Diversity of odorant-binding proteins and chemosensory proteins in insects. **Chem. Senses.**, v. 30, p. i291-i292, 2005. Supplement 1.

PELOSI, P.; ZHOU, J. J.; BAN, L. P.; CALVELLO, M. Soluble proteins in insect chemical communication. **Cell. Mol. Life. Sci.**, v. 63, n. 14, p. 1658-1676, 2006.

PHUC, H. K.; ANDREASEN, M. H.; BURTON, R. S.; VASS, C.; EPTON, M. J.; PAPE, G.; FU, G.; CONDON, K. C.; SCAIFE, S.; DONNELLY, C. A.; COLEMAN, P. G.; WHITE-COOPER, H.; ALPHEY, L. Late-acting dominant lethal genetic systems and mosquito control. **BMC Biol.**, v. 5, p. 11, 2007.

QUACKENBUSH, J.; LIANG, F.; HOLT, I.; PERTEA, G.; UPTON, J. The TIGR gene indices: reconstruction and representation of expressed gene sequences. **Nucleic Acids Res.**, v. 1, p. 141-145, 2000.

RAIKHEL A. S.; DHADIALLA T. S. Accumulation of yolk proteins in insect oocytes. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 37, p. 217-251, 1992.

RAIKHEL, A. S. Vitellogenesis in mosquitoes. **Adv.Dis.Vec. Res.**, v. 9, p. 1-39, 1992.

RAIKHEL, A. S. Monoclonal antibodies as probes for processing of the mosquito yolk protein; a high resolution immunolocalization of secretory and accumulative pathways. **Tissue & Cell.**, v. 19, n. 4, p. 515-529, 1987.

RAIKHEL, A. S.; KOKOZA, V.A.; ZHU, J.; MARTIN, D.; WANG, S. F.; LI, C.; SUN, G.; AHMED, A.; DITTMER, N.; ATTARDO, G. Molecular biology of mosquito vitellogenesis: from basic studies to genetic engineering of antipathogen immunity. **Ins. Bioc. Mol. Biol.**, v. 32, n. 10, p. 1275-1286, 2002.

REY, L. **Bases de Parasitologia médica.** 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 379 p.

RIEHLE, M. A.; BROWN, M. R. Insulin receptor expression during development and a reproductive cycle in the ovary of the mosquito *Aedes aegypti*. **Cell. Tissue Res.**, v. 308, n. 3, p. 409-420, 2002.

RODRÍGUEZ, M. M.; BISSET, J. A.; DIAZ, C.; SOCA, L. A. Resistencia cruzada a piretroides en *Aedes aegypti* de Cuba inducido por la selección con el insecticida organofosforado malation. **Rev. Cub. Med. Trop.**, v. 55, n. 2, p. 105-111, 2003.

ROGERS, D.W.; WHITTEN, M. M.; THAILAYIL, J.; SOICHOT, J.; LEVASHINA, E. A.; CATTERUCCIA, F. Molecular and cellular components of the mating machinery in *Anopheles gambiae* females. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v. 105, n. 49, p. 19390-19395, 2008.

ROZEN, S.; SKALETSKY, H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. **Methods Mol. Biol.**, v. 132, p. 365-386, 2000.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATS, T. Molecular cloning: **A Laboratory Manual.** 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SAMPATH, A.; PADMANABHAN, R. Molecular targets for flavivirus drug discovery. **Antiviral Res.**, v. 81, n. 1, p. 6-15, 2009.

SANDELIN, A.; ALKEMA, W.; ENGSTRÖM, P.; WASSERMAN, W. W.; LENHARD, B. JASPAR: an open-access database for eukaryotic transcription factor binding profiles. **Nucleic Acids Res.**, v. 32, p. D91-94, 2004.

SANDERS, H. R.; EVANS, A. M.; ROSS, L. S.; GILL, S. S. Blood meal induces global changes in midgut gene expression in the disease vector, *Aedes aegypti*. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v. 33, p. 1105-1122, 2003.

SANJAD, N. Da 'abominável profissão de vampiros': Emílio Goeldi e os mosquitos no Pará (1905)'. **História, Ciências, Saúde – Manguinhos**, v. 10, n. 1, p. 85-111, 2003.

SAPPINGTON, T. W.; HELBLING, P.; KOLLER, C. N.; RAIKHEL, A. S. Activation in vitro of vitellogenin uptake by the oocytes of the mosquito, *Aedes aegypti*. **Phys. Ent.**, v. 23, p. 158-164, 1998.

SCIENCE AAAS. **Science Journals**. 2011. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org>>. Acesso em: 15 fev. 2011.

SELIGMAN, S. J.; GOLD, E. A. Live flavivirus vaccines: reasons for caution. **Lancet**, v. 363, n. 9426, p. 2073-2075, 2004.

SINKINS, S. P.; GOULD, F. Gene drive systems for insect disease vectors. **Nat. Rev. Genet.**, v. 7, n. 6, p. 427-435, 2006.

SMARTT, C. T.; CHILES, J.; LOWENBERGER, C.; CHRISTENSEN, B. M. Biochemical analysis of a blood meal-induced *Aedes aegypti* glutamine synthetase gene. **Insect Biochem Mol. Biol.**, v. 28, n. 12, p. 935-945, 1998.

SMITH, D. L.; DUSHOFF, J.; MCKENZIE, F. E. The risk of a mosquito-borne infection in a heterogeneous environment. **PloS Biol.**, v. 2, n. 11, p. 1957-1964, 2004.

SPERANÇA, M. A.; CAPURRO, M. L. Perspectives in the control of infectious diseases by transgenic mosquitoes in the post-genomic era--a review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, v. 102, n. 4, p. 425-433, 2007.

STRODE, C.; WONDJI, C. S.; DAVID, J. P.; HAWKES, N. J.; LUMJUAN, N.; NELSON, D. R.; DRANE, D. R.; KARUNARATNE, S. H.; HEMINGWAY, J.; BLACK, W. C. 4TH.; RANSON, H. Genomic analysis of detoxification genes in the mosquito *Aedes aegypti*. **Insect. Biochem. Mol. Biol.**, v. 38, n. 1, p. 113-123, 2008.

SUN, G.; ZHU, J.; RAIKHEL, A. S. The early gene E74B isoform is a transcriptional activator of the ecdysteroid regulatory hierarchy in mosquito vitellogenesis. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v. 218, n. 1-2, p. 95-105, 2004.

SUN, G.; ZHU, J.; LI, C.; TU, Z.; RAIKHEL, A. S. Two isoforms of the early E74 gene, an Ets transcription factor homologue, are implicated in the ecdysteroid hierarchy governing vitellogenesis of the mosquito, *Aedes aegypti*. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v. 190, n. 1-2, p. 147-157, 2002.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. **Mol. Biol. Evol.**, v. 24, p. 1596-1599, 2007.

TAUIL, P. L. Urbanização e ecologia do dengue. **Cad. Saúde Pública**, v. 17, p. 99-102, 2001. Suplemento.

TELANG, A.; WELLS, M. A. The effect of larval and adult nutrition on successful autogeneus egg production by a mosquito. **J. Ins. Phys.**, v. 50, p. 677-685, 2004.

THANGAMANI, S.; WIKEL, S. K. Differential expression of *Aedes aegypti* salivary transcriptome upon blood feeding. **Parasit. Vectors**, v. 2, n. 1, p. 34, 2009.

THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN F.; HIGGINS, D.G. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Res.**, v. 25, 4876-4882, 1997.

TRAVANTY, E. A.; ADELMAN, Z. N.; FRANZ, A. W.; KEENE, K. M.; BEATY, B. J.; BLAIR, C. D.; JAMES, A. A.; OLSON, K. E. Using RNA interference to develop dengue virus resistance in genetically modified *Aedes aegypti*. **Ins. Bioch. Mol. Biol.**, v. 34, n. 7, p. 607-613, 2004.

URDANETA-MARQUEZ, L.; FAILLOUX, A. B. Population genetic structure of *Aedes aegypti*, the principal vector of dengue viruses. **Infect. Genet. Evol.**, v. 11, n. 2, p. 253-261, 2010.

USD. **National music museum.** 1996. Disponível em: <<http://orgs.usd.edu/nmm/Exhibitions/BeethovenBerlioz/BBlyre.html>>. Acesso em: 03 jan. 2006.

VALLE, D.; MONNERAT, A. T.; SOARES, M. J.; ROSA-FREITAS, M. G.; PELAJO-MACHADO, M.; VALE, B. S.; LENZI, H. L.; GALLER, R.; LIMA, J. B. Mosquito embryos and eggs: polarity and terminology of chorionic layers. **J. Insect Physiol.**, v. 45, n. 8, p. 701-708, 1999.

VASCONCELOS, P. F. Yellow fever. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 36, n. 2, p. 275-293, 2003.

VOGT, R. G. Odorant binding protein homologues of the malaria mosquito *An. gambiae*; possible orthologues of the OS-E and OS-F OBPs of *Drosophila melanogaster*. **J. Chem. Ecol.**, v. 28, p. 2371–2376, 2002.

VOGT, R. G.; RIDDIFORD, L. M. Pheromone binding and inactivation by moth antennae. **Nature**, v. 293, p. 161-163, 1981.

WALKER, K. **Yellow fever mosquito (Aedes aegypti).** **Pest and Diseases Image Library.** 2008. Disponível em: <<http://www.padil.gov.au>>. Acesso em: 15 fev. 2011

WATERHOUSE, R. M.; WYDER, S.; ZDOBNOV, E. M. The *Aedes aegypti* genome: a comparative perspective. **Insect Molecular Biology**, v. 17, n. 1, p. 1-8, 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Dengue and Dengue Haemorrhagic Fever**. Fact Sheet n°117. 2009. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/>>. Acesso em: 20 fev. 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Dengue: Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control**. Geneva: WHO Press 2009. 160 p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Yellow Fever**. Fact sheet N°100. 2011. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs100/en/>>. Acesso em: 25 fev. 2011.

ZHOU, J. J.; HE, X. L.; PICKETT, J. A.; FIELD, L. M. Identification of odorant-binding proteins of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*: genome annotation and comparative analyses. **Insect Mol. Biol.**, v. 17, n. 2, p. 147-163, 2008.

ZHOU, J. J.; HUANG, W.; ZHANG, G. A.; PICKETT, J. A.; FIELD, L. M. "Plus-C" odorant-binding protein genes in two *Drosophila* species and the malaria mosquito *An. gambiae*. **Gene**, v. 327, n. 1, p. 117-129, 2004.

ZHU, J.; CHEN, L.; RAIKHEL, A. S. Distinct roles of Broad isoforms in regulation of the 20-hydroxyecdysone effector gene, Vitellogenin, in the mosquito *Aedes aegypti*. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v. 267, n. 1-2, p. 97-105, 2007.