

Rafaella Sayuri Ioshino

**Mecanismo da redução de fertilidade
em *Aedes aegypti* infectado por
*Plasmodium gallinaceum***

Dissertação 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 Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Biologia da relação Patógeno – Hospedeiro.

Orientadora: Prof Dra Margareth de Lara Capurro Guimarães.

Versão original

**São Paulo
2013**

RESUMO

IOSHINO, R. S. **Mecanismo da redução de fertilidade em *Aedes aegypti* infectados por *Plasmodium gallinaceum***. 2013. 65 f. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

O ciclo reprodutivo dos mosquitos *Aedes aegypti* inicia-se após o repasto sanguíneo realizado pelas fêmeas, pois é através do sangue que os mosquitos adquirem nutrientes e ativam hormônios que irão iniciar e regular a síntese e armazenamento de proteínas precursoras de vitelo que, por fim, resultará na produção dos ovos (CLEMENTS, 1992). Fêmeas do mosquito *Ae. aegypti*, quando realizam repasto sanguíneo infectado (RSI) por *Plasmodium gallinaceum*, apresentam uma redução na produção de ovos (ARAÚJO, 2011). Uma das explicações para essa redução é a morte por apoptose das células foliculares (CF) que envolvem os folículos ovarianos, como foi observado em fêmeas de *Anopheles stephensi* infectadas por *P. yoelii nigeriensis* (HOPWOOD, et al., 2001). Por isso, o objetivo do estudo foi confirmar se a redução da fecundidade dos mosquitos *Ae. aegypti* infectados por *P. gallinaceum* ocorre por morte das CF caso essa característica seja conservada entre os culicídeos. Foram feitas novas posturas individuais com fêmeas sadias e infectadas (n = 35; triplicata experimental) que confirmaram a redução significativa do número de ovos produzidos por mosquitos infectados. Em seguida, foi determinada a viabilidade das células que compõem os ovários através de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio). Após realizar a padronização da técnica para o tecido, foi observado que os ovários sofrem uma redução da viabilidade celular 18, 22 e 24 horas após o RSI. Sendo assim, foram feitas marcações em ovários nesses mesmos intervalos utilizando o reagente *acridine orange* que identifica células mortas através da acidez celular. Não foi possível observar a morte das células no intervalo de 18 horas, porém 22 e 24 horas após o RSI as CF apresentaram cor laranja indicando que elas estão em morte em relação ao mesmo intervalo do repasto sanguíneo controle (RSC). Para determinar se essas células apresentam morte celular do tipo apoptose, foi utilizado o kit DeadEnd Colorimetric TUNEL System (Promega) que realiza marcação do DNA fragmentado, uma das características da apoptose. Os resultados para essa técnica, utilizando os ovários de 22 e 24 horas após RSC e RSI foram negativos, ou seja, não há evidências de DNA fragmentado nas células foliculares nas regiões dos cortes histológicos examinados. Sendo assim, podemos concluir que, utilizando esses ensaios foi possível identificar a morte das CF como uma resposta a redução da fecundidade, porém não foi possível determinar que o tipo de morte é apoptose. Estes resultados apontam para aplicação de métodos moleculares como, por exemplo, medição da atividade da caspase-3 e realização de hibridação *in situ* fluorescente (ROEKRING; SMITH, 2010) para concluirmos se a apoptose é o mecanismo chave na redução da fertilidade em mosquitos *Ae. aegypti* infectados com *P. gallinaceum*.

Palavras-chave: *Aedes aegypti*. Células foliculares. Morte celular. Vitelogênese. Ovários. *Plasmodium gallinaceum*.

ABSTRACT

IOSHINO, R. S. **Mechanism of fecundity reduction in *Aedes aegypti* infected by *Plasmodium gallinaceum***. 2013. 65 p. Dissertation (Masters thesis in Parasitology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Aedes aegypti mosquito is an arthropod belonging to the Culicidae family and Diptera order. The reproductive cycle of these insects begins post blood meal (PBM) ingestion by females. Through the blood mosquitoes acquire nutrients and activate hormones that will initiate and regulate the synthesis and storage of yolk precursor proteins. This cascade will culminate in eggs production (CLEMENTS, 1992). Previous experiments showed that when *Ae. aegypti* female mosquito uptakes *Plasmodium gallinaceum*-infected blood meal there is a decline in egg production (ARAÚJO, 2011). One explanation is the death by apoptosis of follicular cells that surround the ovarian follicles, as observed in *Anopheles stephensi* females infected by *P. yoelii nigeriensis* (HOPWOOD, et al., 2001). Therefore, the objective of this study was to confirm the hypothesis that the fertility reduction in *P. gallinaceum*-infected *Ae. aegypti* occurs by follicular cells death if this characteristic is conserved among the Culicidae family. Initial experiments were performed to count the total number of oviposited eggs by control and infected females individually (n = 35, three independent experiments). A significant reduction in the number of eggs laid by infected mosquitoes was confirmed. The next step was to evaluate the ovary cell viability by MTT (3 - [4,5-dimethyl-thiazol-2-yl] -2,5-diphenyltetrazolium bromide). After performing the technique standardization for the tissue, it was observed a reduction of viable cells in 18, 22 and 24 hours PBM infected. The reduction of fecundity and ovary cell viability by infection led us to mark the ovaries using acridine orange reagent as indicator of cell death through intracellular pH acidification. It was not possible to observe cell death in ovary tissue section 18 hours PBM infected, but the follicular cells showed orange color 22 hours indicating they are in death in relation to the same interval of PBM control. To determine if these cells exhibit apoptosis, we use the TUNEL kit DeadEnd Colorimetric System (Promega) which mark the fragmented DNA, a characteristic of the apoptosis process. Ovaries 22 and 24 hours PBM infected and control were negative for TUNEL marker. This result indicates no evidence of fragmented DNA in the follicular cells from ovary histological preparations. Thus, we conclude that fecundity reduction occurs as a response to follicular cells death caused by *P. gallinaceum* infection. It was not possible to affirm if the type of follicular cells death is apoptosis. Altogether, these results suggest the application of molecular methods, for example, measurement of caspase-3 activity and performing fluorescence *in situ* hybridization (ROEKRING & Smith, 2010) to confirm if apoptosis is a key mechanism in fertility reduction of *P. gallinaceum*-infected *Ae. aegypti* mosquitoes.

Keyword: *Aedes aegypti*. Follicular cells. Cell death. Vitellogenesis. Ovaries. *Plasmodium gallinaceum*.

Introdução

O início do século XXI está sendo marcado pelo aquecimento global assim como o aumento do impacto ambiental causado pelo homem. Essas mudanças têm elevado o número de doenças causadas por patógenos transmitidos pelos insetos, principalmente em países de clima quente e com boa precipitação ao longo do ano. Alguns artrópodes, conhecidos popularmente como mosquitos ou pernilongos, são os principais vetores responsáveis pela transmissão de patógenos causadores de doenças tropicais como, por exemplo, a febra amarela, dengue e a malária (REITER, 2001). Os mosquitos vetores desses patógenos pertencem à família Culicidae, ordem Diptera e podem ser subdivididos em três gêneros distintos principais: *Aedes*, *Culex* e *Anopheles*. Uma das características em comum desses gêneros é a existência de fêmeas hematófagas, ou seja, que se alimentam de sangue dos vertebrados.

Algumas doenças veiculadas por patógenos transmitidos por esses mosquitos, por exemplo, a febre amarela, foram controladas durante as décadas de 50 e 60 através de programas para a redução da população dos mesmos, consistindo na aplicação de inseticidas e vigilância epidemiológica nas regiões afetadas. Porém, no final da década de 70, devido a reintrodução dos mosquitos do gênero *Aedes*, ocorreu o ressurgimento dessas doenças. Esse fato se estende até os dias atuais e os principais fatores que contribuíram para isso foram a falta de vacinas efetivas, problemas socioeconômicos e políticos nas áreas afetadas, resistência dos mosquitos aos inseticidas e o aumento do transporte via navios e aviões, que favoreceram a dispersão e reintrodução do vetor nas áreas controladas.

De acordo com a Organização mundial da saúde e Organização Pan Americana de saúde somente em 2008 ocorreram, aproximadamente, 863 mil mortes causadas pela malária no mundo e 682 mil casos de dengue notificados na América do Sul sendo 585 mil registrados apenas no Brasil (WHO, 2009; PAHO, 2009). No ano de 2010 o número de casos de dengue no país preocupou as autoridades públicas que consideraram essa doença de caráter endêmico, pois houve um aumento de 109,43% do número de casos quando comparado com a mesma época do ano de 2009 (PAHO, 2009).

1.1 *Plasmodium* e seu desenvolvimento no hospedeiro invertebrado

Existem cinco espécies do protozoário do gênero *Plasmodium* capazes de desenvolver a malária humana: *P. vivax*, *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale* e *P. knowlesi* (MARSHALL, et al., 2009). Além disso, podemos encontrar a espécie *P. gallinaceum* que é o parasito capaz de infectar uma grande variedade de aves e tem sido muito utilizado nos estudos básicos da malária (NAGAO, 2008).

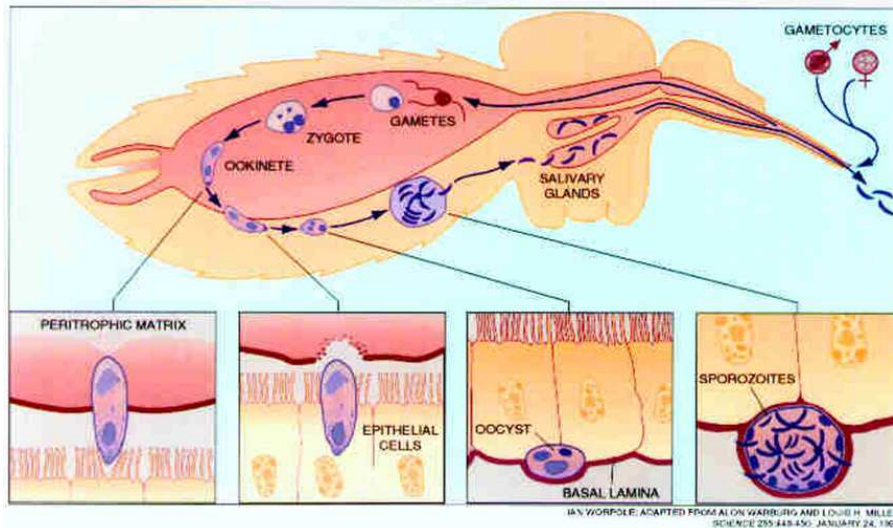
Como já foi dito anteriormente os culicídeos possuem fêmeas hematófagas. Essa característica é importante, pois é através da alimentação sanguínea que a fêmea obtém nutrientes extras para a produção dos seus ovos (CLEMENTS, 1992). Apesar de ter uma grande importância na fisiologia desses insetos, o repasto sanguíneo representa um grande problema de saúde aos homens já que é através desse tipo de alimentação que os mosquitos podem se infectar com vírus (por exemplo, dengue e febre amarela) e parasitos (por exemplo, *Plasmodium*) tornando-os, assim, o vetor transmissor desses patógenos.

Os agentes etiológicos causadores da malária, *Plasmodium* sp. depende de um hospedeiro invertebrado (mosquito) para completar o seu desenvolvimento e reprodução (Figura 01). Após o repasto sanguíneo os gametócitos (masculinos e femininos) presentes no sangue do hospedeiro vertebrado alcançam o intestino médio do mosquito onde realizam a reprodução sexuada. Um zigoto móvel denominado de oocineto é formado e esse, por sua vez, ultrapassa a membrana peritrófica e o epitélio do intestino médio até alcançar a lâmina basal do intestino onde se encista formando o oocisto.

O oocisto é uma das formas mais importantes do parasito, pois é nessa fase que ocorre a reprodução assexuada (esquizogonia) que dará origem aos esporozoítas, forma infectante do parasito da malária. Para que o mosquito se torne vetor transmissor da doença, é necessário que os esporozoítas sejam liberados na hemolinfa e através dessa via eles alcançam a glândula salivar

onde são armazenados até o próximo repasto sanguíneo (SOUZA-NETO, et al., 2009).

Figura 01 - Ciclo de desenvolvimento do *Plasmodium* no hospedeiro invertebrado

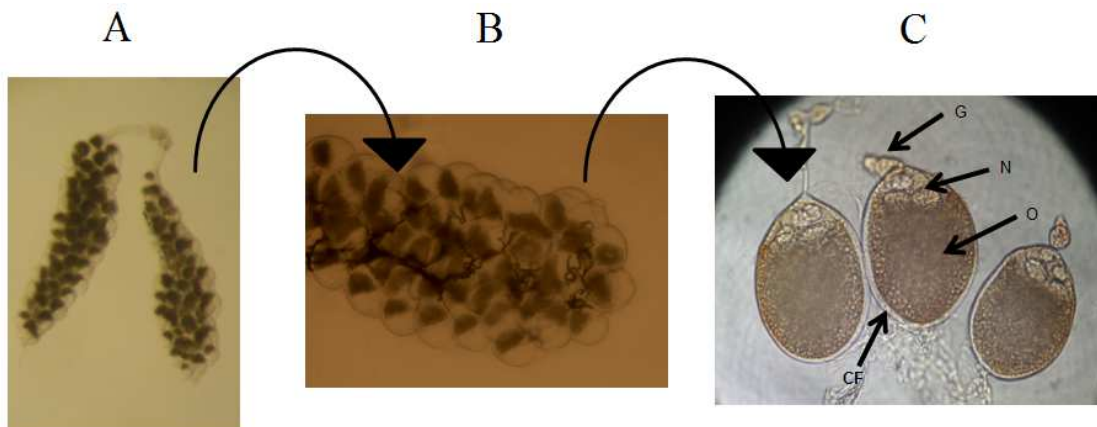


As formas gametocíticas do *Plasmodium*, presentes no sangue do hospedeiro vertebrado infectado, alcançam o intestino médio do mosquito após a alimentação sanguínea. Os gametas por sua vez realizam a reprodução sexuada originando o oocinete. Esse penetra a membrana do intestino médio onde se encista. Após 7 dias inicia-se a liberação dos esporozoítos na hemolinfa e atingem a glândula salivar do hospedeiro invertebrado.

FONTE: Collins (1996)

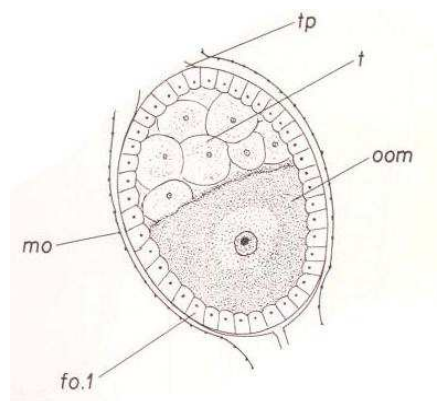
1.2 Vitelogênese

Um dos órgãos mais importantes para a reprodução dos mosquitos são os ovários (Figura 02). Eles estão presentes em pares e cada ovário de mosquito *Ae. aegypti* possui entre 75 a 158 ovariolos unidos pela membrana ovariolar. Cada ovariolo é formado por um germário, folículos primários, secundários e terciários. O folículo ovariano primário é formado por uma túnica própria, células foliculares, sete (7) células acessórias (*nurse*) e um oócito maduro (Figura 03) e será todo esse conjunto que originará o ovo (FORATTINI, 1996).

Figura 02 - Ovários e ovariolos de mosquitos *Aedes aegypti*

Fotos dos ovários (A e B). Ovariolos (C) com suas estruturas: G) germário; N) células acessórias (*nurse*); O) ócito maduro com deposição de proteínas; CF) células foliculares.

FONTE: Ioshino (2013)

Figura 03 - Esquema de um folículo ovariano primário

O folículo ovariano é formado por: membrana ovariolar (mo), a túnica própria (tp), folículo primário com células foliculares (fo. 1), sete células nurse ou trofócito (t) e ócito maduro (oom).
FONTE: Forattini (1996)

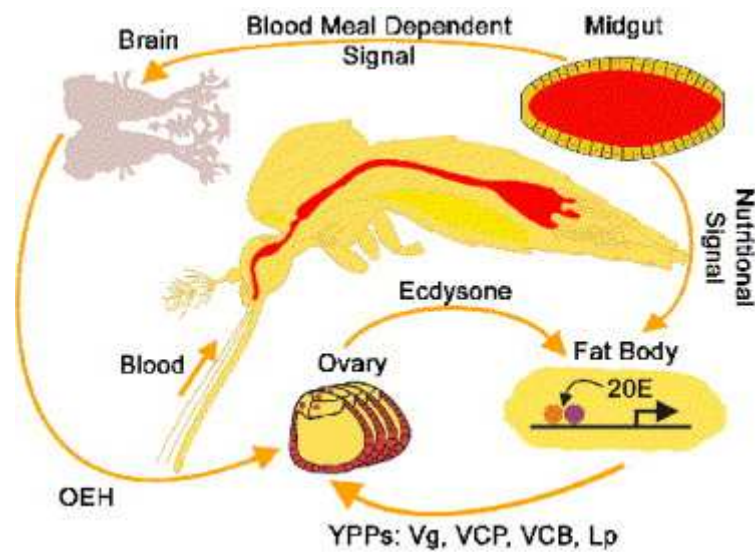
O processo de formação das proteínas precursoras de vitelo denomina-se vitelogênese (Figura 04) que tem como objetivo produzir fonte de nutrientes para o embrião a partir de proteínas sintetizadas e secretadas pelo corpo gorduroso. Muitos estudos sobre a vitelogênese têm sido realizados em *Ae. aegypti* (CLEMENTS, 1992) e para melhorar o entendimento desse processo, ele foi subdividido em três etapas: pré-vitelogênese, período vitelogênico e o

término do período vitelogênico .

A pré-vitelogênese é a fase na qual os tecidos envolvidos são preparados e amadurecidos como, por exemplo, há uma proliferação das organelas biossintéticas nas células do corpo gorduroso e a separação das células foliculares ovarianas para permitir que as moléculas precursoras de vitelo alcancem o oócito maduro. Nessa fase também ocorre a ação do hormônio juvenil III. Ele age sobre o corpo gorduroso e os ovários permitindo uma boa resposta desses órgãos aos hormônios envolvidos no período vitelogênico como o hormônio ecdisteroidogênico e a 20-hidroxiecdisona (RAIKHEL, et al., 2002).

O período vitelogênico inicia-se com a ingestão do sangue pelo mosquito que induz o cérebro a secretar o hormônio ecdisteroidogênico ovariano – OEH (BROWN, et al., 1998). Esse hormônio estimula os ovários a produzir e secretar ecdisona para a hemolinfa que a transportará até o corpo gorduroso onde será convertida em 20-hidroxiecdisona (20E). A 20E por sua vez estimula a síntese das principais proteínas precursoras de vitelo (vitelogenina, carboxipeptidase vitelogênica e catepsina B vitelogênica) que serão secretadas para a hemolinfa pelo corpo gorduroso, endocitadas pelos ovários e armazenadas nos oócitos. Essa fase ocorre entre 0h e 48 horas após o repasto sanguíneo (RAIKHEL; DHADIALLA, 1992; DEITSCH, et al., 1995).

A última fase representa o fim da síntese das proteínas precursoras de vitelo pelo corpo gorduroso e a produção do córion que é uma camada glicoprotéica que, posteriormente, originará a cutícula, camada importante para a proteção do ovo. Essa fase ocorre 48 a 72 horas após a alimentação sanguínea e termina com a deposição dos ovos em uma superfície úmida (RAIKHEL; DHADIALLA, 1992).

Figura 04 - Hormônios envolvidos na vitelogênese no mosquito *Aedes aegypti*

Após a alimentação sanguínea alguns hormônios são ativados para iniciar a síntese das proteínas pelo corpo gorduroso. Inicialmente o cérebro envia um sinal (hormônio ecdisteroidogênico ovariano – OEH) ao ovário que libera a ecdisona na hemolinfa. Esse hormônio, por sua vez, atinge o corpo gorduroso onde é convertido em 20-hidroxiecdisona (20E). Dessa forma inicia-se a síntese das proteínas precursoras de vitelo (YPPs): carboxipeptidase vitelogênica (VCP), vitelogenina (Vg) e catepsina B vitelogênica (VCB).

FONTE: Attardo e D'Amico (2005)

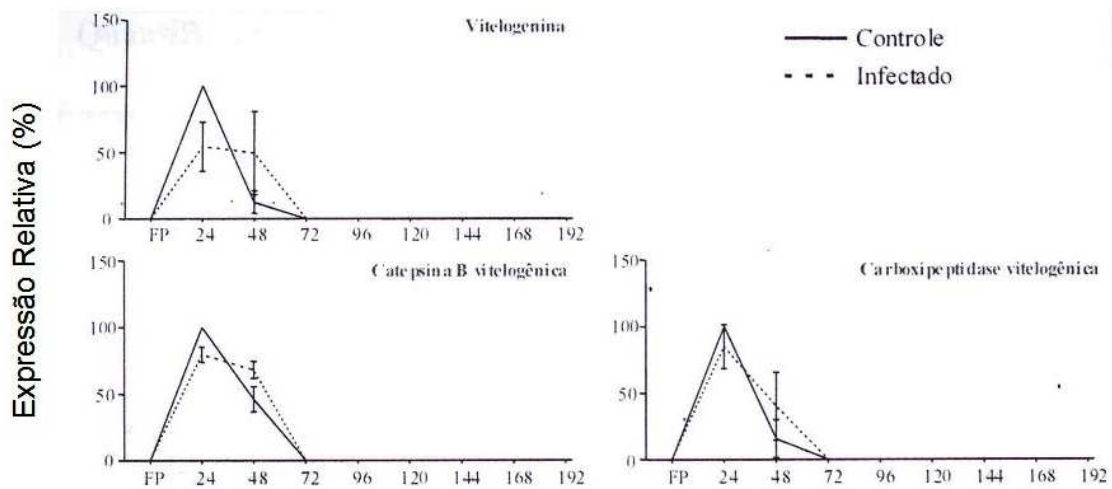
1.3 Alterações proteicas e hormonais em mosquitos infectados

Hogg e colaboradores (1997) demonstraram que fêmeas *Anopheles stephensi* alimentadas com sangue infectado por *P. yoelii nigeriensis* apresentaram ovários com quantidades menores de proteína total. Durante o primeiro ciclo gonadotrófico (24 – 48 horas) ocorre uma redução significativa de vitelina nos ovários, porém a concentração de vitelogenina na hemolinfa estava aumentada (JAHAN; HURD, 1998). Esse resultado foi reforçado com as análises do perfil transcricional de vitelogenina durante os dois ciclos gonadotróficos (após a primeira e segunda alimentação sanguínea, respectivamente) no qual o segundo ciclo, 24 horas após a alimentação sanguínea sadia, apresentou uma redução de 32,75% dos níveis de mRNA de

vitelogenina (AHMED, et al., 2001).

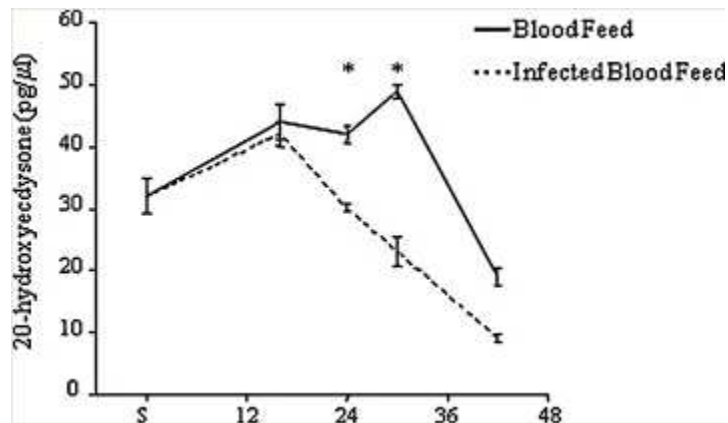
Em mosquitos *Ae. aegypti* infectados por *P. gallinaceum* também foi demonstrado uma alteração no perfil transcricional das três proteínas importantes na vitelogênese de *Ae. aegypti*: vitelogenina, catepsina B vitelogênica e carboxipeptidase vitelogênica. Após 24 horas do repasto sanguíneo infectado com plasmódio ocorreu uma redução na transcrição dos genes que codificam estas proteínas como podemos observar na figura 05 (ARAÚJO, 2011). Além disso, os mosquitos infectados apresentaram uma redução dos níveis do hormônio ecdisona na hemolinfa (Figura 06) (ARAÚJO, 2011).

Figura 05 - Transcrição dos genes das proteínas precursoras de vitelo em mosquitos *Aedes aegypti* infectados por *Plasmodium gallinaceum*



Comparação do perfil de transcrição de genes da vitelogenina, catepsina B vitelogênica e carboxipeptidase vitelogênica de *Aedes aegypti* sadios e infectados por *Plasmodium gallinaceum*.

FONTE: Araújo (2011)

Figura 06 - Quantificação do hormônio ecdisona no mosquito *Aedes aegypti*

Quantificação do hormônio ecdisona na hemolinfa de mosquito *Aedes aegypti* após alimentação sanguínea sadia e infectada com *Plasmodium gallinaceum*.

FONTE: Araújo (2011)

1.4 Alteração do *fitness* reprodutivo em mosquitos infectados por plasmódios

Além dessas alterações na síntese de proteínas há, durante a infecção, mudanças fisiológicas do inseto vetor como a redução da capacidade reprodutiva observada em anofelinos infectados por plasmódios, ou seja, os mosquitos infectados produzem menos ovos quando comparado aos mosquitos saudáveis. Esse fato foi observado tanto em mosquitos da espécie *Ae. aegypti* infectados por *P. gallinaceum* quanto em *An. stephensi* e *An. gambiae* infectados por *P. yoelii nigeriensis* (HACKER, 1971; HOGG; HURD, 1995; AHMED; HURD, 2006; AHMED, et al., 1999). Fêmeas de *Culex tarsalis* infectados com vírus do Nilo Ocidental (WNV) também apresentaram uma redução de, aproximadamente, 50 ovos por jangadas (38,5%), além de reduzir 20% da taxa de eclosão dos mesmos quando comparado aos mosquitos *Culex tarsalis* não infectados (HACKER, 1971; HOGG; HURD, 1995; AHMED, et al., 1999; STYER, et al., 2007).

Uma das hipóteses levantadas para essa redução foi que a quantidade de sangue infectado sugado pelas fêmeas era menor e conseqüentemente o conteúdo de lipídeos, carboidratos e taxa metabólica eram modificados

havendo, assim, uma redução do número de ovos. Entretanto experimentos utilizando *Ae. aegypti* infectado por *P. gallinaceum* revelaram que a queda do número de ovos nesses mosquitos não ocorre por diferenças nutricionais do sangue contendo parasitos. Isso reforça a ideia de que há uma alteração fisiológica quando o parasito invade o organismo do vetor (GRAY; BRADLEY, 2005).

1.5 Morte celular nos mosquitos

A morte celular é uma resposta celular fundamental que apresenta um papel importante no desenvolvimento de organismos e na regulação da homeostase nos tecidos eliminando as células indesejáveis. Um tipo de morte celular é a apoptose uma via de morte celular regulada na qual está envolvida uma sequência de caspases apoptóticas que podem ser classificadas como iniciadoras ou executoras (DEGTEREV; YUAN, 2008; BOATRIGT; SALVESEN, 2003).

Estudos celulares foram capazes de observar a indução da morte celular por apoptose em células foliculares circundantes aos ovócitos em *An. stephensi* 16 horas após alimentação com sangue contendo *P. yoelii nigeriensis*. Essa atividade celular tem como consequência a diminuição do número de ovos produzidos (HOPWOOD et al., 2001).

Em nosso laboratório alguns estudos já foram realizados utilizando o mosquito *Ae. aegypti* infectado por *P. gallinaceum*. Resultados mostraram que ocorre a diminuição da fecundidade em mosquitos infectados quando comparados aos mosquitos não infectados (ARAÚJO, 2007). Esses resultados levam a hipótese de que essa redução pode ser uma consequência do processo de apoptose do folículo ovariano, se essa característica for conservada entre os culicídeos.

Desta forma, o objetivo deste estudo foi aprofundar o conhecimento sobre os mecanismos que podem estar envolvidos na redução do número de ovos produzidos pelos mosquitos *Ae. aegypti* quando infectados por *P. gallinaceum*.

Conclusão

Os mosquitos *Aedes aegypti* infectados por *Plasmodium gallinaceum* apresentam redução significativa do seu fitness reprodutivo e uma das explicações para essa característica é a morte das células foliculares que envolvem os ovariolos.

Até o presente momento não foi possível determinar se o tipo de morte dessas células corresponde à apoptose como foi descrito em mosquitos *Anopheles stephensi* infectados por *Plasmodium yoelii nigeriensis*.

Referências

- 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.
- AHMED, A. M.; MAINGON, R. D.; ROMANS, P.; HURD, H. Effects of malaria infection on vitellogenesis in *Anopheles gambiae* during two gonotrophic cycles. **Insect Mol Biol.**, v. 10, n. 4, p. 347-356, 2001.
- AHMED, A. M.; MAINGON, R. D.; TAYLOR, P. J.; HURD, H. The effects of infection on the reproductive fitness of the mosquito *Anopheles gambiae*. **Invertebr. Repr. Develop.**; v. 36, p. 1-3, 1999.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. Ciclo celular e morte celular programada. In: _____ **A Célula**, 4 ed. São Paulo: Ed. Artmed; 2004, p. 983-1026.
- ARAÚJO, R. V. Estudo dos efeitos da infecção por *Plasmodium gallinaceum* em processos fisiológicos de *Aedes aegypti*. 2007 86 folhas. Tese (Doutorado em Parasitologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.
- ARAÚJO, R. V.; MACIEL, E.; HARTFELDER, K.; CAPURRO, M. L. Effects of *Plasmodium gallinaceum* on hemolymph physiology of *Aedes aegypti* during parasite development. **J. Insect Physiol.**, v. 57, p. 265 – 273, 2011.
- ATTARDO, G.M.; HANSEN, I.A.; RAIKHEL, A.S. Nutritional regulation of vitellogenesis in mosquitoes: implications for anautogeny. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v. 35, p. 661 – 675, 2005.
- BOATRRIGHT, K. M.; SALVESEN, G. S. Mechanisms of caspase activation. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 15, p. 725 – 731, 2003.
- BROWN, M. R.; GRAF, R.; SWIDEREK, K. M.; FENDLEY, D.; STRACKER, T. H.; CHAMPAGNE, D. E.; LEA, A. O. Identification of a steroidogenic neurohormone in female mosquitoes. **J. Biol. Chem.**, v. 273, n. 7, p. 3967-3971, 1998.
- CAROCI, A. S.; LI, Y.; NORIEGA, F. G. Reduced juvenile hormone synthesis in mosquitoes with low teneral reserves reduces ovarian previtellogenic development in *Aedes aegypti*. **J. Exp. Biol.**, v. 207, p. 2685-2690, 2004.

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

- CLEMENTS, A. N. Development, nutrition and reproduction. In: _____ **The Biology of mosquitoes**, v. 1. Londres: Chapman & Hall, 1992, p. 360-405.
- CLIFTON, M. E.; NORIEGA, F. G. Nutrient limitation results in juvenile hormone-mediated resorption of previtellogenic ovarian follicles in mosquitoes. **J. Insect Physiol.**, v. 57, p. 1274–1281, 2011.
- CLIFTON, M. E.; NORIEGA, F. G. The fate of follicles after a blood meal is dependent on previtellogenic nutrition and juvenile hormone in *Aedes aegypti*. **J. Insect Physiol.**, v. 58, p. 1007-1019, 2012.
- COLLINS, F. H.; JAMES, A. A. Genetic modification of mosquitoes. **Science and Medicine**, v. 3, n. 6, p. 52-61, 1996.
- DEGTEREV, A.; YUAN, J. Expansion and evolution of cell death programmes. **Nature**, v. 9, p. 378 – 390, 2008.
- DEITSCH, K. W.; CHEN, J. S.; RAIKHEL, A. S. Indirect control of yolk protein genes by 20-hydroxyecdysone in the fat body of the mosquito, *Aedes aegypti*. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v. 25, n. 4, p. 449-454, 1995.
- FOCKS, D. A. An improved separator for the developmental stages, sexes and species of mosquito (Diptera: Culicidae). **J. Med. Entomol.**, v.17, p. 567-568, 1980.
- FORATTINI, O. P. Família Culicidae – Morfologia . In: _____ **Culicidologia médica**, v. 1. São Paulo: Edusp; 1996, p. 193 - 267.
- 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.
- 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.
- HOGG, J. C.; HURD, H. *Plasmodium yoelii nigeriensis*: the effect of high and low intensity of infection upon the egg production and bloodmeal size of *Anopheles stephensi* during three gonotrophic cycles. **Parasitology**, v. 111, p. 555-562, 1995.
- HOGG, J. C.; HURD, H. The effects of natural *Plasmodium falciparum* infection on the fecundity and mortality of *Anopheles gambiae* s. l. in north east Tanzania. **Parasitology**, v. 114, p. 325-331, 1997.
- 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.

JAHAN, N.; HURD, H. Effect of *Plasmodium yoelii nigeriensis* (Haemosporidia: Plasmodiidae) on *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae) vitellogenesis. **J. Med. Entomol.**, v. 35, n. 6, p. 956-961, 1998.

MARSHALL, J. M.; TAYLOR, C. E. Malaria control with transgenic mosquitoes. **Plos medicine**, v. 6, p. 164-168, 2009.

NAGAO, E.; ARIE, T.; DORWARD, D. W.; FAIRHURST, E. M.; DVORAK, J. A. The avian malaria parasite *Plasmodium gallinaceum* causes marked structural changes on the surface of its host erythrocyte. **J. Struct Biol.**, v. 162, n. 3, p. 460-467, 2008.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. **Health situation in the americas Basic Indicators 2009.** Disponível em: http://new.paho.org/hq/dmdocuments/2009/BI_ENG_2009.pdf. Acesso em: 25 fev. 2013.

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.; 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. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v. 32, p. 1275-1286, 2002.

REITER, P. Climate change and mosquito-borne disease. **Environ. Health Perspect**, v. 109, p. 141-161, 2001.

ROEKRING, S.; SMITH, D. R. Induction of apoptosis in dengue virus infected *Aedes aegypti* mosquitoes. **J. Invertebr. Pathol.**, v. 104, p. 239-241, 2010.

SOUZA-NETO, J. A.; SIM, S.; DIMOPOULOS, G. An evolutionary conserved function of the JAK-STAT pathway in anti-dengue defense. **Proc. Natl. Acad. Sci USA.**, v. 106, n. 42, p. 17841-17846, 2009.

STYER, L. M.; MEOLA, M. A.; KRAMER, L. D. West Nile Virus Infection Decreases Fecundity of *Culex tarsalis* Females. **J. Med. Entomol.**, v. 44, n. 6, p. 1074-1085, 2007.

TUTIDA, L.A. et al. Padronização do MTT como um teste de viabilidade celular em fragmentos corticais de rins de ratos. In: **58 Reunião Anual da Sociedade**

Brasileira Progresso da Ciência. Florianópolis, 2006. Anais. São Paulo. SBPC, 2006 (Online).

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World malaria report 2009.** Geneva: WHO Press 2009, 78 p.