ANDRÉ FRANCO CARDOSO

VITELOGÊNESE DO MOSQUITO

CULEX QUINQUEFASCIATUS

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.

São Paulo
2009

RESUMO

Cardoso AF. Vitelogênese do mosquito *Culex quinquefasciatus* [Tese de Doutorado]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2009.

Fêmeas de *Culex quinquefasciatus* precisam ingerir sangue para iniciar a ovogênese, no qual o corpo gorduroso sintetiza as proteínas vitelogênicas que são secretadas e transportadas aos ovários pela hemolinfa. A vitelogenina (Vg), a principal proteína vitelogênica, é composta por duas subunidades de aproximadamente 200 e 86 kDa. O corpo gorduroso de *Cx. quinquefasciatus* é composto por dois tipos celulares: os enócitos, de citoplasma eletrondenso contendo escassos grânulos, não apresentaram modificações durante todo o processo vitelogênico, e os trofócitos, com grandes inclusões lipídicas e acúmulos de glicogênio que ocupam quase todo o citoplasma. Após o repasto sanguíneo, estas células apresentaram grande crescimento do citoplasma perinuclear até as 48 h após alimentação com sangue (aa), pelo desenvolvimento da maquinaria biossintética. Nesse tempo, a presença de alguns autofagossomos indica o início da degradação dessa maquinaria e o final da síntese de Vg. Às 84 h aa, os trofócitos apresentam as mesmas características prévias ao repasto sanguíneo. Os ovários são subdivididos em subunidades menores, os ovaríolos, que contêm os folículos ovarianos. Antes da alimentação com sangue, os folículos ovarianos mostram um conjunto de células indiferenciadas rodeadas por uma monocamada de epitélio folicular. Logo após o repasto, a Vg circulante é capturada via receptores específicos, localizados principalmente entre as microvilosidades da membrana plasmática do ovócito, sendo endocitada e armazenada em grânulos que, junto a inclusões lipídicas, são acumulados em grandes quantidades durante as primeiras 48 h aa; somente às 84 h aa se observa a incorporação de glicogênio. As células foliculares, responsáveis pela síntese e secreção do córion (casca), apresentam gradual desenvolvimento do retículo endoplasmático rugoso e, às 48 h aa, este preenche o citoplasma. O espaço periovocítico, entre o epitélio e o ovócito, começa a ser preenchido por placas eletrondensas que formarão o endocóron. Simultaneamente, pequenas vesículas eletrondensas na região apical vão se fundindo para dar origem ao exocóron. Por volta das 60 h aa, as células foliculares começam a apresentar grandes vacúolos, indicando o início de sua degeneração. O gene do receptor de vitelogenina (rVitCx), localizado exclusivamente nos ovários, aumenta seus transcritos nos primeiros cinco dias após a emergência da fêmea adulta e nas primeiras 48 h aa, durante a vitelogênese. O perfil transcricional de Vg mostrou um pico no terceiro dia de vida adulta e ao final do processo vitelogênico.

Palavras-chave: *Culex quinquefasciatus*; Vitelogenina; Ovários; Corpo gorduroso; Receptor de vitelogenina; Oogênese.

ABSTRACT

Cardoso AF. *Culex quinquefasciatus* vitellogenesis [Ph. D. Thesis]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2009.

Culex quinquefasciatus females need a blood meal to start the oogenesis in which fat body synthesizes vitellogenic proteins that are secreted and transported to ovaries by the hemolymph. Vitellogenin (Vg), the main vitellogenic protein, is composed of two subunits of approximately 200 and 86 kDa. *Cx. quinquefasciatus* fat body has two cell types: oenocytes, with electrondense cytoplasm containing few granules, show no changes throughout the vitellogenic process, and trophocytes, with large lipid inclusions and glycogen depots that occupy almost all the cytoplasm. After blood meal, trophocytes show an increasing growth of the perinuclear cytoplasm, due the development of the biosynthetic machinery. This process lasts until 48 h post blood meal (PBM), when the presence of some autophagosomes indicates the beginning of the machinery degradation and the end of the Vg synthesis. At 84 h PBM, trophocytes display the same characteristics as before the blood feeding. Ovaries are divided into subunits, the ovarioles, which contain the ovarian follicles. Before blood meal, ovarian follicles show a set of undifferentiated cells surrounded by a monolayer of follicular epithelium. Soon after the engorgement, the circulating Vg begins to be endocytosed via specific receptors, located mainly between the microvilli of the oocyte plasma membrane, and stored in granules that, together with lipid inclusions, are greatly accumulated during the first 48 h PBM; only at 84 h PBM is observed the incorporation of glycogen. The follicular cells, responsible for the synthesis and secretion of the chorion (shell), show gradual development of rough endoplasmic reticulum which, at 48 h PBM, fills their cytoplasm. Perioocytic space (present between the epithelium and the oocyte) begins to be filled by electrondense plates that form the endocórion. At the same time, small electrondense vesicles, formed in the apical region of the cells, fused together to form the exocórion. Around 60 h PBM, follicular cells begin to show large vacuoles, indicating the onset of cell degeneration. The gene of the vitellogenin receptor (rVitCx), localized exclusively in the ovaries, increases its transcripts in the first five days after the adult female emergence and in the first 48 h PBM. The transcriptional profile of Vg shows a peak on the third day of adult life and another at the end of the oogenesis.

Keywords: *Culex quinquefasciatus*; Vitellogenin; Ovaries; Fat body; Vitellogenin receptor; Oogenesis.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Evolução e importância dos insetos

Os insetos pertencem ao Filo Arthropoda que, com mais de um milhão de espécies descritas, constitui o maior grupo do Reino Animal, mais que três vezes a somatória de todas as espécies restantes. Devido a sua grande capacidade adaptativa, os artrópodes colonizaram todos os habitats, sendo o terrestre onde talvez tiveram o maior êxito (Ruppert e Barnes, 1996; Engel e Grimaldi, 2004).

Este Filo é dividido em 5 subfilos: Trilobita (**do lat.** “três lobos”; grupo fóssil); Chelicerata (do gr. *khelé*, “pinças de caranguejo” e *kératos*, “corno”, “antena de inseto”); Crustacea (**do lat.** *crusta*, “crosta” e *aceum*, “natureza de algo”), Myriapoda (**do gr.** *myria*, “dez mil: e *podos*, “patas”) e Hexapoda (**do gr.** *hexa*, “seis” e *podos*, “patas”), ao qual pertencem os insetos. Classificações mais antigas agrupam em um único subfilo, o Atelocerata, os subfilos Hexapoda e Myriapoda, com base em semelhanças morfológicas entre seu sistema respiratório e os apêndices da cabeça (Glenner et al., 2006). Estudos mais recentes, porém, correlacionam o subfilo Hexapoda ao subfilo Crustacea, sendo referidos como Pancrustacea, com base em análise de diversas sequências de uma variedade de genes e novos estudos morfológicos (Giribet et al., 2001; Glenner et al., 2006).

A Classe Insecta, que contém mais de 750 mil espécies descritas, é encontrada em quase todos os habitats. Engel e Grimaldi (2004) estimam que os insetos originaram-se há 434 milhões de anos e que os insetos pterigotos (do gr. pterigotos, “alado”) surgiram há 387 milhões de anos. Sua grande capacidade adaptativa e a capacidade de vôo permitiram enorme dispersão, otimizando a busca por melhores condições ambientais, a fuga de predadores e a busca de alimentos.

As características gerais dos insetos são: corpo segmentado em cabeça, tórax e abdômen; três pares de apêndices articulados (patas); um par de olhos compostos laterais e, geralmente, dois pares de asas, embora um par se encontre reduzido, modificado ou ausente em vários grupos (Ruppert e Barnes, 1996).

A origem dos insetos é um tema muito controverso devido à falta de registros fósseis que conectem os hexápodes aos demais subfilos de artrópodes (Glenner et al.,

2006). Estudos mais recentes sobre este ponto incluem, além da análise morfológica, o estudo molecular com base nas sequências de DNA.

Muitos insetos apresentam grande importância ecológica no ambiente terrestre. Muitas plantas floríferas são polinizadas por insetos; muitos são detritívoros, alimentando-se de plantas e animais mortos, reciclando os restos orgânicos e retornando-os à cadeia alimentar. Outro aspecto interessante dos insetos refere-se à culinária, sendo consideradas saborosas iguarias por diferentes povos (Machado, 1987) como os espetinhos de gafanhotos encontrados no cardápio da culinária chinesa, lagartas grelhadas ou ainda uma saborosa farofa de iça, iguaria muito apreciada por nós, brasileiros.

A exploração dos produtos derivados dos insetos também tem grande importância na sociedade. A produção de mel e a fabricação de tecidos de seda são muito exploradas ainda nos dias atuais. Na medicina legal, ovos ou larvas de algumas espécies de insetos são utilizados para a determinação do tempo decorrido desde a morte (*post mortem*) pelo desenvolvimento embrionário ou larval (Sukontason et al., 2004, 2008). Outra importante utilidade dos insetos é o uso de larvas de mosca em feridas crônicas, nas quais as larvas se alimentam dos tecidos necrosados facilitando a cicatrização (Sherman, 2002; Smith et al., 2006; Figueroa et al., 2006).

Em contrapartida, os insetos também são vistos por muitos como vilões. Na agricultura, muitos insetos como gafanhotos, besouros, cigarrinhas, são verdadeiras pragas por se alimentarem das plantas ou transmitirem a elas uma série de patógenos. Outros insetos nos afetam diretamente por atuarem como vetores de doenças de importância médica humana ou veterinária. Alguns exemplos são: a peste, transmitida pelas pulgas; o tifo, pelos piolhos; as tripanossomíases africanas e americana, transmitidas pela mosca tsé-tsé e pelos triatomíneos, respectivamente; as leishmanioses, transmitidas pelos flebotomíneos, entre outros (Ruppert e Barnes, 1996; Rey, 2008).

Um capítulo à parte é o dos mosquitos, objeto de estudo deste trabalho, vetores de diversos patógenos de importância médica humana e veterinária, que irei detalhar melhor posteriormente. Devido à grande relevância dos insetos vetores, muitos estudos têm sido feitos a fim de controlá-los ou, mais recentemente, de torná-los refratários aos patógenos. O uso crescente de pesticidas tem levado à seleção de indivíduos resistentes fazendo necessários a busca e o desenvolvimento de outras

drogas ou de novas estratégias para o controle dos mesmos (Riehle e Jacobs-Lorena, 2005; Riehle et al., 2007). Outro importante fator relacionado ao uso indiscriminado dos pesticidas, é que eles podem ser danosos tanto para o meio ambiente como para a saúde.

Basicamente, existem três estratégias para o controle de insetos: o controle mecânico (ex: telas nas janelas), o controle químico (inseticidas) e o controle biológico (uso de predadores naturais). Uma quarta estratégia é o uso combinado do controle químico e mecânico (ex: telas impregnadas com inseticidas). Outra alternativa ainda em estudo e desenvolvimento é a utilização de insetos geneticamente modificados (Ito et al., 2002; Moreira et al., 2002; Sperança e Capurro, 2007; Rafikov et al., 2008; Marshall e Taylor, 2009) e a de organismos para transgênicos (Riehle e Jacobs-Lorena, 2005; Riehle et al., 2007; Ren et al., 2008).

1.2 Mosquitos

A família Culicidae (do lat. *Culex*, “mosquito”) pertence à ordem Díptera e é composta por três subfamílias que agregam cerca de 3.600 espécies (Crosskey, 1988), predominantemente na área neotropical (Ward, 1982). Dentre estas três subfamílias: Anophelinae, Culicinae e Toxorhynchitinae, apenas as duas primeiras são vetores de diferentes patógenos, devido a seus hábitos hematófagos (Rey, 2008). Alguns desses patógenos são responsáveis pela transmissão de doenças humanas como malária, filariose linfática, dengue, febre amarela urbana e silvestre, febre de Rift Valley, encefalite de St. Louis, além de outras arboviroses de importância veterinária como as encefalomyelites equinas.

Culex quinquefasciatus (Díptera, Culicidae) é um mosquito cosmopolita, altamente antropofílico e completamente adaptado às condições urbanas, já que suas larvas se desenvolvem em coleções de água poluída. Seu zumbido causa grande incômodo noturno e suas picadas podem causar alergias (Malafronte et al., 2003). Também é o principal vetor de *Wuchereria bancrofti*, agente da filariose linfática, e um competente vetor de vírus neurotrópicos (Gaunt et al., 2001).

Anophelinae e Culicinae, conhecidos popularmente como pernilongos, apresentam pequeno porte e corpo delgado. Holometábolos, eles iniciam sua vida em ambientes

aquáticos, onde a fêmea deposita seus ovos. Estes eclodem e dão origem a larvas que, após aproximadamente sete dias de alimentação, entram na fase de pupa. Nesta fase utilizam os nutrientes armazenados na fase anterior, sofrem metamorfose e dão origem a insetos adultos alados, que passam a viver no meio terrestre. Sua sobrevivência neste meio depende da ingestão de açúcares, porém, para que o ciclo reprodutivo se complete, é necessário que a fêmea se alimente de sangue que, rico em proteínas, é essencial para a maturação dos ovos e a conclusão do ciclo gonotrófico.

Os principais órgãos envolvidos neste processo são o corpo gorduroso e os ovários, cujas generalidades descreveremos a seguir.

1.3 O corpo gorduroso

O corpo gorduroso está distribuído como um lençol celular sob a parede do corpo na região tóraco-abdominal, se estendendo até a cavidade corpórea e formando bainhas ao redor dos órgãos (Clements, 1992). E o principal órgão do metabolismo intermediário (Chapman, 1998) e principal tecido de depósito de substâncias nutritivas e formadoras de energia: proteínas, lipídeos e carboidratos (Snodgrass, 1935).

Quatro tipos celulares foram descritos em diferentes insetos: os trofócitos, os micetócitos, as células de urato e os enócitos. Em muitas ordens de insetos somente os trofócitos são encontrados (Chapman, 1998). Eles são responsáveis pela síntese e estocagem de lipídeos, carboidratos e compostos nitrogenados. Estudos em *Ae. aegypti* (Raikhel e Lea, 1983; Raikhel, 1987a) mostraram que, após a ingestão de sangue, os trofócitos sofrem diversas mudanças morfológicas, tais como: aumento e ativação do nucléolo, proliferação dos ribossomos e do retículo endoplasmático rugoso, desenvolvimento do complexo de Golgi e aumento das invaginações da membrana plasmática.

Os micetócitos são células encontradas em algumas ordens (Hemiptera e Homoptera) de insetos, elas contêm microorganismos simbiotes e estão espalhadas pelo corpo gorduroso (McLean e Houk, 1973; Houk e Griffiths, 1980; Chapman, 1998).

As células de urato são caracterizadas por conterem grandes cristais de ácido úrico em seu citoplasma, sendo encontradas nas ordens Collembola, Blattodea (baratas) e Thysanura (traças de livros) (Chapman, 1998).

Os enócitos são encontrados na cavidade corporal de muitos insetos, localizados em grupos ou individualmente em volta aos órgãos abdominais. Em muitos Hemiptera (percevejos) e Hymenoptera (vespas, abelhas, formigas) adultos, os enócitos são geralmente encontrados livres entre as células do tecido gorduroso (Snodgrass, 1935). Tem se atribuído aos enócitos a síntese de feromônios e hidrocarbonetos, precursores dos principais lipídeos da cutícula (Schal et al., 1998), sendo que os responsáveis pela produção de hidrocarbonetos constituiriam uma população de localização tegumentar em baratas (*Blattella germanica*; Fan et al., 2003).

1.4 Os ovários

Os ovários situam-se dorso-lateralmente na região posterior do abdômen. Cada ovário é composto por unidades funcionais menores, denominadas ovaríolos, que se abrem em um oviduto único, o cálice, que se continua com o oviduto lateral (Clements, 1992). Os ovidutos laterais se unem para formar um duto comum que se liga à vagina. O número de ovaríolos varia muito nas diferentes espécies (Snodgrass, 1935).

A porção cefálica do ovaríolo, o *germarium*, abriga as células germinativas e seus derivados. É o local de proliferação, que darão origem aos ovócitos (Snodgrass, 1935).

O amadurecimento e crescimento dos ovócitos se dão no *vitellarium*, ou zona de crescimento, região localizada caudalmente ao *germarium*. No *vitellarium* é formado o folículo, composto por um ovócito rodeado por uma monocamada de células epiteliais, as células foliculares, que são unidas entre si por pontes intercelulares (Clements, 1992). Quando existentes, as células auxiliaadoras (*nurse cells*) completam o folículo e são responsáveis pela síntese de ribossomos e RNA mensageiro, que são transferidos para o ovócito através de pontes citoplasmáticas. O transporte de RNAs sintetizados nas células auxiliaadoras para o ovócito tem sido bem documentado para inúmeros genes importantes no desenvolvimento ovariano

de *Drosophila* (Cho e Raikhel, 2001). De acordo com a presença ou ausência das células auxiliadoras, os ovários são classificados como ovários meroísticos ou panoísticos, respectivamente (Forattini, 1996).

A cada ciclo gonotrófico, um número variável de folículos maduros é formado, sendo seus ovócitos posteriormente revestidos pelo córion, composto por estruturas protéicas produzidas pelas células foliculares (Clements, 1992; Forattini, 1996). A entrada do espermatozoide no ovócito é realizada através de um pequeno poro, a micrópila.

1.5 Vitelogênese

Este processo foi mais detalhadamente estudado em *Ae. aegypti* (Behan e Hagedorn, 1978; Raikhel e Lea, 1983; Raikhel, 1984; Raikhel et al., 1986; Raikhel, 1987b; Snigirevskaya et al., 1997a, b; Briegel et al., 2003), sendo este modelo utilizado como padrão para todos os mosquitos. Antes da alimentação com sangue, as fêmeas encontram-se na fase pré-vitelogênica, na qual as células do corpo gorduroso e dos folículos ovarianos estão sendo preparadas para a produção, absorção e processamento da vitelogenina (Vg; Raikhel e Lea, 1983).

O processo vitelogênico inicia-se após o repasto sanguíneo. Durante este processo, o corpo gorduroso sintetiza diversas proteínas que são transportadas pela hemolinfa e armazenadas no ovócito. A vitelogenina é a proteína mais abundante encontrada na hemolinfa de *Ae. aegypti* durante este período (Raikhel e Lea, 1983). As vitelogeninas são fosfolipoproteínas glicosiladas oligoméricas, com massa molecular variando entre 200 e 600 kDa, sintetizadas inicialmente como precursores que são clivados em duas ou mais subunidades (Dhadialla e Raikhel, 1990; Clements, 1992). Em *Ae. aegypti*, os tamanhos das duas subunidades são aproximadamente 200 e 65 kDa (Raikhel et al., 1986; Raikhel, 1987a, b; Dhadialla e Raikhel, 1990).

Uma hora após a alimentação com sangue (aa) já foi possível a localização da vitelogenina no corpo gorduroso de *Ae. aegypti*, por imunofluorescência. A síntese atinge seu pico às 24 h aa, e só termina entre 30 e 36 h aa (Raikhel e Lea, 1983).

Ainda nos trofócitos do corpo gorduroso a vitelogenina sofre uma série de modificações como glicosilação, fosforilação e clivagem (Dhadialla e Raikhel, 1990). Transportada para o ovócito pela hemolinfa, atravessa os espaços existentes entre

as células foliculares e se liga aos receptores específicos localizados na membrana do ovócito, sendo incorporada por endocitose (Roth e Porter, 1964; Clements, 1992; Snigirevskaya et al., 1997b; Sappington e Raikhel, 1998).

No ovócito, a vitelogenina é armazenada em grânulos (Raikhel, 1987a) até ser utilizada para o desenvolvimento do embrião. Algumas enzimas, responsáveis pela hidrólise da vitelina durante a embriogênese, também são produzidas pelo corpo gorduroso e são internalizadas e armazenadas no ovócito. Em *Ae. aegypti*, foram descritas duas enzimas sintetizadas no corpo gorduroso e armazenadas no ovócito, uma carboxipeptidase (Cho et al., 1991) e um precursor de 44 kDa, muito semelhante a catepsina B (Cho et al., 1999). Após a internalização, ambas pró-enzimas são armazenadas dentro dos grânulos de vitelina. Em *Musca domestica*, uma catepsina é a principal enzima responsável para aquela função. Ela foi detectada na forma de pró-enzima nos grânulos de vitelo (Ribolla et al., 2001), e é ativada pela diminuição do pH dentro do grânulo durante a embriogênese (Ribolla e de Bianchi, 1995).

1.6 Desenvolvimento folicular

O desenvolvimento folicular pode ser dividido em quatro estágios: a fase pré-vitelogênica, a fase de iniciação, a fase trófica e a fase pós-trófica (Clements, 1992).

Durante a fase pré-vitelogênica, os folículos se separam do *germarium* tornando-se competentes para incorporar a vitelogenina. A fase de iniciação começa poucas horas após a alimentação com sangue, quando o folículo começa a crescer levemente, com formação de microvilosidades. Já na fase trófica ocorre o maior e mais rápido aumento folicular pela incorporação da vitelogenina. Quando a incorporação desta proteína é finalizada, o folículo começa a ser envolvido por uma fina camada de córion. Na fase pós-trófica, o folículo assume sua forma madura e é revestido por duas camadas coriônicas (Clements, 1992).

1.7 Receptores de vitelogenina (VgR)

Receptores de vitelogenina de insetos são moléculas grandes, com peso molecular variando entre 180 e 214 kDa (Sappington et al., 1996), duas vezes maiores que os receptores de vitelogenina encontrados em vertebrados (Sappington e Raikhel, 1998). Eles pertencem à família de receptores de lipoproteínas de baixa densidade (LDLR - *low-density lipoprotein receptor*) sendo caracterizados por conterem domínios estrutural e funcionalmente bem definidos (Sappington e Raikhel, 1998; Tufail e Takeda, 2009). O primeiro domínio, denominado domínio de ligação entre o ligante e o receptor (LBRs - *ligand binding repeats*), contém seis resíduos de cisteína que se ligam por pontes dissulfeto. Redução destas ligações dissulfeto altera a estrutura do receptor inativando sua capacidade de ligação (Tufail e Takeda, 2009). O segundo domínio, fator de crescimento epidérmico (EGF - *epidermal grow factor*), está relacionado com a promoção de estabilidade ao domínio LBR por sua ligação ao cálcio (Sappington e Raikhel, 1998) e à dissociação do ligante/receptor pela acidificação dos endossomos (Tufail e Takeda, 2009). O domínio de glicosilação (tipo O-glicosilação) é curto, com muitos resíduos de serina e treonina (Sappington e Raikhel, 1998; Tufail e Takeda, 2009); está justaposto à região extracelular da membrana plasmática (Tufail e Takeda, 2009). O domínio transmembrana é responsável pela ancoragem do receptor à membrana plasmática e a uma região citoplasmática contendo pelo menos uma cópia do motivo NPXY, responsável pelo sinal de internalização do receptor em vesículas (Sappington e Raikhel, 1998; Tufail e Takeda, 2009).

Os receptores de vitelogenina são encontrados somente nos ovários e estudos realizados em *Ae. aegypti*, utilizando hibridização *in situ*, mostraram que os transcritos estão localizados principalmente nos ovócitos e nas células auxiliadoras, das que são transportados para o ovócito (Sappington et al., 1996; Cho e Raikhel, 2001), em cuja superfície se posicionam (Sappington e Raikhel, 1998).

Durante o período vitelogênico, a membrana plasmática dos ovócitos é caracterizada pela presença de grande desenvolvimento do complexo de endocitose (Snigirevskaya et al., 1997a, b), permitindo que o ovócito acumule grandes quantidades de vitelogenina necessárias para o desenvolvimento do embrião. Este complexo é composto pelas microvilosidades, os receptores específicos localizados principalmente na sua base e entre elas, vesículas recobertas de clatrina e

endossomos (Raikhel e Dhadialla, 1992). Após a dissociação do receptor da vitelogenina, aquele é reciclado em pequenas vesículas que se fundem à membrana celular do ovócito (Clements, 1992; Sappington e Raikhel, 1998).

Imunoensaios realizados em *Ae. aegypti* (Sappington et al., 1995) mostraram que os transcritos de VgR aumentam durante os primeiros cinco dias de vida adulta (período pré-vitelogênico) e durante as primeiras 24 h aa (período vitelogênico), declinando em tempos posteriores.

A capacidade de reconhecimento entre a vitelogenina e seu receptor está intimamente relacionada às modificações pós-traducionais que a vitelogenina sofre no interior dos trofócitos durante sua síntese. Experimentos realizados em *Ae. aegypti* mostraram que o processo de glicosilação é importante para manter a estabilidade da proteína e que o processo de fosforilação está claramente relacionado ao reconhecimento entre ambos (Dhadialla et al., 1992).

1.8 Córion

A formação do córion foi amplamente estudada bioquímica e morfológicamente por diversos autores em *Drosophila* sp, sendo que a maioria dos trabalhos realizados em mosquitos se restringe ao estudo morfológico (Monnerat et al., 1999; Soumaré e Ndiaye, 2005; Pereira et al., 2006; Haddow et al., 2009). Em mosquitos, as células foliculares são responsáveis pela produção e secreção das proteínas coriônicas (Li e Li, 2006). A secreção destas proteínas ocorre em duas fases distintas e resulta na formação de duas camadas, o endocórion e o exocórion (Hinton, 1968; Clements, 1992). A maioria das proteínas coriônicas é glicosilada e extremamente hidrofóbica. Além disso, algumas proteínas coriônicas podem se ligar umas a outras, tornando mais difícil sua solubilização (Yao e Li, 2003). O processo de formação do córion é um importante passo para o sucesso reprodutivo do mosquito. Ele é responsável pela proteção do ovócito e/ou do embrião em desenvolvimento a uma série de intempéries, tais como ressecamento, pressões mecânicas, infecções bacterianas e virais etc (Yao e Li, 2003).

1.9 Controle hormonal durante a vitelogênese

O hormônio juvenil e a 20-hidroxiecdisona são os principais controladores da ativação gênica para a síntese de Vg. Este controle tem sido bastante estudado em aedinos e anofelinos (Fallon et al., 1974; Redfern, 1982; Raikhel et al., 2002; Davey, 2007; Roy et al., 2007).

A fase pré-vitelogênica, na qual o corpo gorduroso se torna capaz para a síntese de vitelogenina, é controlada pelo hormônio juvenil III. Após a alimentação com sangue, a distensão do epitélio intestinal sinaliza ao cérebro a liberação de um neuro-hormônio que estimula os ovários a produzir ecdisona (Roy et al., 2007). A ecdisona é convertida em sua forma ativa, 20-hidroxiecdisona no corpo gorduroso; responsável pelo controle da síntese e secreção de Vg durante o período vitelogênico, é encontrada em altas concentrações na hemolinfa, tendo seu pico por volta das 24 h aa (Raikhel et al., 2002; Roy et al., 2007). Aplicações de 20-hidroxiecdisona *in vivo* ou *in vitro* mostraram que as células do corpo gorduroso de *Ae. aegypti* respondem a doses fisiológicas deste hormônio sintetizando Vg (Fallon et al., 1974; Raikhel et al., 2002). Os níveis de 20 hidroxiecdisona caem gradualmente nos tempos posteriores até o final do processo vitelogênico com o aumento gradual do hormônio juvenil III (Raikhel et al., 2002).

1.10 Lipoforina

Lipoforina é a maior lipoproteína encontrada na hemolinfa de insetos (Sun et al., 2000). A sua função é o transporte de lipídeos derivados da digestão sanguínea para todos os outros tecidos do inseto (Capurro et al., 1994; Marinotti et al., 2006). A massa da molécula nativa é de aproximadamente 700 kDa sendo composta por aproximadamente 35-50% de lipídeos principalmente diacilglicerois e fosfolipídeos (Kanost, 1990). Lipoforinas de insetos são compostas por dois tipos diferentes de apolipoproteínas, apolipoforina-I (ApoLp-I, ~250 kDa) e apolipoforina-II (ApoLp-II, ~80 kDa) (Capurro et al., 1994; Sun et al., 2000; Atella et al., 2006). Uma terceira apolipoproteína (apolipoforina-III, ~18 kDa) é encontrada em algumas espécies de insetos (Capurro et al., 1994; Atella et al., 2006).

Após a alimentação com sangue, foi observado o aumento da concentração de lipoforina em *Ae. aegypti*, atingindo o máximo às 48 h aa e declinando posteriormente até a oviposição (Capurro et al., 1994). Este aumento também foi observado em *Anopheles gambiae*, atingindo o pico às 24 h aa e retornando aos valores basais ao término da digestão de sangue e a formação dos ovos (Marinotti et al., 2006).

1.11 *Wolbachia pipientis*

Wolbachia pipientis é uma α -proteobactéria que pertence à ordem Rickettsiales. Foi reportada pela primeira vez em tecidos reprodutivos do mosquito *Cx. pipiens* por Hertig e Wolbach em 1924. Em homenagem a Wolbach, Hertig a denominou *Wolbachia pipientis* (Stouthamer et al., 1999).

Como característico de todas as bactérias pertencentes ao gênero *Rickettsia*, *Wolbachia* apresenta uma membrana celular rodeada pela parede celular, cromatina dispersa, grande número de ribossomos e, ainda, uma terceira membrana provinda da membrana celular do hospedeiro, aspecto muito comum em endossimbiontes (Voronin et al., 2004). São bactérias Gram-negativas (parede celular composta por uma única camada de proteoglicanas), intracelulares obrigatórias e encontradas principalmente nos tecidos reprodutivos de diversos hospedeiros (insetos, aracnídeos, crustáceos e nematóides), sendo transmitidas por herança materna (Werren, 1997). Existem seis cepas dentro deste grupo: A, B, C, D, E e F, sendo que somente as cepas A e B infectam mosquitos (Lo et al., 2002).

Infecções por esta bactéria acarretam uma série de importantes modificações reprodutivas incluindo: partenogênese, feminização, morte dos machos e incompatibilidade citoplasmática, fenômeno mais comumente encontrado e bem estudado, sendo o único descrito em mosquitos (Voronin et al., 2004). Além disso, *Wolbachia* pode causar diferenças na fecundidade e fertilidade de algumas espécies (Min e Benzer, 1997; Dobson e Rattanadechakul, 2001).

6 CONCLUSÕES

- As fêmeas de *Cx. quinquefasciatus* tomam mais tardiamente seu primeiro repasto sanguíneo e seu processo vitelogênico é mais prolongado que o descrito para *Ae. aegypti*.
- O corpo gorduroso apresenta dois tipos celulares: trofócitos e enócitos. Somente os trofócitos sofrem modificações durante o processo vitelogênico.
- A ultraestrutura dos trofócitos mostra grande desenvolvimento da maquinaria biossintética durante as primeiras 48 h após a alimentação com sangue (aa). Neste tempo começa a degradação organelar e o fim da síntese de vitelogenina (Vg), caracterizada pela presença crescente de autofagossomos.
- Diferentemente do descrito em *Ae. aegypti*, antes da alimentação com sangue o folículo ovariano está constituído por um conjunto de células indiferenciadas rodeadas pelo epitélio folicular.
- Após a alimentação com sangue, o ovócito se caracteriza pelo acúmulo constante de inclusões lipídicas e grânulos de vitelina até as 84 h aa, quando também começa a incorporação de glicogênio.
- A ultraestrutura das células foliculares sugere serem elas as responsáveis pela síntese das proteínas coriônicas devido ao grande desenvolvimento de retículo endoplasmático rugoso e o acúmulo de vesículas e grânulos em sua região apical.
- Similarmente à de outros mosquitos, a Vg de *Cx. quinquefasciatus* é formada por duas subunidades de aproximadamente 200 e 86 kDa, ambas glicosiladas.
- A transcrição do gene da Vg começa logo após a emersão (AE), tendo seu pico no terceiro dia AE. Durante o primeiro ciclo gonotrófico, diferentemente do descrito em *Ae. aegypti* e *Anopheles gambiae*, o transcrito não apresenta um pico bem definido, tendo um leve aumento no final do processo vitelogênico.
- A lipoforina, também constituída por duas subunidades de aproximadamente 248 e 93 kDa (Apo-I e Apo-II), tem aumento da transcrição de seu gene durante as primeiras 48 h aa do primeiro ciclo gonotrófico.

- O fragmento do gene do receptor de vitelogenina de *Cx. quinquefasciatus* apresenta alta identidade com o de *Ae. aegypti*. Sua transcrição aumenta durante os primeiros cinco dias AE e, durante o ciclo gonotrófico, tem seu pico às 48 h aa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adham FK, Mehlhorn H, El-Basheir ZM, Yamany AS. Light and electron microscopic studies on the development of the ovaries of *Culex pipiens quinquefasciatus* (Say) (Diptera: Culicidae). Parasitol Res. 2009;105:939-48.

Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res. 1997;25:3389-402.

Atella GC, Silva-Neto MA, Golodne DM, Arefin S, Shahabuddin M. *Anopheles gambiae* lipophorin: characterization and role in lipid transport to developing oocyte. Insect Biochem Mol Biol. 2006;36:375-86.

Baldrige GD, Feyereisen R. Ecdysteroid titer and oocyte growth in the northern house mosquito, *Culex pipiens* L. Comp Biochem Physiol. 1986;83A:325-29.

Behan M, Hagedorn HH. Ultrastructural changes in the fat body of adult female *Aedes aegypti* in relationship to vitellogenin synthesis. Cell Tissue Res. 1978;186:499-506.

Bose SG, Raikhel AS. Mosquito vitellogenin subunits originate from a common precursor. Biochem Biophys Res Commun. 1988;155:436-42.

Briegleb H, Gut T, Lea AO. Sequential deposition of yolk components during oogenesis in an insect, *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). J Insect Physiol. 2003;49:249-60.

Capurro Mde L, de Bianchi AG, Marinotti O. *Aedes aegypti* lipophorin. Comp Biochem Physiol Biochem Mol Biol. 1994;108:35-9.

Chapman RF. The insects. Structure and function. 4 ed. United Kingdom: Cambridge University Press; 1998.

Chen L, Zhu J, Sun G, Raikhel AS. The early gene Broad is involved in the ecdysteroid hierarchy governing vitellogenesis of the mosquito *Aedes aegypti*. J Mol Endocrinol. 2004;33:743-61.

Cho WL, Deitsch KW, Raikhel AS. An extraovarian protein accumulated in mosquito oocytes is a carboxypeptidase activated in embryos. *Proc Natl Acad Sci.* 1991;88: 10821-24.

Cho KH, Raikhel AS. Organization and developmental expression of the mosquito vitellogenin receptor gene. *Insect Mol Biol.* 2001;10:465-74.

Cho WL, Tsao SM, Hays AR, Walter R, Chen JS, Snigirevskaya ES, Raikhel AS. Mosquito cathepsin B-like protease involved in embryonic degradation of vitellin is produced as a latent extraovarian precursor. *J Biol Chem.* 1999;274:13311-21.

Clements AN. The biology of mosquitoes. 1 ed. New York: Cambridge University Press; 1992.

Clements AN, Boocock MR. Ovarian Development in Mosquitos - Stages of Growth and Arrest, and Follicular Resorption. *Physiol Entomol.* 1984;9:1-8,

Crosskey RW. Old tools and new taxonomic problems in bloodsucking insects. In: Service MW. editor. *Biosystematics of Haematophagous Insects.* Oxford: Clarendon Press; 1988. p. 1-18.

Davey K. From insect ovaries to sheep red blood cells: A tale of two hormones. *J Insect Physiol.* 2007;53:1-10.

da Rosa JA, Justino HHG, Barata JMS. Differences in the size of eggshells among three *Pangstrongylus megistus* colonies. *Rev Saúde Publica.* 2003;37:528-30.

de Almeida F. Análise comparativa de *Culex quinquefasciatus* infectados e não infectados por *Wolbachia pipientis* [dissertação (Mestrado em Ciências - Relação patógeno-hospedeiro)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2008.

Dhadialla TS, Hays AR, Raikhel AS. Characterization of the solubilized mosquito vitellogenin receptor. *Insect Biochem Mol Biol.* 1992;22:803-16.

Dhadialla TS, Raikhel AS. Biosynthesis of mosquito vitellogenin. *J Biol Chem.* 1990;265: 9924-33.

Dhadialla TS, Raikhel AS. Binding of vitellogenin to membranes isolated from mosquito ovaries. Arch Insect Biochem Physiol. 1991;18:55-70.

Dobson S.L, Rattanadechakul WA. A novel technique for removing *Wolbachia* infectins from *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). J Med Entomol. 2001;28:844-49.

Edwards MJ. The vitelline membranes of *Aedes aegypti* and *Drosophila melanogaster*. A comparative review. Invertebr Reprod Dev. 1996;30:255-64.

Engel MS, Grimaldi DA. New light shed on the oldest insect. Nature. 2004;437:627-30.

Fallon AM, Hagedorn HH, Wyatt GR, Laufer H. Activation of vitellogenin synthesis in the mosquito *Aedes aegypti* by ecdysone. J Insect Physiol. 1974;20:1815-23.

Fan YL, Zurek L, Dykstra MJ, Schal C. Hydrocarbon synthesis by enzymatically dissociated oenocytes of the abdominal integument of the german cockroach, *Blattella germanica*. Naturwissenschaften. 2003;90:121-26.

Figuerola L, Uherek F, Yusef P, López L, Flores J. Experiencia de terapia larval em pacientes con úlceras crónicas. Parasitol Latinoam. 2006;61:160-4.

Forattini OP. Culicidologia Médica. 1 ed. São Paulo: Edusp; 1996. v.1; 541 p.

Gaunt MW, Sall AA, de Lamballerie X, Falconar AK, Dzhivanian TI, Gould EA. Phylogenetic relationships of flaviviruses correlate with their epidemiology, disease association and biogeography. J Gen Virol. 2001;82:1867-76.

Giribet G, Edgecombe GD, Wheeler WC. Arthropod phylogeny based on eight molecular loci and morphology. Nature. 2001;413:157-161.

Glauss WF, Briggs RC, Hnilica LS. Use of lectins for detection of electrophoretically separated glycoproteins transferred onto nitrocellulose sheets. 1981;115:219-224.

Glenner H, Thomsen PF, Hebsgaard MB, Sorensen MV, Willerslev E. The origin of insects. Science. 2006;314:1883-84.

Haddow AD, Moulton JK, Gerhardt RR, McCuiston LJ, Jones CJ. Description of the egg of *Ochlerotatus japonicus japonicus* (Diptera: Culicidae) using variable pressure scanning electron microscopy. J Med Entomol. 2009;46:9-14.

Hagedorn HH, Fallon AM, Laufer H. Vitellogenin synthesis by the fat body of the mosquito *Aedes aegypti*. Dev Biol. 1973;31:285-94.

Hinton HE. Structure and protective devices of the egg of the mosquito *Culex pipiens*. J Insect Physiol. 1968;14:145-161.

Houk E.J, Griffiths GW. Intracellular Symbiotes of the Homoptera. Annu Rev Entomol. 1980;25:161-187.

Ito J, Ghosh A, Moreira LA, Wimmer EA, Jacobs-Lorena M. Transgenic anopheline mosquitoes impaired in transmission of a malaria parasite. Nature. 2002;417:452-55.

Kanost MR, Kawooya JK, Law J.H, Ryan RO, van Heusden MC, Ziegler R. Insect haemolymph proteins. Adv. Insect Physiol. 1990;22:299-396.

Kokoza VA, Martin D, Mienaltowski MJ, Ahmed A, Morton CM, Raikhel AS. Transcriptional regulation of the mosquito vitellogenin gene via a blood meal-triggered cascade. Gene. 2001;274:47-65.

Kokoza VA, Snigirevskaya ES, Raikhel AS. Mosquito clathrin heavy chain: analysis of protein structure and developmental expression in the ovary during vitellogenesis. Insect Mol. Biol. 1997;6:357-368.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970;227:680-85.

Li JS, Li J. Major proteins and their crosslinking during chorion hardening in *Aedes aegypti* mosquitoes. Insect Biochem Mol Biol. 2006;36:954-64.

Liu Y, Liu HH, Liu SM, Wang S, Jiang RJ, Li S. Hormonal and Nutritional Regulation of Insect Fat Body Development and Function. Arch Insect Biochem. 2009;71:16-30.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25:402-8.

Lo N, Casiraghi M, Salati E, Bazzocchi C, Bandi C. How many *Wolbachia* supergroups exist? *Mol. Biol. Evol.* 2002;19:341-6.

Lucantoni L, Giusti F, Cristofar M, Pasqualini L, Espósito F, Lupetti P, Habluetzel A. Effects of a neem extract on blood feeding, oviposition and oocyte ultrastructure in *Anopheles stephensi* Liston (Diptera: Culicidae). *Tissue Cell*. 2006;38:361-71.

Machado PA. O homem e os insetos, passado, presente e futuro. *Rev Saúde Pública*. 1987;21:474-79.

Malafronte RS, Calvo E, James AA, Marinotti O. The major salivary gland antigens of *Culex quinquefasciatus* are D7-related proteins. *Insect Biochem Mol Biol*. 2003;33:63-71.

Marinotti O, Capurro Mde L, Nirmala X, Calvo E, James AA. Structure and expression of the lipophorin-encoding gene of the malaria vector, *Anopheles gambiae*. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol*. 2006;144:101-9.

Marshall JM, Taylor CE. Malaria control with transgenic mosquitoes. *PLoS Med*. 2009;6:e1000020.

Mclean DL, Houk EJ. Phase-Contrast and Electron-Microscopy of Mycetocytes and Symbiotes of Pea Aphid, *Acyrtosiphon-Pisum*. *J Insect Physiol*. 1973;19:625-633.

Melo AC, Valle D, Machado EA, Salerno AP, Paiva-Silva GO, Cunha E, Silva NL, de Souza W, Masuda H. Synthesis of vitellogenin by the follicle cells of *Rhodnius prolixus*. *Insect Biochem Mol Biol*. 2000;30:549-57.

Min KT, Benzer S. *Wolbachia*, normally a symbiont of *Drosophila*, can be virulent, causing degeneration and early death. *Proc Natl Acad Sci*. 1997;94:10792-96.

Monnerat AT, Soares MJ, Lima JBP, Rosa-Freitas MG, Valle D. *Anopheles albitarsis* eggs: ultrastructural analysis of chorion layers after permeabilization. *J Insect Physiol*. 1999;45:915-22.

Moreira LA, Ghosh AK, Abraham EG, Jacobs-Lorena M. Genetic transformation of mosquitoes: a quest for malaria control. *Int J Parasitol.* 2002;32:1599-1605.

Nirmala X, Marinotti O, James AA. The accumulation of specific mRNAs following multiple blood meals in *Anopheles gambiae*. *Insect Mol Biol.* 2005;14:95-103.

Nirmala X, Marinotti O, Sandoval JM, Phin S, Gakhar S, Jasinskiene N, James AA. Functional characterization of the promoter of the vitellogenin gene, AsVg1, of the malaria vector, *Anopheles stephensi*. *Insect Biochem Molec Biol.* 2006;36:694-700.

Obara MT, Barata JMS, da Silva NN, Ceretti W, Urbinatti PR, da Rosa JA, Jurberg J, Galvao C. Morphologic, morphometrical, and histological aspects of the eggs of four species of the genera *Meccus* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2007a;102:13-19.

Obara MT, da Rosa JA, da Silva, NN, Ceretti W, Urbinatti PR, Barata JMS, Jurberg J. Galvao C. Morphological and histological study of eggs of six species of the *Triatoma* genus (Hemiptera : Reduviidae). *Neotrop Entomol.* 2007b;36:798-806.

Okuda K, de Souza Caroci A, Ribolla PE, de Bianchi AG, Bijovsky AT. Functional morphology of adult female *Culex quinquefasciatus* midgut during blood digestion. *Tissue Cell.* 2002;34:210-19.

Pereira ST, Secundino NFC, Botelho ACC, Pinheiro VC, Tadei W.P, Pimenta PFP. Role of egg buster in hatching of *Aedes aegypti*. Scanning electron microscopy study. *J Med Entomol.* 2006;43:68-72.

Rafikov M, Bevilacqua L, Wyse AP. Optimal control strategy of malaria vector using genetically modified mosquitoes. *J Theor Biol.* 2008; doi:10.1016/j.jtbi.2008.08.006.

Raikhel, AS, Lea AO. Previtellogenic development and vitellogenin synthesis in the fat body of a mosquito: an ultrastructural and immunocytochemical study. *Tissue Cell.* 1983;15:281-300.

Raikhel AS. The accumulative pathway of vitellogenin in the mosquito oocyte: a high-resolution immuno- and cytochemical study. *J Ultrastruct Res.* 1984;87:285-302.

Raikhel AS. Lysosomes in the cessation of vitellogenin secretion by the mosquito fat body; selective degradation of Golgi complexes and secretory granules. *Tissue Cell*. 1986a;18:125-42.

Raikhel, AS. Role of lysosomes in regulating of vitellogenin secretory in the mosquito fat body. *J Insect Physiol*. 1986b;32:597-604.

Raikhel AS. Monoclonal antibodies as probe for processing of the mosquito yolk protein; a high-resolution immunolocalization of secretory and accumulative pathways. *Tissue Cell*. 1987a;19:515-29.

Raikhel AS. The cell biology of mosquito vitellogenesis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1987b;82:93-101.

Raikhel AS, Dhadialla TS. Accumulation of yolk proteins in insect oocytes. *Annu Rev Entomol*. 1992;37:217-51.

Raikhel AS, Kokoza VA, Zhu J, Martin D, Wang SF, 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*. 2002;32:1275-86.

Raikhel AS, Pratt LH, Lea AO. Monoclonal antibodies as probes for processing of yolk protein in the mosquito; production and characterization. *J Insect Physiol*. 1986;32:879-90.

Redfern CPF. 20- hydroxyl-ecdysone and ovarian development in *Anopheles stephensi*. *J. Insect Physiol*. 1982;28:97-109.

Ren X, Hoiczky E, Rasgon JL. Viral paratransgenesis in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *PLoS Pathog*. 2008;4. e1000135.

Rey L. Organização e Fisiologia dos Insetos. In: *Parasitologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008. 669-686.

Ribolla PEM, de Bianchi AG. Processing of procathepsin from *Musca domestica* eggs. *Insect Biochem Mol Biol*. 1995;25:1011-17.

Ribolla PEM, Bijovsky AT, de Bianchi AG. Procathepsin and phosphatase are stored in *Musca domestica* yolk spheres. J Insect Physiol. 2001;47:225-32.

Riehle MA, Jacobs-Lorena M. Using bacteria to express and display anti-parasite molecules in mosquitoes: current and future strategies. Insect Biochem Mol Biol. 2005;35: 699-707.

Riehle MA, Moreira CK, Lampe D, Lauzon C, Jacobs-Lorena M. Using bacteria to express and display anti-Plasmodium molecules in the mosquito midgut. Int J Parasitol. 2007;37:595-603.

Roth TF, Porter KR. Yolk Protein Uptake in the Oocyte of the Mosquito *Aedes aegypti*. L. J Cell Biol. 1964;20:313-32.

Roy SG, Hansen, IA, Raikhel AS. Effect of insulin and 20-hydroxyecdysone in the fat body of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. Insect Biochem Mol Biol. 2007;37:1317-26.

Ruppert E, Barnes, RD. Zoologia dos invertebrados. 6 ed. São Paulo: Rocca;1996.

Salerno AP, Dansa-Petretski M, Silva-Neto MA, Coelho HS, Masuda H. *Rhodnius prolixus* vitellin is composed of three different populations: comparison with vitellogenin. Insect Biochem Mol Biol. 2002;32:709-17.

Sappington TW, Hays AR, Raikhel AS. Mosquito vitellogenin receptor: purification, developmental and biochemical characterization. Insect Biochem Mol Biol. 1995;25:807-17.

Sappington TW, Kokoza VA, Cho WL, Raikhel AS. Molecular characterization of the mosquito vitellogenin receptor reveals unexpected high homology to the *Drosophila* yolk protein receptor. Proc Natl Acad Sci. 1996;93:8934-39.

Sappington TW, Raikhel AS. Molecular characteristics of insect vitellogenins and vitellogenin receptors. Insect Biochem Mol Biol. 1998;28:277-300.

Schal C, SevalaVL, Young HP, Bachmann JAS. Synthesis and transport of hydrocarbons: Cuticle and ovary as target tissues. Am Zool. 1998;38:382-93.

Shapiro, AB, Wheelock GD, Hagedorn HH, Baker FC, Tsai LW, Schooley DA. Juvenile-Hormone and Juvenile-Hormone Esterase in Adult Females of the Mosquito *Aedes-Aegypti*. J Insect Physiol. 1986;32:867-77.

Sherman RA. Maggot therapy for foot and leg wounds. Int J Low Extrem Wounds. 2002;1:135-142.

Smith AG, Powis RA, Pritchard DL, Britland S. Greenbottle (*Lucila sericata*) larval secretions delivered from a prototype hydrogel wound dressing accelerate the closure of model wounds. Biotechnol Prog. 2006;22:1690-96.

Snigirevskaya ES, Hays AR, Raikhel AS. Secretory and internalization pathways of mosquito yolk protein precursors. Cell Tissue Res. 1997a;290:129-42.

Snigirevskaya ES, Sappington TW, Raikhel AS. Internalization and recycling of vitellogenin receptor in the mosquito oocyte. Cell Tissue Res. 1997b;290:175-83.

Snodgrass RE. The Internal Organs of Reproduction. In: Principles of insect morphology. New York: Mc Graw-Hill Book Company; 1935.

Soumaré ML, Ndiaye M. Ultrastructural studies of mosquito ovogenesis. Tissue Cell. 2005;37:117-24.

Sperança MA, Capurro M.L. Perspectives in the control of infectious diseases by transgenic mosquitoes in the post-genomic era - A Review. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2007;102:425-33.

Stouthamer R, Breeuwer JA, Hurst GD. *Wolbachia pipientis*: microbial manipulator of arthropod reproduction. Annu Rev Entomol. 1999;53:71-102.

Sukontason K, Sukontason KL, Piangjai S, Boonchu N, Kurahashi H, Hope M, Olson JK. Identification of forensically important fly eggs using a potassium permanganate staining technique. Micron. 2004;35:391-5.

Sukontason KL, Sribanditmongkol P, Chaiwong T, Vogtsberger RC, Piangjai S, Sukontason K. Morphology of immature stages of *Hemipyrellia ligurriens* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae) for use in forensic entomology applications. Parasitol Res. 2008;103:877-87.

Sun Jm, Hiraoka T, Dittmer NT, Cho KH, Raikhel AS. Lipophorin as a yolk protein precursor in the mosquito, *Aedes aegypti*. Insect Biochem Mol Biol. 2000;30:1161-71.

Tadkowski TM, Jones JC, Firman J. The fine structure of the imaginal oenocytes of *Aedes aegypti*. Ann Entomol Soc Am. 1977;70:837-40.

Tadkowski TM, Jones JC. Changes in the fat body and oocysts during starvation and vitellogenesis in a mosquito, *Aedes aegypti* (L.). J Morphol. 1979;159:185-204.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci USA. 1979;76:21415-57.

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

Tufail M, Takeda M. Molecular characteristics of insect vitellogenins. J. Insect Physiol. 2008;54:1447-58.

Tufail M, Takeda M. Insect vitellogenin/lipophorin receptors: Molecular structures, role in oogenesis, and regulatory mechanisms. J Insect Physiol. 2009;55:88-104.

van der Horst DJ. Insect adipokinetic hormones: release and integration of flight energy metabolism. Comp Biochem Phys. B. 2003;136:217-26.

van Handel E. Postvitellogenetic metabolism of the mosquito (*Culex quinquefasciatus*) ovary. J. Insect Physiol. 1992;38:75-9.

van Handel E. Fuel metabolism of the mosquito (*Culex quinquefasciatus*) embryo. J Insect Physiol. 1993;39:831-3.

van Heusden MC, Erickson BA, Pennington JE. Lipophorin levels in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*, and the effect of feeding. Arch Insect Biochem Physiol. 1997;34:301-12.

van Heusden MC, Thompson F, Dennis J. Biosynthesis of *Aedes aegypti* lipophorin and gene expression of its apolipoproteins. *Insect Biochem Mol Biol*. 1998;28:733-8.

Voronin DA, Dudkina NV, Kiseleva EV. A new form of symbiotic bacteria *Wolbachia* found in the endoplasmic reticulum of early embryos of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*. 2004;140:1319-38.

Ward RA. Culicidae. In: Hurlbert SH, Villalobos-Figueroa A, editors. *Aquatic biota of Mexico, Central America and the West Indies*. San Diego: San Diego State University; 1982. p. 417-29.

Werren JH. Biology of *Wolbachia*. *Annu Rev Entomol*. 1997;42:587-609.

Werren JH, Baldo L, Clark ME. *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology. *Nat Rev Microbiol*. 2008;6:741-51.

Yao R, Li J. Towards global analysis of mosquito chorion proteins through sequential extraction, two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics*. 2003;3:2036-43.

Zhou WG, Rousset F, O'Neil S. Phylogeny and PCR-based classification of strains using wsp gene sequences. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*. 1998;265:509-15.

Ziegler R, Ibrahim MM. Formation of lipid reserves in fat body and eggs of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *J Insect Physiol*. 2001;47:623-27.