

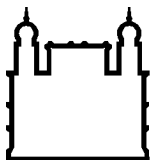
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado – Programa de Pós Graduação em Biologia Parasitária

**Culicídeos vetores: diferenças e semelhanças
fisiológicas e estruturais relacionadas ao processo de
resistência dos ovos à dessecação**

Luana Cristina Farnesi Ferreira

Rio de Janeiro; agosto de 2014



Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

Luana Cristina Farnesi Ferreira

Culicídeos vetores: diferenças e semelhanças fisiológicas e estruturais relacionadas ao processo de resistência dos ovos à dessecação

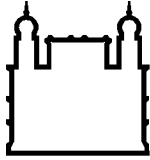
Tese submetida à Coordenação do curso de Pós-Graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção de grau em Doutor em Biologia Parasitária, área de concentração: Biologia.

Orientadora: Dr^a Denise Valle (IOC)

Orientador: Dr Gustavo Lazzaro Rezende (UENF)

Rio de Janeiro; agosto de 2014

Espaço para ficha catalográfica a ser elaborada pela Biblioteca Central de Manguinhos para versão final da tese



Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

Luana Cristina Farnesi Ferreira

Culicídeos vetores: diferenças e semelhanças fisiológicas e estruturais relacionadas ao processo de resistência dos ovos à dessecação

Orientadora: Dr^a Denise Valle

Orientador: Dr Gustavo Lazzaro Rezende

EXAMINADORES:

Dr^a Rafaela Vieira Bruno

Dr Rafael Maciel de Freitas

Dr^a Márcia Maria Gentile Bitondi

Dr Marcos Henrique Ferreira Sorgine (suplente)

Dr^a Maria Goreti Rosa-Freitas (suplente)

Rio de Janeiro, 22 de agosto de 2014.

“O inverno nunca falha em se tornar primavera”

Nitiren Daishonin

***Dedico esta tese à minha irmã Patrícia
Veronica Farnesi Ferreira (in memorian).***

AGRADECIMENTOS

O budismo é a base de toda minha vida. Aprendi que a Lei de causas e efeitos rege todo o Universo, então acredito que, para modificar meu destino é preciso somente “arregaçar as mangas” e construir causas positivas! Aprendi com essa filosofia que a revolução humana é possível, agradeço a todas as dificuldades enfrentadas ao longo da execução do projeto de doutorado que geraram esta tese, pois as dificuldades forjam o caráter!

Ao meu mestre Dr Daisaku Ikeda por sua luta abnegada pelo humanismo.

Aos meus pais Carlos e Hilda e aos meus irmãos Jorge, Patrícia, Marcelo e Carlos Augusto por me ensinarem o significado da palavra família. Nós somos mais do que unidos, somos um só, juntos somos a fortaleza Farnesi! Obrigada por construírem junto comigo as “barragens da fé” que seguraram as mais bravias ondas de toda minha vida com força e esperança sem precedentes! Aos meus sobrinhos e afilhada por toda a alegria que trazem à minha vida.

Ao meu marido Rodrigo pela compreensão, dedicação, carinho e apoio em todos os momentos que precisei. O que você dedicou a mim neste período foi mais que amor foi companheirismo!

À família Henrique da Silva que esteve presente em todos os momentos de minha formação escolar, me incentivando a continuar, mesmo em meio a todas as adversidades e problemas financeiros. Tia Niva sem você seria impossível!

E também a todos os meus outros familiares que participaram direta ou indiretamente da minha formação. Um “obrigada” especial ao meu primo Rodrigo Farnesi, que é como um irmão.

Ao maior amigo do mundo: Thiago Belinato! É para sempre, é eterno, é amor!

À minha amiga-irmã-cumadre de todas as horas Lorena Lima Rangel, Esses 17 anos de amizade não deixam a menor dúvida de que você foi muito importante em todas as etapas de minha formação, principalmente nesta. Te amo!

Ao meu amigo e orientador Gustavo Lazzaro Rezende. Tenho o prazer de dizer que tudo o que aprendi sobre pesquisa tem um toque seu. Já são mais de 10 anos trabalhando juntos, construindo uma relação de orientador-aluno bastante incomum que, ao meu ver, não poderia ter sido melhor. Obrigada por toda liberdade de diálogo que me deu ao longo destes anos, sem você não seria possível.

À minha AMIGA e orientadora Denise Valle, acima de tudo pela confiança. Quando temos um sonho, precisamos de um “Norte”, Denise Valle é meu “Norte”, é o lugar onde eu quero chegar como pesquisadora, como mulher, como amiga, como orientadora. Só quem convive com a Denise sabe de que tipo de ser humano que eu estou falando. Ser humano de primeira categoria. Mais uma vez quero deixar registrado neste documento quão tamanha é minha admiração por você Denise. Espero nunca te decepcionar. E continuo a dizer: a Denise é a pessoa mais competente que conheço! Muito obrigada por todos esses anos, muito obrigada, muito obrigada e muito obrigada!

À mestranda Helena Vargas, que foi minha aluna de iniciação científica (IC). Eu não poderia ter tido mais sorte em ter uma pessoa tão esforçada, dedicada e carinhosa como aluna de IC. Você foi um presente na minha vida tanto acadêmica quanto pessoal, seus esforços farão você ir cada vez mais longe. Muito obrigada por tudo, eu amo você!

Ao Dr Rubem Menna Barreto e sua aluna Ana Helisa Cardoso pessoas incríveis sempre dispostas a ajudar. Obrigada pela receptividade e paciência com essa menina ligada nos 220 V, valeu! Os resultados que obtivemos valeram a pena as muitas horas de trabalho!

Ao Dr Garcia, do Laboratório de Embriologia de Vertebrados da UFRJ, e toda sua equipe, por ter aberto as portas de seu laboratório quando precisei. Em especial aos doutores José Brito e Alice Reis pela ajuda com os experimentos de microscopia de transmissão e também pela amizade.

Às amigas mestres em Matemática Lorena Souza e Sueni Arouca pela ajuda com as fórmulas para calcular a área da tal esferoide prolata. É como diz o ditado que sempre uso: “Quem tem amigo não morre pagão”. Muito obrigada meninas.

Aos amigos do LAFICAVE Ademir, Aline, Bento, Diogo, Felipe, Gilberto, Luana Carrara, Luiz Paulo, Márcia, Monique, Priscila e Taiza obrigada pelos anos de convivência tranquila e solícita que tive neste laboratório ao lado de todos vocês.

A todos os amigos do LBMI e LABMOF da FIOCRUZ é muito bom poder contar com as portas desses laboratórios de excelência sempre abertas para colaborações e com a recepção amigável de todos vocês sempre que eu os solicito. Muito obrigada!

Aos meus amigos não biólogos pelo apoio e principalmente pela compreensão da minha ausência em momentos que foram importantes para vocês, enquanto estive focada na redação da tese. Vou compensar tudo depois!

À Pós Graduação em Biologia Parasitária do IOC, principalmente aos coordenadores Dr^a Ana Gaspar e Dr Rafael Maciel Freitas, pois nos momentos que precisei resolver problemas de quaisquer esferas se colocaram disponíveis e foram extremamente atenciosos e eficientes na resolução. Obrigada!

Ao Dr Phil Lounibos e toda equipe do FMEL por todo carinho e atenção que me concederam no período em que realizei o sanduíche na Flórida. Muito, muito obrigada! Em especial aos amigos Tanise, Erick, Nish Nakamura, Gabriela Maxxine e Maria Casrrasquilla que me ajudaram e muito em todos os experimentos, principalmente com a alimentação sanguínea em galinhas.

Ao Instituto Oswaldo Cruz e a CAPES pelo apoio financeiro e técnico para a realização deste trabalho.

Este trabalho foi realizado, em grande parte, no Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes Vetores (Instituto Oswaldo Cruz- IOC) e no Laboratório de Entomologia do Centro de Pesquisa General Dr Ismael da Rocha, Instituto de Biologia do Exército. Alguns aspectos foram desenvolvidos no Laboratório de Biologia Molecular de Flavivírus, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ; no Laboratório de Química e Função de Proteínas e Peptídeos, Centro de Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, RJ e no *Florida Medical Entomology Laboratory, University of Florida, Vero Beach, FL, EUA*. Foram utilizados recursos da Fundação Oswaldo Cruz, da Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), da Fundação Carlos Chagas Filho de Apoio à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (Faperj) e do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular (INCT-EM).

ÍNDICE

RESUMO.....	2
ABSTRACT	3
1) INTRODUÇÃO	4
1.1) RELEVÂNCIA DOS INSETOS	4
1.2) Dípteros	5
1.3) CULICÍDEOS VETORES	6
1.4) MOSQUITOS VETORES ABORDADOS NESTE ESTUDO	7
1.4.1) <i>Aedes aegypti</i> (Linnaeus 1762).....	7
1.4.2) <i>Anofelinos</i>	8
1.4.2.1) <i>Anopheles aquasalis</i> (Curry, 1932).....	10
1.4.2.2) <i>Anopheles quadrimaculatus</i> (Say, 1824)	11
1.4.2.3) O mutante GORO de <i>Anopheles quadrimaculatus</i>	11
1.4.3) <i>Culex quinquefasciatus</i> (Say, 1823).....	12
1.4.4) <i>Relações filogenéticas entre mosquitos dos gêneros Aedes, Culex e Anopheles</i>	13
1.5) CONTROLE DE CULICÍDEOS VETORES	14
1.6) CICLO DE VIDA E CARACTERÍSTICAS DE POSTURA DOS MOSQUITOS	16
1.7) EMBRIOGÊNESE DE MOSQUITOS	20
1.8) A 'CASCA' DO OVO DE MOSQUITO E SUA RELAÇÃO COM PERMEABILIDADE.....	25
1.8.1) <i>Quitina em insetos e sua relação com a resistência de ovos à dessecação</i>	28
1.8.2) <i>O processo de esclerotização e melanização de ovos de mosquitos</i>	29
1.9) JUSTIFICATIVA E APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS.....	32
2) OBJETIVOS	34
2.1) OBJETIVO GERAL	34
2.2) OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	34
3) RESULTADOS.....	35
3.1) CAPÍTULO 1	35
3.2) CAPÍTULO 2	43
3.3) CAPÍTULO 3	59
3.4) CAPÍTULO 4	85
4) DISCUSSÃO GERAL E PERSPECTIVAS	91
5) CONCLUSÕES	98
6) REFERÊNCIAS.....	100
7) ANEXO	108

RESUMO

Diversos parasitas, agentes etiológicos de uma série de agravos, são transmitidos por mosquitos vetores em todo o mundo. Apesar de sua importância médica, ainda existem muitas lacunas no conhecimento da embriogênese desses insetos. Ovos de espécies do gênero *Aedes* resistem à dessecação, e são capazes de sobreviver vários meses no seco em estado de quiescência ao final da embriogênese. Entretanto, ovos de espécies de outros gêneros, como *Anopheles* e *Culex*, não possuem capacidade de resistir a longos períodos de exposição ao seco, apesar de adquirirem algum grau de impermeabilidade. Nos mosquitos *Aedes aegypti* e *Anopheles gambiae* tem sido mostrado que, durante a embriogênese, a síntese da cutícula serosa (CS), que contém quitina, coincide com a aquisição da resistência dos ovos à dessecação (ROD). O objetivo deste trabalho foi investigar, comparativamente, a embriogênese de diferentes mosquitos vetores, para elucidar semelhanças e diferenças na ROD. A maior parte do trabalho foi realizada com as espécies *Ae. aegypti*, *An. aquasalis* e *Cx. quinquefasciatus*. Verificamos que para *An. aquasalis* e *Cx. quinquefasciatus* a formação da CS também é simultânea à aquisição de ROD e contém quitina. O tempo requerido para a finalização da embriogênese de *Ae. aegypti*, *An. aquasalis* e *Cx. quinquefasciatus* é, respectivamente, 77,4, 51,3, e 34,2 horas após a postura. A formação da CS ocorre em estágio embrionário equivalente para *Ae. aegypti* e *An. aquasalis* e um pouco mais tardio para *Cx. quinquefasciatus*. Ao final da embriogênese diferentes níveis de ROD foram detectados: alto para *Ae. aegypti*, médio para *An. aquasalis* e baixo para *Cx. quinquefasciatus*. Com o objetivo de entender essas diferenças, avaliamos, comparativamente, alguns aspectos físicos dos ovos: comprimento, largura, área, volume, peso e a superfície da casca. Apesar de diferenças interessantes e significativas terem sido observadas, não foi possível estabelecer correlação direta entre ROD e tais aspectos, quando avaliados individualmente. Quantificação do polissacarídeo quitina revelou tendência de maior conteúdo em cascas de ovos de espécies mais resistentes ao seco. Além disso, diferenças significativas foram encontradas no grau de melanização dos ovos das diferentes espécies, sugerindo que ovos mais melanizados são mais resistentes ao seco. Essa hipótese foi testada utilizando o mutante GORO da espécie *An. quadrimaculatus*. Nesta linhagem a melanização não ocorre corretamente, e as cascas de seus ovos têm aparência dourada. Em contraste, seu equivalente selvagem (WT) possui ovos de casca escura. Ovos GORO possuem ROD deficiente: quando expostos ao seco por 10 horas após a formação da CS, apenas 12,3% são viáveis, em contraste com 66,5% de ovos WT. Nossos resultados confirmam de forma direta que, além da quitina da CS, a melanização da casca dos ovos é importante para a impermeabilização dos ovos de insetos.

ABSTRACT

Several parasites, etiologic agents of a number of diseases, are transmitted by mosquito vectors worldwide. Despite their medical importance, many gaps in our knowledge about the embryogenesis of these insects still remain. Eggs from the *Aedes* genus resist to desiccation, and are able to survive several months in dry conditions in a quiescent status at the end of embryogenesis. In contrast, eggs belonging to other genera, like *Anopheles* and *Culex*, do not withstand long periods of exposure in dry conditions, although they acquire some degree of impermeability. It has already been demonstrated that, in the course of *Aedes aegypti* and *Anopheles gambiae* embryogenesis, the synthesis of the serosal cuticle (SC), which contains chitin, coincides with the acquisition of egg resistance to desiccation (ERD). The aim of the present work was to investigate, under a comparative basis, the embryogenesis of different mosquito vectors, in order to elucidate ERD similarities and differences. Most of the work was performed with *Ae. aegypti*, *Anopheles aquasalis* and *Culex quinquefasciatus*. We found that, for *An. aquasalis* and *Cx. quinquefasciatus*, ERD acquisition is also simultaneous to the development of SC, a layer containing chitin. Time required for embryogenesis completion is 77.4, 51.3, and 34.2 hours after egg laying for respectively *Ae. aegypti*, *An. aquasalis* and *Cx. quinquefasciatus*. The formation of SC occurs in an equivalent embryonic stage for *Ae. aegypti* and *An. aquasalis*, but a little later for *Cx. quinquefasciatus*. At the end of embryogenesis different ERD levels were detected: high for *Ae. aegypti*, medium for *An. aquasalis* and low for *Cx. quinquefasciatus*. In order to understand these differences, we comparatively evaluated some physical aspects of the eggs: length, width, area, volume, weight and eggshell surface appearance. Although interesting and significant differences have been observed, it was not possible to establish any direct correlation between ERD and these physical aspects, when individually considered. Quantification of chitin revealed tendency of higher amount of this polysaccharide in the eggshells of species more resistant to desiccation. Furthermore, significant differences were found in the degree of melanization of eggs from the different species, suggesting that more melanized eggs are also more resistant to dry conditions. This hypothesis was tested using the *An. quadrimaculatus* GORO mutant. In this strain, melanization does not occur properly, and the eggs have a golden appearance. Eggshells from the wild type (WT) strain, in contrast, are dark. GORO eggs exhibit a defective ERD: when exposed to dry conditions during 10 hours after the SC formation only 12.3% are viable, in contrast with 66.5% of WT eggs. Our results confirm, directly, that beyond the chitin present in the SC, the eggshell melanization is an important factor towards insect eggs impermeability.

1) INTRODUÇÃO

1.1) Relevância dos insetos

O sucesso evolutivo de um animal pode ser medido de várias formas, mas certamente o número de espécies que o grupo contém e a extensão de sua distribuição geográfica são critérios significativos e de fácil avaliação. No grupo dos insetos, animais pertencentes ao filo Artropoda, subfilo Hexapoda e classe Insecta, são conhecidas aproximadamente um milhão de espécies e estão estimadas mais de cinco milhões a serem descritas (Grimald e Engel 2005, Brusca e Brusca 2007, Ruppert e Barnes 2008). Esses animais apresentam uma vasta distribuição em todo o planeta Terra. Estão presentes tanto em ambientes terrestres quanto aquáticos. Podem ser encontrados nos mais diversos lugares: nas superfícies oceânicas, regiões litorâneas marinhas, nascentes sulfúricas e até riachos glaciais, estando ausentes apenas das águas marinhas subtidais (Borror e DeLong 1988, Brusca e Brusca 2007, Ruppert e Barnes 2008). Avaliando os padrões apresentados acima é possível justificar o êxito obtido por este grupo de artrópodes.

Características adaptativas que evoluíram de representantes ancestrais de um grupo animal geralmente são atribuídas a seu sucesso. De fato, a evolução de tais características permite radiação das espécies, as quais, a partir de então, podem ocupar novos nichos ecológicos. O grande sucesso dos insetos poderia, portanto, ser atribuído à evolução de algumas características cruciais para este grupo, como por exemplo as asas, localizadas no tórax e encontradas na maioria dos representantes do grupo. As asas possibilitam o voo a longas distâncias o que, entre outros, potencializa o acesso aos alimentos e ajuda a fugir de predadores. Outra característica importante, típica de insetos holometábolos, é a existência de uma fase larvar durante o desenvolvimento, o que possibilita a utilização de recursos diferentes da fase adulta (Grimald e Engel 2005, Brusca e Brusca 2007, Ruppert e Barnes 2008). Não menos importante para o sucesso de muitos insetos são adaptações de seus ovos: alguns grupos apresentam casca resistente à dessecação, que permite a exposição a diversas condições ambientais, por vezes extremas (Brusca e Brusca 2007, Ruppert e Barnes 2008). Ovos de

culicídeos, objeto desta tese, serão abordados de forma detalhada, com ênfase no processo de aquisição de resistência à dessecação, mais à frente.

Muitos insetos têm grande valor ecológico e econômico por suas atividades, como a polinização. Cerca de dois terços das plantas floríferas dependem exclusivamente dos insetos para reprodução. Insetos fornecem aos seres humanos alimento e matéria prima, a exemplo das espécies *Apis mellifera* (Linnaeus 1758) e *Bombyx mori* (Linnaeus 1758), responsáveis pela produção de mel e seda, respectivamente. Insetos têm também relevante participação na cadeia alimentar, servindo como fonte de alimento para pássaros, peixes e outros animais; atuam no controle de animais e plantas nocivas e participam da decomposição de matéria orgânica (Borror e DeLong 1988, Ruppert e Barnes 2008). Entretanto, os insetos muitas vezes estão associados a incômodo humano ou a transmissão de doenças, atuando como vetores de diversos parasitas. Além disso, muitos grupos são considerados pragas agrícolas, e chegam a provocar perdas da ordem de um terço de toda produção mundial (Brusca e Brusca 2007).

1.2) Dípteros

Os dípteros constituem uma das mais amplas ordens de insetos holometábolos, com número de indivíduos e de espécies abundantes em quase todos os lugares do mundo (Borror e DeLong 1988). Esta gigantesca ordem compreende cerca de 10.000 gêneros. Os Diptera distinguem-se prontamente dos outros insetos alados por possuírem apenas um par de asas transparentes e funcionais, equivalente ao par anterior das outras ordens. O par posterior está substituído por halteres, estruturas de tamanho reduzido que dão equilíbrio ao inseto durante o voo (revisto por Forattini 1996 e Rey 2001).

Apesar de geralmente pequenos, os dípteros podem ter grande importância, tanto econômica quanto médica, ou ainda como modelo de estudo de diversas áreas do conhecimento, como é o caso da mosca da fruta *Drosophila melanogaster* (Meigan 1830). Esta ordem é dividida em dois grupos: os dípteros inferiores (parafilético) que contém, dentre outras, as famílias Culicidae (mosquitos) e Psychodidae (flebotomíneos), e o grupo dos Neodiptera (monofilético) que contém as moscas como, por exemplo, a *D. melanogaster* (Wiegmann et al 2011). A grande importância médica de vários

membros da família Culicidae está relacionada ao hábito hematofágico das fêmeas de algumas espécies, que desenvolvem potencial de transmissão de patógenos e de disseminação de doenças que causam grande agravo à saúde pública (Consoli e Lourenço de Oliveira, 1994, Forattini 1996).

1.3) Culicídeos vetores

Os primeiros registros concretos que associam a transmissão de parasitoses aos culicídeos datam do século XIX, com a comprovação por Patrick Manson, em 1877, da transmissão de filárias. Esta ideia foi confirmada por Lewis, no mesmo ano, ao mostrar que a *Filaria sanguinis hominis* (Mastim 1888) (nematódeo causador da elefantíase) desenvolvia-se em *Culex fatigans* (Wiedemann, 1828), mosquitos marrons que colocavam os ovos aderidos uns aos outros. Em 1897 a transmissão, por mosquitos, de plasmódios parasitas da malária, também foi confirmada (Christophers 1960, Beauty e Marquardt 1996).

Culicídeos podem ser vetores de inúmeros parasitos, alguns dos quais responsáveis por surtos e epidemias, e todos fonte de preocupação para a saúde pública: protozoários, helmintos, ou mesmo arbovírus, como dengue, febre amarela, febre do Nilo Ocidental e chikungunya. Países em desenvolvimento são os mais afetados, tanto pela precária infraestrutura sanitária e dos sistemas públicos de saúde quanto pelas condições climáticas típicas das zonas tropicais e subtropicais, propícias ao desenvolvimento de vetores onde, em geral, estes países estão localizados (Clements 1992, Maciel-de-Freitas et al 2012).

São muitos os esforços para minimizar o impacto destes parasitas sobre o homem. Entretanto, na maior parte dos casos, ainda não estão disponíveis nem vacinas nem tratamentos específicos para as pessoas acometidas (OMSa 2014). Nesse sentido, o estudo da biologia dos vetores, elo “vulnerável” da cadeia de transmissão de muitos agravos, contribui para o desenvolvimento de novas estratégias de controle.

1.4) Mosquitos vetores abordados neste estudo

1.4.1) *Aedes aegypti* (Linnaeus 1762)

De fácil reconhecimento para os taxonomistas, *Aedes aegypti*, pertence ao subgênero *Stegomyia* e é um mosquito de corpo escuro na fase alada, possuindo manchas brancas na superfície dorsal e um desenho, composto por escamas claras em forma de “lira”, em seu escudo do tórax (Figura 1.1).

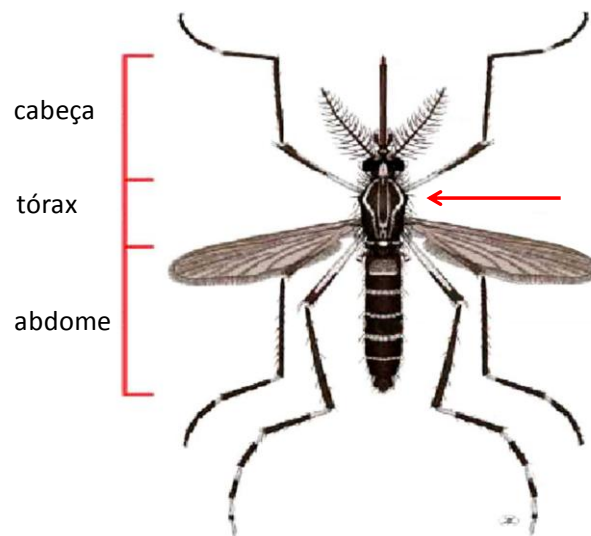


Figura 1.1: Mosquito *Aedes aegypti*. Seta aponta para a região do tórax que exhibe o desenho das escamas em forma de “lira”. As três regiões corporais, comum a todos os insetos, estão indicadas à esquerda. Adaptado de Rueda 2004.

Oriundo do Velho Mundo, *Ae. aegypti* foi originalmente descrito no Egito, daí seu nome específico; atualmente tem distribuição mundial, ocorrendo em regiões tropicais e subtropicais. No Brasil, esta espécie foi introduzida durante o período colonial, provavelmente com o tráfico de escravos, vindo nos estágios de ovo ou larva nos barris de armazenamento de água das embarcações. Como era vetor da febre amarela, foi intensamente combatido em nosso território, chegando a ser considerado erradicado em 1955. Contudo, países vizinhos, como as Guianas, Venezuela, Estados Unidos, dentre outros centro-americanos, não o erradicaram. Esse descuido culminou na reinvasão do Brasil pelo *Ae. aegypti*, na década de 1960 (Consoli e Lourenço-de-Oliveira 1994).

No gênero *Aedes* há muitas espécies silvestres, de *habitat* essencialmente florestal, realizando repasto sanguíneo em diversos vertebrados, que não o homem (Forattini et al 1990). Algumas espécies deste gênero se adaptaram perfeitamente ao ambiente urbano, e se tornaram importantes transmissores de patógenos. É o caso de *Ae. aegypti*, espécie sinantrópica e antropofílica (Nelson 1986, Consoli e Lourenço-de-Oliveira 1994) que, no ambiente urbano, está presente principalmente no domicílio e no peridomicílio, onde encontra condições favoráveis para completar seu ciclo de vida. Esta espécie é considerada o vetor primário do vírus dengue (DENV), apesar de existirem variações entre populações do vetor, conferindo-lhes diferentes níveis de competência vetorial. Além disso, está entre os culicídeos envolvidos na transmissão do vírus chikungunya (Jupp et al 1981, Maciel-de-Freitas et al 2012, Dupon-Rouzeyrol et al 2012).

Algumas características biológicas da espécie *Ae. aegypti* são responsáveis por sua expansão geográfica ao longo dos anos, dificultando o controle desse vetor (Valle et al 2014). Entre elas estão: a preferência desta espécie por alimentação em humanos, o hábito de espalhar os ovos por muitos criadouros, a diversidade de sítios de postura e a discordância gonotrófica, ou seja, a habilidade de picar mais de uma pessoa a cada lote de ovos produzido. Em particular, destaca-se a forte capacidade dos ovos desta espécie de permanecerem viáveis no seco, em estado de quiescência, por meses, aguardando que o criadouro seja novamente alagado (Christophers 1960, Kliewer 1961, Consoli e Lourenço-de-Oliveira 1994).

1.4.2) Anofelinos

Mosquitos do gênero *Anopheles* pertencem à subfamília *Anophelinae*. Anofelinos adultos apresentam corpo delgado, coloração escura e asas longas com escamas formando áreas com manchas claras e escuras. De comportamento crepuscular e característico, os anofelinos muitas vezes são chamados de mosquitos prego porque, durante o pouso, ficam oblíquos à superfície (Figura 1.2) (Consoli e Lourenço-de-Oliveira 1994).



Figura 1.2: Mosquito do gênero *Anopheles*, pouso oblíquo à superfície (adaptado de <http://fme1.ifas.ufl.edu/key/genus/anopheles.shtml>).

Há aproximadamente 400 diferentes espécies de mosquitos do gênero *Anopheles*, mas apenas cerca de 30 são vetores de importância médica. Neste gênero encontram-se os principais vetores de agentes etiológicos da malária, protozoários parasitas do gênero *Plasmodium*. Entre as doenças de origem parasitária, a malária é a de maior morbidade e mortalidade em todo o mundo; ocorre especialmente nos países em desenvolvimento, predominantemente de regiões tropicais e subtropicais, e implica em sérios custos sociais e econômicos (OMSb 2014). No Brasil, existem 54 espécies de anofelinos, pertencentes a cinco subgêneros: *Nyssorhynchus*, *Kerteszia*, *Stethomyia*, *Lophopodomyia* e *Anopheles*. Os vetores de malária humana no país pertencem aos subgêneros *Nyssorhynchus* e *Kerteszia* sendo que *Anopheles darlingi* (Root 1926) é o principal vetor (Consoli e Lourenço-de-Oliveira 1994, Rosa-Freitas et al 1998).

As formas imaturas dos vetores de malária nas Américas em geral se desenvolvem em grandes coleções de água. A associação da malária com empreendimentos do setor hidrelétrico e de esquemas de irrigação em ambientes tropicais vem sendo citada em estudos de impacto ambiental como um alerta, pois grandes construções que provocam mudanças no ecossistema local propiciam a formação de criadouros e a proliferação dos mosquitos vetores (Sanchez-Ribas et al 2012).

Abaixo estão descritos alguns aspectos de duas espécies de anofelinos estudadas nesta tese.

1.4.2.1) *Anopheles aquasalis* (Curry, 1932)

O mosquito *An. aquasalis*, do subgênero *Nyssorhynchus*, quando imaturo vive em *habitats* aquáticos ensolarados contendo vegetação emergente, bem como em água salobra e fresca. É preferencialmente encontrado em águas claras, não poluídas, como bolsões de água salobra e lagunas, embora haja registro de exemplares encontrados em águas turvas, corpos de água de fluxo lento, em número relativamente elevado. A preferência da espécie por alagados com algum teor de cloreto de sódio determina sua distribuição; por exemplo, no Brasil, é considerado o principal vetor na região costeira (Rosa-Freitas et al 1998, Sinka et al 2010).

A densidade de *An. aquasalis* é sazonal, sendo mais abundante nas estações chuvosas. Assim como muitos outros mosquitos deste gênero, é essencialmente crepuscular. É zoofílico, alimentando-se preferencialmente de vertebrados não humanos. É também considerado exófilo, adentrando as residências para realizar a hematofagia apenas quando está em alta densidade populacional. Contudo, em certas localidades do litoral nordestino, é comum observar espécimes de *An. aquasalis* picando o homem dentro das habitações (Figura 1.3), fora do período crepuscular (Consoli e Lourenço-de-Oliveira 1994, Sinka et al 2010).



Figura 1.3: Mosquito *Anopheles aquasalis* realizando repasto sanguíneo. Imagem de Genilton Vieira - Fiocruz.

Apesar de ser um vetor de malária muito menos importante que *An. darlingi*, visto que a transmissão está associada a locais e ocasiões em que está presente em elevada densidade, *An. aquasalis* é considerado vetor primário de malária nas zonas áridas do Nordeste e em todas as planícies costeiras do país (Rosa-Freitas et al 1998).

1.4.2.2) *Anopheles quadrimaculatus* (Say, 1824)

Oriundo da América do Norte, *An. quadrimaculatus* pertence ao subgênero *Anopheles*, subgrupo *Quadrimaculatus*, e é o mais importante anofelino, e principal vetor de malária, no leste, centro e sul dos Estados Unidos (Figura 1.4). Está presente também no México e Canadá (Rutledge e Meek 1998, Harbach et al 2007). *Anopheles quadrimaculatus* está associado com a produção de arroz, sendo principalmente encontrado quando os campos de cultivo são inundados (Rutledge e Meek 1998, Sinka et al 2010). Tais condições refletem aquelas encontradas no *habitat* natural, onde fêmeas depositam seus ovos: grandes coleções de águas mansas, como lagunas e pântanos com vegetação emergente.

Os adultos parecem ser preferencialmente zoofílicos e exofílicos. *Anopheles quadrimaculatus* geralmente realiza o repasto sanguíneo durante a noite, com maior atividade ao entardecer e amanhecer. O descanso depois do repasto sanguíneo inclui locais como buracos de árvores e celeiros de gado, por exemplo (Sinka et al 2010).

1.4.2.3) O mutante GORO de *Anopheles quadrimaculatus*

Esta linhagem foi criada pela combinação de duas outras linhagens: **Golden cuticle** e **Rose eye** (daí o nome GORO). Essas duas linhagens possuem mutações no cromossomo X que foram induzidas pelo agente mutagênico químico EMS (metanosulfonato de etila). Na linhagem **Golden cuticle**, todos os estágios de vida possuem aspecto dourado, isto é, com melanização deficiente em relação a linhagens selvagens. Na linhagem **Rose eye**, os olhos possuem coloração rosa, diferente do selvagem que possui olhos pretos. Assim, mutantes GORO (Figura 1.5) são mais claros (dourados) e possuem olho rosa, diferente da linhagem selvagem (Figura 1.4) (Greene et al 2003, BEI 2014). O fenótipo mais claro é observado em todas as fases do desenvolvimento, incluindo os ovos.



Figura 1.4: *Anopheles quadrimaculatus* realizando repasto sanguíneo sobre hospedeiro humano. Imagem de Sean Mc Cann, Universidade da Flórida.

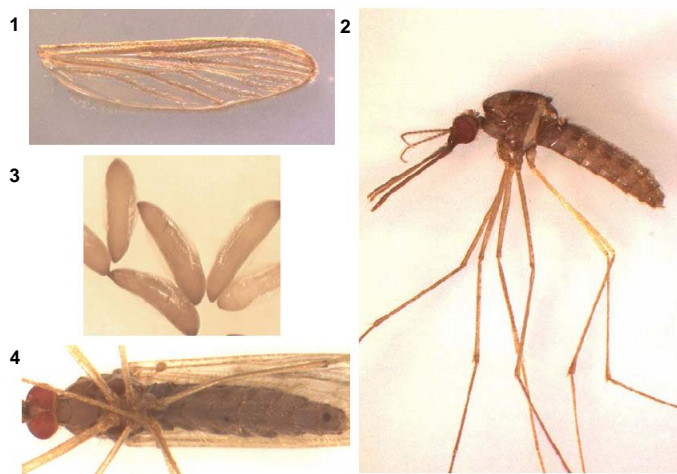


Figura 1.5: Fenótipo dourado da linhagem GORO de *Anopheles quadrimaculatus*. (1,2 e 4): adulto; (2): ovos. Adaptado de www.mr4.org.

1.4.3) *Culex quinquefasciatus* (Say, 1823)

A espécie *Culex quinquefasciatus*, do complexo *Cx. pipiens*, pertence à subfamília Culicinae e subgênero *Culex*, e ocorre principalmente em regiões tropicais e subtropicais (Cornel et al 2003). Embora tenha sido primeiramente descrito em Nova Orleans, EUA, é encontrado em muitas regiões do globo, principalmente na África, Américas, Oceania e em regiões meridionais da Ásia, estando ausente apenas no extremo norte de algumas regiões temperadas. Este culicíneo também se encontra distribuído por todo o território brasileiro. Quando adulto, *Cx. quinquefasciatus* é considerado um mosquito de grande porte; sua coloração marrom claro ajuda na identificação da espécie (Figura 1.6). Extremamente antropofílico, *Cx. quinquefasciatus* ocorre e é abundante onde o homem está presente, associando-se a

aglomerados humanos, tanto em áreas urbanas como em vilarejos rurais (Consoli e Lourenço-de-Oliveira 1994).



Figura 1.6: Mosquito adulto da espécie *Culex quinquefasciatus*. Retirado de http://fmel.ifas.ufl.edu/key/genus/culex_quin.shtml).

Culex quinquefasciatus e *Cx. pipiens* são os principais vetores do nematódeo *Wuchereria bancrofti*, agente etiológico da filariose bancroftiana. *Culex quinquefasciatus* e outros mosquitos do mesmo gênero também são capazes de transmitir ao homem diversos arbovírus de importância médica, como o vírus da encefalite de Saint Louis e o vírus do Oeste do Nilo (Consoli e Lourenço-de-Oliveira 1994, Khalil et al 2008, Micieli et al 2013). Este mosquito, popularmente chamado de pernilongo, também é conhecido pelo incômodo de suas picadas e zumbido alto, durante a noite.

1.4.4) Relações filogenéticas entre mosquitos dos gêneros *Aedes*, *Culex* e *Anopheles*

A classificação tradicional dos mosquitos era feita com bases fenéticas e bionômicas, ou seja, eram realizadas análises morfológicas e de relação espécie-ambiente, respectivamente (Ross 1951). O estudo da relação evolutiva entre grupos, atualmente, utiliza a aplicação tanto de métodos morfológicos quanto moleculares.

Recentemente Reidenbach et al (2009) analisaram as relações filogenéticas de 25 gêneros da família Culicidae, com base na comparação de seis genes nucleares e de 80 caracteres morfológicos. Os resultados confirmaram a posição basal e o monofiletismo das subfamílias Anophelinae (que inclui o gênero *Anopheles*) e Culicinae (que inclui os gêneros *Aedes* e *Culex*), como já havia sido proposto por Ross (1951) e Harbach et al (2007).

Reidenbach et al (2009) também estimaram que a divergência entre as principais linhagens de culicídeos datam do início do Cretáceo. O último ancestral comum entre anofelinos e culicíneos tem cerca de 217 milhões de anos, enquanto que entre os gêneros *Aedes* e *Culex*, 204 milhões de anos (Figura 1.7).

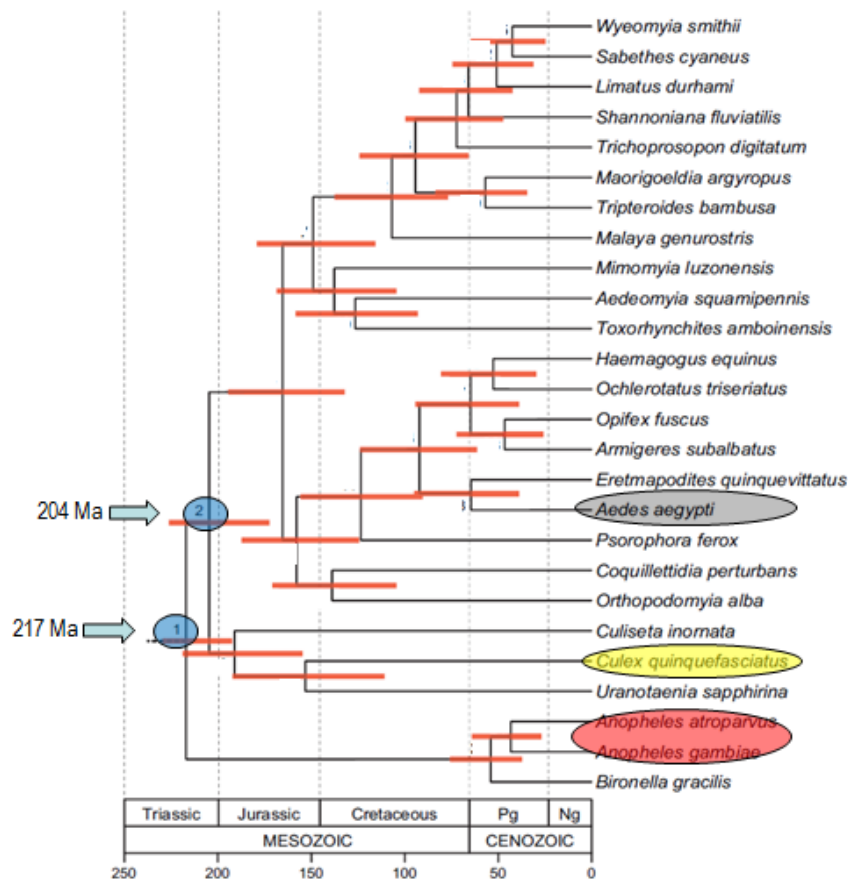


Figura 1.7: Filogenia e tempo de divergência entre os culicídeos. Destaque para a separação entre anofelinos e culicíneos (círculo azul 1) e o nó separando os gêneros *Aedes* e *Culex* (círculo azul 2). Estão também ressaltadas as espécies *Ae. aegypti* (cinza), *Cx. quinquefasciatus* (amarelo), *An. atroparvus* e *An. gambiae* (vermelho). Ma: Milhões de anos. Adaptado de Reidenbach et al 2009.

1.5) Controle de culicídeos vetores

De forma simplificada, existem três diferentes métodos de combate aos culicídeos vetores: controle mecânico (identificação dos possíveis criadouros das formas imaturas realizando, quando possível, a eliminação destes), controle biológico (utilização de organismos com a finalidade de diminuir a densidade populacional) e controle químico (utilização de inseticidas).

O controle mecânico é uma medida que, muitas vezes, exige a participação da população. Ou até governamentais, quando se trata de intervenções que focam saneamento. Este método não se aplica a culicídeos que usam coleções de água naturais como criadouro. Entretanto, no caso de vetores como *Ae. aegypti*, cujos criadouros muitas vezes são recipientes artificiais de fácil eliminação, ações desta natureza podem minimizar a necessidade de outros métodos de controle. O exemplo de Cingapura, entre 2004 e 2005, onde houve redução significativa do índice de infestação de mosquitos *Ae. aegypti* e consequente reedução na incidência de dengue, devido à eliminação dos criadouros, comprova a eficácia deste método de controle (Floore 2006, Burattini et al 2008).

O controle biológico utiliza basicamente predadores naturais de culicídeos, como bactérias, fungos e vírus patogênicos (Floore 2006, Gosh e Dash 2007, Lacey 2007). O uso de peixes larvófagos, por exemplo, tem se mostrado viável no controle de malária em muitos países do Ocidente e da Europa (Rozendaal 1997). Por outro lado, nem sempre é possível a introdução de outras espécies em criadouros de culicídeos, devido à possibilidade de futuros problemas ambientais. Bactérias do gênero *Bacillus* possuem comprovada atividade larvicida contra *Aedes*, *Anopheles* e *Culex* (Lacey 2007). No entanto, ainda existem problemas relacionados à sensibilidade de formulações de *Bacillus* a fatores externos como luz e calor, o que dificulta o uso deste método para o controle de culicídeos de países tropicais (Lima et al 2005).

Apesar do grande número de registros de populações resistentes, o uso de compostos químicos é, ainda, uma estratégia muito difundida no combate aos culicídeos vetores (Rose 2001, Valle et al 2014). Como consequência do uso intenso, atualmente muitas populações vetores encontram-se resistentes às principais classes de inseticidas, tradicionalmente utilizados em saúde pública, o que representa um entrave para esse tipo de controle. Já foi observada, por exemplo, resistência em populações de três importantes gêneros: *Aedes*, *Anopheles* e *Culex* (Price 1991, Braga et al 2004, Cui et al 2006, Montella et al 2007, Coetzee e Koekemoer 2013, Sahu et al 2014). Novos larvicidas, com diferentes alvos de atuação, têm sendo utilizados no controle de vetores, na tentativa de mitigar o problema da resistência. Tais

larvicidas pertencem à classe dos reguladores do crescimento de insetos (IGR do inglês: *Insect Growth Regulators*), e compreendem, entre outros, os análogos de hormônio juvenil e os inibidores da síntese de quitina (Graf 1993).

Concomitante aos métodos descritos acima, algumas alternativas já se encontram disponíveis ou em fase de testes. Um exemplo é a utilização da bactéria intracitoplasmática, *Wolbachia*. Mosquitos portadores de determinadas linhagens desta bactéria, além da longevidade comprometida, têm inibida a replicação de arbovírus, como dengue e chikungunya (McMeniman et al 2009, Moreira et al 2009). Outro exemplo é a construção de linhagens transgênicas de mosquitos que podem, por exemplo, ser refratários à transmissão de patógenos ou ainda carregar em seu genoma um gene letal que possa ser transmitido no momento da cópula gerando prole inviável (Benedict e Robinson 2003, Phuck et al 2007).

Nosso grupo tem investido esforços, há cerca de 15 anos, no estudo da embriogênese dos mosquitos. Acreditamos que o conhecimento da biologia e fisiologia desta fase do ciclo de vida pode ajudar no estabelecimento de mais um alvo para ações de controle de culicídeos vetores.

1.6) Ciclo de vida e características de postura dos mosquitos

O ciclo de vida dos mosquitos é composto por quatro estágios: ovo, quatro instares larvais, pupa e adulto (Figura 1.8). As larvas alimentam-se de matéria orgânica dissolvida e de microorganismos presentes no criadouro alagado. Uma vez que passam a maior parte de seu ciclo de vida na água, considera-se que os mosquitos são fundamentalmente aquáticos; ganham o ambiente terrestre somente na fase adulta, quando se reproduzem e dispersam (Borror e DeLong 1988, Forattini 1996). Machos e fêmeas adultos se alimentam de seiva. Em mosquitos hematófagos, o repasto sanguíneo, feito somente pelas fêmeas, é requerido para a produção dos ovos.

Após a cópula, fêmeas armazenam, de forma permanente, os espermatozoides em estruturas chamadas espermatecas. Nos ovários, os ovócitos migram em direção aos ovidutos laterais à medida em que estão maduros e são fecundados quando passam pelo oviduto central, conectado à espermateca, de maneira geral, imediatamente antes da postura (Figura 1.9) (Clements 1992). Os espermatozoides penetram no ovócito através de uma

abertura específica, localizada na região anterior do ovócito, denominada micrópila (Chapman 1998).

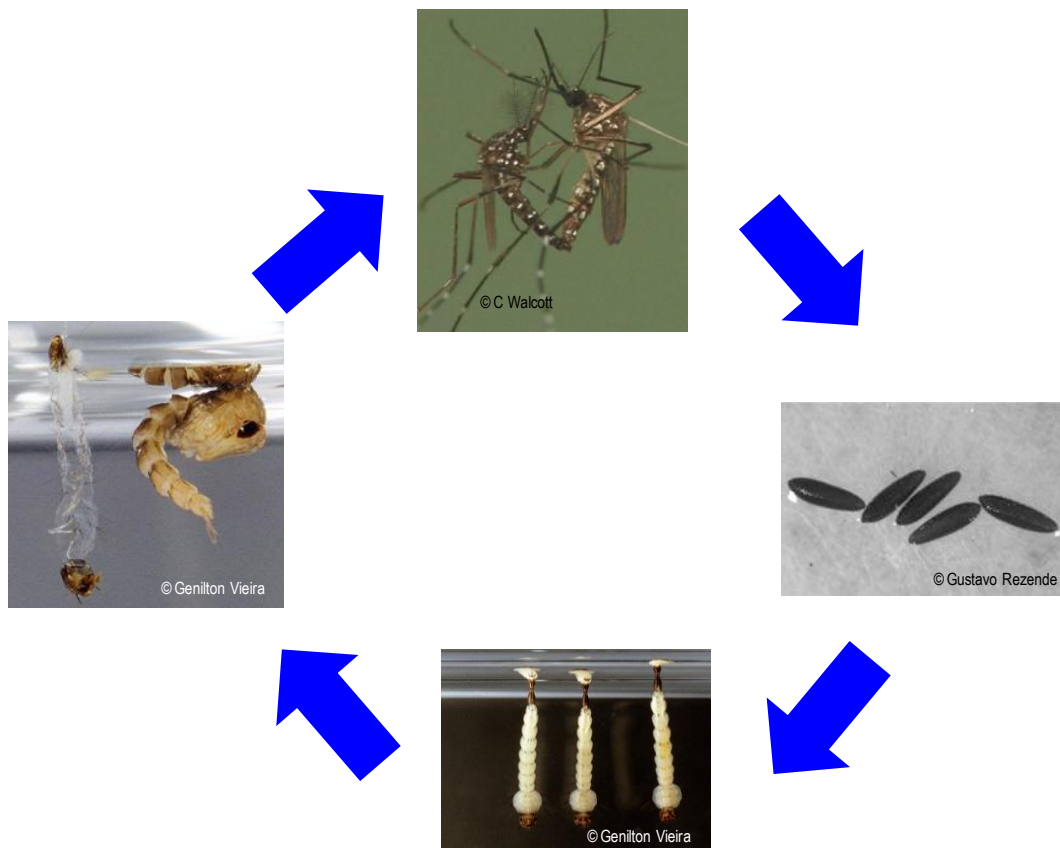


Figura 1.8: Ciclo de vida dos mosquitos. A espécie *Aedes aegypti* foi utilizada como modelo nas imagens deste ciclo (crédito das fotos referenciados em cada imagem).

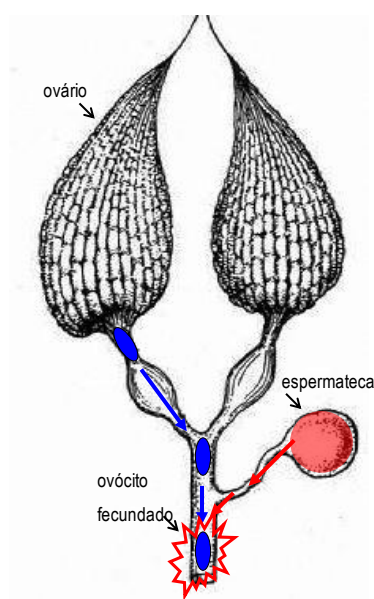


Figura 1.9: Aparelho reprodutor feminino de culicídeos. Destaque para espermateca (em vermelho) e ovócitos (em azul). Esquema cedido por Gustavo Rezende.

A escolha do sítio de postura pelas fêmeas parece ser, até certo ponto, espécie-específica, pois depende da percepção de características particulares que variam entre as espécies, como odor, salinidade, quantidade de matéria orgânica ou mesmo níveis de sombreamento (Clements 1992, Forattini 1996).

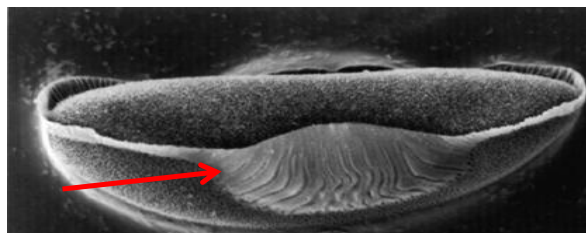
Os mosquitos do gênero *Anopheles* colocam seus ovos de forma isolada diretamente sobre a água (Figura 1.10); os ovos flutuam na superfície líquida por conta de aparatos específicos deste gênero, chamados de “flutuadores” (Figura 1.11) (Consoli e Lourenço de Oliveira 1994, Sinka et al 2010).



Figura 1.10: Fêmea de anofelino: ovos depositados de forma isolada e diretamente na água.

(Fonte: http://bestpractice.bmj.com/best-practice/images/bp/en-gb/161-3_default.jpg).

A



B

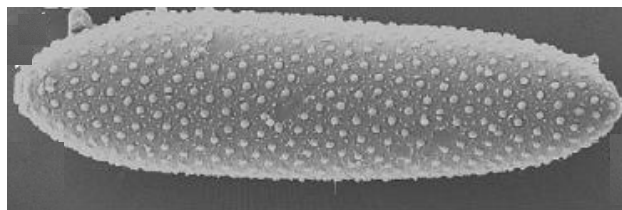


Figura 1.11: Microscopia eletrônica de varredura da superfície do ovo de (A) *An. albitalarsis* e (B) *Aedes aegypti*. A seta indica o flutuador, que é uma expansão do

exocócion. Maiores informações sobre o exocócion, vide Item 1.8 (Fontes: Valle et al 1999 e Suman et al 2011).

As fêmeas de *Culex* põem os ovos em conjunto, diretamente na superfície da água, formando aglomerados, semelhantes a jangadas, que podem ser constituídos por dezenas de ovos (Figura 1.12); geralmente fazem a postura em locais com grande aporte de matéria orgânica (Consoli e Lourenço-de-Oliveira 1994).



Figura 1.12: Fêmea de espécie do gênero *Culex* realizando postura. Ovos aglomerados formando “jangada”.
(Fonte: http://entnemdept.ufl.edu/creatures/aquatic/southern_house_mosquito.htm).

Por outro lado, fêmeas de algumas espécies do gênero *Aedes* depositam ovos na linha da superfície da água, onde ficam aderidos (Figura 1.13) até a eclosão das larvas. Os criadouros de mosquitos desse gênero podem ser temporários. Naturais ou artificiais, estes locais sempre acumulam “água limpa”, ou seja, com pouca quantidade de matéria orgânica (Lima et al 1988, Consoli e Lourenço de Oliveira 1994).



Figura 1.13: Ilustração de fêmea de espécie do gênero *Aedes* realizando postura. Seta aponta para ovos recém postos. (Fonte: www.fiocruz.br).

1.7) Embriogênese de mosquitos

Em mosquitos, a embriogênese é o período que se estende do momento da fusão dos núcleos dos gametas feminino e masculino até a formação completa da larva dentro do ovo. Na maioria dos insetos o embrião se desenvolve dentro de um ovo, estágio de vida interessante sob vários pontos de vista. Os ovos de inseto possuem características de importância taxonômica e são também o objeto de estudo da biologia do desenvolvimento. Por outro lado, o manejo da absorção e da perda de água na fase embrionária é relacionado à cobertura dos ovos (Clements 1992). Esta fase, que não experimenta dispersão ativa, tem ainda o potencial de ser alvo de ações de controle populacional de vetores ou pragas (Beament 1989, Wolpert e Tickle 2011). De simetria bilateral, ovos de mosquitos em geral têm as maiores dimensões no eixo antero-posterior (Clements 1992, Chapman 1998).

Embriões de insetos podem ser classificados em 'banda curta', 'banda média' e 'banda longa de acordo com o espaço do ovo, na região ventral, que a banda germinal (o embrião propriamente dito) ocupa na fase inicial de desenvolvimento. Essa classificação também diz respeito ao ambiente, celular ou acelular (sincicial), em que o embrião define sua organização corporal. Em embriões banda longa, que ocupam toda a região ventral do ovo desde o início, os limites de todos os segmentos corporais são definidos simultaneamente, ainda durante o blastoderma sincicial (ver abaixo). Por outro lado, em embriões banda curta e média, que no início da

embriogênese só ocupam a região mais ventro-posterior do ovo, a definição dos segmentos corporais ocorre progressivamente, do polo anterior em direção ao posterior. Em geral insetos 'banda longa' possuem desenvolvimento embrionário mais rápido que insetos 'banda curta' (Davis e Patel 2002, Fonseca et al 2012).

Embriões de dípteros são do tipo 'banda longa'; nestes, as primeiras e rápidas divisões nucleares ocorrem no citoplasma inicial do ovócito, sem acompanhamento de divisões celulares. Os núcleos resultantes são chamados de energídeos (Figura 1.14 A, B). Os energídeos formam um sincício e migram para a periferia do ovo (Figura 1.14 C). Nesta fase, de blastoderma sincicial, ainda não existem membranas isolando a maioria dos núcleos, com exceção das células polares, precursoras da linhagem germinativa, que são formadas nesta etapa (Figura 1.14 D, E). Subsequentemente são estabelecidos os limites celulares da linhagem somática, o que resulta no blastoderma celular, visível no córtex do embrião (Figura 1.14 F). As células polares se concentram no polo posterior enquanto as células somáticas, de menores dimensões, permeiam todo o resto do embrião.

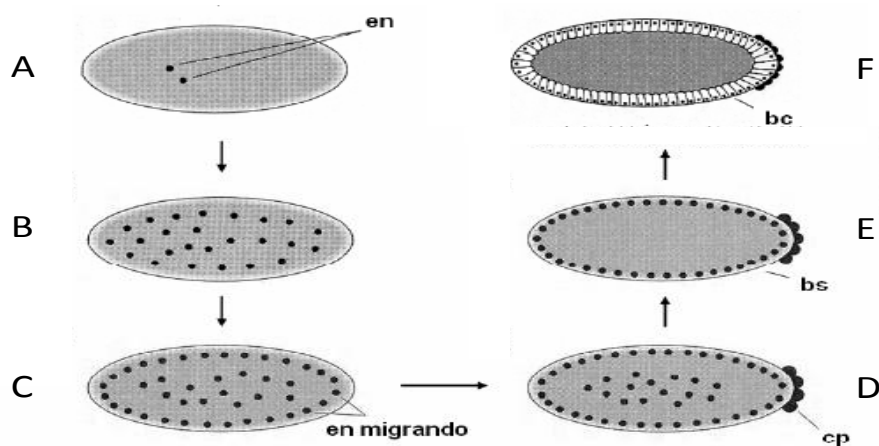


Figura 1.14: Fases iniciais da embriogênese de dípteros. (A) Divisão do zigoto em dois energídeos; (B) multiplicação dos energídeos, formando um sincício; (C) início da migração dos energídeos para a periferia do ovo; (D) início da formação do blastoderma sincicial e formação das células polares; (E) fase de blastoderma sincicial; (F) celularização, fase de blastoderma celular. (en) energídeos; (bc) blastoderma celular; (bs) blastoderma sincicial; (cp) células polares. Adaptação de Beaty e Marquardt 1996, retirada de Rezende 2008.

Durante a gastrulação, que sucede a formação do blastoderma celular, ocorre a definição dos folhetos embrionários: endoderma, mesoderma e ectoderma. É nesta fase que se define também quais células somáticas darão origem ao embrião propriamente dito e às membranas extraembrionárias, estas de início ocupando domínio dorsal do embrião (Raminani e Cupp 1975, Goltsev et al 2007). Culicídeos, e a maioria dos insetos, possuem duas membranas extraembrionárias: o amnion e a serosa (Figura 1.15 A) (Raminani e Cupp 1975, Goltsev et al 2007, Wolpert e Tickle 2011). Durante a gastrulação a serosa e o amnion se expandem lateral e ventralmente. A serosa envolverá o embrião e o amnion, enquanto o amnion cobrirá o embrião apenas na sua porção ventral (Figura 1.15 B, C e D) (Goltsev et al 2007).

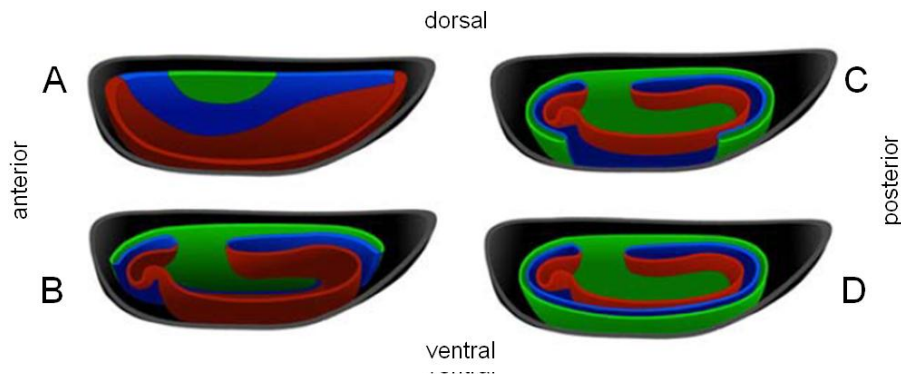


Figura 1.15: Esquema simplificado da formação e movimentação das membranas extraembrionárias em culicídeos. Os estágios sucessivos são mostrados de **A** a **D**. Em preto a delimitação do ovo, em verde a serosa, em azul o amnion, em vermelho o embrião. O vitelo não está mostrado. Não considerar, nessa figura, o estágio do embrião propriamente dito (Fonte: Goltsev et al 2009).

Em paralelo com a movimentação das membranas extraembrionárias (amnion e serosa), após o estágio de blastoderma celular, a banda germinal se forma na região mais ventral do ovo, ao longo de todo o eixo antero-posterior (Figura 1. 16 A). Em seguida ocorre a extensão da banda germinal, cuja porção posterior se dobra e avança dorsalmente (Figura 1. 16 B), indo ao encontro do lobo cefálico, já evidente e pronunciado na região anterior (Figura 1. 16 C). Após a extensão máxima, ocorre a retração da banda germinal (Figura 1. 16 D), estágio em que os sulcos entre os segmentos se aprofundam. Nesta fase, embriões de culicídeos rotacionam 180° em torno do seu eixo longitudinal. O próximo movimento é o fechamento dorsal do embrião, quando o embrião envolve o vitelo (Figura 1.16 E). Nesta fase, a serosa e o amnion se rompem ventralmente e se retraem para a região dorsal do embrião onde sofrem apoptose, antes do término do desenvolvimento embrionário (Schmidt–Ott 2005, Goltsev et al 2009). Quando o fechamento dorsal se completa, todo o vitelo está interiorizado no embrião. Ao final do processo é possível visualizar a larva recém-formada, com três segmentos torácicos fundidos e oito segmentos abdominais evidentes, bem como o sifão respiratório (Figura 1.17) e o espinho de eclosão dorsal. Essas características definem o término do desenvolvimento embrionário (Raminani e Cupp 1978, Clements 1992, Valle et al 1999, Monnerat et al 2002, Rezende et al 2008, Vital et al 2010).

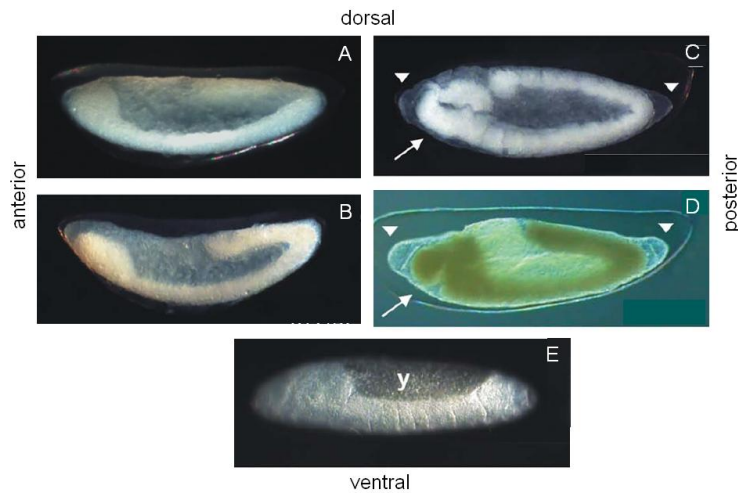


Figura 1.16: Sequência de imagens dos estágios da embriogênese de *Ae. aegypti*. (A) banda germinal (embrião) na região mais ventral do ovo. (B) banda germinal em sua fase rápida de extensão. Em A e B o embrião não está segmentado. (C) extensão máxima da banda germinal, cujo final posterior toca o lobo cefálico; embrião segmentado. (D) meio da retração da banda germinal. (E) fase de fechamento dorsal, quando o embrião começa a envolver o vitelo. Seta indica segmentação cefálica; cabeças de seta a cutícula serosa e y (*yolk*) o vitelo. Fonte: Adaptado de Rezende et al 2008 e Vital et al 2010.

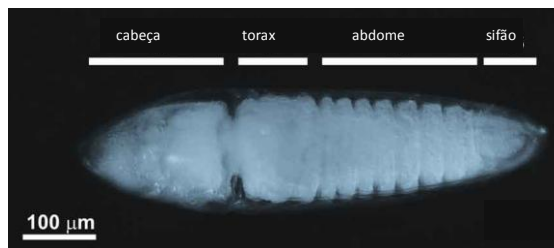


Figura 1.17: Larva do mosquito *Ae. aegypti* ao final da embriogênese. Destaque para os segmentos torácicos evidentes. Embrião em visão ventral. Adaptado de Farnesi et al 2009.

Assim como em outros insetos, nos culicídeos a duração do desenvolvimento embrionário é diretamente influenciada por variações de temperatura, ou seja, quanto maior a temperatura, mais rápida a embriogênese. Entretanto, existe uma faixa de temperatura permissiva ao desenvolvimento das espécies (Rosay 1959, Trpis et al 1973, Chapman 1998, Carvalho et al 2002, Impoinvil et al 2007, Farnesi et al 2009). Ou seja, além de afetar o tempo de desenvolvimento dos embriões de culicídeos, a temperatura influencia diretamente sua viabilidade (Carvalho et al 2002, Farnesi et al 2009).

1.8) A 'casca' do ovo de mosquito e sua relação com permeabilidade

A casca do ovo confere proteção ao embrião em desenvolvimento, enquanto minimiza perda de água para o ambiente (Clements 1992). Ovos recém-postos de culicídeos são brancos (Figura 1.18 A), flexíveis e extremamente permeáveis e se tornam escuros (Figura 1.18 C-D), rígidos e impermeáveis durante o desenvolvimento (Clements 1992, Chapman 1998, Li e Li 2006, Rezende 2008).

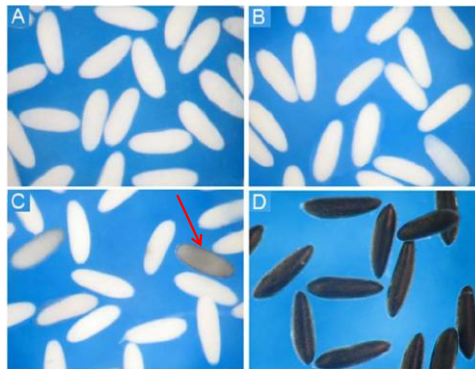


Figura 1.18: Escurecimento gradativo da casca de ovos de *Ae. aegypti*, mostrados em diferentes momentos após a postura: (A) 0-5'; (B) 45-50'; (C) 60-65'; (D) 90-95'. Seta aponta para ovo parcialmente escurecido. Fonte: Li e Li 2006.

Logo depois da postura, e nas primeiras fases da embriogênese, o revestimento dos ovos é composto exclusivamente pelo córion, uma estrutura complexa produzida no ovário. O córion é formado por duas subcamadas: o endocóron, dito homogêneo e rígido, e o exocóron, heterogêneo e mais frouxo, que se desprende facilmente do endocóron (Clements 1992, Chapman 1998, Monnerat et al 1999, Valle et al 1999). Vale ressaltar que a espessura do endocóron varia na família Culicidae; há registros entre 0,6 e 5 μm (Clements 1992, Monnerat et al 1999).

Como detalhado adiante, o enrijecimento e o escurecimento dos ovos estão relacionados com a esclerotização e a melanização do endocóron, que ocorre ao longo das primeiras 3 a 4 horas de desenvolvimento embrionário (Clements 1992, Li e Li 2006, Rezende 2008). Vale notar que estes ovos de culicídeos completamente escurecidos, do início do desenvolvimento, ainda são sensíveis à dessecação (Martins 2002, Rezende et al 2008). Apesar disto, estes processos tornam-se, muitas vezes, entraves ao estudo da embriogênese de culicídeos (Monnerat et al 1999, Rezende et al 2008).

Durante o primeiro terço da embriogênese dos culicídeos ocorre a secreção, pela serosa, da cutícula serosa (CS), matriz extracelular situada entre o endocócion e a própria serosa. A CS torna-se, a partir do lado externo, a terceira camada que compõe o revestimento final dos embriões de culicídeos (Figura 1.19). Em *Ae. aegypti* e *An. gambiae* a CS é sintetizada com cerca de 21 e 22% do tempo total da embriogênese, respectivamente. Em ambas as espécies a CS se forma na etapa de extensão máxima da banda germinal. Ao contrário do cócion, a CS é resistente à digestão por hipoclorito de sódio, sendo esta precisamente a propriedade utilizada para identificá-la (Clements 1992, Rezende 2008, Rezende et al 2008, Farnesi et al 2009, Goltsev et al 2009).

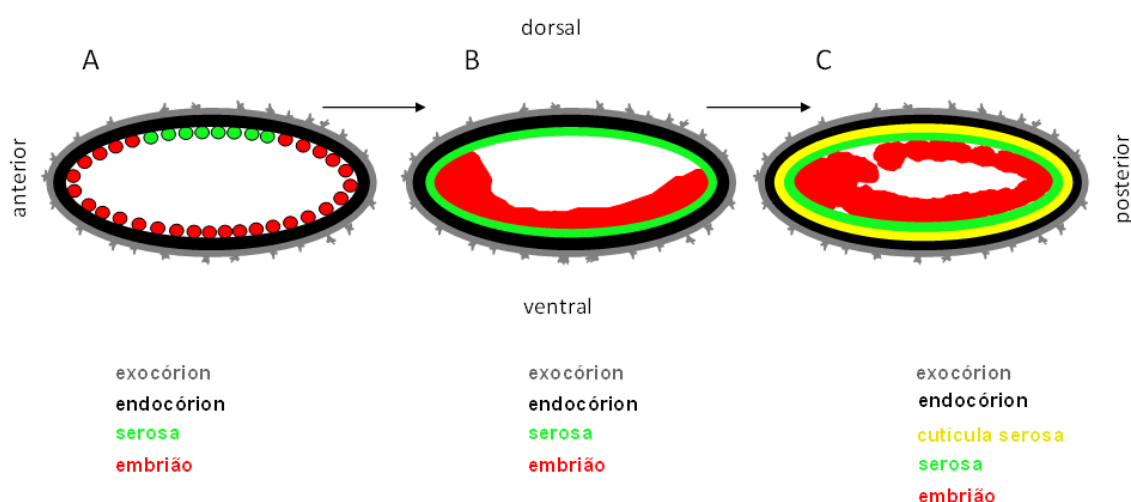


Figura 1.19: Esquema representativo da síntese da cutícula serosa e variação da composição da casca dos ovos durante a embriogênese de culicídeos. **(A)** No estágio de blastoderma celular, a casca é composta de exo e endocócion. As células da serosa estão localizadas dorsalmente. **(B)** Quando a banda germinal é formada, as células da serosa envolvem completamente o embrião. **(C)** Durante a extensão da banda germinal a CS é formada, compondo a casca do ovo. O amnion não está representado nesse esquema. Adaptado de Rezende et al 2008.

Antes da formação da CS os ovos de mosquitos perdem água para o ambiente. A formação da CS em ovos de *Ae. aegypti* e *An. gambiae* confere impermeabilidade, garantido-lhes sobrevivência quando expostos ao seco (Rezende et al 2008, Goltsev et al 2009). Essa proteção contra a perda de água que a casca confere ao ovo é o que chamamos nesta tese de “Resistência do Ovo à Dessecação” (ROD).¹

¹ Nosso grupo vinha empregando até agora o termo ‘Resistência à Dessecação Embrionária’ (RDE). Entendemos que ROD, ‘resistência dos ovos à dessecação’, é um termo mais apropriado. No Capítulo 1 desta tese, já publicado, considere “RDE” como “ROD”.

Trabalho prévio do grupo verificou que ovos da espécie *Culex quinquefasciatus* também ficam impermeáveis durante a embriogênese (Martins 2002), embora nem a presença de CS nesta espécie nem a relevância fisiológica de tal resistência à dessecação tenham sido investigadas. A função da cutícula serosa na ROD foi confirmada no besouro *Tribolium castaneum* (Jacobs et al 2013), e parece ser um traço primitivo nos insetos.

A ROD permite a sobrevivência de embriões mesmo em condições ambientais de baixa umidade (Telford 1957, Beckel 1958, Harwood e Horsfall 1959, Judson e Hokama 1965, Rezende et al 2008, Goltsev et al 2009, Jacobs et al 2013) e tem impacto importante na epidemiologia de doenças como a dengue. Por exemplo, depois de adquirir resistência à dessecação, ovos de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* podem permanecer viáveis, em estado de dormência, por meses, mesmo em condições secas, até que o ambiente se torne adequado à eclosão das larvas (Christophers 1960, Juliano e Lounibos 2005, Urbanski et al 2010). Esta característica está relacionada também com questões ecológicas significativas, tais como a capacidade de dispersão e de conquista de novos *habitats* por mosquitos desse gênero (Christophers 1960, Juliano e Lounibos 2005, Brown et al 2011).

Goltsev et al (2009) fixaram embriões de *An. gambiae* e isolaram as células da serosa, no momento de síntese da CS. Por meio de análise de transcriptoma identificaram que três vias estavam muito ativadas na serosa em relação ao resto do embrião: metabolismo de aminoácidos, de tirosina e de alongamento de lipídios. O primeiro está direcionado para a biossíntese de quitina, o segundo para os processos de esclerotização e melanização e o terceiro para a formação de ceras. Presença de quitina já foi confirmada na CS do besouro *Tribolium castaneum* e dos culicídeos *Ae. aegypti* e *An. gambiae* (Rezende et al 2008, Goltsev et al 2009, Jacobs et al 2013). Também há registros que sugerem a participação de ceras na impermeabilização do tegumento de insetos adultos, impedindo a saída de água (Gibbs 1998, Chapman 1998, Juaréz e Fernandez 2007). Na ordem Orthoptera estão descritas duas camadas de CS: uma externa, fina, denominada “cutícula amarela” e outra interna e grossa, a “cutícula branca”. A quitina está presente na cutícula branca e sugeriu-se que a cutícula amarela possua cera (Jahn 1935, Slifer 1937, 1948).

1.8.1) Quitina em insetos e sua relação com a resistência de ovos à dessecação

A quitina é um homo-amino-polissacarídeo formado por monômeros de N-acetil-glicosamina (GlcNAc) ligados entre si através de pontes glicosídicas do tipo β 1-4 (Figura 1.20). Depois da celulose, quitina é o biopolímero mais abundante na natureza, estando presente em fungos, nematódeos e artrópodes. Este açúcar participa de várias estruturas e matrizes extracelulares de insetos, como o exoesqueleto, a matriz peritrófica sintetizada pelo tubo digestivo, traqueias, partes do sistema reprodutor e a cutícula serosa (Reynolds e Samuels 1996, Rezende et al 2008, Farnesi et al 2012 - Anexo, Merzendorfer 2012).

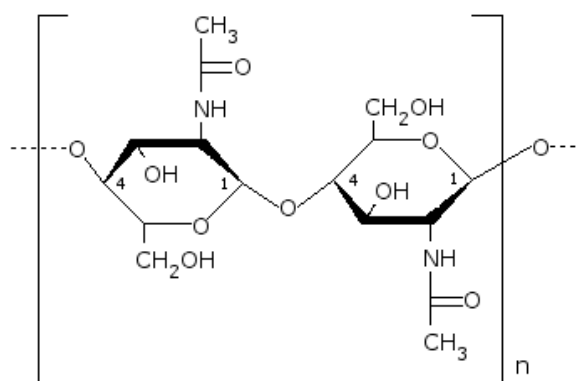


Figura 1.20: Estrutura da molécula de quitina. Estão representados dois monômeros de GlcNAc, ligados entre si por pontes glicosídicas do tipo β 1-4 (fonte: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Quitina>).

As quitina Sintases (CHS do inglês *chitin Synthase*), enzimas da família das glicosiltransferases, proteínas integrais de membrana, são as catalisadoras da produção de quitina, empregando UDP-GlcNAc como doador de monômeros de GlcNAc (Merzendorfer e Zimoch 2003). A importância da quitina em todas as fases da vida dos insetos, aliada a sua ausência em vertebrados, fazem desta molécula alvo de uma classe de inseticidas: as benzoil-fenil-ureias, que atuam como inibidores da síntese de quitina (ISQ). Os efeitos de um ISQ sobre a fisiologia de síntese da cutícula de larvas de *Ae. aegypti* estão apresentados no Anexo desta tese (Farnesi et al 2012).

Recentemente a técnica de RNAi foi usada no besouro *Tribolium castaneum* para suprimir a expressão do gene *TcCHS1*, relacionado com a

síntese de quitina para a CS. Houve diminuição da taxa de eclosão dos ovos de forma diretamente proporcional à queda na umidade relativa do ambiente. Os autores concluíram que a quitina da CS tem participação na resistência dos ovos desta espécie a ambiente de baixa umidade relativa (Jacobs et al 2013).

1.8.2) O processo de esclerotização e melanização de ovos de mosquitos

A melanina é um pigmento presente em diversos organismos, de fungos a mamíferos. Existem dois tipos de melaninas: as feomelaninas, que conferem colorações em tons de vermelho e as eumelaninas, cujas colorações vão do marrom claro ao preto (Sugumaran 2009). Na presente tese, todas as referências a “melanina” estão relacionadas com as eumelaninas. A melanização em insetos é um traço bastante variável, com diferenças significativas nos padrões entre populações de uma mesma espécie e mesmo entre indivíduos de uma mesma população, podendo ter relação com aspectos tão distintos quanto comunicação visual, mimetismo, camuflagem, ou ainda com a resistência à dessecação.

Diferente dos vertebrados, que usam tipos especiais de células para criar padrões de pigmentação do corpo, os insetos tipicamente sintetizam pigmentos e/ou precursores de pigmentos em suas células epidérmicas, e a melanização é uma das possibilidades. As melaninas são uma classe predominante de pigmentos em insetos. São incorporadas à cutícula, sobrepondo-se às células epidérmicas através de um processo conhecido como esclerotização. Então, a cor das estruturas corpóreas dos insetos, como as cutículas, não é simplesmente como uma “parede pintada” por pigmentos; a cor é uma parte integrante dessa “parede” (Wittkopp e Beldade 2009).

A esclerotização também está presente em todo o reino animal, resultando no enrijecimento de diferentes estruturas; entretanto, os insetos estão entre os grupos que mais extensivamente utilizam este processo. Nos insetos, esclerotização e melanização de estruturas corpóreas são interligadas e compartilham, ao menos parcialmente, a mesma via bioquímica. Em insetos, enrijecimento e/ou escurecimento podem ser observados no exoesqueleto, nas ootecas, e também no endocórion, entre outras estruturas (Hopkins e Kramer 1992, Rezende 2008, Wittkopp e Beldade 2009).

A esclerotização pode ser definida, de forma geral, como a estabilização de estruturas de biomoléculas por meio de ligações cruzadas (no original: *cross-linking*) entre quinonas (compostos orgânicos derivados da oxidação de fenóis) e os grupamentos funcionais de proteínas, açúcares e lipídios. Postula-se que ligações cruzadas aromáticas são inseridas em cadeias polipeptídicas causando progressivos enrijecimento e desidratação, além da vedação dos polímeros (Hopkins e Kramer 1992). Proteínas covalentemente ligadas por esclerotização a partir de quinonas foram chamadas de esclerotinas por Pryor na década de 1940 (*apud* Hopkins e Kramer 1992). As esclerotinas são geralmente muito resistentes à degradação tanto por processos físicos quanto químicos.

O passo inicial da esclerotização e da melanização envolve a oxidação da tirosina (por meio de hidroxilação), gerando dopa. Dopa pode ser decarboxilada, gerando dopamina (Figura 1.21). Dopa e dopamina podem ser usadas na melanização, ou dopamina pode seguir para a esclerotização. A tirosina é a molécula precursora da melanização em mosquitos *Ae. aegypti*.

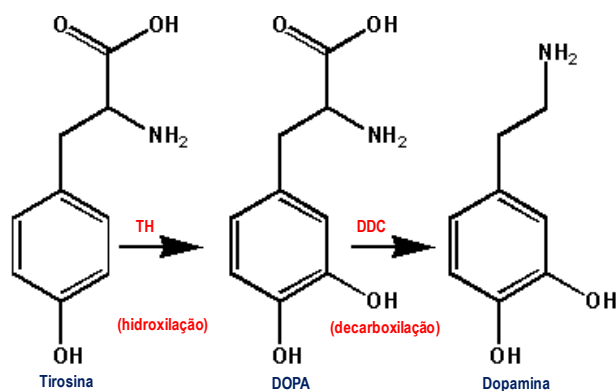


Figura 1.21: Etapas de hidroxilação e decarboxilação, a partir do aminoácido tirosina, nas vias de esclerotização e melanização. Dopa segue para a melanização. Dopamina pode seguir tanto para a esclerotização quanto para a melanização. TH: tirosina hidroxilase; DDC: dopa decarboxilase. Adaptado de <http://pt.wikipedia.org/wiki/Catecolamina>.

Seguindo na melanização, dopa e dopamina podem ser oxidadas em quinonas que irão originar cromos: dopa-cromo e dopamina-cromo. Essas moléculas podem ser novamente reduzidas e reagir entre si formando melaninas (Figura 1.22) (Rezende 2008, Wittikopp e Beldade 2009). Quando o caminho é a esclerotização, dopamina pode ser hidroxilada, gerando

norepinefrina. Tanto dopamina quanto norepinefrina podem passar por acetilações, gerando moléculas intermediárias que, oxidadas, dão origem a derivados o-quinona altamente reativos, com potencial de, via reações não enzimáticas, formarem ligações cruzadas com outras moléculas como proteínas, açúcares e lipídios (Hopkins e Kramer 1992, Li e Christensen 1993, Li 1994, Chapman 1998).

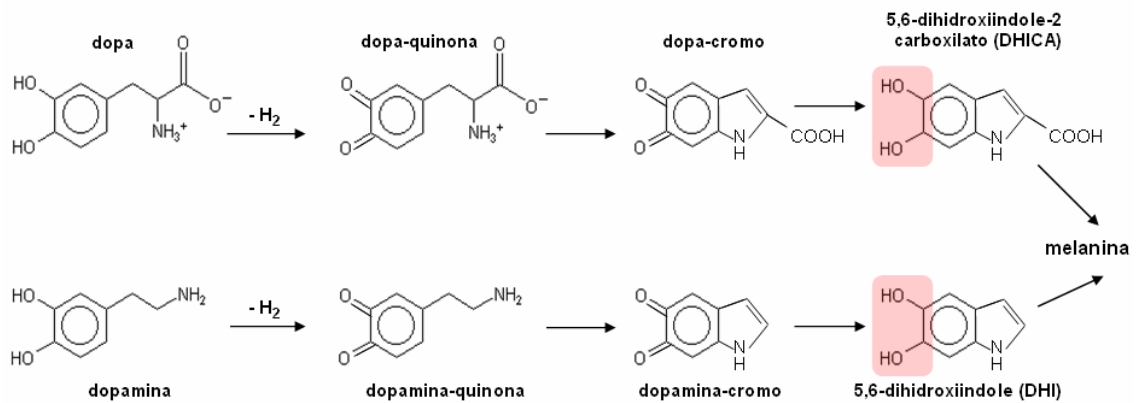


Figura 1.22: Etapas finais da via de melanização: Oxidação de dopa ou dopamina e formação das quinonas, seguida pela formação de cromos. Na sequência, redução dos cromos e formação de melaninas. Retirado de Rezende 2008, adaptado de Hopkins e Kramer 1992.

1.9) Justificativa e apresentação dos resultados

Existem, em mosquitos, questões sobre a resistência de ovos à dessecação (ROD) que ainda não foram abordadas na literatura. Perguntas simples como: “Além de *Aedes* e *Anopheles*, ovos de outros gêneros de mosquitos também adquirem ROD abruptamente?” “Por quanto tempo ovos de mosquitos 'não-*Aedini*' podem sobreviver em ambiente seco?” Há ainda questões mais complexas: “Em que medida há conservação de ROD e de cutícula serosa na evolução dos culicídeos?”, ou “Que fatores contribuem para a 'impermeabilidade' dos ovos?”.

Nossa proposta foi comparar, por meio de abordagens fisiológicas, morfológicas, e bioquímicas, a aquisição de resistência dos ovos à dessecação, durante a embriogênese de mosquitos vetores de três gêneros: *Aedes*, *Anopheles* e *Culex*. As espécies *Ae. aegypti*, *An. aquasalis* e *Cx. quinquefasciatus*, de histórias evolutivas e características ecológicas distintas, foram estudadas simultaneamente. *Aedes aegypti*, cuja ROD tem sido investigada pela equipe há algum tempo, foi utilizado como modelo em ensaios fisiológicos, sendo comparado com as outras espécies abordadas neste estudo. A formação da CS e a viabilidade no seco depois da aquisição de ROD foram estudadas. Vários parâmetros físicos dos ovos foram investigados, como peso, área e volume, bem como a presença de quitina. A contribuição da melanização para a aquisição de ROD também foi averiguada. Neste caso, além de trabalhar com as espécies já citadas, utilizamos um mutante deficiente de melanização da espécie *An. quadrimaculatus*. Esperamos, através dos resultados desta tese, contribuir com o conhecimento sobre o fenômeno da resistência dos ovos à dessecação, aspecto fisiológico que poderá auxiliar no desenvolvimento de novas estratégias de controle de culicídeos vetores. Os resultados estão apresentados em forma de artigos publicados ou manuscritos em preparação.

O primeiro capítulo dos resultados, já publicado (Vargas, Farnesi et al 2014), trata da resistência à dessecação observada em embriões de três espécies de mosquitos (*Aedes aegypti*, *Anopheles aquasalis* e *Culex quinquefasciatus*) e sua relação com a formação da cutícula serosa, uma camada do ovo secretada pela serosa, esta uma membrana extraembrionária.

O segundo capítulo descreve algumas grandezas físicas dos ovos das mesmas espécies de mosquitos, além de detalhes da superfície do endocóxon, obtidos por microscopia eletrônica de varredura, com o objetivo de identificar se há correlação destes aspectos com os níveis diferenciados de resistência dos ovos à dessecação observados anteriormente.

No terceiro capítulo, procuramos avançar na compreensão da natureza da resistência dos ovos à dessecação: identificamos tendência de correlação positiva entre este fenômeno e o conteúdo de quitina, um componente importante da cutícula serosa. Além disso, verificamos que o processo de melanização, responsável pelo escurecimento das cascas, também contribui para a impermeabilidade dos ovos. Este último aspecto foi confirmado de forma direta, por meio de ensaios funcionais com mutante de *Anopheles quadrimaculatus* no qual a melanização é deficiente.

O quarto capítulo, que descreve resultados ainda preliminares, contempla avaliação da ultraestrutura da casca de ovos de *Aedes aegypti*. A ideia neste caso é ainda poder aplicar a mesma metodologia em ovos de culicídeos das outras espécies, na tentativa de identificar correlação com os distintos níveis de resistência dos ovos à dessecação encontrados.

Finalmente, o anexo é um artigo com trabalho paralelo (Farnesi et al 2012), que relata o efeito de um inibidor de síntese de quitina sobre aspectos fisiológicos e morfológicos de larvas de *Aedes aegypti*.

2) OBJETIVOS

2.1) Objetivo geral

Comparar, usando abordagens fisiológicas, bioquímicas, genéticas e morfológicas, o processo de aquisição de resistência à dessecação durante a embriogênese de *Ae. aegypti*, *Cx. quinquefasciatus*, *An. aquasalis* e *An. quadrimaculatus*. Investigar o papel da cutícula serosa e de outros fatores neste processo.

2.2) Objetivos específicos

- a) Identificar, para as espécies *Cx. quinquefasciatus*; *An. aquasalis* e *An. quadrimaculatus*, o período necessário para a finalização do desenvolvimento embrionário.
- b) Determinar o estágio morfológico e o momento cronológico em que surge a resistência à dessecação nos ovos das diferentes espécies.
- c) Comparar a viabilidade dos ovos, frente a variados regimes de exposição ao seco, durante e após o fim da embriogênese.
- d) Investigar se há relação entre aquisição de resistência dos ovos à dessecação e:
 - d.1) grandezas físicas dos ovos e estrutura da superfície do endocórion.
 - d.2) a formação de cutícula serosa em *Cx. quinquefasciatus* e *An. aquasalis*; verificar se a cutícula serosa destas espécies contém quitina.
 - d.3) o grau de escurecimento dos ovos:
 - comparativamente entre os gêneros *Aedes*, *Anopheles* e *Culex*
 - especificamente em *An. quadrimaculatus* nas linhagens selvagem (ovos de coloração escura) e mutante (ovos de coloração dourada).
 - d.4) a espessura do endocórion.

3) RESULTADOS

3.1) Capítulo 1

Helena Carolina Martins Vargas, Luana Cristina Farnesi, Ademir Jesus Martins, Denise Valle, Gustavo Lazzaro Rezende (2014) Serosal cuticle formation and distinct degrees of desiccation resistance in embryos of the mosquito vectors *Aedes aegypti*, *Anopheles aquasalis* and *Culex quinquefasciatus*. *Journal of Insect Physiology* 62: 54–60.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Insect Physiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jinsphys

Serosal cuticle formation and distinct degrees of desiccation resistance in embryos of the mosquito vectors *Aedes aegypti*, *Anopheles aquasalis* and *Culex quinquefasciatus*



Helena Carolina Martins Vargas^{a,b,1,2}, Luana Cristina Farnesi^{a,b,3,2}, Ademir Jesus Martins^{a,b,d}, Denise Valle^{d,e,*}, Gustavo Lazzaro Rezende^{c,d,*}

^a Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodos Vetores, IOC, Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ 21045-900, Brazil

^b Laboratório de Entomologia, Instituto de Biologia do Exército, Rio de Janeiro, RJ 20911-270, Brazil

^c Laboratório de Química e Função de Proteínas e Peptídeos, Centro de Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, RJ 28013-602, Brazil

^d Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular, Rio de Janeiro, RJ 21941-902, Brazil

^e Laboratório de Biologia Molecular de Flavivírus, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ 21045-900, Brazil.

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 December 2013

Received in revised form 31 January 2014

Accepted 3 February 2014

Available online 15 February 2014

Keywords:

Desiccation resistance

Serosal cuticle

Embryogenesis

Mosquito vectors

Impermeability

Viability under dry conditions

ABSTRACT

Given their medical importance, mosquitoes have been studied as vectors of parasites since the late 1800's. However, there are still many gaps concerning some aspects of their biology, such as embryogenesis. The embryonic desiccation resistance (EDR), already described in *Aedes* and *Anopheles gambiae* mosquitoes, is a peculiar trait. Freshly laid eggs are susceptible to water loss, a condition that can impair their viability. EDR is acquired during embryogenesis through the formation of the serosal cuticle (SC), protecting eggs from desiccation. Nevertheless, conservation of both traits (SC presence and EDR acquisition) throughout mosquito evolution is unknown. Comparative physiological studies with mosquito embryos from different genera, exhibiting distinct evolutionary histories and habits is a feasible approach. In this sense, the process of EDR acquisition of *Aedes aegypti*, *Anopheles aquasalis* and *Culex quinquefasciatus* at 25 °C was evaluated. Completion of embryogenesis occurs in *Ae. aegypti*, *An. aquasalis* and *Cx. quinquefasciatus* at, respectively 77.4, 51.3 and 34.3 hours after egg laying. *Cx. quinquefasciatus* embryonic development taking less than half the time of *Ae. aegypti*. In all cases, EDR is acquired in correlation with SC formation. For both *Ae. aegypti* and *An. aquasalis*, EDR and SC appear at 21% of total embryonic development, corresponding to the morphological stage of complete germ band elongation/beginning of germ band retraction. Although phylogenetically closer to *Ae. aegypti* than to *An. aquasalis*, *Cx. quinquefasciatus* acquires both EDR and serosal cuticle later, with 35% of total development, when the embryo already progresses to the middle of germ band retraction. EDR confers distinct egg viability in these species. While *Ae. aegypti* eggs demonstrated high viability when left up to 72 hours in a dry environment, those of *An. aquasalis* and *Cx. quinquefasciatus* supported these conditions for only 24 and 5 hours, respectively. Our data suggest that serosa development is at least partially uncoupled from embryo development and that, depending upon the mosquito species, EDR bestows distinct levels of egg viability.

© 2014 The Authors. Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY-NC-SA license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/>).

Abbreviations: EDR, embryonic desiccation resistance; HAE, hours after egg laying; SC, serosal cuticle.

* Corresponding authors. Address: Laboratório de Biologia Molecular de Flavivírus, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ 21045-900, Brazil. Tel.: +55 22 2748 6425; fax: +55 22 2739 7178 (D. Valle). Address: Laboratório de Química e Função de Proteínas e Peptídeos, Centro de Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, RJ 28013-602, Brazil. Tel.: +55 22 2748 6425; fax: +55 22 2739 7178 (G.L. Rezende).

E-mail addresses: helenacvargas@gmail.com (H.C.M. Vargas), lfarnesi@ioc.fiocruz.br (L.C. Farnesi), ademirjr@ioc.fiocruz.br (A.J. Martins), dvalle@ioc.fiocruz.br (D. Valle), grezende@uenf.br (G.L. Rezende).

¹ Present address: Laboratório de Química e Função de Proteínas e Peptídeos, Centro de Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, RJ 28013-602, Brazil.

² These authors contributed equally to this work.

³ Present address: Laboratório de Biologia Molecular de Flavivírus, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ 21045-900, Brazil.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jinsphys.2014.02.001>

0022-1910/© 2014 The Authors. Published by Elsevier Ltd.

This is an open access article under the CC BY-NC-SA license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/>).

1. Introduction

Mosquitoes (Culicidae) are insects of the order Diptera that have great medical importance, since many species are vectors of parasites such as arboviruses and *Plasmodium* (Clements, 1992). Control of many of these diseases affecting thousands of people every year, depends primarily on actions focused on their vectors (Maciel-De-Freitas et al., 2012; Who, 2013). Although mosquito vectors have been studied since the late 1800's (Christophers, 1960) and despite their public health importance, many gaps still remain concerning the biology of these insects. In this sense, embryogenesis is the least known stage of the mosquito life cycle.

Mosquitoes oviposit in water, and freshly laid eggs are prone to water loss. *Aedes* and *Anopheles gambiae* eggs are known to acquire embryonic desiccation resistance (EDR) in the course of embryogenesis. This trait protects developing embryos from losing water, therefore enabling the egg to survive under dry conditions (Beckel, 1958; Goltsev et al., 2009; Harwood and Horsfall, 1959; Judson and Hokama, 1965; Rezende et al., 2008; Telford, 1957). The EDR acquisition arises abruptly during *Aedes aegypti* and *An. gambiae* embryogenesis, and since egg darkening occurs many hours earlier, both processes do not seem to be coupled. The serosal cuticle (SC), an extracellular matrix containing chitin, is the structure responsible to confer EDR to mosquitoes (Goltsev et al., 2009; Rezende et al., 2008) as well as the *Tribolium castaneum* beetle (Jacobs et al., 2013), seemingly a primitive trait among insects.

The serosal cuticle is secreted by the serosa, an extraembryonic membrane of most insects (Panfilio, 2008). In early embryogenesis the serosa primordium is first defined at the differentiated blastoderm stage. Afterwards, two events occur in parallel: (i) the germ band (i.e. the embryo per se) extends and then retracts, with the concomitant definition of the body segments and (ii) the serosa envelops the embryo and secretes the SC (Goltsev et al., 2007, 2009; Handel et al., 2000; Rezende et al., 2008). After the end of germ band retraction, the process of dorsal closure begins when embryo epidermis progresses towards the dorsal midline, closing the body (Monnerat et al., 2002; Rezende et al., 2008; Vital et al., 2010). During dorsal closure, the serosa retracts dorsally forming the dorsal organ, finally degenerating (Clements, 1992; Goltsev et al., 2009; Panfilio, 2008; Raminani and Cupp, 1978).

The SC confers a very effective EDR for *Ae. aegypti* eggs, enabling them to survive under dry conditions for months, or even a year (Christophers, 1960; Rezende et al., 2008). This trait is implicated in significant ecological issues, such as the mosquito capacity to continue its life cycle after drought periods (Christophers, 1960) and disperse to new locations (Brown et al., 2011). However, there are still gaps in the knowledge related to this process, e.g. what are the biochemical components of the SC? Which enzymes are needed for SC formation? To what extent are the presence of SC and the EDR trait conserved among mosquito evolution? Could eggs from other species survive in dry conditions for long periods, as described for *Ae. aegypti*? Therefore, we adopted a comparative approach to investigate EDR in mosquitoes. The species *Ae. aegypti*, *Anopheles aquasalis* and *Culex quinquefasciatus*, belonging to three different genera with distinct evolutionary histories and ecological traits (Christophers, 1960; Clements, 1992; Farajollahi et al., 2011; Reidenbach et al., 2009; Simonsen and Mwakitalu, 2013; Sinka et al., 2010), were studied simultaneously. To our knowledge, this is the first inclusion of *Culex* eggs in evaluations of the presence of a serosal cuticle and acquisition of EDR.

The objectives of the present study are to determine the time needed for completion of embryogenesis of *An. aquasalis* and *Cx. quinquefasciatus*, to identify SC formation in both species in correlation with embryo morphogenesis and, finally, to investigate the viability of mosquito late embryos when eggs are exposed to dry

conditions. In all cases, the model system *Ae. aegypti* was used as a reference species with known SC-driven EDR (Rezende et al., 2008).

2. Methods

2.1. Mosquitoes

Mosquitoes from stable colonies maintained in the Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes Vetores, IOC, Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil, were employed: the *Ae. aegypti* Rockefeller strain (Kuno, 2010) as well as *An. aquasalis* and *Cx. quinquefasciatus* cultivated in the laboratory for respectively 18 and 14 years (Belinato et al., 2013; de Carvalho et al., 2002). *Ae. aegypti* and *Cx. quinquefasciatus* larvae were reared in dechlorinated water and fed with crushed cat food (Friskies®, “Peixes – Sensações marinhas”, Purina, Camaquã, RS, Brazil); *An. aquasalis* larvae were reared in brackish dechlorinated water (2 mg of marine salt/mL of dechlorinated water) and fed with powdered fish food (TetraMin®, Tetramarine Saltwater Granules, Tetra GmbH, Germany). In all cases, adults were kept at 26 °C and 70–80% relative humidity and fed ad libitum with 10% sucrose solution. For egg production, females were sugar deprived for 24 h and then blood-fed on anaesthetized guinea pigs.

2.2. Synchronous egg laying

Egg laying was always induced under dark conditions, inside an incubator with precise temperature control at 25 ± 1 °C during 1 hour. Eggs were then kept at 25 °C until reaching the adequate age for the experiments. According to the species, the egg laying stimulus procedure was slightly different: *Ae. aegypti* and *An. aquasalis* females, 3–4 days after blood feeding, were anaesthetized in ice for one minute, transferred to upside down Petri dishes (8.5 cm diameter) where the lid became the base and internally covered with Whatman No. 1 filter paper. After insect revival, the filter paper was wet with dechlorinated water for *Ae. aegypti* and with brackish dechlorinated water for *An. aquasalis*, thus stimulating egg laying. *Cx. quinquefasciatus* females were anaesthetized in ice only 5–6 days after blood meal and transferred to 8.5 cm diameter Petri dishes (not upside down) without filter paper. After insect revival, dechlorinated water was added with the aid of a micropipette through a small hole in the lid until the mosquitoes were pressed against the lid, this procedure immediately prompting egg laying (details in Rezende et al., 2008).

2.3. Defining the end point of embryonic development

The definition of embryonic development completion for *An. aquasalis* and *Cx. quinquefasciatus* at 25 °C was performed as previously described for *Ae. aegypti* (Farnesi et al., 2009), with few modifications. Briefly, 2 hours before the putative eclosion of the first larva (empirically determined) *An. aquasalis* and *Cx. quinquefasciatus* eggs were flooded with, respectively, brackish or dechlorinated water, and egg hatching was evaluated at 30-min intervals. For both species the end of embryogenesis was defined as the time required for eclosion of 50% of total larvae. For *An. aquasalis* three independent experiments were undertaken where each experiment consisted of three replicates of 50 eggs each (total of 450 eggs). For *Cx. quinquefasciatus*, four independent experiments were performed (total of 600 eggs). The percentage of hatching was normalized by viability controls (batch of eggs with total hatching recorded 24 hours after the previously defined end of embryogenesis).

2.4. Analysis of embryonic desiccation resistance (EDR) acquisition

The EDR acquisition evaluation was performed as described previously (Rezende et al., 2008), based on cryobiology-derived protocols (Valencia et al., 1996a,b). At distinct embryogenesis time points, replicates consisting of 40 or 50 eggs, obtained from synchronous egg laying, were placed onto a polycarbonate filter (25 mm diameter, 8 μ m pore, Poretics Corporation), deposited on a drop of dechlorinated water. Each filter was then blotted on a Whatman No. 1 filter paper to remove all water, and eggs were air-dried for 15 min. Afterwards, the shrunken or intact eggs were counted under a stereomicroscope. Three independent experiments were performed.

2.5. Bleaching procedures to identify serosal cuticle

Bleach (NaOCl) digestion removes the egg chorion while leaving the SC intact. This procedure has already been successfully employed for *Ae. aegypti* (Rezende et al., 2008) and *An. gambiae* (Goltsev et al., 2009). Eggs immediately before and immediately after EDR acquisition were treated with 50% NaOCl (containing approximately 6% active chlorine at final concentration) for 3–20 min and viewed under a stereomicroscope Stereo Discovery V.12 (Zeiss) coupled with a digital image acquisition system.

2.6. Analysis of embryo morphology after EDR acquisition

Synchronized eggs were fixed and clarified according to a methodology described elsewhere (Trpis, 1970). The embryonic morphology of pools of 100 eggs immediately after EDR acquisition was observed. Images were obtained with the same system described above in item 2.5. Embryonic stages were identified according to Monnerat et al. (2002), Rosay (1959), Vital et al. (2010).

2.7. Analysis of egg viability after exposure of late embryos to dry conditions

Synchronized eggs were transferred from wet to dry conditions at approximately 80% of embryogenesis (i.e. 62, 41 and 27 HAE, respectively, for *Ae. aegypti*, *An. aquasalis* and *Cx. quinquefasciatus*). In each case, groups of 150 eggs were kept dry for varying periods: 5, 10, 24, 48 or 72 hours, comprising 750 eggs in all. Egg viability was then quantified through L1 larvae counting, after employing yeast extract solution (150 mg/mL) as a hatching stimulus (Farnesi et al., 2009). In some experimental conditions, the total test interval (“wet plus dry”) remained below the embryogenesis completion period. In these cases eggs were returned to a moist Whatman No.1 filter paper up to that period (see Fig. 5 for details). For each experimental condition a parallel control sample with 150 eggs was maintained in moist filter paper up to the embryogenesis completion period, when yeast extract solution was applied. Each experiment was performed as independent triplicates inside an incubator at 25 ± 1 °C. Relative humidity inside the incubator ranged from 20% to 55%.

2.8. Statistical analysis

For all experiments, mean and standard error were calculated. One way analysis of variance (ANOVA) ($P < 0.05$) followed by Tukey's Multiple Comparison Test was used in the experiment of abrupt acquisition of desiccation resistance and the experiment of egg viability under dry conditions. The results of these analyses are shown in Figs. 2 and 5.

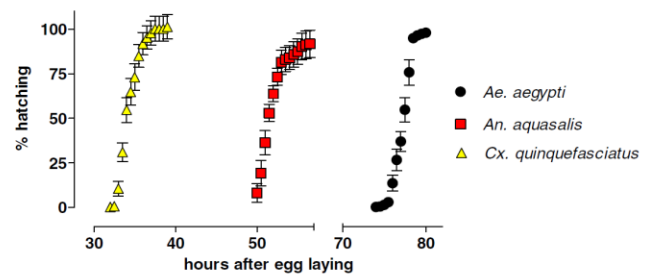


Fig. 1. The time course of mosquito embryonic development at 25 °C varies among species. Cumulative L1 hatching of *Ae. aegypti*, *An. aquasalis* and *Cx. quinquefasciatus* is depicted. Average and standard error of each time point, normalized by viability controls (see Methods), are shown. A total of 360 eggs for *Ae. aegypti*, 450 eggs for *An. aquasalis* and 600 eggs for *Cx. quinquefasciatus* were evaluated.

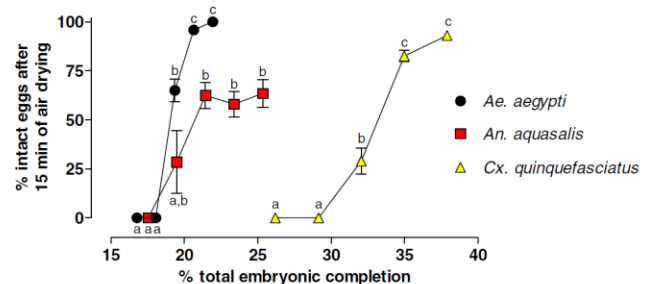


Fig. 2. Abrupt acquisition of desiccation resistance during mosquito embryogenesis. Pools of synchronized mosquito eggs were air-dried for 15 min at different embryonic ages. The percentage of intact eggs (i.e. that did not shrink) was then recorded. The rate of intact eggs in the y-axis is expressed relative to the percentage of total embryonic development for each species at 25 °C (in the x-axis). Data represent mean and standard errors. A total of 600 eggs for *Ae. aegypti*, 750 eggs for *An. aquasalis* and 750 eggs for *Cx. quinquefasciatus* were evaluated. For each species, values followed by different lowercase letters were significantly different according to Tukey's Multiple Comparison Test.

3. Results

3.1. The total embryo developmental time differs among mosquito species

The three species were tested at 25 °C, temperature previously associated with the highest viability of *Ae. aegypti* embryos, around 96% (Farnesi et al., 2009). *Ae. aegypti* exhibited the longest embryogenesis period, lasting 77.4 hours after egg laying (HAE). *An. aquasalis* presented the intermediate value of 51.3 HAE, and *Cx. quinquefasciatus* was the fastest, its embryonic development being completed after 34.2 HAE (Fig. 1 and Table 1). Given that embryo development of each species requires a distinct time period for completion, it would not be possible to directly compare their physiological processes in ‘hours after egg laying’. We then used percentages relative to total embryogenesis for each of the three species. Therefore, in the following results, 100% of embryonic development means 77.4, 51.3 and 34.2 HAE, respectively, for *Ae. aegypti*, *An. aquasalis* and *Cx. quinquefasciatus*.

3.2. EDR acquisition in *An. aquasalis* and *Cx. quinquefasciatus* is related to SC formation

An. aquasalis and *Cx. quinquefasciatus* eggs were air-dried for 15 min (see Methods) in order to investigate if, and when, EDR occurs in these species. The same methodology has been previously adopted to detect EDR in *Ae. aegypti* eggs, at 28 °C (Rezende et al., 2008). In all cases EDR acquisition was confirmed (Fig. 2).

Table 1
Parameters related to mosquito embryonic development at 25 °C.

Species	Hours after egg laying			% Viability ^d
	Completion of embryogenesis ^b	First L1 ^c	Last L1 ^c	
<i>Ae. aegypti</i> ^a	77.4 ± 0.8	74.0	79.0	96.0 ± 2.0
<i>An. aquasalis</i>	51.3 ± 0.8	50.0	56.5	55.7 ± 17.4
<i>Cx. quinquefasciatus</i>	34.2 ± 0.8	32.0	39.0	66.9 ± 21.4

^a *Aedes aegypti* data were obtained from Farnesi et al. (2009).

^b Mean hatching of 50% of larvae specimens.

^c L1: first instar larvae. The first and last L1 hatching were recorded among 12 replicates.

^d Values are average ± standard deviation of viability controls (see Methods for details).

Table 2
Time frames associated with mosquito embryonic desiccation resistance (EDR) acquisition at 25 °C.

Species	Period of EDR acquisition	
	HAE ^a	% ^b
<i>Ae. aegypti</i>	14–16	18.1–20.7
<i>An. aquasalis</i>	9–11	17.5–21.4
<i>Cx. quinquefasciatus</i>	10–12	29.1–35.0

^a HAE: hours after egg laying.

^b Percentage of total embryonic development time (see Table 1).

In *Ae. aegypti* eggs, EDR is acquired between 18.1% (14 HAE) and 20.7% (16 HAE) of embryogenesis, all eggs younger than 14 HAE shrinking when air-dried for 15 min. In contrast, 16 HAE or older eggs remain intact under the same conditions. *An. aquasalis* exhibits a similar profile, with EDR acquisition at approximately 21% of total embryogenesis. In *Cx. quinquefasciatus*, EDR is attained later, at 35% of embryo development, which in this species corresponds to 12 HAE (Table 2).

Similar to the detection of a serosal cuticle in *Ae. aegypti* (Rezende et al., 2008) and *An. gambiae* (Goltsev et al., 2009) bleach digestion confirmed the formation of this structure in both *An. aquasalis* and *Cx. quinquefasciatus*, eggs completely destroyed before, but not after, EDR is acquired, indicating SC synthesis

during this period (Fig. 3). Interestingly, SC of *Cx. quinquefasciatus* directly manipulated with an entomological needle displayed a fragile and gelatinous texture in contrast to that from *An. aquasalis* and *Ae. aegypti*, more rigid to the touch.

3.3. Embryo morphology when EDR is acquired

Embryo morphology at the moment of EDR acquisition, at 25 °C, was also evaluated for the three species, according to the descriptions available in Rosay (1959), Monnerat et al. (2002) and Vital et al. (2010) (Fig. 4). This corresponded to 21% of total embryo development time for both *Ae. aegypti* and *An. aquasalis* and 35% for *Cx. quinquefasciatus*. At that time, *Ae. aegypti* and *An. aquasalis* embryos were at the maximum germ band extension/beginning of germ band retraction stage while those of *Cx. quinquefasciatus* were in the middle of germ band retraction. The morphology analysis of earlier *Cx. quinquefasciatus* embryos confirmed germ band retraction and not germ band extension at 35% of development (data not shown). It is important to mention that immediately before EDR acquisition (i.e. 18.1%, 17.5% and 29.1% of total embryonic development for *Ae. aegypti*, *An. aquasalis* and *Cx. quinquefasciatus*), the embryos are completely surrounded by serosa cells (data not shown), but the SC is not formed yet.

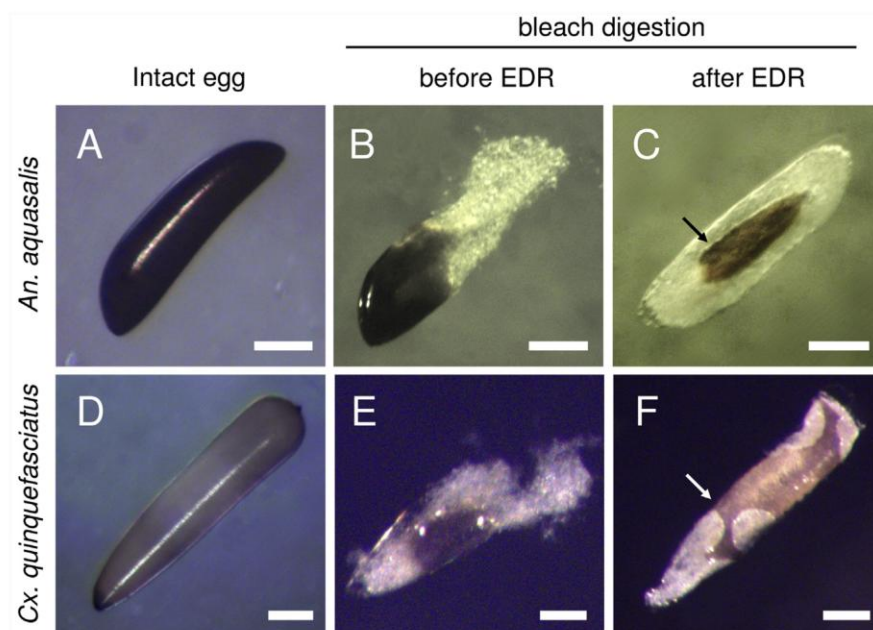


Fig. 3. Acquisition of EDR in *An. aquasalis* and *Cx. quinquefasciatus* is related to serosal cuticle formation. The serosal cuticle presence was determined by bleach digestion. (A and D) Intact eggs; (B, C, E, F) eggs after bleach digestion. (B and E) Eggs before EDR acquisition. (C and F) Eggs after EDR acquisition possess a serosal cuticle that resists to bleach digestion. Arrows: remaining endochorion fragments. Bars = 100 µm.

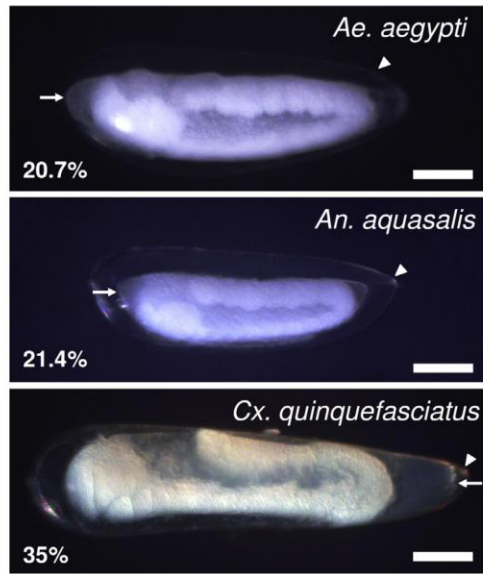


Fig. 4. Embryo morphology at the onset of desiccation resistance acquisition. When EDR is acquired *Ae. aegypti* and *An. aquasalis* embryos are at the end of germ band extension/beginning of germ band retraction while those of *Cx. quinquefasciatus* are in the middle of germ band retraction. Images were obtained after endochorion clarification and embryo fixation (see Methods). Percentages are related to total embryonic development at 25 °C. Arrowheads: clarified endochorion. Arrows: Serosal cuticle. Bars = 100 μ m.

3.4. The extent of EDR varies among mosquito species

In order to estimate the physiological relevance of EDR, a viability assay was performed. Eggs at 80% of embryogenesis were transferred from wet to dry conditions for varying periods of time, ranging from 5 to 72 hours (Fig. 5, see item 2.7 for details). For *Ae. aegypti* eggs, viability remained above 86% throughout the experiment. *An. aquasalis* viability was inversely proportional to the time spent under dry conditions, eggs exposed for 72 hours not hatching at all. Viability of *Cx. quinquefasciatus* eggs was only 75% after 5 hours under dry conditions, and no hatching was observed after exposure for longer periods of time.

4. Discussion

We aimed to study the generality of EDR acquisition in different mosquito species of medical importance. Representatives of three important vector genera were chosen: *Aedes*, *Anopheles* and *Culex*. Chemical control of vector mosquitoes is mainly directed against larval or adult stages. There has been little focus on mosquito eggs, despite the potential of being a relevant control target (Beament, 1989). *Ae. aegypti* eggs can remain viable under dry conditions for months due to the EDR phenomenon and SC formation (Christophers, 1960; Rezende et al., 2008). Nevertheless, there was a lack of data regarding the egg viability on dry for relevant physiological periods (i.e. for hours or days during embryogenesis and after its end) in other genera (such as *Culex* and *Anopheles*).

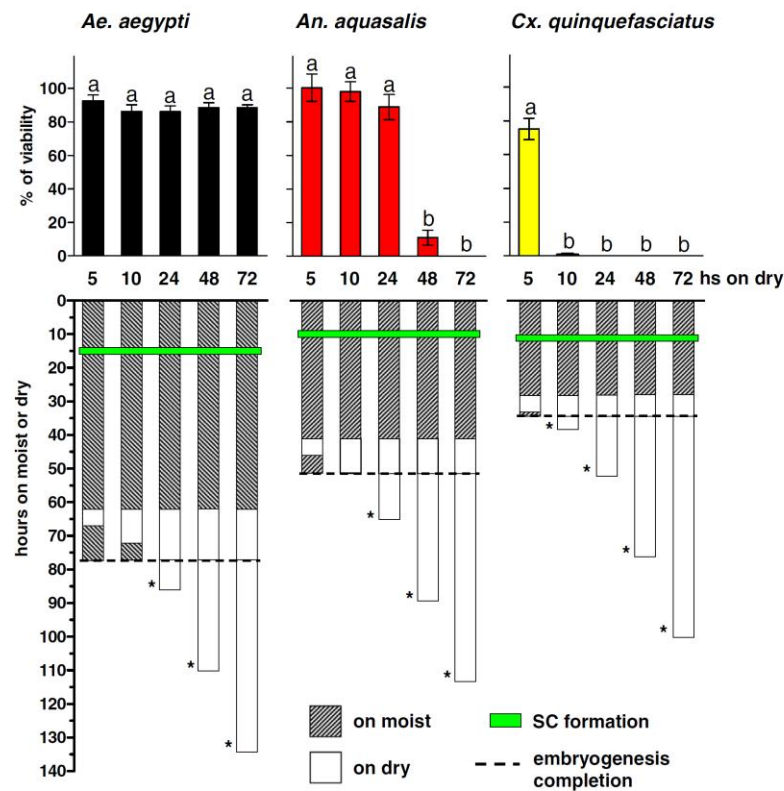


Fig. 5. Egg viability under dry conditions at the end of embryogenesis varies among mosquito species. Pools of synchronized eggs, with 80% of embryogenesis completed, were transferred to dry conditions for 5, 10, 24, 48 or 72 h at 25 °C, as indicated in the lower panels. Hatching of samples was then evaluated (see item 2.7 for details). Data are expressed as percent viability, normalized from control samples, kept under moist conditions throughout development. Green stripe: period comprising SC formation (see Table 2). Dashed line: end of embryogenesis. Hatching stimuli with yeast extract solution was performed at the end of embryogenesis, or when indicated with an asterisk. Each bar represents mean and standard deviation of 450 eggs (triplicates of 150 eggs each). *Aedes aegypti* was used as a positive control of desiccation resistance. For each species, values followed by different lowercase letters were significantly different according to Tukey's Multiple Comparison Test. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

At 25 °C, *Ae. aegypti* embryos finish their development at 77.4 HAE. At this temperature, a great variation is noted among *Aedes* species: *Ae. dorsalis*, *Ae. nigromaculis*, *Ae. albopictus*, *Ae. vexans*, *Ae. sticticus* and *Ae. squamiger* embryonic development terminates, respectively, after 75.7, 75.7, 80.8, 91, 152 and 270 HAE according to estimative from literature data (Moretti and Larsen, 1973; Telford, 1957; Trpis et al., 1973) and Vargas (unpublished results for *Ae. albopictus*). Similar periods for embryogenesis completion are apparent in *An. aquasalis* (51.3 HAE), *An. gambiae* (50 HAE) (Goltsev et al., 2009) and *Anopheles quadrimaculatus* (55.9 HAE) (Farnesi et al., unpublished results), unlike *Cx. quinquefasciatus* (34.2 HAE) and *Culex tarsalis* (46.3 HAE) (Rosay, 1959). These data indicate that it is not feasible to estimate the total embryonic development time of a given mosquito species based solely on its genus. Several aspects, such as ecological niche, geographical distribution and even the number of generations per year can influence the definition of this trait (Gillooly and Dodson, 2000). For example, embryos of *Ae. aegypti*, a multivoltine species, with several generations each year, develop twice as fast as the univoltine *Ae. sticticus* (Christophers, 1960; Trpis et al., 1973). *Cx. quinquefasciatus* exhibits a predominant tropical distribution and also tends to reach the end of embryogenesis faster than *Cx. tarsalis*, present in temperate regions (Wrabu, 2013a; Wrabu, 2013b).

The present study revealed, based on cryobiology-derived protocols from Valencia et al. (1996a) and Valencia et al. (1996b) that *An. aquasalis* and *Cx. quinquefasciatus* eggs also develop resistance to desiccation in the course of embryogenesis. This is due to the formation of the SC, a layer secreted by serosa cells, as detected for *Ae. aegypti* (Rezende et al., 2008), *An. gambiae* (Goltsev et al., 2009) and the *Tribolium castaneum* beetle (Jacobs et al., 2013). EDR arises at an equivalent development moment for both *Ae. aegypti* and *An. aquasalis*, at around 21% of embryogenesis, also corresponding to the same morphogenetic stage (end of germ band extension/beginning of germ band retraction). In *Cx. quinquefasciatus*, EDR appears later, at 35% of embryogenesis and corresponds to a more advanced stage (middle of germ band retraction). Our data suggest that serosa development (and the consequent EDR acquisition) is at least partially dissociated from embryo development, since both developmental programs occur independently in the three mosquito species studied. Uncoupling between embryonic and extraembryonic insect development is corroborated by the normal development of the *Tribolium castaneum* beetle lacking a serosa, a feat accomplished by silencing the transcription factor *Zerknüllt 1* by RNAi in parental specimens (van der Zee et al., 2005).

The viability after exposure to dry conditions at the end of embryogenesis was evaluated in order to assess the physiological relevance of the EDR for different mosquitoes. As expected, *Ae. aegypti* embryos survived drought up to 72 h, the longest period tested, and would survive for months, as described before (Christophers, 1960; Clements, 1992; Rezende et al., 2008). In our experimental conditions, *An. aquasalis* eggs attained high viability rates up to 14 h after the end of embryogenesis (24 h in a dry environment) while viability of *Cx. quinquefasciatus* eggs dropped to almost zero after only 5 h under the same conditions. It could be argued that the low viability of *An. aquasalis* and mainly of *Cx. quinquefasciatus* after the end of embryogenesis is not due to desiccation but rather to eventual metabolic needs of the pharate larvae inside the egg (i.e. larvae could have died from starvation rather than drying). However, *An. gambiae* larvae, if kept in humid microclimates, can hatch up to ~10 days after the end of embryogenesis (Beier et al., 1990; Shililu et al., 2004), for other *Anopheles* species this period possibly being even longer (Clements, 1992). We are not aware of any similar study performed with *Culex* eggs, and further experiments are necessary to completely discard the starving hypothesis for *Cx. quinquefasciatus*. In any case, the *Anopheles* “mild” EDR is probably of ecological relevance in the maintenance

of egg viability during dry seasons, for example in sub-Saharan Africa (Beier et al., 1990; Goltsev et al., 2009; Shililu et al., 2004), as adult desiccation resistance is ecologically relevant for the *An. gambiae* complex (Gray and Bradley, 2005).

According to Beckel (1958), blockage of water passage out of the mosquito eggshell is not derived from the SC alone. It is a consequence of the interaction between SC and endochorion and would be driven by the process of sclerotization/melanization (Goltsev et al., 2009; Hopkins and Kramer, 1992). Therefore, the distinct EDR degrees observed in the three species evaluated might be due to many reasons: differences in the endochorion or SC thickness, degree of endochorion sclerotization/melanization or variations in the SC biochemical components. In any case, it is worth mentioning that in lepidopteran *Manduca sexta* eggs, there is a tradeoff between water loss and respiratory gases exchange (i.e. an increase in water retention decreases the capacity of the embryo to exchange gases) (Woods, 2010). We are unaware of any study relating water loss and gas exchange in developing mosquito embryos.

An. aquasalis belongs to the Anophelinae subfamily, while both *Ae. aegypti* and *Cx. quinquefasciatus* belong to the Culicinae subfamily. Their last common ancestor took place ~217 million years ago, while the split between *Aedes* and *Culex* lineages occurred ~204 million years ago (Reidenbach et al., 2009). Therefore, it could be inferred that the delayed SC formation and EDR acquisition observed in *Cx. quinquefasciatus* would be a derived trait, not shared with the *Aedes* and *Anopheles* genera. Moreover, there is a high divergence related to the degree of egg viability under dry conditions among the three species. In this regard, it is interesting that the two extremes of viability in dry conditions (i.e. “high” for *Ae. aegypti* and “low” for *Cx. quinquefasciatus*) occurs in the two species more closely related, while the more distant *An. aquasalis* possesses a “mild” viability.

Given that lower dipterans (including mosquitoes) are essentially aquatic insects (Wiegmann et al., 2011) and the existence of SC and EDR are ancestral insect traits (Jacobs et al., 2013), it could be hypothesized that in the course of evolution generating *Cx. quinquefasciatus*, a waterproofing SC was not under an intense selection pressure. Eggs of *Cx. quinquefasciatus* are laid in water rich in organic matter or even polluted (Clements, 1992; Simonsen and Mwakitulu, 2013) that has lower oxygen content and possesses a myriad of microbes, some of which can be pathogenic. The serosa is capable of eliciting an immune response against pathogens (Gorman et al., 2004; Jacobs and van der Zee, 2013), possibly acting as an immune tissue to protect the developing embryo. Assuming that the weaker EDR is due to a weaker SC, the *Cx. quinquefasciatus* serosa could deviate a significant fraction of the energy employed to synthesize its cuticle to elicit a better immune response. In addition, in this case a weaker EDR would be beneficial, since it would permit a more efficient gas exchange thus allowing a faster development.

Meanwhile, in the course of evolution that originated the *Ae. aegypti* species, a mosquito whose larvae develop in clean water, opposite strategies may have occurred, with a decrease in the gas exchange rate due to an increase of EDR level leading to a longer period of embryonic development completion.

5. Conclusions

This work extends knowledge on the processes of EDR acquisition and serosal cuticle formation in mosquito eggs. Although in all cases the production of a serosal cuticle inhibits embryo water loss, their degree of viability under dry conditions varies enormously depending upon the species. We are currently studying the nature of these differences in *Ae. aegypti*, *An. aquasalis* and *Cx. quinquefasciatus*.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Acknowledgments

This work was supported by CNPq and FAPERJ. H.C.M.V. and L.C.F. are both fellows from CNPq. English review and revision by Mitchell Raymond Lishon, native of Chicago, Illinois, USA. We would like to thank José Bento Lima and the technicians from the Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodos Vetores (Laficave) for maintaining the colony of the mosquitoes and all members of Laficave for their constant help. We also thank the two anonymous reviewers for relevant comments and Gilberto Couto Alcântara for the invaluable support on mosquito blood feeding. The authors posthumously thank Dr Alexandre Afranio Peixoto for his friendship, generosity and example as a Scientist and as a Virtuous Man. It is a privilege to have known him. This work is dedicated to his memory.

References

- Beament, J., 1989. John Hull Grundy lecture. Eggs – the neglected insects. *J. R. Army Med. Corps* 135 (2), 49–56.
- Beckel, W., 1958. Investigation of permeability, diapause and hatching in the eggs of the mosquito *Aedes hexodontus* Dyar. *Can. J. Zool.* 36, 541–554.
- Beier, J.C., Copeland, R., Oyaró, C., Masinya, A., Odago, W.O., Oduor, S., Koech, D.K., Roberts, C.R., 1990. *Anopheles gambiae* complex egg-stage survival in dry soil from larval development sites in western Kenya. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 6 (1), 105–109.
- Belinato, T.A., Martins, A.J., Lima, J.B., Valle, D., 2013. Effect of triflumuron, a chitin synthesis inhibitor, on *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* and *Culex quinquefasciatus* under laboratory conditions. *Parasites Vectors* 6, 83. <http://dx.doi.org/10.1186/1756-3305-6-83>.
- Brown, J.E., McBride, C.S., Johnson, P., Ritchie, S., Paupy, C., Bossin, H., Lutomiah, J., Fernandez-Salas, I., Ponlawat, A., Cornel, A.J., Black, W.C.T., Gorrochotegui-Escalante, N., Urdaneta-Marquez, L., Sylla, M., Slotman, M., Murray, K.O., Walker, C., Powell, J.R., 2011. Worldwide patterns of genetic differentiation imply multiple 'domestications' of *Aedes aegypti*, a major vector of human diseases. *Proc. Biol. Sci.* 278 (1717), 2446–2454. <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2010.2469>.
- Christophers, S., 1960. *Aedes aegypti* (L) The Yellow Fever Mosquito. Its Life History, Bionomics and Structure, Cambridge. University Press, Cambridge.
- Clements, A., 1992. The Biology of Mosquitoes: Development, Nutrition and Reproduction. Chapman and Hall, London.
- de Carvalho, S.C., Martins Junior Ade, J., Lima, J.B., Valle, D., 2002. Temperature influence on embryonic development of *Anopheles albitarsis* and *Anopheles aquasalis*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 97 (8), 1117–1120.
- Farajollahi, A., Fonseca, D.M., Kramer, L.D., Marm Kilpatrick, A., 2011. "Bird biting" mosquitoes and human disease: a review of the role of *Culex pipiens* complex mosquitoes in epidemiology. *Infect. Genet. Evol.* 11 (7), 1577–1585. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2011.08.013>.
- Farnesi, L.C., Martins, A.J., Valle, D., Rezende, G.L., 2009. Embryonic development of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): influence of different constant temperatures. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 104 (1), 124–126.
- Gillooly, J.F., Dodson, S.I., 2000. The relationship of egg size and incubation temperature to embryonic development time in univoltine and multivoltine aquatic insects. *Freshwater Biol.* 44 (4), 595–604.
- Goltsev, Y., Fuse, N., Frasca, M., Zinzen, R.P., Lanzaro, G., Levine, M., 2007. Evolution of the dorsal-ventral patterning network in the mosquito, *Anopheles gambiae*. *Development* 134 (13), 2415–2424. <http://dx.doi.org/10.1242/dev.02863>.
- Goltsev, Y., Rezende, G.L., Vranizan, K., Lanzaro, G., Valle, D., Levine, M., 2009. Developmental and evolutionary basis for drought tolerance of the *Anopheles gambiae* embryo. *Dev. Biol.* 330 (2), 462–470. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2009.02.038>.
- Gorman, M.J., Kankanala, P., Kanost, M.R., 2004. Bacterial challenge stimulates innate immune responses in extra-embryonic tissues of tobacco hornworm eggs. *Insect Mol. Biol.* 13 (1), 19–24.
- Gray, E.M., Bradley, T.J., 2005. Physiology of desiccation resistance in *Anopheles gambiae* and *Anopheles arabiensis*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 73 (3), 553–559.
- Handel, K., Grunfelder, C.G., Roth, S., Sander, K., 2000. *Tribolium* embryogenesis: a SEM study of cell shapes and movements from blastoderm to serosal closure. *Dev. Genes. Evol.* 210 (4), 167–179. <http://dx.doi.org/10.1007/s004270050301>.
- Harwood, R.F., Horsfall, W.R., 1959. Development, structure and function of coverings of eggs of floodwater mosquitoes III: Functions of coverings. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 52, 113–116.
- Hopkins, T.L., Kramer, K.J., 1992. Insect cuticle sclerotization. *Annu. Rev. Entomol.* 37, 273–302.
- Jacobs, C.G., Rezende, G.L., Lamers, G.E., van der Zee, M., 2013. The extraembryonic serosa protects the insect egg against desiccation. *Proc. Biol. Sci.* 280 (1764), 20131082. <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2013.1082>.
- Jacobs, C.G., van der Zee, M., 2013. Immune competence in insect eggs depends on the extraembryonic serosa. *Dev. Comp. Immunol.* 41 (2), 263–269. <http://dx.doi.org/10.1016/j.dci.2013.05.017>.
- Judson, C.L., Hokama, Y., 1965. Formation of the line of dehiscence in aedine mosquito eggs. *J. Insect Physiol.* 11 (3), 337–338. [http://dx.doi.org/10.1016/0022-1910\(65\)90081-8](http://dx.doi.org/10.1016/0022-1910(65)90081-8).
- Kuno, G., 2010. Early history of laboratory breeding of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) focusing on the origins and use of selected strains. *J. Med. Entomol.* 47 (6), 957–971.
- Maciel-De-Freitas, R., Aguiar, R., Bruno, R.V., Guimaraes, M.C., Lourenco-De-Oliveira, R., Sorgine, M.H., Struchiner, C.J., Valle, D., O'Neill, S.L., Moreira, L.A., 2012. Why do we need alternative tools to control mosquito-borne diseases in Latin America? *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 107 (6), 828–829.
- Monnerat, A.T., Machado, M.P., Vale, B.S., Soares, M.J., Lima, J.B., Lenzi, H.L., Valle, D., 2002. *Anopheles albitarsis* embryogenesis: morphological identification of major events. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 97 (4), 589–596.
- Moretti, L., Larsen, J., 1973. Embryology, Bionomics and Embryology of the Inland Floodwater Mosquito *Aedes vexans*. University of Illinois Press, Urbana.
- Panfilio, K.A., 2008. Extraembryonic development in insects and the acrobatics of blastokinesis. *Dev. Biol.* 313 (2), 471–491. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.11.004>.
- Raminani, L.N., Cupp, E.W., 1978. Embryology of *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae): organogenesis. *Int. J. Insect Morphol. Embryol.* 7, 273–296.
- Reidenbach, K.R., Cook, S., Bertone, M.A., Harbach, R.E., Wiegmann, B.M., Besansky, N.J., 2009. Phylogenetic analysis and temporal diversification of mosquitoes (Diptera: Culicidae) based on nuclear genes and morphology. *BMC Evol. Biol.* 9, 298. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2148-9-298>.
- Rezende, G.L., Martins, A.J., Gentile, C., Farnesi, L.C., Pelajo-Machado, M., Peixoto, A.A., Valle, D., 2008. Embryonic desiccation resistance in *Aedes aegypti*: presumptive role of the chitinized serosal cuticle. *BMC Dev. Biol.* 8, 82. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-213x-8-82>.
- Rosay, B., 1959. Gross external morphology of embryos of *Culex tarsalis* Coquillett (Diptera: Culicidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 52, 481–484.
- Shillu, J.L., Grueber, W.B., Mbogo, C.M., Githure, J.I., Riddiford, L.M., Beier, J.C., 2004. Development and survival of *Anopheles gambiae* eggs in drying soil: influence of the rate of drying, egg age, and soil type. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 20 (3), 243–247.
- Simonsen, P.E., Mwakitalu, M.E., 2013. Urban lymphatic filariasis. *Parasitol. Res.* 112 (1), 35–44. <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-012-3226-x>.
- Sinka, M.E., Rubio-Palis, Y., Manguin, S., Patil, A.P., Temperley, W.H., Gething, P.W., Van Boeckel, T., Kabaria, C.W., Harbach, R.E., Hay, S.I., 2010. The dominant *Anopheles* vectors of human malaria in the Americas: occurrence data, distribution maps and bionomic precis. *Parasites Vectors* 3, 72. <http://dx.doi.org/10.1186/1756-3305-3-72>.
- Telford, A., 1957. The pasture *Aedes* of central and northern California the egg stage: gross embryology and resistance to desiccation. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 50, 537–543.
- Trpis, M., 1970. A new bleaching and decalcifying method for general use in zoology. *Can. J. Zool.* 48, 892–893.
- Trpis, M., Haufe, W., Shemanchuk, J., 1973. Embryonic development of *Aedes* (O.) sticticus (Diptera: Culicidae) in relation to different constant temperatures. *Can. Entomol.* 105, 43–50.
- Valencia, M.D., Miller, L.H., Mazur, P., 1996a. Permeability of intact and dechorionated eggs of the *Anopheles* mosquito to water vapor and liquid water: a comparison with *Drosophila*. *Cryobiology* 33 (1), 142–148. <http://dx.doi.org/10.1006/cryo.1996.0014>.
- Valencia, M.D., Miller, L.H., Mazur, P., 1996b. Permeabilization of eggs of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Cryobiology* 33 (1), 149–162. <http://dx.doi.org/10.1006/cryo.1996.0015>.
- van der Zee, M., Berns, N., Roth, S., 2005. Distinct functions of the *Tribolium zerknullt* genes in serosa specification and dorsal closure. *Curr. Biol.* 15 (7), 624–636. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2005.02.057>.
- Vital, W., Rezende, G.L., Abreu, L., Moraes, J., Lemos, F.J., Vaz Ida Jr., S., Logullo, C., 2010. Germ band retraction as a landmark in glucose metabolism during *Aedes aegypti* embryogenesis. *BMC Dev. Biol.* 10, 25. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-213x-10-25>.
- WHO, 2013. Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases: second WHO report on neglected diseases. Geneva.
- Wiegmann, B.M., Trautwein, M.D., Winkler, I.S., Barr, N.B., Kim, J.-W., Lambkin, C., Bertone, M.A., Cassel, B.K., Bayless, K.M., Heimberg, A.M., Wheeler, B.M., Peterson, K.J., Pape, T., Sinclair, B.J., Skevington, J.H., Blagoderov, V., Caravas, J., Kutty, S.N., Schmidt-Ott, U., Kampmeier, G.E., Thompson, F.C., Grimaldi, D.A., Beckenbach, A.T., Courtney, G.W., Friedrich, M., Meier, R., Yeates, D.K., 2011. Epidemic radiations in the fly tree of life. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1012675108>.
- Woods, H.A., 2010. Water loss and gas exchange by eggs of *Manduca sexta*: trading off costs and benefits. *J. Insect Physiol.* 56 (5), 480–487. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinsphys.2009.05.020>.
- Wrubu, 2013a. *Culex quinquefasciatus*, 29/05/2013. <http://wrubu.si.edu/speciespages_non-ano/non-ano_a-hab/cxqui_hab.html>.
- Wrubu, 2013b. *Culex tarsalis*, 29/05/2013. <http://wrubu.si.edu/SpeciesPages_non-ANO/non-ANO_A-hab/CXtrs_hab.html>.

3.2) Capítulo 2

Este capítulo descreve grandezas e características físicas dos ovos dos mosquitos *Ae. aegypti*, *An. aquasalis* e *Cx. quinquefasciatus*, correlacionando-as com a resistência à dessecação observada previamente.

Esta etapa da tese foi realizada no Laboratório de Biologia Celular (LBC) em colaboração com o Dr. Rubem Menna-Barreto e no Laboratório de Fisiologia e Controle de Insetos Vetores (LAFICAVE), ambos do Instituto Oswaldo Cruz (IOC-FIOCRUZ).

Os dados estão apresentados em forma de um manuscrito em preparação.

Ovos de culicídeos vetores: grandezas físicas e superfície do endocórrion de *Aedes aegypti*, *Anopheles aquasalis* e *Culex quinquefasciatus*

Luana Cristina Farnesi^{1,2,3}, Rubem Menna-Barreto⁴, Denise Valle^{1,3,#}, Gustavo Lazzaro Rezende^{3,5,#}

#autores de correspondência: dvalle@ioc.fiocruz.br (D. Valle), grezende@uenf.br (G.L. Rezende)

¹Laboratório de Biologia Molecular de Flavivírus, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. ²Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes Vetores, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. ³Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. ⁴Laboratório de Biologia Celular, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. ⁵Laboratório de Química e Função de Proteínas e Peptídeos, Centro de Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, RJ, Brasil.

Resumo

Diferentes espécies de mosquitos apresentam níveis variados de resistência dos ovos à dessecação (ROD): enquanto ovos de *Ae. aegypti* podem permanecer viáveis por meses em condição seca, ovos de *An. aquasalis* e *Cx. quinquefasciatus* sobrevivem no seco por apenas 24 e 5 horas, respectivamente. Nossa hipótese é que essas diferenças no nível de ROD possam estar relacionadas com algumas características físicas dos ovos. Diversos aspectos foram então avaliados comparativamente nas três espécies: comprimento, largura, área, volume, peso e o aspecto da superfície externa do endocórrion. Ovos de *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus* têm área e volume semelhantes, e significativamente maiores que de *An. aquasalis*. *Cx. quinquefasciatus* apresenta os ovos de maior comprimento, seguido de *Ae. aegypti* e *An. aquasalis*. Ovos de *Ae. aegypti* são os mais largos e de *An. aquasalis*, os mais delgados. Durante a embriogênese ocorre expansão de

área e volume dos ovos, maior em *Cx. quinquefasciatus*, seguida de *An. aquasalis* e *Ae. aegypti*. Ovos de *Cx. quinquefasciatus*, *Ae. aegypti* e *An. aquasalis* pesam respectivamente 13,5; 10,0 e 3,8 µg e a casca representa 22,6; 15,2 e 40,5 % deste peso total. *Ae. aegypti* possui ondulações em toda a superfície do endocóron, *Cx. quinquefasciatus* somente na extremidade posterior do ovo e *An. aquasalis* não possui ondulações. A ROD de *Ae. aegypti* é superior às outras espécies. Contudo, nos aspectos aqui avaliados, as espécies *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus* se aproximam, enquanto as maiores diferenças foram observadas em *An. aquasalis*. Nossos resultados indicam que há mais aspectos a considerar para explicar as diferenças de ROD dos culicídeos.

Palavras-chave: grandezas físicas, ovos de mosquitos vetores, resistência à dessecação, casca dos ovos

Abreviaturas: ROD: resistência do ovo à dessecação, CS: cutícula serosa, LAFICAVE: Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes Vetores (Fiocruz, RJ, Brasil).

Introdução

A avaliação de características físicas de ovos de culicídeos é utilizada em diversas abordagens. Kliewer (1961) correlacionou o peso de ovos de *Aedes aegypti* ao longo do desenvolvimento embrionário com a viabilidade pós embrionária. Lounibos et al (1997) realizaram uma descrição completa, por microscopia eletrônica de varredura, do exocóron de ovos de anofelinos, gerando dados de potencial relevância taxonômica. Suman et al (2011) utilizaram a mesma ferramenta na diferenciação de ovos de espécies do gênero *Aedes*. Sota e Mogi (1992) descreveram, para ovos de diferentes espécies do gênero *Aedes*, correlação positiva entre o volume e o tempo de sobrevivência em ambientes de baixa umidade.

A casca dos ovos tem importante papel na proteção e na manutenção do balanço hídrico de embriões de mosquitos (Clements 1992). A casca é composta por três camadas, da mais externa para a mais interna: o

exocócion, o endocócion e a cutícula serosa (Clements 1992, Valle et al 1999, Rezende et al 2008). O exocócion é uma camada transparente e frágil. O endocócion é branco e flexível no momento da postura e começa a escurecer cerca de meia hora depois. Em três horas alcança níveis máximos de escurecimento e de enrijecimento, fenômenos relacionados com os processos de melanização e esclerotização (Beckel 1958, Hopkins e Kramer 1992, Li e Christensen 1993, Chapman 1998, Li e Li 2006, Rezende 2008, Wittkopp e Beldade 2009, Wu et al 2013). Exo e endocócion constituem o cócion, estrutura complexa produzida ainda no ovário da fêmea durante o processo de corionogênese (Chapman 1998, Monnerat et al 1999, Valle et al 1999). No entanto, a terceira camada só é formada durante o primeiro terço da embriogênese de mosquitos, quando um grupo de células extra-embriônicas, a serosa, envolve completamente o embrião e secreta a cutícula serosa (CS), matriz extracelular situada internamente ao endocócion (Clements 1992, Rezende et al 2008, Vargas et al 2014).

Concomitante com a formação da CS, ovos de mosquitos e de outros insetos se tornam impermeáveis (Rezende et al 2008, Goltsev et al 2009, Jacobs et al 2013, Vargas et al 2014), fenômeno que denominamos de 'resistência do ovo à dessecação' (ROD). A ROD é relevante sobretudo quando consideramos mosquitos vetores de parasitas, que fazem postura em criadouros apenas temporariamente alagados, um risco para a dessecação dos ovos, inviabilizando a eclosão. Dentre os mosquitos já foram observadas diferenças no nível de ROD: ovos de *Ae. aegypti*, *Anopheles aquasalis* e *Culex quinquefasciatus* possuem, respectivamente alta, média e baixa resistência ao seco (Vargas et al 2014). Contudo, ainda não são claros os fatores que contribuem para estas diferenças.

Neste trabalho avaliamos, de forma comparativa, várias grandezas físicas: comprimento, largura, área, volume e peso dos ovos de *Ae. aegypti*, *An. aquasalis* e *Cx. quinquefasciatus*, além das superfícies dos endocócions, este último aspecto por microscopia eletrônica de varredura. Nosso objetivo foi investigar se é possível correlacionar estas características com as diferenças observadas no nível de ROD.

Métodos

Manutenção de mosquitos e posturas sincronizadas

Foram usados ovos das colônias de *Ae. aegypti*, *An. aquasalis* e *Cx. quinquefasciatus* mantidas no LAFICAVE (IOC, Fiocruz). Larvas das três espécies foram crescidas a 26 ± 1 °C e alimentadas com dietas específicas para cada caso: *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus* com ração para gatos (Friskies®, Purina, Camaquã, RS, Brasil) e *An. aquasalis* com comida para peixe da marca Tetramin® (*Tetramarine Saltwater Granules, Tetra GmbH, Germany*). Os adultos foram mantidos a 25 ± 1 °C, 70-80% de umidade relativa e receberam solução de sacarose a 10 % *ad libitum*. Para o repasto sanguíneo, adultos foram privados da solução de sacarose por um período de 12-24 horas e então alimentados em cobaios anestesiados (CEUA-FIOCRUZ L-011/09).

A metodologia de obtenção de posturas sincronizadas foi adaptada de Valencia et al (1996), conforme descrito em Rezende et al (2008) e Vargas et al (2014). De maneira resumida, dependendo da espécie de mosquito, a postura foi induzida entre três e cinco dias depois da alimentação de sangue: as fêmeas foram colocadas em um tubo, anestesiadas em gelo por um minuto e rapidamente transferidas para um disco de papel Whatman Nº 1, colocado sobre a tampa de uma placa de Petri invertida (90 ou 150 mm de diâmetro), fechada com sua base. Depois que as fêmeas se recuperavam da anestesia, o papel era umedecido com água. Para *Cx. quinquefasciatus*, água desclorada era colocada diretamente na placa de Petri, sem papel-filtro. Em todos os casos, a postura foi realizada durante uma hora. Em todos os casos as posturas forçadas foram realizadas durante o dia. A espécie *Cx. quinquefasciatus*, que possui hábitos noturnos, é mantida em uma sala com fotoperíodo invertido.

Determinação do comprimento, largura, área e volume dos ovos

Para cada espécie, foram realizadas medições de comprimento e largura de lotes de no mínimo 16 ovos em dois diferentes momentos, 20 e 80 % em relação ao desenvolvimento embrionário total. Foram realizados dois experimentos independentes para cada espécie. As imagens foram obtidas em um sistema de captura digital acoplado a um microscópio óptico Zeiss (Axio Skop 40) e analisadas utilizando o programa *Image J*.

A área e o volume foram calculados assumindo-se que os ovos se assemelham a um esferoide prolato (uma elipse tridimensional com diâmetro do eixo polar maior que o do eixo equatorial, vide Figura Suplementar 1), conforme atribuído por Sota e Mogi (1992) para ovos de mosquitos do gênero *Aedes*. As seguintes fórmulas foram utilizadas: Área da esfera prolata = $2 \pi \times a^2 \times [(1 + b) \times \text{sen}^{-1} \times e] / (a \times e)$; Onde “a” é a metade da largura do ovo, “b” é a metade do comprimento e “e” é a excentricidade da esfera, calculada pela fórmula: $e^2 = 1 - a^2/b^2$. Volume da esfera prolata = $4/3\pi \times a^2 \times b^2$.

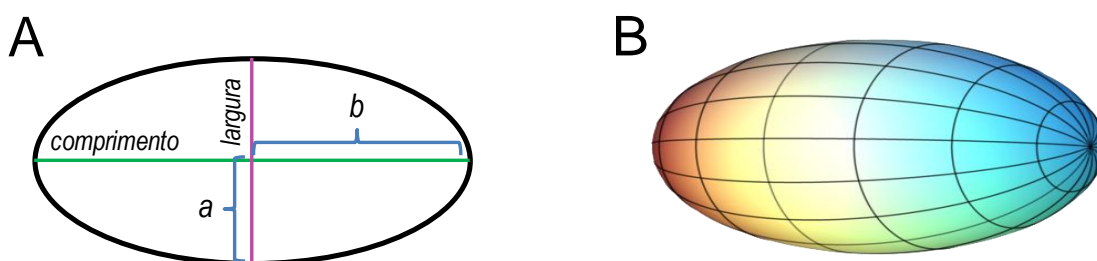


Figura Suplementar 1: Ovos de mosquitos foram considerados elipsoides para cálculo de suas medidas físicas. (A) Elipse assumida para avaliação de comprimento e largura. **(B)** Esfera prolata, figura tridimensional assumida para os cálculos de área e volume. a: metade da largura; b: metade do comprimento. **(A, B):** adaptado de Wikipedia (http://pt.wikipedia.org/wiki/Esferoide_prolato).

Pesagem de ovos e cascas

Essas medidas foram feitas em grupos de ovos tardios, com 88 %-96 % de desenvolvimento embrionário, obtidos de posturas sincronizadas, como descrito. Os ovos foram tratados com solução de 5 a 6 % de NaOCl por 1 minuto para remoção do exocóron. Em seguida foram lavados por três vezes com água desclorada, secos em papel-filtro, contabilizados e então pesados. Após a pesagem, os ovos foram devolvidos para o ambiente úmido para finalização da embriogênese e eclosão das larvas, estimulada com solução de extrato de levedura 0,15 % (peso/volume), de acordo com Farnesi et al (2009). As cascas (que neste momento são constituídas de endocóron e cutícula serosa) foram retiradas do meio úmido, secas em papel de filtro, novamente contabilizadas e pesadas. Para cada espécie, pelo menos três experimentos independentes foram realizados. Para *Ae. aegypti* foram utilizadas cerca de 7 – 12 mg de ovos e 0,4 – 0,6 mg de cascas; para *An. aquasalis* 2 – 5 mg de ovos e 0,4 a 0,9 mg de casca e para *Cx. quinquefasciatus* 5 – 6 mg de ovos e 0,9 –

1 mg de casca. As pesagens foram realizadas em tubos *Eppendorf* de capacidade de 1,5 mL de volume, em balança *Denver Instrument* (APX-200, precisão de 0,1 mg).

Microscopia eletrônica de varredura da superfície do endocóxon

Cascas obtidas como descrito acima foram fixadas por 1 hora, a 25 °C, em glutaraldeído 2,5 % em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,2 e lavadas três vezes no mesmo tampão. As amostras foram pós-fixadas por 1 hora em tetróxido de ósmio 1 % com ferrocianeto de potássio 0,8 % e tratadas com cloreto de sódio 2,5 mM por 20 minutos a 25 °C. Em seguida as cascas foram desidratadas por passagens de 10 minutos em soluções de acetona a 30, 50, 70 e 90 % e duas vezes em acetona 100 %. Seguiu-se a secagem em ponto crítico com CO₂ e montagem em suportes de isopor, revestidos com uma camada de 20 nm de ouro. Cascas de pelo menos 10 ovos de cada uma das três espécies foram examinadas ao microscópio eletrônico de varredura JOEL JSM6390LV.

Análises estatísticas

Análises estatísticas foram feitas utilizando o GraphPad Prism versão 5.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com). Detalhes adicionais das análises são fornecidos ao longo do texto.

Resultados

Comprimento, largura e expansão dos ovos variam entre as espécies

Entre as espécies avaliadas, existem diferenças significativas tanto no comprimento quanto na largura dos ovos (ANOVA, $P < 0,05$) (Figura 1). Ovos de *Cx. quinquefasciatus* apresentam o maior comprimento e ovos de *Ae. aegypti* são os mais largos. *Anopheles aquasalis* possui os ovos mais curtos e mais afilados. Com base nessas medidas, verificou-se que a área e o volume dos ovos de *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus* possuem dimensões semelhantes, enquanto *An. aquasalis* é significativamente menor (ANOVA, $P < 0,05$).

A Tabela resume as grandezas físicas obtidas em dois momentos relativos ao desenvolvimento total, 20 e 80%. Observa-se uma tendência de incremento de todas as dimensões, nas três espécies, em graus bastante variados. Entre 20 e 80% do desenvolvimento embrionário total, ovos de *Cx. quinquefasciatus* expandem quase 20% em volume, enquanto ovos de *Ae. aegypti*, apenas três por cento. Em nossas análises, os ovos menores, de *An. aquasalis*, têm expansão intermediária: 10% de seu volume.

Tabela: grandezas físicas dos ovos de três espécies de culicídeos vetores.

Espécie	% embriogênese *	Comprimento (µm)	Largura (µm)	Área média**		Volume médio**	
				(mm ²)	% aumento	(mm ³)	% aumento
<i>Ae. aegypti</i>	20	621,6 ± 35,7	168,0 ± 6,1	0,265		0,0092	
	80	633,6 ± 34,3	168,9 ± 8,1	0,272	2,6	0,0095	3,2
<i>An. aquasalis</i>	20	460,4 ± 15,0	125,4 ± 4,9	0,146		0,0038	
	80	471,7 ± 18,1	130,1 ± 4,6	0,156	6,4	0,0041	10,0
<i>Cx. quinquefasciatus</i>	20	686,1 ± 15,9	144,1 ± 5,1	0,248		0,0074	
	80	727,9 ± 24,9	151,0 ± 5,9	0,276	11,3	0,0087	17,5

* percentual da embriogênese total (baseado nos dados de Farnesi et al 2009 e Vargas et al 2014).

** ovos considerados como esferas prolatas (ver Métodos e Figura Suplementar 1 para detalhes)

± desvio padrão

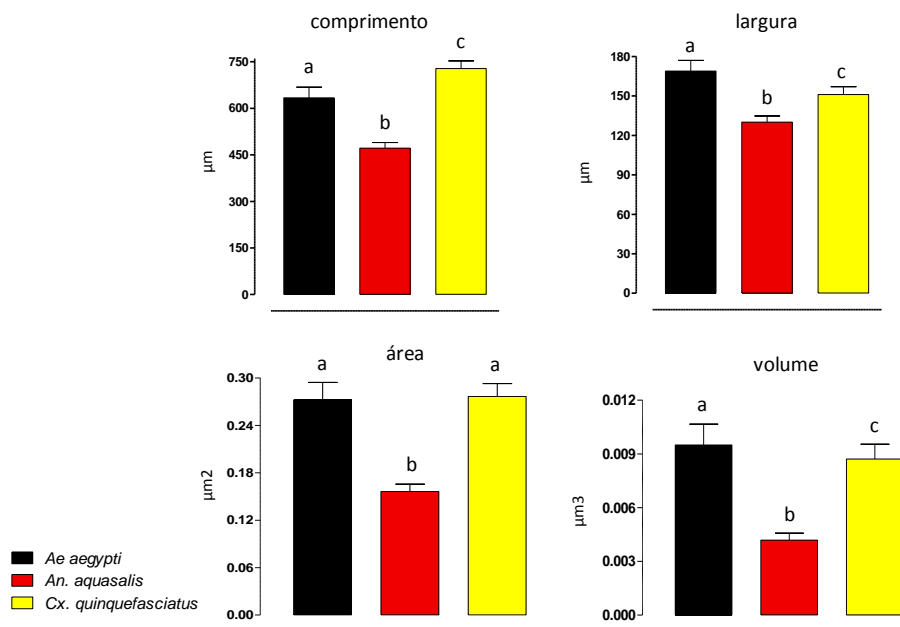


Figura 1: Grandezas físicas dos ovos de mosquitos ao final da embriogênese. As medidas de comprimento, largura, área e volume foram avaliadas com 80% do desenvolvimento embrionário total. As barras representam a média e o desvio padrão de dois experimentos independentes, que utilizaram no mínimo 20 ovos cada. Área e volume foram calculados com base nas medições de comprimento e largura considerando os ovos como esferas prolatas (ver Métodos e Figura Suplementar 1). Letras acima das barras representam diferenças estatísticas entre as espécies (ANOVA, $P < 0,05$, seguido de Tukey).

O peso dos ovos e das cascas também varia entre as espécies

O peso dos ovos foi avaliado ao final da embriogênese, e o peso das cascas, depois da eclosão das larvas (Figura 2). Ovos de *Cx. quinquefasciatus* são os mais pesados, e de *An. aquasalis* os mais leves. Embora as cascas de ovos de *Cx. quinquefasciatus* também sejam as mais pesadas, as de *Ae. aegypti* e *An. aquasalis* apresentam valores semelhantes. A Figura 2C mostra que, proporcionalmente ao peso dos ovos, as cascas de *An. aquasalis* são as que apresentam o maior valor.

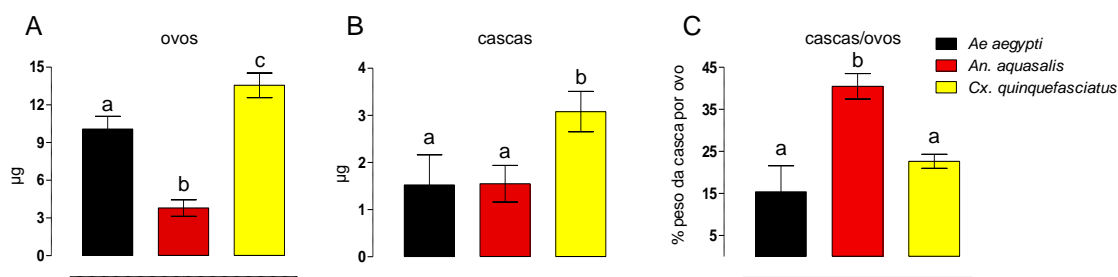


Figura 2: Peso dos ovos e das cascas de ovos de mosquitos. (A) ovos, (B) cascas e (C) percentual do peso das cascas em relação ao peso dos ovos. Barras representam média e desvio padrão de pelo menos três experimentos independentes cada qual usando no mínimo 390 ovos e 300 cascas. Letras indicam diferenças significativas entre as espécies (ANOVA, $P < 0,05$; seguido de Tukey).

O aspecto da superfície do endocórrion varia entre os culicídeos

A superfície externa do endocórrion de cada uma das três espécies, avaliada por microscopia eletrônica de varredura (Figura 3) apresenta características exclusivas: *Ae. aegypti* exibe marcações poligonais em alto relevo em toda superfície, *An. aquasalis* possui sulco lateral ao longo do eixo antero-posterior margeando o lado ventral da casca (Valle et al 1999) e *Cx. quinquefasciatus* apresenta marcas de pequenos círculos, em baixo relevo, próximas à extremidade posterior (setas nos painéis superiores da Figura 3). Excluindo tais particularidades, a superfície do endocórrion de *Ae. aegypti* é toda ondulada, e de *An. aquasalis*, toda lisa. *Cx. quinquefasciatus* também apresenta o endocórrion liso, com exceção da extremidade posterior, que apresenta ondulações (Figura 3).

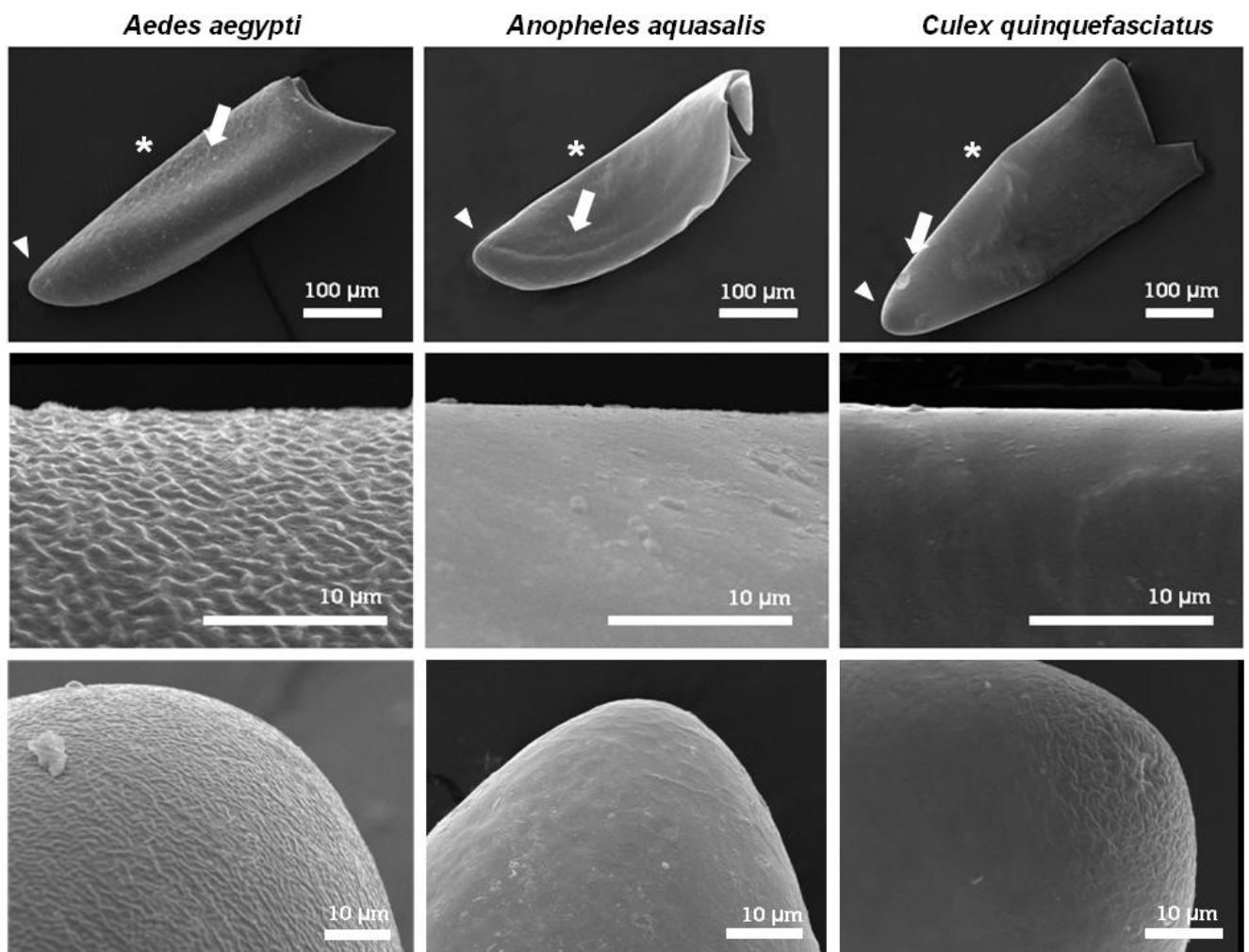


Figura 3: Microscopia eletrônica de varredura revela diferenças na superfície do endocócion de três espécies de culicídeos. Painéis superiores: aspecto do endocócion de ovos inteiros; painéis do meio: detalhe das porções dorsais marcadas com asteriscos no painel superior; painéis inferiores: detalhe das extremidades posteriores (cabeças de seta nos painéis superiores). Setas brancas apontam diferenças na escultura do endocócion entre as espécies: *Ae. aegypti* possui marcações poligonais em alto relevo; *An. aquasalis* apresenta sulco lateral, ao longo do eixo antero-posterior; *Cx. quinquefasciatus* tem marcas de pequenos círculos, em baixo relevo, próximas à extremidade posterior. As imagens mostradas são representativas de pelo menos 10 amostras de cada espécie. Note que as barras de escala são diferentes entre as micrografias da primeira linha e as restantes.

Discussão

A literatura diverge em relação às medidas de comprimento e largura dos ovos de culicídeos. Enquanto os valores encontrados no presente trabalho para *Ae. aegypti*, *An. aquasalis* e *Cx. quinquefasciatus* se assemelham a outros grupos (Linley et al 1993, Maldonado et al 1997, Suman et al 2009, 2011), Sota e Mogi (1992), utilizando ovos de *Ae. aegypti* de populações de diferentes regiões do globo, relatam volume médio entre 18 e 22 μm^3 . Nós obtivemos aproximadamente a metade destes valores para *Ae. aegypti*, utilizando ovos da cepa Rockefeller. Os mesmos autores, Sota e Mogi (1992), comparando populações do gênero *Aedes* de diferentes regiões geográficas, encontraram correlação positiva entre o volume dos ovos e sua capacidade de sobrevivência em condições secas. Em nossas análises, que perpassaram três gêneros distintos, não encontramos correlação do tamanho dos ovos com o nível de ROD: apesar de igualmente volumosos, ovos de *Cx. quinquefasciatus* e de *Ae. aegypti* possuem, respectivamente, baixa e alta ROD. Os ovos de *An. aquasalis*, de menor volume, apresentam ROD intermediária.

No presente trabalho, encontramos peso médio de 10 μg para ovos de *Ae. aegypti* ao final da embriogênese. É sabido que ovos desta espécie aumentam de peso e volume durante o desenvolvimento embrionário devido à absorção de água do ambiente (Gander 1951, Kliewer 1961). De acordo com Kliewer (1961), ovos recém-postos pesam 5 μg e absorvem água gradativamente durante as 16 horas seguintes; a partir de então mantêm o peso de 12 μg até o final da embriogênese. O mesmo autor verificou que a formação da CS é concomitante com o fim da absorção de água pelo ovo. Em nossas avaliações identificamos que os ovos de *Cx. quinquefasciatus* foram os

que mais expandiram, seguidos de *An. aquasalis* e *Ae. aegypti*. Assim como sugerido por Kliwer (1961), estas diferenças podem ser atribuídas à dinâmica de formação da CS: em *Ae. aegypti* e *An. aquasalis* a CS é formada com 21% da embriogênese, enquanto em *Cx. quinquefasciatus* só mais tarde, com 35 % (Vargas et al 2014), o que resultaria em potencial de maior absorção de água. Ou seja, se o peso, ou o volume, dos ovos fosse comparado entre 35 e 80% da embriogênese, é provável que pouca diferença fosse encontrada. Alternativamente porém, a grande expansão dos ovos de *Cx. quinquefasciatus* pode estar relacionada com uma maior permeabilidade da casca em relação às outras espécies. Em consonância com essa hipótese está o menor nível de ROD de ovos de *Cx. quinquefasciatus*. Investigações adicionais são necessárias para compreender melhor esse aumento de volume distinto em os ovos de diferentes espécies.

A espessura do endocócion varia na família Culicidae: em *Ae. aegypti*, possui entre 4 e 5 μm (Clements 1992) enquanto em *An. albitarsis* mede entre 0,6 e 1,2 μm (Monnerat et al 1999). Esta medição em mosquitos não é simples, principalmente depois da esclerotização e melanização que ocorrem durante a embriogênese inicial, processos que enrijecem a casca dos ovos e dificultam os cortes histológicos. Por exemplo, no estudo mencionado acima com *An. albitarsis*, os ovos foram cortados antes da finalização do enrijecimento e com a adição de uma droga que retarda esse processo. Neste contexto, como alternativa para verificar se há relação entre a massa das cascas e a impermeabilidade dos ovos, optamos por determinar o peso das cascas, além de sua contribuição relativa ao peso total dos ovos de cada espécie. Curiosamente, a casca proporcionalmente mais pesada é a de *An. aquasalis*, que possui ROD intermediária; *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus*, que se encontram em extremos opostos em relação ao grau de ROD, apresentam peso semelhante de casca, proporcionalmente ao peso do ovo. Esses dados apontam que a massa da casca, pelo menos quando avaliada isoladamente, possui pouca relação com a capacidade do ovo em resistir a ambientes secos. Entendemos que a verificação da espessura do endocócion nas diferentes espécies possibilitaria estabelecer a densidade das cascas, grandeza importante no contexto desta investigação. Com base em nossos achados, nossa hipótese é que componentes bioquímicos específicos

presentes nas cascas possam influenciar qualitativamente a permeabilidade dos ovos de culicídeos. Algumas substâncias que possivelmente estão relacionadas com a ROD são as melaninas, esclerotinas ou ainda lipídios (Slifer 1937, 1948, Hopkins e Kramer 1992, Goltsev et al 2009, Wittkopp e Beldade 2009, Wu et al 2013).

Muitas vezes, em estudos com ovos de mosquitos, a microscopia eletrônica de varredura é utilizada como ferramenta para análise do exocócion (Linley 1989, Linley et al 1993, Lounibos et al 1997, Maldonado et al 1997, Suman et al 2011). Nosso grupo já utilizou essa abordagem também para visualizar o endocócion de anofelinos, que se mostrou homogêneo nas faces ventral e dorsal do ovo de *An. albitarsis* (Monnerat et al 1999, Valle et al 1999). No presente estudo o exocócion foi removido por ser uma camada que se desprende facilmente durante a manipulação dos ovos (Linley 1989). Além disso, tínhamos interesse em investigar diretamente o endocócion, posto que a ROD em ovos de culicídeos não sofre alterações quando o exocócion é removido (Martins AJ, dados não publicados). Ondulações homogêneas em toda a superfície do endocócion foram vistas apenas em *Ae. aegypti*, a única, entre as espécies avaliadas, que apresenta grande resistência ao ambiente seco (Vargas et al 2014).

Acreditamos que a investigação de outras características físicas e químicas de ovos é necessária para a compreensão da natureza dos diferentes níveis de ROD encontrados, entre os culicídeos vetores. No entanto, os dados até agora obtidos apontam para uma conjunção de fatores operando em sinergia para estabelecer os distintos níveis de resistência à dessecação observados.

Agradecimentos

À toda equipe do LAFICAVE pela ajuda com a obtenção dos espécimes de *Ae. aegypti*, *An. aquasalis* e *Cx. quinquefasciatus* e pelo apoio na realização deste trabalho. À Ana Helisa Cardoso pela ajuda com os experimentos de microscopia eletrônica de varredura.

Referências

- Beckel W 1958. Investigation of permeability, diapause and hatching in the eggs of the mosquito *Aedes hexodontus* Dyar. *Can J Zool* 36: 541-554.
- Chapman RF 1998. The insects - Structure and function, Cambridge University Press,
- Clements A 1992. The Biology of Mosquitoes: Development, Nutrition and Reproduction., Chapman and Hall, London.
- Farnesi LC, Martins AJ, Valle D e Rezende GL 2009. Embryonic development of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): influence of different constant temperatures. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104: 124-6.
- Gander R 1951. Experimentelle und oekologische Untersuchungen über das Schlupfvermögen der Larven von *Aedes aegypti* L. *Revue Suisse de zoologie* 58: 215-278.
- Goltsev Y, Rezende GL, Vranizan K, Lanzaro G, Valle D e Levine M 2009. Developmental and evolutionary basis for drought tolerance of the *Anopheles gambiae* embryo. *Dev Biol* 330: 462-70.
- Hopkins TL e Kramer KJ 1992. Insect Cuticle Sclerotization. *Ann Review Entomol* 37: 273-302.
- Jacobs CG, Rezende GL, Lamers GE e van der Zee M 2013. The extraembryonic serosa protects the insect egg against desiccation. *Proc Biol Sci* 280: 20131082.
- Kliwer JW 1961. Weight and Hatchability of *Aedes aegypti* Eggs (Diptera: Culicidae). *Ann Entomol Soc Am* 54: 912-917.
- Li J e Christensen BM 1993. Involvement of l-tyrosine and phenol oxidase in the tanning of *Aedes aegypti* eggs. *Insect Bioch Mol Biol* 23: 739-748.
- Li JS e Li J 2006. Major chorion proteins and their crosslinking during chorion hardening in *Aedes aegypti* mosquitoes. *Insect Bioch Mol Biol* 36: 954-964.
- Linley JR 1989. Scanning electron microscopy of the egg of *Aedes (Protomacleaya) triseriatus* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* 26: 474-8.
- Linley JR, Lounibos LP, Conn J 1993. A description and morphometric analysis of the eggs of four South American populations of *Anopheles (Nyssorhynchus) aquasalis* (Diptera: Culicidae). *Mosq Systematics* 25: 198 - 214.
- Lounibos LP, Duzak D e Linley JR 1997. Comparative egg morphology of six species of the *Albimanus* section of *Anopheles (Nyssorhynchus)* (Diptera:Culicidae). *J Med Entomol* 34: 136-55.
- Maldonado V, Finol HJ e Navarro JC 1997. *Anopheles aquasalis* eggs from two Venezuelan localities compared by scanning electron microscopy. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 92: 487-91.
- Monnerat AT, Soares MJ, Lima JB, Rosa-Freitas MG e Valle D 1999. *Anopheles albitalis* eggs: ultrastructural analysis of chorion layers after permeabilization. *J Insect Physiol* 45: 915-922.

- Rezende GL 2008. Investigações sobre a aquisição de resistência à dessecação durante a embriogênese de *Aedes aegypti* e *Anopheles gambiae*. Doutorado. Biologia Celular e Molecular.
- Rezende GL, Martins AJ, Gentile C, Farnesi LC, Pelajo-Machado M, Peixoto AA e Valle D 2008. Embryonic desiccation resistance in *Aedes aegypti*: presumptive role of the chitinized serosal cuticle. *BMC Dev Biol* 8: 82.
- Slifer EH 1937. The origin and fatge of the Membrane surrounding the Grasshopper Egg; together with some Experiments on the Source of the Hatching Enzyme. *Quart. J Micr Sci* 79: 493-506.
- Slifer EH 1948. Isolation of a wax-like material from the shell of the grasshopper egg. *Discussion of Faraday Soc* 182-187.
- Sota T e Mogi M 1992. Survival time and resistance to desiccation of diapause and non-diapause eggs of temperate *Aedes (Stegomyia)* mosquitoes. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 63: 155-161.
- Suman DS, Shrivastava AR, Pant SC e Parashar BD 2011. Differentiation of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) with egg surface morphology and morphometrics using scanning electron microscopy. *Arthropod Struct Dev* 40: 479-83.
- Suman DS, Shrivastava AR, Parashar BD, Pant SC, Agrawal OP e Prakash S 2009. Variation in morphology and morphometrics of eggs of *Culex quinquefasciatus* mosquitoes from different ecological regions of India. *J Vector Ecol* 34: 191-9.
- Valencia MD, Miller LH e Mazur P 1996. Permeability of intact and dechorionated eggs of the *Anopheles* mosquito to water vapor and liquid water: a comparison with *Drosophila*. *Cryobiology* 33: 142-8.
- Valle D, Monnerat AT, Soares MJ, Rosa-Freitas MG, Pelajo-Machado M, Vale BS, Lenzi HL, Galler R e Lima JBP 1999. Mosquito embryos and eggs: polarity and terminology of chorionic layers. *J Insect Physiol* 45: 701-708.
- Vargas HC, Farnesi LC, Martins AJ, Valle D e Rezende GL 2014. Serosal cuticle formation and distinct degrees of desiccation resistance in embryos of the mosquito vectors *Aedes aegypti*, *Anopheles aquasalis* and *Culex quinquefasciatus*. *J Insect Physiol* 62: 54-60.
- Wittkopp PJ e Beldade P 2009. Development and evolution of insect pigmentation: Genetic mechanisms and the potential consequences of pleiotropy. *Seminars in Cell & Devel Biol* 20: 65-71.
- Wu X, Zhan X, Gan M, Zhang D, Zhang M, Zheng X, Wu Y, Li Z e He A 2013. Laccase2 is required for sclerotization and pigmentation of *Aedes albopictus* eggshell. *Parasitol Res* 112: 1929-34.

3.3) Capítulo 3

Este capítulo descreve que o processo de melanização da casca dos ovos de mosquitos é um fator importante para o fenômeno de aquisição de resistência dos ovos à dessecação.

Esta etapa da tese foi realizada no Laboratório de Fisiologia e Controle de Insetos Vetores (LAFICAVE), IOC, FIOCRUZ e no *Florida Medical Entomology Laboratory* (FMEL), da Universidade da Flórida em Vero Beach, EUA, em colaboração com a equipe do Dr Phil Lounibos.

Os dados estão apresentados na forma de um manuscrito em preparação.

Melanização é fundamental para a resistência à dessecação em ovos de insetos

Luana Cristina Farnesi^{1,2,4}, Helena Carolina Martins Vargas^{2,3}, Denise Valle^{1,4,#}, Gustavo Lazzaro Rezende^{3,4,#}

autores de correspondência: dvalle@ioc.fiocruz.br (D. Valle), grezende@uenf.br (G.L. Rezende)

¹Laboratório de Biologia Molecular de Flavivírus, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. ²Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes Vetores, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. ³Laboratório de Química e Função de Proteínas e Peptídeos, Centro de Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, RJ, Brasil. ⁴Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

Resumo

A maioria dos insetos tem uma membrana extraembrionária, chamada serosa, que envolve todo o embrião. Durante a embriogênese, a serosa secreta uma matriz extracelular, a cutícula serosa (CS), que acaba por se tornar parte da casca do ovo, em adição ao córion. A CS é um componente essencial do fenômeno da resistência dos ovos à dessecação (ROD). Em mosquitos, ovos de espécies diferentes possuem distintos níveis de resistência à dessecação ao final da embriogênese: *Aedes aegypti*, *Anopheles aquasalis* e *Culex quinquefasciatus* exibem, respectivamente, alta, média e baixa viabilidade quando expostos ao seco. No presente trabalho, a avaliação da aquisição de ROD, durante a embriogênese das três espécies, mostra que a CS possui um papel relevante para esse processo. Quitina é um dos componentes da CS. Quantificação de quitina revelou tendência de maior conteúdo em cascas de ovos mais resistentes ao seco. Além disto, diferenças significativas foram encontradas no grau de melanização: *Aedes aegypti* tem a casca mais melanizada, seguido de *An. aquasalis* e *Cx. quinquefasciatus*. Isso sugere que ovos mais melanizados são mais resistentes ao seco. Essa hipótese foi em

seguida investigada com o mutante de *An. quadrimaculatus* denominado GORO. Esta linhagem não é melanizada corretamente, e as cascas de seus ovos têm aparência dourada, distinta de seu equivalente selvagem (WT), que possui ovos de casca escura. Embora a dinâmica da embriogênese e da formação da CS nas linhagens WT e GORO seja equivalente, embriões GORO são mais sensíveis a ambientes secos: quando expostos ao seco por 10 horas, depois da formação da CS, apenas 12,3% dos embriões GORO são viáveis, em contraste com 66,5% de embriões WT. Nossos resultados confirmam, de forma direta, que, além da quitina da CS, a melanização da casca dos ovos está relacionada com a aquisição de impermeabilidade que ocorre em os ovos de insetos.

Palavras-chave - impermeabilização, mosquitos vetores, embrião, melanização, casca do ovo

Abreviaturas: CS: cutícula serosa, FMEL-USA: Florida Medical Entomology Laboratory (Vero Beach, FL, USA), LAFICAVE-BR: Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes Vetores (Fiocruz, RJ, Brasil), ROD: resistência do ovo à dessecação.

Introdução

Balanço hídrico é um componente primário da homeostasia em todos os organismos. A compreensão de suas bases fisiológicas, o envolvimento de circunstâncias ambientais e a evolução de traços particulares deste processo, assim como suas potenciais implicações ecológicas, têm sido há muito tempo tópicos significativos da biologia (Chown et al 2011). O manejo da absorção e da perda de água é uma questão importante para organismos que apresentam volume reduzido em relação à área de superfície, como os insetos.

Já foi descrita em alguns insetos a aquisição, durante a embriogênese, de tolerância a ambientes secos, fenômeno que denominamos 'resistência do ovo à dessecação' (ROD). A ROD possibilita a sobrevivência de embriões em condições ambientais de baixa umidade relativa (Rezende et al

2008, Goltsev et al 2009, Jacobs et al 2013, Vargas et al 2014). Em mosquitos já foi observado que diferentes espécies possuem distintos níveis de ROD (Vargas et al 2014, Figura suplementar 1). A ROD é uma característica particularmente importante quando culicídeos vetores são considerados, pois os mesmos colocam ovos em ambiente aquático, muitas vezes temporários, o que levaria os ovos a dessecarem, inviabilizando-os. É o caso de alguns mosquitos dos gêneros *Aedes*, *Anopheles* e *Culex*, capazes de abrigar vírus como dengue, chikungunya, da febre do Oeste do Nilo ou mesmo plasmódios, entre outros parasitas (Consoli e Lourenço-de-Oliveira 1994, Gould e Solomon 2008, Powers 2010). Curiosamente, depois de adquirir ROD, ovos de mosquitos do gênero *Aedes*, mas não dos gêneros *Culex* ou *Anopheles*, podem permanecer viáveis, em estado de dormência, sob condições secas, por meses (Christophers 1960, Juliano e Lounibos 2005, Urbanski et al 2010, Vargas et al 2014). Apesar da importância dos mosquitos vetores e do conhecido envolvimento da casca dos ovos, ainda existem lacunas sobre os fatores que contribuem para a ROD nesses insetos (Telford 1957, Beckel 1958, Harwood e Horsfall 1959, Judson e Hokama 1965, Rezende et al 2008, Goltsev et al 2009).

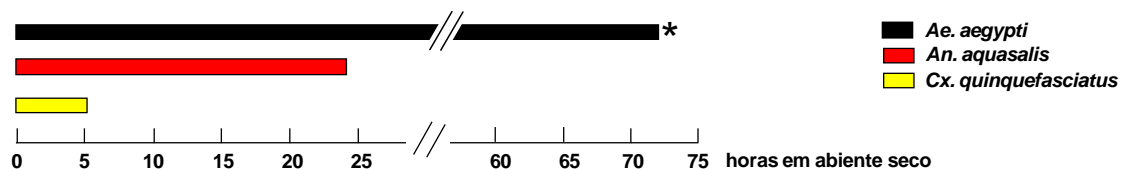


Figura Suplementar 1: Resistência, pós embrionária, de ovos de mosquitos à dessecação. Período, ao final da embriogênese, em que os ovos permanecem viáveis quando mantidos em ambientes secos. (*) Sabe-se que ovos de *Ae. aegypti* mantêm alta viabilidade por períodos ainda maiores (Christophers 1960, Rezende et al 2008).

Em ovos recém-postos, a casca é composta apenas pelo córion, uma estrutura produzida pelas células foliculares, ainda no ovário da fêmea. O córion é formado por duas camadas: o exo e o endocórion (Chapman 1998, Monnerat et al 1999, Valle et al 1999). O endocórion de mosquitos passa por notáveis transformações bioquímicas logo no início da embriogênese: no momento da postura, o endocórion é branco e flexível; dentro de meia hora começa a escurecer e, após duas a três horas, está totalmente escuro e enrijecido (Gander 1951, Beckel 1958, Christophers 1960, Raminani e Cupp

1975, Li e Li 2006, Rezende 2008). Após a formação do blastoderma celular, uma das primeiras etapas da embriogênese dos insetos, um grupo de células extraembrionárias, denominadas coletivamente 'serosa', envolve o embrião. A serosa secreta a cutícula serosa (CS), que se localiza adjacente e internamente ao endocócion (Goltsev et al 2009). No presente trabalho consideramos que a casca do ovo possui três camadas: o exocócion, o endocócion e a cutícula serosa. Foi demonstrado que a secreção da CS coincide com o momento da aquisição de impermeabilidade em embriões de *Ae. aegypti*, *An. gambiae*, *An. aquasalis* e *Cx. quinquefasciatus*, apontando que a CS é um componente do processo de ROD em mosquitos (Rezende et al 2008, Goltsev et al 2009, Vargas et al 2014). Embora a composição da CS de mosquitos ainda não tenha sido totalmente elucidada, sabe-se que o polissacarídeo quitina é um de seus componentes (Rezende et al 2008, Goltsev et al 2009).

Vários estudos sugerem que, além da CS, outros fatores participam da resistência do ovo à dessecação, incluindo a presença de ceras, a natureza da conexão entre a CS e o endocócion e os processos de melanização e esclerotização das cascas (Beckel 1958, Harwood 1958, Rezende et al 2008, Vargas et al 2014). A melanização e a esclerotização se iniciam com a transformação de tirosina em dopa que, por sua vez, poderá dar origem a agentes esclerotizantes ou a melaninas (Hopkins e Kramer 1992, Li e Christensen 1993). É sabido que a esclerotização contribui para estabilizar diversas estruturas corpóreas de insetos, e também as cascas de seus ovos, enquanto as melaninas atuam escurecendo-as (Hopkins e Kramer 1992, Li e Li 2006). Foi identificada, na serosa de *An. gambiae*, a expressão de genes relacionados com esses processos (Goltsev et al 2009). Embora a existência de relação entre resistência à dessecação e melanização em insetos já seja conhecida (Kalmus 1941, True 2003, Parkash et al 2009, Wittkopp e Beldade 2009), a relevância desta interação para o ovo ainda não foi descrita.

A natureza do fenômeno de resistência à dessecação em ovos de insetos foi investigada usando embriões de mosquitos como modelos. A ROD foi analisada comparativamente em diferentes espécies de vetores: *Aedes aegypti*, *Culex quinquefasciatus* e *Anopheles sp.* Identificamos que, além da

CS, a impermeabilidade dos ovos de mosquitos está diretamente relacionada com a melanização da casca.

Métodos

Manutenção de mosquitos e posturas sincronizadas

As colônias de *Ae. aegypti*, *An. aquasalis* e *Cx. quinquefasciatus* utilizadas foram mantidas no LAFICAVE. As linhagens de *An. quadrimaculatus*, GORO (MRA-891) e selvagem (WT) (ORLANDO, MRA-139), foram obtidas do *Malaria Research and Reference Reagent Resource Center* - MR4 (Manassas, VA, USA) e mantidas no FMEL. A linhagem GORO advém do cruzamento entre as linhagens mutantes GOCUT (MRA-123, *Golden Cuticle*) e ROSEYE (MRA 122, *Rose eyes*) (BEI 2014). Larvas de todas as espécies foram crescidas a 26 ± 1 °C e alimentadas com dietas específicas para cada caso: *An. quadrimaculatus* com uma mistura 1:1 de levedura e infusão de fígado; *An. aquasalis* com comida para peixe da marca Tetramin® (*Tetramarine Saltwater Granules*, Tetra GmbH, Germany) e *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus* com ração para gatos (Friskies®, Purina, Camaquã, RS, Brasil). Os adultos foram mantidos a 25 ± 1 °C, 70-80% de umidade relativa e receberam solução de sacarose a 10 % *ad libitum*. Para o repasto sanguíneo, adultos foram privados da solução de sacarose por um período de 12-24 horas e então alimentados em cobaias ou em galinhas anestesiadas. A metodologia de obtenção de posturas sincronizadas foi adaptada de Valencia (1996), conforme descrito em Rezende et al (2008) e Vargas et al (2014). De maneira resumida, dependendo da espécie de mosquito, a postura foi induzida entre três e cinco dias depois da alimentação de sangue: as fêmeas foram colocadas em um tubo, anestesiadas em gelo por um minuto e rapidamente transferidas para um disco de papel Whatman N° 1, colocado sobre a tampa de uma placa de Petri invertida (90 ou 150 mm de diâmetro), fechada com sua base. Depois que as fêmeas se recuperavam da anestesia, o papel era umedecido com água. Para *Cx. quinquefasciatus*, água desclorada era colocada diretamente na placa de Petri, sem papel-filtro. Em todos os casos, a postura foi realizada durante uma hora.

Determinação dos períodos de embriogênese e de aquisição de ROD em *An. quadrimaculatus*

Conhecimento tanto do período exato necessário para a finalização do desenvolvimento embrionário quanto do momento de aquisição de ROD são pré-requisitos para estudar a viabilidade dos embriões no seco. Estes dois momentos já haviam sido previamente determinados para todas as espécies estudadas (Figura Suplementar 2), com exceção de *An. quadrimaculatus*, submetido aqui aos mesmos procedimentos descritos para os outros mosquitos (Farnesi et al 2009, Vargas et al 2014).

Para determinar o tempo total da embriogênese, em síntese, os ovos de *An. quadrimaculatus* foram monitorados de hora em hora a partir de momento definido, prévia e empiricamente, como sendo anterior à eclosão esperada das primeiras larvas. Considerou-se como término da embriogênese o tempo necessário para eclosão de 50% das larvas. Foram realizados três experimentos independentes, cada qual com aproximadamente 120 ovos, para ambas as linhagens, WT e GORO.

O período de aquisição de ROD foi avaliado conforme descrito por Rezende (2008), com réplicas de 40-50 ovos obtidos de posturas sincronizadas: em diferentes momentos da embriogênese os ovos foram expostos ao seco por 15 min e depois desse período o percentual de ovos murchos foi contabilizado por observação em lupa.

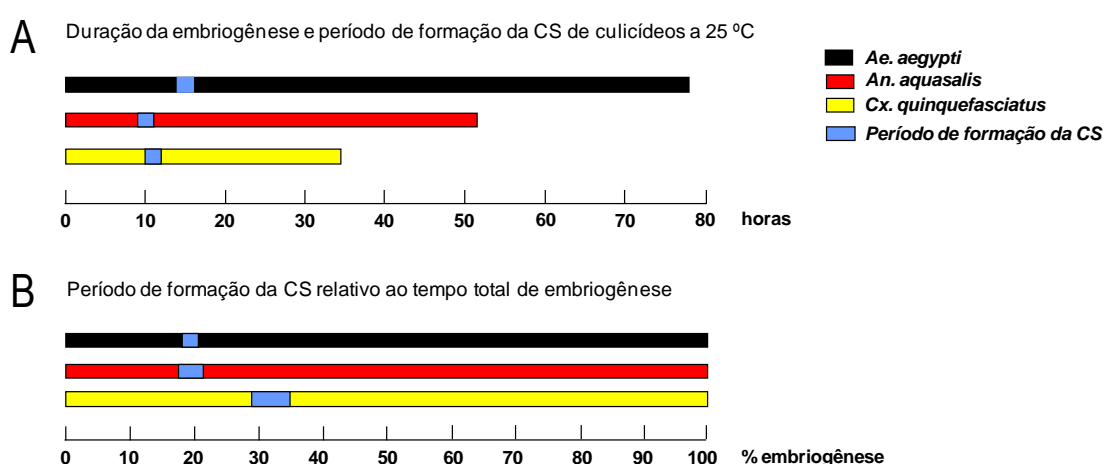


Figura Suplementar 2: linha do tempo do desenvolvimento embrionário de três mosquitos vetores, com foco na formação da cutícula serosa. (A) dados expressos em horas após a postura; **(B)** o tempo de desenvolvimento embrionário das três espécies foi normalizado (100%) e o período relativo de formação da CS foi calculado. Informações adaptadas de Farnesi et al 2009, Vargas et al 2014.

Viabilidade dos embriões em ambiente seco

Grupos de 40 ou 50 ovos, obtidos de posturas sincronizadas, foram transferidos para condições secas (sobre papel Whatman N° 1), em diferentes momentos da embriogênese, antes e depois da aquisição de ROD. O período no seco foi de 2, 5 ou 10 horas, e depois os ovos foram novamente transferidos para ambiente úmido, onde permaneceram até a finalização da embriogênese. Em todas as condições experimentais, o intervalo total de teste (período inicial úmido mais período no seco) foi inferior ao tempo necessário para finalização da embriogênese. A viabilidade foi quantificada por contagem da eclosão de larvas, estimulada com solução de extrato de levedura 0,15% (peso/volume) (Farnesi et al 2009), a cada hora, até que não houvesse mais eclosão por duas horas seguidas. Vinte e quatro horas depois, verificou-se novamente a eclosão, para determinação do total de larvas. Para cada espécie e para cada condição experimental, uma amostra foi mantida em paralelo, em papel-filtro úmido, até o final da embriogênese para controle da taxa de eclosão. Em todos os casos, três experimentos independentes foram realizados, em triplicata, dentro de incubadoras, a 25 °C, com umidade relativa variando entre 40 e 80 %.

Isolamento da cutícula serosa e detecção de quitina

Cascas de ovos de *Ae. aegypti*, *An. aquasalis* e *Cx. quinquefasciatus* foram coletadas depois da eclosão das larvas. A partir destas cascas, o isolamento de cutículas serosas foi adaptado de Rezende et al (2008): digestão completa do córion foi feita com NaOCl 3% ativo durante 15-40 minutos, dependendo da espécie. As CSs resultantes foram lavadas três vezes com água destilada e três vezes com tampão salina-fosfato (PBS, do inglês '*phosphate buffered saline*') contendo 20 mg/ml de albumina sérica bovina (BSA, do inglês '*bovine serum albumin*') (PBSB). Para detecção de quitina, CSs isoladas foram incubadas com a lectina WGA (aglutinina do gérmen do trigo, do inglês '*Wheat Germ Agglutinin*') conjugada com o fluoróforo Isotiocianato de fluoresceína (FITC, do inglês '*fluorescein isothiocyanate*'), ou seja, WGA-FITC (EY Laboratories) 5 µg/ml em solução de PBSB, por uma hora, à temperatura ambiente e no escuro. Depois de lavagem extensiva na solução de PBSB, as CSs foram montadas e analisadas com DIC ou microscopia de fluorescência (microscópio Axio Imager A.2 Zeiss acoplado a

uma AxioCam MRc 5 e software AxioVision Rel. 4.8). Este experimento foi realizado três vezes, de forma independente.

Conteúdo de quitina nas cascas de ovos

Ovos de *Ae. aegypti*, *An. aquasalis* e *Cx. quinquefasciatus* ao final da embriogênese foram tratados com 5-6 % de NaOCl ativo por 1 minuto para remoção do exocócion. Em seguida, aguardou-se o fim da embriogênese e as cascas (compostas nesta etapa por endocócion e CS) foram coletadas imediatamente depois da eclosão das larvas. O conteúdo de quitina foi quantificado por meio de seus derivados de glicosamina, obtidos por deacetilação, despolimerização e deaminação, como descrito anteriormente (Lehmann e White 1975, Zhang e Zhu 2006, Farnesi et al 2012). De maneira geral, as cascas de ovos foram submetidas à digestão alcalina que converte, por deacetilação, a quitina em quitosana, um polímero de glicosamina. Isto é feito por meio da ação conjunta de temperaturas elevadas (130 °C) e alta concentração alcalina (14 M KOH). A quitosana então é despolimerizada gerando glicosamina que em seguida é deaminada resultando em aldeídos solúveis, através da reação com HNO₂. Aos aldeídos é adicionado NH₄SO₃NH₂, MBTH (3-Metil-2-benzotiazolinona hidrazona) e Fe³⁺, e o produto é quantificado colorimetricamente a 650 nm. O conteúdo de quitina é expresso em unidades de glicosamina, de acordo com curva padrão feita com um substrato comercial (Sigma, G4875). Para as espécies *Ae. aegypti* e *An. aquasalis* foram realizados três experimentos independentes e para a espécie *Cx. quinquefasciatus*, dois. Para cada experimento foram utilizadas pelo menos 300 cascas de ovos, previamente contadas e pesadas.

Análise do grau de melanização das cascas de ovos

Foram usadas cascas de ovos de *Ae. aegypti*, *An. aquasalis* e *Cx. quinquefasciatus* coletadas imediatamente depois da eclosão das larvas e com o exocócion removido como descrito acima. As imagens foram obtidas com uma câmera digital acoplada a um microscópio óptico Zeiss Axio Scop 40 e o aplicativo *Image J* foi usado para quantificar o grau de melanização das cascas. O valor máximo de melanização foi atribuído para *Ae. aegypti*. Para

cada espécie foram realizados pelo menos dois ensaios, cada qual com grupos de 20 cascas de ovos.

Análises estatísticas

Sempre que necessário, análises estatísticas foram feitas utilizando o GraphPad Prism versão 5.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com). Detalhes adicionais das análises são fornecidos ao longo do texto.

Resultados

Ovos de diferentes culicídeos, expostos ao seco durante a embriogênese, têm distintos padrões de viabilidade

A viabilidade de embriões das espécies *Ae. aegypti*, *An. aquasalis* e *Cx. quinquefasciatus* foi avaliada, após exposição ao seco por vários períodos, e em diferentes fases da embriogênese. Em todos os casos, foram escolhidos quatro pontos: imediatamente antes e imediatamente depois da formação da cutícula serosa (CS) e dois pontos mais tardios. Uma vez que o tempo necessário para que o desenvolvimento embrionário se complete é diferente para cada espécie, assim como o momento e o período de formação da CS (Figura Suplementar 2), os resultados são apresentados como percentuais do tempo total de desenvolvimento embrionário (Figura 1). Assim, pretendeu-se comparar diretamente as três espécies estudadas.

De forma geral, quanto mais tardiamente os ovos são expostos ao seco, maior é a sua viabilidade. A relação entre a aquisição de impermeabilidade dos ovos e a formação da CS, mostrada previamente por Vargas et al (2014), foi confirmada nesta análise fisiológica. Para todas as espécies, as maiores diferenças de viabilidade foram observadas entre o primeiro e o segundo pontos avaliados, ou seja, imediatamente antes e depois da formação da CS (ANOVA, $P < 0,05$).

Após a formação da CS, a viabilidade dos embriões de *Cx. quinquefasciatus* foi inversamente proporcional ao tempo de exposição ao seco, ou seja, quanto maior o período no seco, menor a viabilidade. Nesta espécie, tal efeito alcançou o máximo após 10 horas de exposição, quando

todos os embriões morreram. O mesmo fenômeno não ocorreu nas outras duas espécies analisadas (*Ae. aegypti* e *An. aquasalis*), nas quais a taxa de eclosão em cada ponto avaliado foi equivalente para todos os períodos de exposição ao seco. Além disso, nestas duas espécies, a CS parece ter influência distinta sobre a viabilidade dos embriões. Para *An. aquasalis*, o impacto da formação da CS é quase que exclusivo: a viabilidade de embriões expostos ao seco, nula antes da formação da CS, chega a 100% imediatamente depois. Para *Ae. aegypti* o efeito da CS é apenas parcial, elevando a viabilidade de 30-50% (antes da formação da CS) para cerca de 68-81% (após a formação da CS). É importante ressaltar que, nesta espécie, antes da formação da CS, quanto maior é o tempo de exposição ao seco, menor é a viabilidade. De qualquer forma, este efeito parcial da formação da CS sobre a taxa de eclosão das larvas de *Ae. aegypti* indica que fatores adicionais, que ocorrem previamente ao período de formação da CS, podem ser relevantes para a manutenção da viabilidade dos embriões em condições secas. *Culex quinquefasciatus* exibiu perfil intermediário: apenas para o menor tempo de exposição ao seco antes da formação da CS houve alguma eclosão de larvas, em torno de 20% (Figura 1).

Ainda em *Ae. aegypti*, um aumento gradual da viabilidade dos embriões, observado no decorrer do desenvolvimento e para todos os períodos de exposição ao seco, mostra indícios de algum tipo de 'maturação da ROD', que poderia ser dependente da CS e de outros fatores, e cuja eficiência na proteção do embrião contra perda de água é progressiva. Tal perfil de 'maturação da ROD' também pode ser observado em *Cx. quinquefasciatus*, na condição de ovos expostos por 5 horas ao seco (Figura 1).

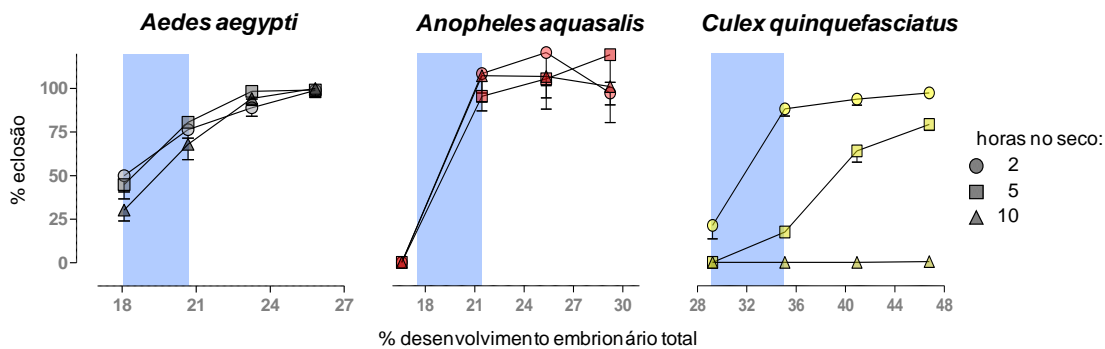


Figura 1: Ovos de culicídeos exibem distintos padrões de viabilidade quando expostos ao seco durante a embriogênese. Dados são apresentados como eclosão de larvas (normalizados em relação ao controle mantido em condições padrão, ver Métodos) em função do percentual do desenvolvimento total de cada espécie (de acordo com Vargas et al 2014). Cada ponto representa a média e o erro padrão de três experimentos independentes, com pelo menos 120 ovos cada. As faixas azuis indicam o período de formação da cutícula serosa (CS), relativo ao total da embriogênese. Em todos os casos, a viabilidade foi significativamente diferente entre os dois primeiros pontos experimentais, antes e depois da formação da CS (ANOVA, $P < 0,05$).

O conteúdo de quitina nas cascas de ovos de diferentes culicídeos é variável

Marcação WGA-FITC confirmou a presença de quitina em cutículas serosas isoladas de *Ae. aegypti*, *An. aquasalis* e *Cx. quinquefasciatus* (Figura 2). Diferenças no aspecto da CS desses culicídeos também são evidentes: as CSs de *Ae. aegypti* e *An. aquasalis* são morfologicamente bem estruturadas, em oposição à CS frágil e quebradiça de *Cx. quinquefasciatus*.

O conteúdo de quitina foi quantificado em grupos de cascas (contendo endocórrion e CS) e apresentado como equivalentes de glicosamina (ver Métodos). A Tabela mostra que o conteúdo de quitina das cascas de *Ae. aegypti* é, em média, maior que *An. aquasalis*, que por sua vez é maior do que *Cx. quinquefasciatus*. Como os ovos dos mosquitos avaliados possuem tamanhos diferentes (ver seção 3.2 desta tese), o conteúdo de quitina também foi normalizado em relação à área dos ovos; ainda assim a espécie *Cx. quinquefasciatus* exibe menor conteúdo relativo. No entanto, não foram encontradas diferenças estatísticas nos dados da Tabela (ANOVA, $P > 0,05$). Verificou-se tendência de menor conteúdo de quitina em cascas de ovos mais

densas (Figura 3). Por outro lado, espécies com maior conteúdo relativo de quitina nas cascas dos ovos foram precisamente aquelas que exibiram maior ROD (compare a Figura 3 com a Figura Suplementar 1). Apesar desses dados sugerirem relação direta entre o nível de quitina e o grau de ROD em insetos, espera-se que outros fatores também influenciem na impermeabilidade dos ovos (Beckel 1958).

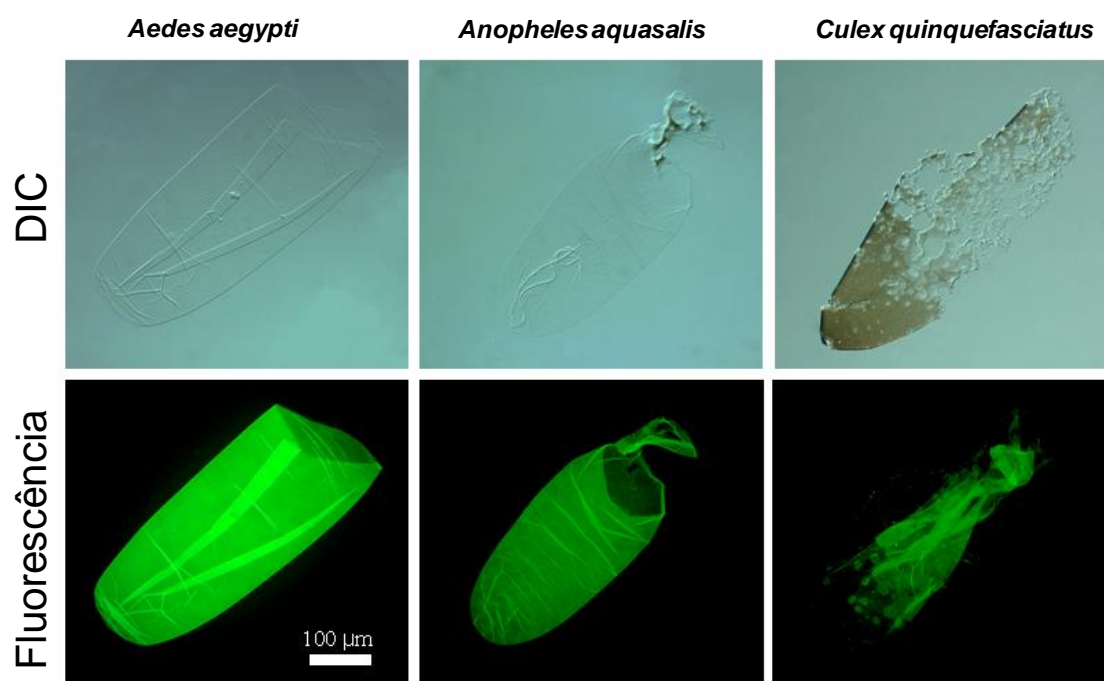


Figura 2: Quitina está presente na cutícula serosa dos ovos de diferentes culicídeos. Painéis superiores: DIC; painéis inferiores: marcação com WGA-FITC para identificação de quitina. O registro da fluorescência foi feito nas mesmas condições para todas as amostras. Todas as imagens possuem a mesma magnificação.

Tabela: Quantificação de quitina em cascas de ovos de culicídeos. As cascas eram constituídas de endocóron e cutícula serosa. Os valores estão normalizados por peso ou por área das cascas. Foram utilizados os dados do capítulo 2 da seção Resultados para os cálculos de peso e área das cascas. Não houve diferenças significativas entre os valores obtidos (ANOVA, $P > 0,05$).

	ng glicosamina / μg casca	ng glicosamina / área (μm^2) casca
<i>Ae. aegypti</i>	0,673 \pm 0,341	3,150 \pm 0,528
<i>An. aquasalis</i>	0,317 \pm 0,157	2,949 \pm 0,930
<i>Cx. quinquefasciatus</i>	0,181 \pm 0,036	1,910 \pm 0,044

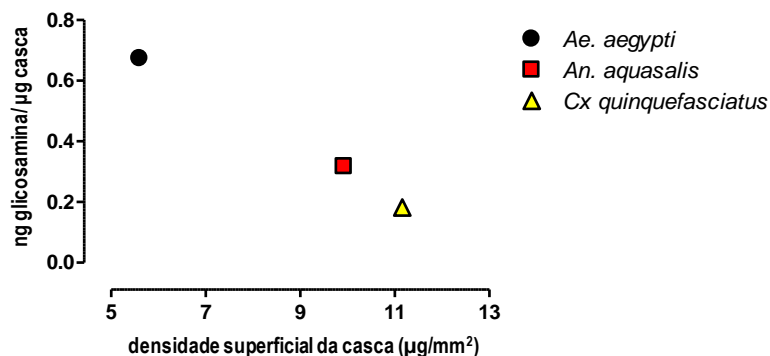


Figura 3: Cascas de ovos de mosquitos com maior teor de quitina são as que exibem menor densidade e também as que mais resistem ao seco. Eixo horizontal: densidade superficial da casca (peso da casca/ área do ovo, calculada com base nos dados apresentados no capítulo 2 da seção Resultados desta tese). Eixo vertical: equivalente de quitina por µg de casca. Para cada espécie foram utilizadas pelo menos 600 cascas de ovos, contadas e pesadas previamente ao ensaio de dosagem de quitina.

Espécies de mosquitos com ovos mais melanizados possuem maior ROD

O grau de melanização do endocócion de *Ae. aegypti*, *An. aquasalis* e *Cx. quinquefasciatus* foi avaliado comparativamente, utilizando-se o culicídeo de ovo mais escuro, *Ae. aegypti*, como parâmetro para o percentual máximo de melanização (Figura 4). Ovos de *Ae. aegypti* e *An. aquasalis* mostram padrão de melanização homogêneo. O mesmo não foi verificado para *Cx. quinquefasciatus*, cujos ovos foram então avaliados em dois pontos distintos. *Culex quinquefasciatus* exibiu o endocócion menos melanizado, seguido de *An. aquasalis*, este último cerca de 20% menos escuro que *Ae. aegypti*. Todas as diferenças encontradas no grau de melanização do endocócion das espécies foram significativas (ANOVA, $P < 0,05$). O grau de melanização variou diretamente com a intensidade de ROD das espécies (compare a Figura 4 com a Figura Suplementar 1, Vargas et al 2014), ou seja, ovos mais melanizados parecem ser mais resistentes ao seco.

No entanto, os ensaios mostrados até aqui não permitem estabelecer relação entre a ROD e a melanização especificamente, tendo em vista que outros fatores contribuem para a impermeabilização dos ovos. Para investigar diretamente a relação entre melanização e ROD, lançamos mão da espécie *Anopheles quadrimaculatus*, que possui um mutante, GORO, com melanização afetada (ver Métodos) (BEI 2014).

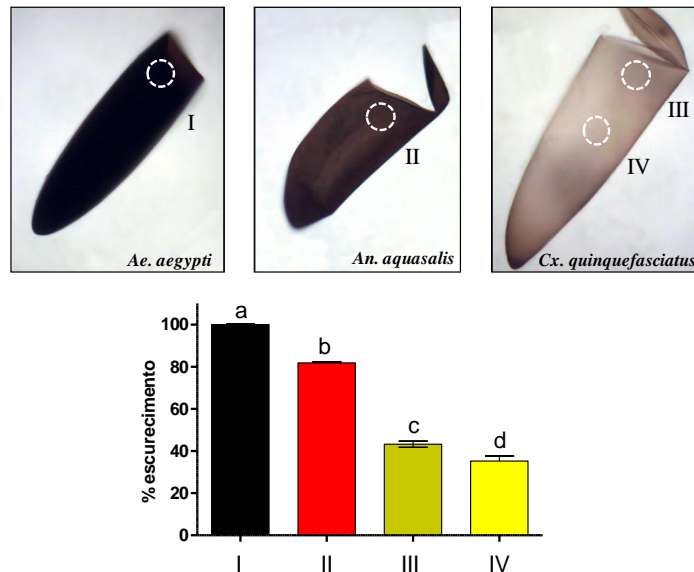


Figura 4: Diferenças no grau de melanização de cascas de ovos de mosquitos podem estar associadas com resistência do ovo à dessecação. Imagens obtidas em microscopia de campo claro de endocóricions (painéis superiores) foram usadas para quantificar o grau de escurecimento (painel inferior). A região de avaliação em cada espécie está indicada por círculos, numerados. Cascas de ovos de *Cx. quinquefasciatus* foram avaliadas em dois locais distintos, porque a pigmentação não é homogênea. *Aedes aegypti* foi utilizado como padrão de escurecimento máximo. No gráfico, as barras representam média e erro padrão de dois experimentos independentes, com pelo menos 20 cascas cada. Letras distintas indicam diferenças significativas (ANOVA, $P < 0,05$). Barra = 100µm.

Alguns aspectos das linhagens WT e GORO de An. quadrimaculatus

A Figura 5 ilustra as fases do ciclo de vida das linhagens de *An. quadrimaculatus* WT e GORO. Na linhagem mutante GORO a melanização das estruturas corpóreas de todos os estágios de vida é deficiente, o que lhe confere aspecto dourado, diferente de sua contraparte selvagem. Tiramos proveito da existência desta linhagem para analisar a influência do processo de melanização da casca sobre a aquisição de impermeabilidade dos ovos, independente de outros fatores.

Inicialmente foi necessário identificar, nas duas linhagens, a cronologia do desenvolvimento embrionário total e o momento de aquisição de ROD. O tempo necessário para completar o desenvolvimento embrionário, de 56,1 horas após a postura, não difere entre as cepas selvagem e GORO (Figura 6A). A aquisição de impermeabilidade ocorre no período entre 19,6 e 25% do desenvolvimento embrionário para as duas linhagens (Figura 6B). A aquisição de impermeabilidade é concomitante com a formação da CS nas duas linhagens (Figura 7), como visto em outros culicídeos (Vargas et al 2014).

Estes resultados confirmam a relação entre impermeabilidade e CS também em *An. quadrimaculatus* e mostram que no mutante GORO a formação da CS não é alterada.

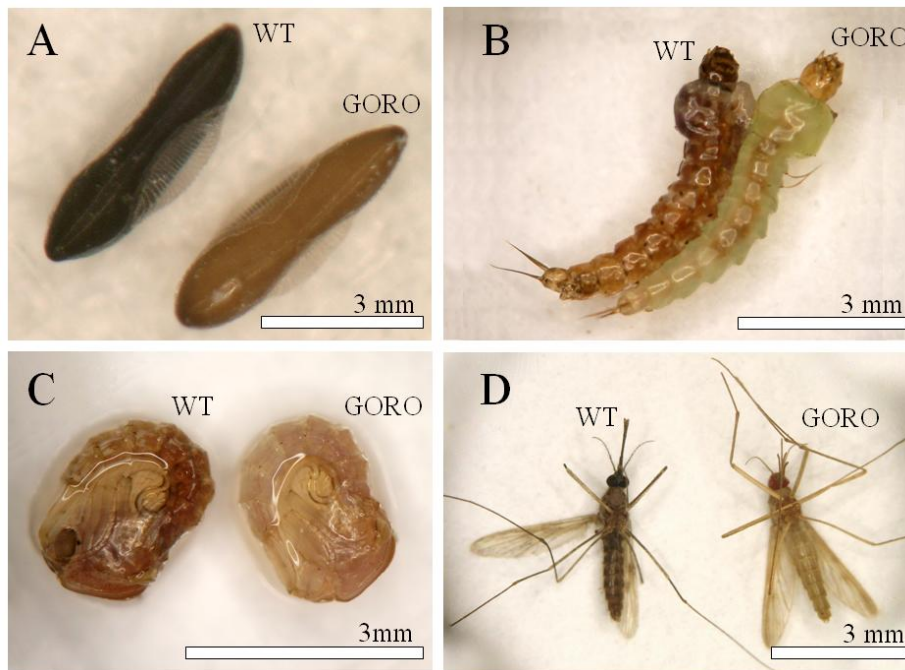


Figura 5: Estágios de vida do *Anopheles quadrimaculatus*, linhagens selvagem (WT) e não melanizada corretamente (GORO). (A) ovos; (B) larvas, (C) pupas; (D) adultos. GORO = “Golden Cuticle and ROse eyes”.

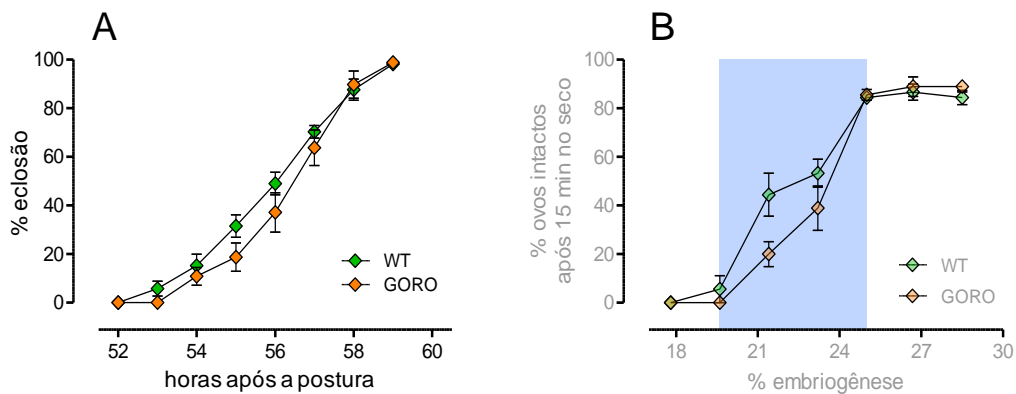


Figura 6: Nas linhagens selvagem (WT) e GORO de *An. quadrimaculatus* o tempo total de embriogênese e a aquisição de resistência do ovo à dessecação são similares. (A) Eclosão cumulativa de larvas de primeiro instar a 25 °C, normalizada em relação ao registro do máximo de larvas eclodidas, obtido 24 horas após o término esperado da embriogênese. (B) Grupos de ovos de diferentes idades foram mantidos em ambiente seco por 15 minutos. A taxa de ovos intactos (que não murcharam neste intervalo) é apresentada em função do tempo de embriogênese, expresso em percentual do desenvolvimento total a 25 °C. A faixa azul indica o período do desenvolvimento associado à formação da cutícula serosa. Nos dois casos, cada ponto representa a média e o desvio-padrão de três experimentos independentes, totalizando 270 ovos.

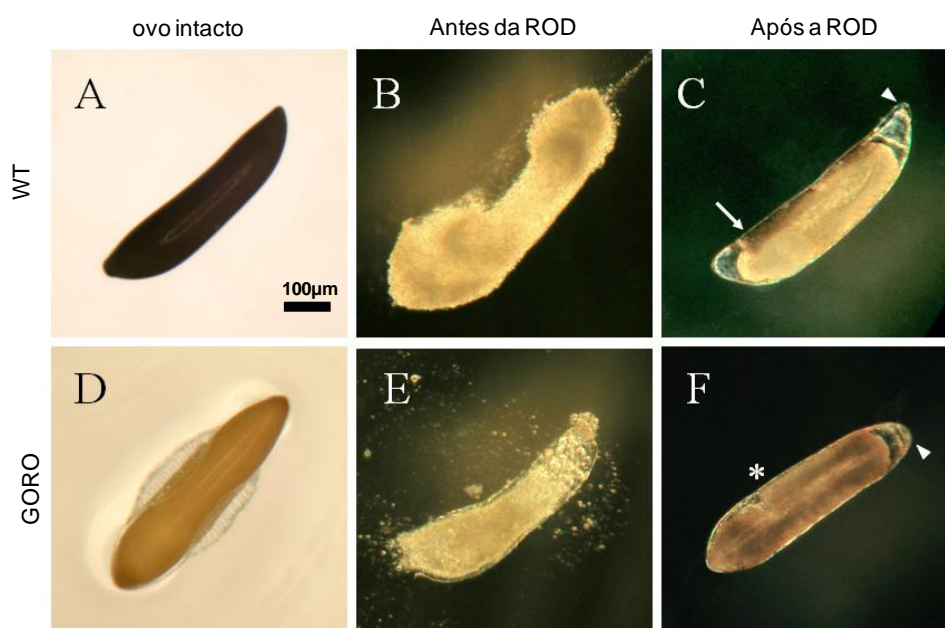


Figura 7: Nas linhagens WT e GORO de *An. quadrimaculatus* a aquisição de resistência do ovo à dessecação (ROD) está relacionada com a formação da **cutícula serosa (CS)**. A presença de cutícula serosa foi determinada por digestão com cloro ativo. (A, D) Ovos intactos; (B, E) ovos tratados com cloro antes da aquisição da ROD são totalmente digeridos; (C, F) ao contrário, ovos submetidos ao mesmo tratamento depois da aquisição de ROD permanecem íntegros; estes ovos possuem CS resistente ao cloro. Seta: resquícios de endocócion ainda não consumido pelo cloro; cabeça de seta: limites da cutícula serosa; asterisco: porção mais posterior da banda germinal. Embriões de ambas as cepas estão na fase de extensão máxima da banda germinal logo depois da formação da CS. Todas as imagens possuem a mesma magnificação.

O processo de melanização é importante para a ROD

As duas linhagens de *An. quadrimaculatus* foram utilizadas para avaliar a influência relativa da melanização na ROD. Para tanto, a exemplo do que havia sido feito com as outras espécies (Figura 1), avaliou-se a viabilidade de embriões de *An. quadrimaculatus*, selvagens e GORO, expostos ao ambiente seco, antes e depois da formação da CS, por diferentes períodos de tempo (2, 5 e 10 horas) (Figura 8). Embriões GORO, não melanizados corretamente, apresentaram menores taxas de viabilidade quando comparados aos embriões selvagens expostos às mesmas condições. Além disso, quanto maior o tempo de exposição ao seco, menor a viabilidade das duas linhagens, e mais evidentes as diferenças entre elas. Já no menor período testado, de duas horas de exposição ao seco, houve queda significativa na viabilidade dos embriões GORO em relação aos WT (ANOVA, $P < 0,05$) (Figura 8, painel da

esquerda). Depois de 10 horas no seco, a viabilidade dos embriões GORO não alcançou 15%, enquanto embriões WT ultrapassaram 65% de viabilidade. Estes resultados comprovam a influência direta da melanização sobre a resistência dos ovos de insetos à perda de água para o ambiente.

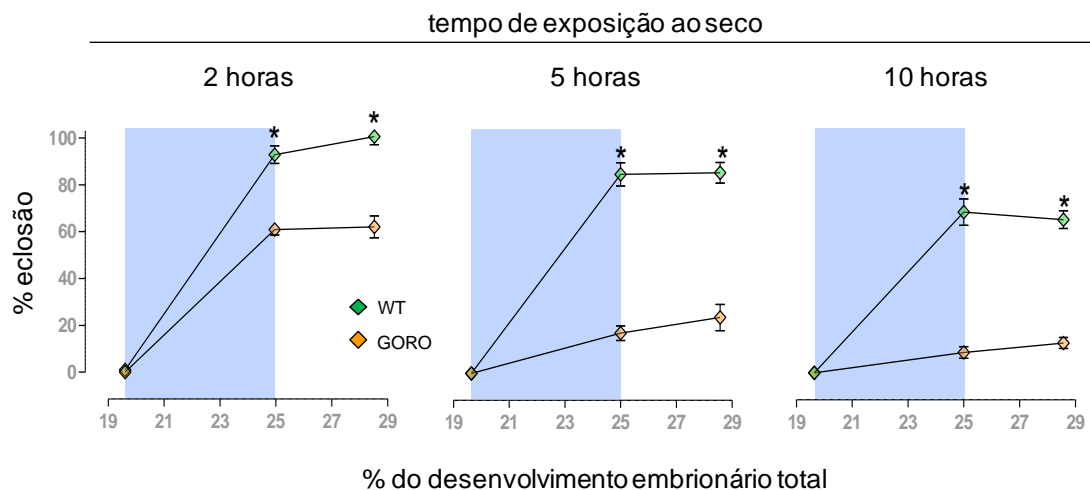


Figura 8: Ovos não melanizados de *An. quadrimaculatus* resistem pouco à dessecação. Ovos das cepas selvagem (WT) e GORO foram expostos ao seco por diferentes períodos, a partir dos momentos da embriogênese indicados nos eixos-x, antes e depois da aquisição de ROD. A taxa de eclosão foi normalizada por controles de viabilidade, mantidos em condições úmidas. Cada ponto representa a média e o erro-padrão de três ensaios independentes, cada qual com 40 ou 50 ovos. As faixas azuis indicam o período associado à formação da cutícula serosa. (*) diferenças significativas na viabilidade entre as linhagens WT e GORO, em pontos equivalentes da embriogênese (ANOVA, seguido do teste de Tukey, $P < 0,05$).

Discussão

A resistência à dessecação dos ovos de insetos é um fenômeno que os ajuda a sobreviver em ambientes inóspitos. Em mosquitos, ovos com forte resistência ao seco estão confinados aos gêneros *Aedes*, *Ochlerotatus*, *Psorophora*, *Haemagogus* e *Opifex* (Clements 1992, Juliano e Lounibos 2005), que totalizam cerca de 29% das espécies descritas (Walter Reed Biosystematics Unit 2014).

Mosquitos que se desenvolvem em ambientes apenas temporariamente alagados, como buracos de árvores, e alguns outros criadouros naturais ou mesmo artificiais, estão sujeitos a flutuações do nível de umidade. Nesses casos, a resistência à dessecação é considerada uma estratégia reprodutiva (Vinogradova 2007). Além disso, sabe-se que espécies de mosquito que possuem ovos muito resistentes ao seco têm sua capacidade

de dispersão aumentada. Sendo assim, a resistência do ovo à dessecação (ROD) é fortemente associada à introdução de espécies de culicídeos em novas regiões geográficas (Juliano e Lounibos 2005). Essa importante característica ecológica tem implicações na dispersão e na transmissão de doenças como, por exemplo, a dengue, de distribuição global (Bhatt et al 2013).

É sabido que a resistência dos ovos à dessecação é majoritariamente adquirida no primeiro terço da embriogênese, e que este processo está intimamente relacionado à formação da cutícula serosa (Farnesi et al 2009, Goltsev et al 2009, Jacobs et al 2013, Vargas et al 2014). Recentemente foram identificadas diferenças nos níveis de ROD em três gêneros de culicídeos vetores: *Aedes*, *Anopheles* e *Culex* (Vargas et al 2014). Todos possuem CS e todos apresentam algum grau de resistência ao seco ao final da embriogênese. Apesar disto, em *Anopheles* e *Culex*, a impermeabilidade conquistada no primeiro terço da embriogênese não é suficiente para proteger os embriões de exposições ao seco por mais de 24 ou 5 horas, respectivamente (Vargas et al 2014, Figura Suplementar 1). Neste trabalho investimos esforços na análise da impermeabilidade que se desenvolve especificamente ao longo da embriogênese, para tentar entender sua relevância sobre a ROD. Para tanto, diferente de Vargas et al (2014), todos os ensaios de exposição ao seco foram feitos antes que a embriogênese das espécies avaliadas se completasse.

Nossos dados mostram, em todos os casos, que a viabilidade foi menor quando os embriões foram expostos ao seco antes da formação da CS, corroborando os achados prévios da literatura que apontam para a importância da formação dessa matriz extracelular sobre o fenômeno da ROD em insetos. Curiosamente, embriões de *Ae. aegypti*, quando expostos ao seco por até 10 horas a partir de momento anterior à formação da CS, já exibem 30% de viabilidade. Esses resultados corroboram a hipótese de Beckel (1958) de que outros fatores da casca, além da CS, estão associados à ROD. Por outro lado, Rezende et al (2008) demonstraram que, antes da formação da CS, ovos de *Ae. aegypti* não são capazes de resistir ao seco por períodos mais longos (acima de 25 horas). Ou seja, tais fatores iniciais que atuam em *Ae. aegypti* antes da formação da CS só conferem proteção parcial ao embrião, contra

exposições ao seco por intervalos curtos de tempo. Estes fatores iniciais podem ser percebidos, de forma mais sutil, também em ovos de *Cx. quinquefasciatus*, que possuem baixa ROD: nesta espécie, exposição ao seco por 2 horas antes da formação da CS não foi suficiente para bloquear completamente a eclosão das larvas (Figura 1).

Em consonância com Rezende et al (2008), observamos que após a formação da CS em ovos de *Ae. aegypti* de fato, parece ocorrer 'maturação da ROD' ao longo da embriogênese inicial: quanto mais tardiamente os ovos são expostos ao seco, maior é a viabilidade dos embriões. Este aumento gradativo de viabilidade no decorrer do desenvolvimento foi equivalente para intervalos de exposição ao seco entre 2 e 10 horas. A mesma 'maturação da ROD' foi observada para *Cx. quinquefasciatus*, em ovos expostos ao seco por 5 horas.

Embriões do gênero *Anopheles* avaliados neste trabalho mostraram dependência inicial exclusiva da formação da CS, uma vez que a viabilidade foi nula antes da formação desta matriz (Figuras 1 e 8). Entretanto, as duas espécies avaliadas mostraram diferenças no perfil de aquisição de resistência ao seco 'pós-CS': enquanto em embriões de *An. aquasalis*, a exemplo de *Ae. aegypti*, a recuperação da viabilidade foi equivalente para todos os períodos de exposição ao seco testados, a viabilidade de *An. quadrimaculatus* foi inversamente proporcional ao tempo de exposição ao seco. A CS de embriões de *Cx. quinquefasciatus* foi a que apresentou menor efeito sobre a resistência ao seco; baixos níveis de viabilidade foram observados mesmo depois de poucas horas de exposição após a formação desta matriz. Perfil semelhante foi encontrado por Vargas et al (2014) para esta espécie ao final da embriogênese.

A quitina é considerada um dos principais componentes do exoesqueleto dos insetos e está presente também na matriz peritrófica de larvas e adultos e na CS dos ovos (Moussian et al 2005, Rezende et al 2008, Moussian 2010, Farnesi et al 2012, Merzendorfer 2012). Goltsev et al (2009) mostraram que há, na serosa, expressão de genes que codificam enzimas da via de biossíntese de quitina. Jacobs et al (2013) comprovaram a importância da quitina na resistência à dessecação dos ovos do besouro *Tribolium castaneum*: silenciamento por RNAi do gene *chitin synthase1* reduziu a viabilidade quando os ovos eram expostos a condições de baixa umidade. Com

base nestas informações investigamos no presente trabalho a relação entre ROD e quitina. Nossos dados sugerem que o conteúdo de quitina das cascas de ovos é diretamente proporcional à intensidade de ROD.

Em adição à quitina presente na CS, Jacobs et al (2013) também mostraram de forma inequívoca que outros fatores participam do processo de ROD em insetos: ovos silenciados para o fator de transcrição *Zerknüllt1* (que não possuem serosa nem CS) são ainda mais sensíveis à dessecação do que os ovos silenciados especificamente para *chitin synthase1* (que possuem serosa e também CS, embora sem quitina). Nesse contexto, optamos por investigar se haveria participação da melanização das cascas dos ovos no nível de ROD em mosquitos.

É importante ressaltar que o escurecimento (melanização) progressivo do endocóxon é observado logo depois que os ovos são postos. Em *Ae. aegypti* a melanização se completa entre 1,5 e 2 horas (Clements 1992, Li e Li 2006, Rezende 2008). Aproximadamente ao mesmo tempo, ocorrem a esclerotização e o enrijecimento do endocóxon (Beckel 1958, Christophers 1960, Rezende 2008). Li e Christensen (1993) apontam a importância da esclerotização e da melanização das cascas para a viabilidade dos embriões, ressaltando que caso tais processos não se completem dentro de 6-8 horas depois da postura, os ovos geralmente colapsam quando expostos a condições secas.

Genes que codificam enzimas das vias de melanização e esclerotização, como tirosina hidroxilase e dopa decarboxilase, são expressos na serosa, durante a formação da CS de *An. gambiae* (Goltsev et al 2009). Com base nesses achados acreditamos que, além do endocóxon, possa haver também esclerotização, ou melanização, da cutícula serosa. Nossa hipótese é que a maior fragilidade da CS de *Cx. quinquefasciatus* ao toque, bem como sua maior sensibilidade ao hipoclorito (dados não mostrados) podem ser a consequência de esclerotização menos intensa nesta espécie. Resta avaliar a expressão relativa de enzimas desta via metabólica nos vetores aqui apresentados.

Inicialmente abordamos a potencial relação entre melanização e ROD comparativamente, utilizando *Ae. aegypti*, *An. aquasalis* e *Cx. quinquefasciatus*. Espécies com ovos mais melanizados apresentaram maior

ROD (Figuras 1, 4 e Suplementar 1, Vargas et al 2014). No entanto, estas foram evidências apenas circunstanciais. Por outro lado, o emprego de *Ae. aegypti* mutantes de melanização não é factível, pois são letais embrionários (Craig Jr e Hickey 1967). Evidência recente desta letalidade são os embriões inviáveis de *Ae. aegypti* silenciados para *laccase 2*, gene envolvido no processo de melanização (Wu et al 2013). No entanto, o mutante GORO (ver Métodos) de *Anopheles quadrimaculatus* tem a sua melanização afetada (BEI 2014) e, ao contrário de *Ae. aegypti*, possui ovos viáveis. A existência da linhagem GORO permitiu avaliar diretamente a contribuição da melanização para a ROD. Primeiramente confirmamos que, na linhagem GORO, tanto o tempo de desenvolvimento embrionário quanto de síntese da CS e da relação entre CS e a aquisição de impermeabilidade são equivalentes à linhagem selvagem. Esses resultados configuraram GORO como uma valiosa ferramenta para testar a relação entre ROD e melanização, independente de outros processos intermediários da embriogênese. Verificamos que os ovos da linhagem GORO são muito mais sensíveis à exposição ao seco durante a embriogênese que os embriões selvagens, melanizados.

O conjunto dos resultados apresentados demonstra que em ovos de mosquitos, utilizados aqui como modelos para insetos, a aquisição de resistência à dessecação não é uma característica exclusivamente relacionada com a formação da CS, sendo também estreitamente dependente da melanização. No entanto, ainda não é possível precisar se esta melanização ocorre apenas no córion, apenas na CS ou em ambas as estruturas. A melanização, que também pode ser um indicador de esclerotização, é requisito fundamental para o sucesso adaptativo de insetos. Além disso, a decodificação do processo de ROD em insetos pode ser relevante tanto para estudos de ecologia e evolução quanto para a busca de novos alvos para o controle de vetores e pragas.

Agradecimentos

Ao Dr Phil Lounibos e ao FMEL pelo espaço para realização dos experimentos com a espécie *An. quadrimaculatus* e por toda ajuda na realização deste trabalho. Ao BEI Resources e ao *Malaria Research and Reference Reagent Resource Center* (MR4, NIH), por ceder os ovos de *An. quadrimaculatus*. À

Maria Cristina Carrasquilha, Tanise Stenn, Erick Blosser e Gabriela Maxxine pela ajuda com a manutenção das colônias de *An. quadrimaculatus*. À Jutta Linss pela ajuda com os ensaios bioquímicos de quantificação de quitina. À toda equipe do LAFICAVE pela ajuda com a obtenção dos espécimes de *Ae. aegypti*, *An. aquasalis* e *Cx. quinquefasciatus* e pelo apoio na realização deste trabalho.

Ao INCT-EM e ao programa Ciência sem Fronteiras, ambos do CNPq, pela bolsa de apoio financeiro.

Referências

- Beckel W 1958. Investigation of permeability, diapause and hatching in the eggs of the mosquito *Aedes hexodontus* Dyar. *Can J Zool* 36: 541-554.
- BEI 2014. Biodefense and Emerging Infections Research Resources Repository. Catalog. [Acessado em 18 de Julho de 2014]. Disponível em: www.beiresources.org/catalog/livingMosquitoes/MRA-891.aspx.
- Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, Drake JM, Brownstein JS, Hoen AG, Sankoh O, Myers MF, George DB, Jaenisch T, Wint GR, Simmons CP, Scott TW, Farrar JJ e Hay SI 2013. The global distribution and burden of dengue. *Nature* 496: 504-7.
- Chapman RF 1998. The insects - Structure and function, Cambridge University Press.
- Chown SL, Sorensen JG e Terblanche JS 2011. Walter loss in insects: an environmental change perspective. *J Insect Physiol* 57: 1070-84.
- Christophers S 1960. *Aedes aegypti* (L) The Yellow Fever Mosquito. Its Life History, Bionomics and Structure, Cambridge at the University Press, Cambridge.
- Clements A 1992. The Biology of Mosquitoes: Development, Nutrition and Reproduction., Chapman and Hall, London.
- Consoli RA e Lourenço-de-Oliveira R 1994. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil, Editora Fiocruz, Rio de Janeiro.
- Craig Jr G e Hickey W 1967. Genetics of *Aedes aegypti*. Genetics of insect vectors of disease. New York. NY Elsevier. p. 67 - 131.
- Farnesi LC, Brito JM, Linss JG, Pelajo-Machado M, Valle D e Rezende GL 2012. Physiological and Morphological Aspects of *Aedes aegypti* Developing Larvae: Effects of the Chitin Synthesis Inhibitor Novaluron. *PLoS ONE* 7: e30363.
- Farnesi LC, Martins AJ, Valle D e Rezende GL 2009. Embryonic development of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): influence of different constant temperatures. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104: 124-6.

- Gander R 1951. Experimentelle und oekologische Untersuchungen über das Schlupfvermögen der Larven von *Aedes aegypti* L. *Revue Suisse de Zoologie* 58: 215-278.
- Goltsev Y, Rezende GL, Vranizan K, Lanzaro G, Valle D e Levine M 2009. Developmental and evolutionary basis for drought tolerance of the *Anopheles gambiae* embryo. *Dev Biol* 330: 462-70.
- Gould EA e Solomon T 2008. Pathogenic flaviviruses. *Lancet* 371: 500-9.
- Harwood RF 1958. Development, structure, and function of coverings of eggs of floodwater mosquitoes. II. Postovarian structure. *Ann Ent Soc Am* 51: 464-471.
- Harwood RF e Horsfall WR 1959. Development, structure and function of coverings of eggs of floodwater mosquitoes. III: Functions of coverings. *Ann Entomol Soc Am* 52: 113-116.
- Hopkins TL e Kramer KJ 1992. Insect Cuticle Sclerotization. *Ann Review Entomol* 37: 273-302.
- Jacobs CG, Rezende GL, Lamers GE e van der Zee M 2013. The extraembryonic serosa protects the insect egg against desiccation. *Proc Biol Sci* 280: 20131082.
- Judson CL e Hokama Y 1965. Formation of the line of dehiscence in aedine mosquito eggs. *J Insect Physiol* 11: 337-338.
- Juliano SA e Philip Lounibos L 2005. Ecology of invasive mosquitoes: effects on resident species and on human health. *Ecol Letters* 8: 558-574.
- Kalmus H 1941. The resistance to desiccation of *Drosophila* mutants affecting body colour. *Proc Royal Soc London* 130: 185-201.
- Lehmann PF e White LO 1975. Chitin assay used to demonstrate renal localization and cortisone-enhanced growth of *Aspergillus fumigatus* mycelium in mice. *Infect Immun* 12: 987-92.
- Li J e Christensen BM 1993. Involvement of l-tyrosine and phenol oxidase in the tanning of *Aedes aegypti* eggs. *Insect Bioch Mol Biol* 23: 739-748.
- Li JS e Li J 2006. Major chorion proteins and their crosslinking during chorion hardening in *Aedes aegypti* mosquitoes. *Insect Bioch Mol Biol* 36: 954-964.
- Merzendorfer H 2012. Chitin synthesis inhibitors: old molecules and new developments. *Insect Sci* 20: 121-138.
- Monnerat AT, Soares MJ, Lima JB, Rosa-Freitas MG e Valle D 1999. *Anopheles albitarsis* eggs: ultrastructural analysis of chorion layers after permeabilization. *J Insect Physiol* 45: 915-922.
- Moussian B 2010. Recent advances in understanding mechanisms of insect cuticle differentiation. *Insect Bioch Mol Biol* 40: 363-375.
- Moussian B, Soding J, Schwarz H e Nusslein-Volhard C 2005. Retroactive, a membrane-anchored extracellular protein related to vertebrate snake neurotoxin-like proteins, is required for cuticle organization in the larva of *Drosophila melanogaster*. *Dev Dyn* 233: 1056-63.

- Parkash R, Rajpurohit S e Ramniwas S 2009. Impact of darker, intermediate and lighter phenotypes of body melanization on desiccation resistance in *Drosophila melanogaster*. *J Insect Sci* 9: 1-10.
- Powers AM 2010. Chikungunya. *Clinics in Laboratory Medicine* 30: 209-219.
- Raminani LN e Cupp EW 1975. Early embryology of *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). *International Journal of Insect Morphology and Embryology* 4: 517-528.
- Rezende GL 2008. Investigações sobre a aquisição de resistência à dessecação durante a embriogênese de *Aedes aegypti* e *Anopheles gambiae*. Doutorado. Biologia Celular e Molecular.
- Rezende GL, Martins AJ, Gentile C, Farnesi LC, Pelajo-Machado M, Peixoto AA e Valle D 2008. Embryonic desiccation resistance in *Aedes aegypti*: presumptive role of the chitinized serosal cuticle. *BMC Dev Biol* 8: 82.
- Telford A 1957. The pasture *Aedes* of central and northern California the egg stage: gross embryology and resistance to desiccation. *Ann Entomol Soc Am* 50: 537-543.
- True JR 2003. Insect melanism: the molecules matter. *Trends in Ecology & Evolution* 18: 640-647.
- Urbanski JM, Benoit JB, Michaud MR, Denlinger DL e Armbruster P 2010. The molecular physiology of increased egg desiccation resistance during diapause in the invasive mosquito, *Aedes albopictus*. *Proc Royal Soc B: Biol Sci* 277: 2683-2692.
- Valencia MD, Miller LH e Mazur P 1996. Permeability of intact and dechorionated eggs of the *Anopheles* mosquito to water vapor and liquid water: a comparison with *Drosophila*. *Cryobiology* 33: 142-8.
- Valle D, Monnerat AT, Soares MJ, Rosa-Freitas MG, Pelajo-Machado M, Vale BS, Lenzi HL, Galler R e Lima JBP 1999. Mosquito embryos and eggs: polarity and terminology of chorionic layers. *J Insect Physiol* 45: 701-708.
- Vargas HC, Farnesi LC, Martins AJ, Valle D e Rezende GL 2014. Serosal cuticle formation and distinct degrees of desiccation resistance in embryos of the mosquito vectors *Aedes aegypti*, *Anopheles aquasalis* and *Culex quinquefasciatus*. *J Insect Physiol* 62: 54-60.
- Vinogradova EB 2007. Diapause in aquatic insects, with emphasis on mosquitoes. Diapause in aquatic invertebrates, theory and human use. New York. Springer-Verlag. 83-113.
- Wittkopp PJ e Beldade P 2009. Development and evolution of insect pigmentation: Genetic mechanisms and the potential consequences of pleiotropy. *Seminars in Cell & Devel Biol* 20: 65-71.
- Wu X, Zhan X, Gan M, Zhang D, Zhang M, Zheng X, Wu Y, Li Z e He A 2013. Laccase2 is required for sclerotization and pigmentation of *Aedes albopictus* eggshell. *Parasitol Res* 112: 1929-34.
- Water Reed Biosystematics Unit 2014. Systematics Catalog of Culicidae. [Acessado em 20 de julho de 2014]. Disponível em: <http://www.mosquitocatalog.org/>

Zhang J e Zhu KY 2006. Characterization of a chitin synthase cDNA and its increased mRNA level associated with decreased chitin synthesis in *Anopheles quadrimaculatus* exposed to diflubenzuron. *Insect Bioch Mol Biol* 36: 712-25.

3.4) Capítulo 4

Este capítulo descreve resultados preliminares de microscopia eletrônica de transmissão em cascas de ovos de *Aedes aegypti*.

Esta etapa da tese foi realizada no Laboratório de Embriologia de Vertebrados (LEV), do Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, em colaboração com a Dra. Alice Helena dos Reis Ribeiro.

Avaliação da ultraestrutura da casca do mosquito *Aedes aegypti*

Ovos recém-postos de mosquitos são brancos, flexíveis e extremamente permeáveis. No início da embriogênese, seu revestimento é composto exclusivamente pelo córion, estrutura formada ainda no ovário da fêmea. O córion é composto por duas subcamadas: o exo e o endocóron (Clements 1992, Chapman 1998, Valle et al 1999, Monnerat et al 1999). O enrijecimento e o escurecimento dos ovos estão relacionados com a esclerotização e a melanização do endocóron, que ocorrem logo nas duas primeiras horas de desenvolvimento embrionário (Clements 1992, Li e Li 2006, Rezende 2008). Cerca de 10 horas depois, um grupo de células extra-embrionárias, denominadas coletivamente 'serosa', envolve completamente o embrião. As células da serosa sintetizam a cutícula serosa (CS), que se localiza imediatamente abaixo do endocóron. A partir desse momento, consideramos que a casca de mosquitos é composta de três camadas, da mais externa para a mais interna, respectivamente: exocóron, endocóron e cutícula serosa.

A formação da CS confere ao ovo resistência à dessecação, que permite a manutenção da viabilidade dos embriões em ambiente seco (Beckel 1958, Rezende et al 2008, Vargas et al 2014). Diferentes culicídeos possuem distintos níveis de resistência à dessecação. Vargas et al (2014) descrevem que, ao final da embriogênese, ovos de *Aedes aegypti*, *Anopheles aquasalis* e *Culex quinquefasciatus* são viáveis sob condições secas por 72, 24 e 5 horas, respectivamente.

Em adição à CS, acredita-se que outros fatores possam estar relacionados ao grau de resistência do ovo à dessecação (ROD), como por exemplo: presença de biomoléculas específicas, espessura do endocóron, grau de esclerotização e melanização do endocóron e mesmo da CS e a interação destas duas camadas (Beckel 1958, Harwood 1958, Rezende et al 2008). No entanto, a esclerotização e a melanização tornam-se, muitas vezes, entraves ao estudo da estrutura da casca, e até da embriogênese de culicídeos, por dificultar a realização de cortes histológicos e a visualização do interior dos ovos. Apesar disso, Monnerat et al (1999) obtiveram cortes longitudinais de ovos inteiros de *An. albiparvus*, o que permitiu a visualização da ultraestrutura do córion. Para tal, foi necessário utilizar benserazida, um inibidor

dos processos de esclerotização e melanização, em ovos que haviam sido postos há apenas 90 minutos, ou seja, antes da finalização do processo de enrijecimento da casca. Posteriormente, Rezende (2008) verificou que, de fato, a 28° C, a rigidez máxima da casca dos ovos de *Ae. aegypti* é atingida 3 horas e 20 minutos depois da postura, muito antes do surgimento da impermeabilização acarretada pela CS.

A estratégia diferencial aqui empregada foi a utilização de apenas cascas de ovos, rompidas, depois da eclosão das larvas. Se por um lado, a presença da CS e a rigidez máxima do endocórion são dificultadores potenciais ao processo, por outro lado, com o acesso dos reagentes químicos às faces interna e externa, a impregnação de toda a casca seria mais efetiva, o que poderia facilitar a preparação do material e a obtenção dos cortes.

Com essa abordagem, pretendemos investigar, através de microscopia eletrônica de transmissão (MET), a ultraestrutura da casca dos ovos de *Ae. aegypti*, *An. aquasalis* e *Cx. quinquefasciatus*. Esses experimentos são realizados com o intuito de avaliar se a estrutura e a espessura da casca destas espécies têm relação com os diferentes níveis de ROD. Até agora, temos resultados referentes a *Ae. aegypti*.

Foi utilizado o protocolo descrito por Monnerat et al (1999) com pequenas alterações. O exocórion foi retirado com hipoclorito de sódio contendo 5-6% de cloro ativo por 1 minuto, quando os ovos tinham completado cerca de 95% do desenvolvimento embrionário. Depois da eclosão das larvas, cascas de cerca de 20 ovos foram coletadas, pré-fixadas em glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,2 e formaldeído 4% durante a noite. A pós-fixação foi realizada em solução de tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,2 por 1 hora, seguida de desidratação seriada, com passagens de 10 minutos em acetona nas concentrações de 25, 50, 70, 90 e 100%. O material foi incluído em uma mistura de Resina Spurr e acetona, na proporção de 1:1 por 24 horas, seguido de inclusão em resina pura por mais 24 horas. Cortes ultrafinos de 60 a 70 nm foram obtidos em ultramicrótomo LKB, coletados em grades de cobre (300 mesh) e contrastados com acetato de uranila aquoso (2%) para posterior observação em microscópio eletrônico de transmissão (Zeiss 900), operado em 80 kv. Foram obtidas imagens digitais com 1024 x 1024 de resolução através do software iTEM.

A Figura mostra cortes de cascas de ovos de *Ae. aegypti*, onde são observados o endocócion e a cutícula serosa. O endocócion não é homogêneo, evidenciando dois estratos, sendo o externo mais delgado e elétron-denso. A face externa do endocócion exibe ondulações, corroborando microscopia eletrônica de varredura da superfície do endocócion desta espécie (Figura 4 do Capítulo 2 dos Resultados). Em anofelinos, não foram notadas ondulações proeminentes como as observadas no endocócion de *Ae. aegypti* (Monnerat et al 1999, Valle et al 1999, Figura 4 do Capítulo 2). A Figura também mostra que, em nossas condições, o endocócion de *Ae. aegypti* mede aproximadamente 2,5 μm de espessura, cerca de duas a quatro vezes mais que o de *An. albicans*, que tem de 0,6 a 1,2 μm (Monnerat et al 1999).

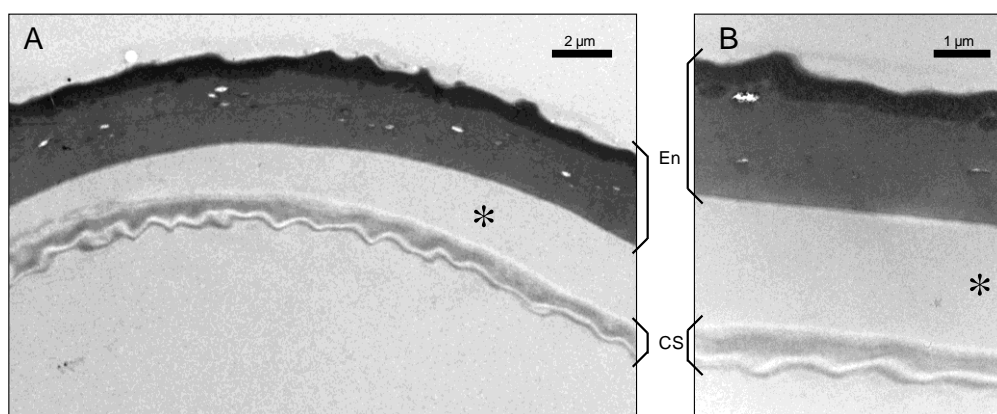


Figura: Ultraestrutura de cascas de ovos de *Ae. aegypti*. Cortes longitudinais de cascas fixadas foram avaliadas por microscopia eletrônica de transmissão (A, B). Tanto o endocócion (En) quanto a cutícula serosa (CS) apresentam estratos diferenciados. (*): espaço vazio produzido como artefato de preparação das amostras.

A cutícula serosa é interna ao endocócion, e contém estratos de elétron-densidade diferenciada. Nesta camada é a face interna que apresenta as ondulações mais evidentes. Duas camadas da CS são descritas em Orthoptera, uma externa, mais delgada, denominada 'cutícula amarela' e, internamente, a 'cutícula branca'. Quitina está presente na cutícula branca e sugeriu-se que a cutícula amarela possua lipídios (Slifer 1937, 1948). Assim como apontado para Orthoptera, Goltsev et al (2009) sugerem a participação de lipídios na CS do mosquito *An. gambiae*. A camada lipídica da cutícula serosa de insetos estaria envolvida com a impermeabilização. Acreditamos que a camada mais espessa e elétron-densa observada na CS de *Ae. aegypti*

poderia então ser composta por lipídeos. Atribuímos a lacuna observada entre o endocóron e CS a algum artefato durante a preparação.

Este experimento será repetido com *Ae. aegypti* e realizado também com *An. aquasalis* e *Cx. quinquefasciatus*. Os resultados serão avaliados comparativamente no contexto do fenômeno da resistência dos ovos à dessecação.

Referências

- Beckel W 1958. Investigation of permeability, diapause and hatching in the eggs of the mosquito *Aedes hexodontus* Dyar. *Can J Zool* 36: 541-554.
- Chapman RF 1998. The insects - Structure and function, Cambridge University Press,
- Clements A 1992. The Biology of Mosquitoes: Development, Nutrition and Reproduction., Chapman and Hall, London.
- Goltsev Y, Rezende GL, Vranizan K, Lanzaro G, Valle D e Levine M 2009. Developmental and evolutionary basis for drought tolerance of the *Anopheles gambiae* embryo. *Dev Biol* 330: 462-70.
- Harwood RF 1958. Development, structure, and function of coverings of eggs of floodwater mosquitoes. II. Postovarian structure. *Ann Ent Soc Am* 51: 464-471.
- Li JS e Li J 2006. Major chorion proteins and their crosslinking during chorion hardening in *Aedes aegypti* mosquitoes. *Insect Bioch Mol Biol* 36: 954-964.
- Monnerat AT, Soares MJ, Lima JB, Rosa-Freitas MG e Valle D 1999. *Anopheles albitarsis* eggs: ultrastructural analysis of chorion layers after permeabilization. *J Insect Physiol* 45: 915-922.
- Rezende GL 2008. Investigações sobre a aquisição de resistência à dessecação durante a embriogênese de *Aedes aegypti* e *Anopheles gambiae*. Doutorado. Biologia Celular e Molecular.
- Rezende GL, Martins AJ, Gentile C, Farnesi LC, Pelajo-Machado M, Peixoto AA e Valle D 2008. Embryonic desiccation resistance in *Aedes aegypti*: presumptive role of the chitinized serosal cuticle. *BMC Dev Biol* 8: 82.
- Slifer EH 1937. The origin and fatge of the Membrane surrounding the Grasshopper Egg; together with some Experiments on the Source of the Hatching Enzyme. *Quart. J Micr Sci* 79: 493-506.
- Slifer EH 1948. Isolation of a wax-like material from the shell of the grasshopper egg. *Discussion of Faraday Soc* 182-187.
- Valle D, Monnerat AT, Soares MJ, Rosa-Freitas MG, Pelajo-Machado M, Vale BS, Lenzi HL, Galler R e Lima JBP 1999. Mosquito embryos and eggs: polarity and terminology of chorionic layers. *J Insect Physiol* 45: 701-708.

Vargas HC, Farnesi LC, Martins AJ, Valle D e Rezende GL 2014. Serosal cuticle formation and distinct degrees of desiccation resistance in embryos of the mosquito vectors *Aedes aegypti*, *Anopheles aquasalis* and *Culex quinquefasciatus*. *J Insect Physiol* 62: 54-60.

4) DISCUSSÃO GERAL E PERSPECTIVAS

A fase de ovo é a única do ciclo de vida dos mosquitos na qual a dispersão ativa não é possível. Apesar dos culicídeos vetores serem objeto de estudo em diversas áreas de pesquisa, e do potencial relevante desta fase como alvo de controle, pouco foco é direcionado nesse sentido (Beament 1989, Monnerat et al 1999).

Em relação à embriogênese, de maneira geral, para culicídeos, embora muitos esforços tenham sido investidos entre as décadas de 1940 e 1970 (Woodhill 1948, Telford 1957, Beckel 1958, Harwood 1958, Rosay 1959, Christophers 1960, Judson e Hokama 1965, Trpis 1970, 1973, Raminani e Cupp 1975), até próximo dos anos 2000 muitas lacunas ainda estavam por preencher. Nesse sentido, importantes parâmetros fisiológicos da embriogênese de espécies vetoras, descritas como de importância médica há mais de 100 anos (Consoli e Lourenço-de-Oliveira 1994), foram recentemente abordados (Farnesi et al 2009, Vargas et al, 2014).

No presente trabalho, o desenvolvimento embrionário dos mosquitos é abordado sob uma dupla perspectiva: ampliar os conhecimentos relativos à biologia do desenvolvimento e elucidar a fisiologia da aquisição de resistência dos ovos à dessecação (ROD). A decodificação desse processo chave, que permite aos embriões manter sua viabilidade diante das variações dos níveis ambientais de umidade relativa, pode ser importante também para o desenvolvimento de novas ferramentas de controle de vetores. Nesse sentido, vários aspectos da embriogênese de culicídeos foram abordados aqui, de forma comparativa. Inicialmente nosso objetivo foi estudar a generalidade da aquisição de ROD em espécies de mosquitos de importância médica de três diferentes gêneros, com nichos ecológicos e histórias de vida distintas (Reidenbach et al 2009).

Primeiramente foram investigados os níveis de ROD e sua relação com a formação da cutícula serosa nas espécies *Ae. aegypti*, *An. aquasalis* e *Cx. quinquefasciatus*; os resultados estão no Item 3.1 (Vargas et al 2014). Como pré-requisito para análises comparativas, verificamos, de forma precisa,

o tempo necessário para o término do desenvolvimento embrionário de cada espécie. Esse conhecimento possibilitou avaliações posteriores, em nível de percentual do tempo de desenvolvimento total, tanto da cinética de aquisição de ROD, quanto do estágio morfológico dos embriões dos diferentes culicídeos ao adquirirem essa característica. É importante ressaltar que a análise do tempo gasto com a embriogênese pode gerar informações relevantes sobre estes culicídeos, relacionadas com seus nichos ecológicos, número de gerações em um dado período de tempo ou ainda competição interespecífica. Por exemplo, em situações em que espécies de imaturos coabitam a mesma coleção de água, aquela que eclode e se desenvolve mais rapidamente terá vantagem na utilização de recursos. Em adição aos aspectos intrínsecos de cada espécie, ocorre influência de componentes abióticos, como a temperatura, sobre o tempo de desenvolvimento embrionário de culicídeos. Todos os experimentos desta tese foram realizados a 25 °C, temperatura que não tem influência negativa sobre a viabilidade dos embriões: ao contrário, corresponde à maior taxa de viabilidade de ovos de *Ae. aegypti* (Farnesi et al 2009).

Confirmamos que, embora menos que *Ae. aegypti*, ovos de *An. aquasalis* e *Cx. quinquefasciatus* também desenvolvem algum grau de resistência à dessecação no decurso da embriogênese, como descrito por Martins (2002). A aquisição de resistência à dessecação (medida pela capacidade de se contrapor ao murchamento, depois de exposição ao seco por 15 minutos, no primeiro terço da embriogênese) é concomitante com a formação da cutícula serosa, exatamente como ocorre para *Ae. aegypti* (Rezende et al 2008) e *An. gambiae* (Goltsev et al 2009). O estágio morfológico da embriogênese, no momento em que os ovos se tornam impermeáveis, também revela alguma variação entre as espécies. Finalmente, a relevância fisiológica da ROD foi avaliada depois de expor embriões tardios ao seco por diferentes períodos de tempo. As três espécies exibiram diferentes níveis de viabilidade: alto, para *Ae. aegypti*, médio para *An. aquasalis* e, para *Cx. quinquefasciatus*, baixo (Item 3.1). Vale lembrar que *Ae. aegypti* deposita seus ovos próximo às coleções de água parada que irão se tornar criadouros dos estágios imaturos, enquanto as outras espécies aqui avaliadas depositam ovos diretamente sobre a superfície da água (Christophers 1960, Consoli e

Lourenço-de-Oliveira 1994). Foi interessante notar que o mosquito anofelino apresenta nível intermediário de ROD apesar de ser a espécie filogeneticamente mais distante das outras e de, na natureza, depositar seus ovos em grandes coleções de água que, em geral, são duradouras (Sinka et al 2010). Em contraposição, *Cx. quinquefasciatus*, a espécie com menor ROD, deposita seus ovos em criadouros que podem ser temporários (Consoli e Lourenço-de-Oliveira 1994). Há relato, para outra espécie do gênero *Anopheles*, de resistência branda dos ovos à dessecação, por até 10 dias em condições de baixa umidade (Shiliu et al 2004). Assim, a ROD intermediária característica dos anofelinos pode ter sido determinante para a conquista de ambientes com disponibilidade variável de água.

O elevado nível de ROD que detectamos em *Ae. aegypti* corrobora a grande viabilidade de seus ovos em condições secas, por meses, até que ocorra inundação do criadouro, algumas vezes em estação chuvosa subsequente àquela da postura (Christophers 1960). Acreditamos que esta característica, de ROD elevada, também possa estar envolvida com a capacidade dos ovos de *Ae. aegypti* de suportar variações ambientais, o que teria impacto na epidemiologia e na distribuição dos parasitas que transmite, como dengue e chikungunya, atualmente em processo de disseminação no globo terrestre (Bhatt et al 2013, Vega-Rúa et al 2014).

A constatação de que as espécies de culicídeos exibem distintos níveis de ROD estimulou investigações para entender a natureza de tais diferenças. Inicialmente questionamos se grandezas físicas dos ovos têm relação com o grau de ROD. Foram encontradas diferenças significativas de tamanho e de peso dos ovos entre as espécies, embora sem relação aparente com o nível de ROD, quando cada grandeza foi avaliada de forma isolada. Por exemplo, ovos de *Ae. aegypti*, com ROD mais elevada, são os que apresentam o maior volume entre as espécies avaliadas. Esses dados corroboram Sota e Mogi (1992) em relação aos culicídeos do gênero *Aedes*, segundo os quais ovos de maior volume são os mais resistentes ao seco. Entretanto não foi possível estabelecer uma correlação positiva entre volume dos ovos e nível de ROD para as outras espécies: ovos de *Cx. quinquefasciatus* são quase tão volumosos quanto os de *Ae. aegypti* e possuem a ROD mais baixa. Apesar disto, cálculo da densidade superficial das cascas (peso da casca / área do

ovo), sugere que ovos mais resistentes ao seco tendem a ter cascas com menor densidade (Item 3.3, Figura 3, eixo-x).

Confirmamos também que há crescimento dos ovos ao longo do desenvolvimento embrionário, como descrito anteriormente por Gander (1951). A propósito, grandes diferenças foram encontradas quando avaliamos a expansão de área e volume dos ovos, maior em *Cx. quinquefasciatus*, seguida de *An. aquasalis* e *Ae. aegypti*, o oposto do que foi observado para os níveis de ROD. Ou seja, os dados obtidos pareciam sugerir correlação inversa entre níveis de expansão dos ovos e níveis de ROD: quanto maior a expansão, menor a ROD. No entanto, uma vez que as medidas de área e volume não foram feitas em momentos fisiologicamente equivalentes nas três espécies, não foi possível, ainda, confirmar esta aparente relação.

De maneira geral, *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus* se aproximam nas grandezas físicas avaliadas, de tamanho e volume, enquanto as maiores diferenças foram observadas em *An. aquasalis*. Em oposição, nas análises de ROD do Item 3.1, *Ae. aegypti* se aproximou mais de *An. aquasalis* em diversas características. Finalmente, análises de microscopia eletrônica de varredura revelaram, apenas em *Ae. aegypti*, ondulações na superfície do endocóxon, cuja influência em sua forte resistência à dessecação resta investigar.

Envolvimento de ROD com a cutícula serosa de insetos é conhecido. Por outro lado, a formação da CS, que possui quitina em sua composição, é independente dos eventos de escurecimento e enrijecimento da casca dos ovos, que ocorrem nas primeiras horas de desenvolvimento embrionário (Li e Christensen 1993, Rezende 2008, Rezende et al 2008, Goltsev et al 2009, Jacobs et al 2013). No entanto, o elevado nível de expressão, na serosa de ovos de *An. gambiae*, de alguns genes relacionados com a melanização e esclerotização, indicam a possibilidade do envolvimento desses processos com a ROD (Goltsev et al 2009). Adicionalmente, destacam-se também estudos com insetos em diferentes estágios do ciclo de vida, imaturos e adultos, que apontam para a relação entre melanização e resistência à aridez (Kalmus 1941, True 2003, Wittkopp e Beldade 2009). Tendo em vista este cenário, investigamos se o conteúdo de quitina e o grau de melanização das cascas dos ovos de culicídeos teriam relação com a ROD. Considerando que ao final do desenvolvimento existem duas cutículas envolvendo os embriões tardios, a da

serosa e a da larva farata, tomamos o cuidado de desacoplar a interferência potencial que a cutícula larval poderia exercer sobre nossas avaliações de ROD. Nesse sentido, diferente do Item 3.1, todas as análises de exposição dos ovos ao seco apresentadas no Item 3.3 foram realizadas durante a primeira metade da embriogênese.

Investigamos a viabilidade de embriões expostos ao seco antes e após a formação da CS. Em todos os casos e de maneira geral a viabilidade foi menor quando os embriões foram expostos antes da formação da CS, corroborando o que foi descrito por Rezende et al (2008) para *Ae. aegypti* e por Goltsev et al (2009) para *An. gambiae*. É interessante comparar a ROD medida pela viabilidade dos ovos expostos ao seco até a primeira metade (Item 3.3) ou ao fim da embriogênese (Item 3.1). Não há, em nenhuma espécie, aumento na viabilidade entre a metade da embriogênese e seu final. Ou seja, a ROD está relacionada exclusivamente com a estrutura e com os componentes da casca formados até aquele momento. A formação da cutícula da larva ou de quaisquer outros componentes larvais (metabólitos, por exemplo) não conferem ROD adicional.

Observamos que ovos mais melanizados são também os que mais resistem ao seco, ou seja, que apresentam ROD mais elevada. O mutante de *An. quadrimaculatus* GORO, de coloração dourada em todas as fases do desenvolvimento, gerado há décadas (BEI 2014) e que praticamente ainda não havia sido investigado, possibilitou avaliar diretamente a interferência do grau de melanização na ROD. Esta ideia de investigar a influência da melanização na permeabilidade dos ovos surgiu há cerca de 15 anos atrás, fruto de colaboração entre a Dra Denise Valle e o Dr Peter Mazur, este da University of Tennessee, EUA. Os experimentos iniciais com *An. quadrimaculatus* já sugeriam que o mutante 'Golden Cuticle' era mais permeável que a linhagem selvagem. Além destes, os experimentos de transcriptoma realizados pelo Dr Gustavo Rezende, em colaboração com o Dr Michael Levine, da University of Califórnia, Berkeley, EUA, apontavam para a participação de genes relacionados com a melanização no momento de síntese da cutícula serosa de *An. gambiae*. Este conjunto de evidências indicava a necessidade de trabalhar com *An. quadrimaculatus*, em especial com o mutante dourado. Uma vez que tal espécie não pode ser manipulada em nosso país, esta etapa do trabalho foi

realizada no laboratório do Dr Phillip Lounibos, no Florida Medical Entomology Laboratory, University of Florida, EUA.

Embriões GORO exibem resistência ao seco quando expostos por 15 minutos depois da formação da CS. No entanto, quando este intervalo é superior a 2 horas, embriões GORO são muito mais sensíveis que embriões selvagens. Estes resultados demonstraram relação estreita entre o processo de melanização da casca dos ovos e a ROD de insetos, para longos períodos. Por outro lado, resistência dos ovos GORO ao seco por 15 minutos mostra que componentes da cutícula serosa são suficientes para protegê-los neste curto período de exposição. Nossa hipótese é que quitina e cera, depositadas na cutícula serosa desde o início de sua formação, sejam alguns destes componentes. Conjugando os resultados obtidos com *Ae. aegypti*, *An. aquasalis* e *Cx. quinquefasciatus* com as evidências diretas encontradas com o mutante GORO, estamos convencidos de que a melanização da casca é requisito fundamental para o sucesso adaptativo de culicídeos que realizam algum tipo de dormência embrionária. Este é o caso da quiescência em *Ae. aegypti* e da diapausa em *Ae. albopictus* (Denlinger e Armbruster 2014), ambos com cascas muito melanizadas.

Nossos resultados indicam que a aquisição de ROD nos culicídeos é um processo de fato multifatorial. Com o intuito de esgotar as abordagens de análise, iniciamos ensaios para investigar se há relação entre ROD e a ultraestrutura das cascas dos ovos das diferentes espécies. Essas análises até o momento foram realizadas apenas com *Ae. aegypti*.

Ainda existem lacunas relacionadas à ROD, por exemplo, a investigação do papel dos lipídios. Vale lembrar que Goltsev et al (2009) identificaram que uma enzima importante para a síntese de ceras é expressa na serosa de *An. gambiae* no momento em que a CS é secretada. Essa descoberta é coerente quando comparada à composição conhecida da CS em outros insetos. No ortóptero *Melanoplus differentialis* sugeriu-se que uma camada lipídica externa e fina faz parte da CS (Slifer 1937, 1948). Uma camada de cera é depositada ao redor dos embriões do hemíptero *Rhodnius prolixus* depois da formação da serosa, aumentando-lhes a resistência à dessecação (Beament 1989). Também foi sugerido que uma camada de cera da CS seria fator importante para a resistência à dessecação de embriões de

espécies do gênero *Aedes* (Beckel 1958, Clements 1992). Tal camada de cera ainda não foi identificada em mosquitos. Nosso grupo atualmente trabalha na investigação de componentes lipídicos da casca, utilizando como modelo o besouro *T. castaneum*.

Acreditamos que a investigação minuciosa da ROD, processo-chave para o sucesso adaptativo de muitos insetos, é pertinente tanto no âmbito da ecologia e evolução dos insetos, quanto na busca de novos alvos para o controle de vetores e pragas.

5) CONCLUSÕES

1. O período de desenvolvimento embrionário varia entre as espécies *Ae. aegypti*, *An. aquasalis*, *An. quadrimaculatus* e *Cx. quinquefasciatus*.
2. Ovos de mosquitos de todas as espécies avaliadas adquirem resistência à dessecação no primeiro terço da embriogênese, devido à formação da matriz extracelular denominada cutícula serosa (CS).
3. O surgimento da CS ocorre durante a extensão da banda germinal em embriões de *Ae. aegypti*, *An. aquasalis* e *An. quadrimaculatus* e um pouco mais tardiamente (retração da banda germinal) em embriões de *Cx. quinquefasciatus*.
4. A ROD adquirida na primeira metade do desenvolvimento embrionário, relacionada à formação da CS, não é aumentada ao final do desenvolvimento pela formação da cutícula da larva.
5. A exemplo de *Ae. aegypti*, a CS de *An. aquasalis* e *Cx. quinquefasciatus* possui quitina.
6. Há tendência de correlação direta entre a quantidade de quitina nas cascas dos ovos e o nível de resistência dos ovos à dessecação (ROD).
7. Peso, comprimento, largura, área e volume dos ovos de culicídeos variam significativamente entre as espécies. Entretanto, quando avaliadas individualmente, não mostram correlação com os distintos níveis de ROD observados.
8. Ondulações foram observadas em toda a superfície do endocórion de *Ae. aegypti*, mas não em *An. aquasalis* e *Cx. quinquefasciatus*.

9. O grau de melanização da casca de ovos de mosquitos é relevante para o nível de ROD em culicídeos. Ovos mais melanizados resistem mais ao seco.

6) REFERÊNCIAS

- Beament J 1989. John Hull Grundy lecture. Eggs - the neglected insects. *J Royal Army Medical Corps* 135: 49-56.
- Beauty BJ e Marquardt WC 1996. II. Fleas and the agents they transmit. *The Biology of Disease Vectors*. University Press of Colorado.
- Beckel W 1958. Investigation of permeability, diapause and hatching in the eggs of the mosquito *Aedes hexodontus* Dyar. *Can Jf Zool* 36: 541-554.
- BEI 2014. Biodefense and Emerging Infections Research Resources Repository. Catalog. [Acessado em 18 de Julho de 2014]. Disponível em: www.beiresources.org/catalog/livingMosquitoes/MRA-891.aspx.
- Benedict MQ e Robinson AS 2003. The first releases of transgenic mosquitoes: an argument for the sterile insect technique. *Trends Parasitol* 19: 349-55.
- Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, Drake JM, Brownstein JS, Hoen AG, Sankoh O, Myers MF, George DB, Jaenisch T, Wint GR, Simmons CP, Scott TW, Farrar JJ e Hay SI 2013. The global distribution and burden of dengue. *Nature* 496: 504-7.
- Borror JD e DeLong DM 1988. Introdução ao estudo dos insetos, Edgar Blucher, São Paulo.
- Braga IA, Lima JBP, Cunha SP, Soares SS, Melo RCGM, Valle D 2004. *Aedes aegypti* resistance to temephos during 2001 in several municipalities in Rio de Janeiro, Sergipe and Alagoas States, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99: 199-203.
- Brown JE, McBride CS, Johnson P, Ritchie S, Paupy C, Bossin H, Lutomiah J, Fernandez-Salas I, Ponlawat A, Cornel AJ, Black WCt, Gorrochotegui-Escalante N, Urdaneta-Marquez L, Sylla M, Slotman M, Murray KO, Walker C e Powell JR 2011. Worldwide patterns of genetic differentiation imply multiple 'domestications' of *Aedes aegypti*, a major vector of human diseases. *Proc Biol Sci* 278: 2446-54.
- Brusca R e Brusca G 2007. Invertebrates, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
- Burattini MN, Chen M, Chow A, Coutinho FA, Goh KT, Lopez LF, Ma S e Massad E 2008. Modelling the control strategies against dengue in Singapore. *Epidemiol Infect* 136: 309-19.
- Carvalho SC, Martins Junior Ade J, Lima JB e Valle D 2002. Temperature influence on embryonic development of *Anopheles albitarsis* and *Anopheles aquasalis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97: 1117-20.
- Chapman RF 1998. The insects - Structure and function, Cambridge University Press.
- Christophers S 1960. *Aedes aegypti* (L) The Yellow Fever Mosquito. Its Life History, Bionomics and Structure, Cambridge at the University Press, Cambridge.
- Clements A 1992. The Biology of Mosquitoes: Development, Nutrition and Reproduction. Chapman and Hall, London.

- Coetzee M e Koekemoer LL 2013. Molecular systematics and insecticide resistance in the major African malaria vector *Anopheles funestus*. *Annu Rev Entomol* 58: 393-412.
- Consoli RA e Lourenço-de-Oliveira R 1994. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil, Editora Fiocruz, Rio de Janeiro.
- Cornel AJ, McAbee RD, Rasgon J, Stanich MA, Scott TW e Coetzee M 2003. Differences in extent of genetic introgression between sympatric *Culex pipiens* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) in California and South Africa. *J Med Entomol* 40: 36-51.
- Cui F, Raymond M e Qiao CL 2006. Insecticide resistance in vector mosquitoes in China. *Pest Manag Sci* 62: 1013-22.
- Davis GK e Patel NH 2002. Short, long, and beyond: molecular and embryological approaches to insect segmentation. *Ann Rev Entomol* 47: 669-99.
- Delinger DL e Armbruster PA 2014. Mosquito Diapause. *Ann Rev Entomol* 59.
- Dupont-Rouzeyrol M, Caro V, Guillaumot L, Vazeille M, D'Ortenzio E, Thiberge JM, Baroux N, Gourinat AC, Grandadam M e Failloux AB 2012. Chikungunya virus and the mosquito vector *Aedes aegypti* in New Caledonia (South Pacific Region). *Vector Borne Zoonotic Dis* 12: 1036-41.
- Farnesi LC, Brito JM, Linss JG, Pelajo-Machado M, Valle D e Rezende GL 2012. Physiological and Morphological Aspects of *Aedes aegypti* Developing Larvae: Effects of the Chitin Synthesis Inhibitor Novaluron. *PLoS ONE* 7: e30363.
- Farnesi LC, Martins AJ, Valle D e Rezende GL 2009. Embryonic development of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): influence of different constant temperatures. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104: 124-6.
- Floore TG 2006. Mosquito larval control practices: past and present. *J Am Mosq Control Assoc* 22: 527-33.
- Fonseca RN, Gomes H e Araújo H 2012. Tópicos Avançados em Entomologia Molecular. Capítulo 2. Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular.
- Forattini OP, Gomes Ade C, Santos JL, Kakitani I e Marucci D 1990. Frequency in human environment and dispersion of Culicidae mosquitoes in an area adjacent to a primitive Atlantic plain forest. *Rev Saude Publica* 24: 101-7.
- Forattini OP 1996. Culicidologia Médica. Volume 2. Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Gander R 1951. Experimentelle und oekologische Untersuchungen über das Schlupfvermögen der Larven von *Aedes aegypti* L. *Revue Suisse de zoologie* 58: 215-278.
- Ghosh SK e Dash AP 2007. Larvivorous fish against malaria vectors: a new outlook. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 101: 1063-4.
- Gibbs AG 1998. Water-proofing properties of cuticular lipids. *Am Zoologist* 38: 471-482.

- Goltsev Y, Fuse N, Frasch M, Zinzen RP, Lanzaro G e Levine M 2007. Evolution of the dorsal-ventral patterning network in the mosquito, *Anopheles gambiae*. *Dev* 134: 2415-24.
- Goltsev Y, Rezende GL, Vranizan K, Lanzaro G, Valle D e Levine M 2009. Developmental and evolutionary basis for drought tolerance of the *Anopheles gambiae* embryo. *Dev Biol* 330: 462-70.
- Graf JF 1993. The role of insect growth regulators in arthropod control. *Parasitol Today* 9: 471-4.
- Greene EA, Codomo CA, Taylor NE, Henikoff JG, Till BJ, Reynolds SH, Enns LC, Burtner C, Johnson JE, Odden AR, Comai L e Henikoff S 2003. Spectrum of Chemically Induced Mutations From a Large-Scale Reverse-Genetic Screen in Arabidopsis. *Genetics* 164: 731-740.
- Grimaldi DE, Engel MS 2005. Evolution of the insects. Cambridge University Press.
- Harbach RE 2007. The Culicidae (Diptera): a review of taxonomy, classification and phylogeny. *Zootaxa* 1668: 591-638.
- Harwood RF 1958. Development, structure, and function of coverings of eggs of floodwater mosquitoes. II. Postovarian structure. *Ann. Ent. Sot. Am.* 51: 464-471.
- Harwood RF e Horsfall WR 1959. Development, structure and function of coverings of eggs of floodwater mosquitoes. III: Functions of coverings. *Ann Entomological Soc Am* 52: 113-116.
- Hopkins TL e Kramer KJ 1992. Insect Cuticle Sclerotization. *Ann Review Entomol* 37: 273-302.
- Impoinvil DE, Cardenas GA, Gihture JI, Mbogo CM e Beier JC 2007. Constant temperature and time period effects on *Anopheles gambiae* egg hatching. *J Am Mosq Control Assoc* 23: 124-30.
- Jacobs CG, Rezende GL, Lamers GE e van der Zee M 2013. The extraembryonic serosa protects the insect egg against desiccation. *Proc Biol Sci* 280: 20131082.
- Jahn TL 1935. Nature and permeability of grasshopper eggs membranes II. Chemical composition of membranes. *Proc Soc for Experimental Biol and Med* 33:159-163.
- Juarez MP e Fernandez GC 2007. Cuticular hydrocarbons of triatomines. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 147: 711-730.
- Judson CL e Hokama Y 1965. Formation of the line of dehiscence in aedine mosquito eggs. *J Insect Physiol* 11: 337-338.
- Juliano SA e Philip Lounibos L 2005. Ecology of invasive mosquitoes: effects on resident species and on human health. *Ecol Letters* 8: 558-574.
- Jupp PG, McIntosh BM, Dos Santos I e DeMoor P 1981. Laboratory vector studies on six mosquito and one tick species with chikungunya virus. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 75: 15-9.

- Kalmus H 1941. The resistance to desiccation of *Drosophila* mutants affecting body colour. *Proc Royal Soc London* 130: 185-201.
- Khalil HA-A, Ayman AE-B, Ahmed HAE, Abdullah MA-J, Al-Zubiany SF e El-Kheir DI 2008. A Study on Culex Species and Culex Transmitted Diseases in Al-Madinah Al-Munawarah, Saudi Arabia. *Parasitologists United J* 1: 101-108.
- Kliwer JW 1961. Weight and Hatchability of *Aedes aegypti* Eggs (Diptera: Culicidae). *Ann Entomol Soc Am* 54: 912-917.
- Lacey LA 2007. *Bacillus thuringiensis* serovariety israelensis and *Bacillus sphaericus* for mosquito control. *J Am Mosq Control Assoc* 23: 133-63.
- Li J 1994. Egg chorion tanning in *Aedes aegypti* mosquito. *Comp Bioch Physiol A Physiol* 109:835-843.
- Li J e Christensen BM 1993. Involvement of l-tyrosine and phenol oxidase in the tanning of *Aedes aegypti* eggs. *Insect Bioch Mol Biol* 23: 739-748.
- Li JS e Li J 2006. Major chorion proteins and their crosslinking during chorion hardening in *Aedes aegypti* mosquitoes. *Insect Bioch Mol Biol* 36: 954-964.
- Lima JB, de Melo NV e Valle D 2005. Residual effect of two *Bacillus thuringiensis* var. israelensis products assayed against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in laboratory and outdoors at Rio de Janeiro, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 47: 125-30.
- Lima MM, Aragão MB e Amaral RdS 1988. Criadouros de *Aedes aegypti* encontrados em alguns bairros da cidade do Rio de Janeiro, RJ, Brasil, em 1984-85. *Cadernos de Saúde Pública* 4: 293-300.
- Maciel-de-Freitas R, Aguiar R, Bruno RV, Guimaraes MC, Lourenco-de-Oliveira R, Sorgine MH, Struchiner CJ, Valle D, O'Neill SL e Moreira LA 2012. Why do we need alternative tools to control mosquito-borne diseases in Latin America? *Mem Inst Oswaldo Cruz* 107: 828-9.
- Martins AJ 2002. Investigação da permeabilidade de ovos de culicídeos como requisito para a manutenção de mosquitos transgênicos. Monografia. Faculdade de Ciências Biológicas (FCB-UFRJ).
- McMeniman CJ, Lane RV, Cass BN, Fong AWC, Sidhu M, Wang Y-F e O'Neill SL 2009. Stable Introduction of a Life-Shortening *Wolbachia* Infection into the Mosquito *Aedes aegypti*. *Science* 323: 141-144.
- Merzendorfer H 2012. Chitin synthesis inhibitors: old molecules and new developments. *Insect Sci* 20: 121-138.
- Merzendorfer H e Zimoch L 2003. Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. *J Exp Biol* 206: 4393-412.
- Mieli MV, Maticchiero AC, Muttis E, Fonseca DM, Aliota MT e Kramer LD 2013. Vector competence of Argentine mosquitoes (Diptera: Culicidae) for West Nile virus (Flaviviridae: Flavivirus). *J Med Entomol* 50: 853-62.
- Monnerat AT, Machado MP, Vale BS, Soares MJ, Lima JB, Lenzi HL e Valle D 2002. *Anopheles albitarsis* embryogenesis: morphological identification of major events. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97: 589-96.

- Monnerat AT, Soares MJ, Lima JB, Rosa-Freitas MG e Valle D 1999. *Anopheles albitarsis* eggs: ultrastructural analysis of chorion layers after permeabilization. *J Insect Physiol* 45: 915-922.
- Montella IR, Martins AJ, Viana-Medeiros PF, Lima JB, Braga IA e Valle D 2007. Insecticide resistance mechanisms of Brazilian *Aedes aegypti* populations from 2001 to 2004. *Am J Trop Med Hyg* 77: 467-77.
- Moreira LA, Iturbe-Ormaetxe I, Jeffery JA, Lu G, Pyke AT, Hedges LM, Rocha BC, Hall-Mendelin S, Day A, Riegler M, Hugo LE, Johnson KN, Kay BH, McGraw EA, van den Hurk AF, Ryan PA e O'Neill SL 2009. A Wolbachia Symbiont in *Aedes aegypti* Limits Infection with Dengue, Chikungunya, and Plasmodium. *Cell* 139: 1268-1278.
- Nelson MJ 1986. *Aedes aegypti*: biologia y ecologia. Organización Panamericana de la Salud, Washington, DC.
- OMSa 2014. Vacina Dengue. [Acessado em 30 de julho de 2014]. Disponível em:
http://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=2557:opas-oms-no-brasil-apoia-grupo-trabalho-ministerio-saude-preparacao-introducao-vacina-dengue&Itemid=777
- OMSb 2014. Organização Mundial de Saúde. Relatório sobre Malária. [Acessado em 20 de maio de 2014]. Disponível em:
http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2012/report/en/
- Phuc HK, Andreasen MH, Burton RS, Vass C, Epton MJ, Pape G, Fu G, Condon KC, Scaife S, Donnelly CA, Coleman PG, White-Cooper H e Alphey L 2007. Late-acting dominant lethal genetic systems and mosquito control. *BMC Biol* 5: 11.
- Price NR 1991. Insect resistance to insecticides: Mechanisms and diagnosis. *Comp Biochem Physiol* 100c: 319-326.
- Raminani LN e Cupp EW 1975. Early embryology of *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). *International J Insect Morphol and Embryol* 4: 517-528.
- Raminani LN e Cupp EW 1978. Embryology of *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae): organogenesis. *International Journal of Insect Morphology and Embryology* 7: 273-296.
- Reidenbach KR, Cook S, Bertone MA, Harbach RE, Wiegmann BM e Besansky NJ 2009. Phylogenetic analysis and temporal diversification of mosquitoes (Diptera: Culicidae) based on nuclear genes and morphology. *BMC Evol Biol* 9: 298.
- Rey L 2001. Parasitologia, 3ª Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
- Reynolds SE e Samuels RI 1996. Physiology and Biochemistry of Insect Moulting Fluid. *Advances in Insect Physiology*. Academic Press. 157-232.
- Rezende GL 2008. Investigações sobre a aquisição de resistência à dessecação durante a embriogênese de *Aedes aegypti* e *Anopheles gambiae*. Doutorado. Biologia Celular e Molecular.

- Rezende GL, Martins AJ, Gentile C, Farnesi LC, Pelajo-Machado M, Peixoto AA e Valle D 2008. Embryonic desiccation resistance in *Aedes aegypti*: presumptive role of the chitinized serosal cuticle. *BMC Dev Biol* 8: 82.
- Rosa-Freitas MG, Lourenco-de-Oliveira R, de Carvalho-Pinto CJ, Flores-Mendoza C e Silva-do-Nascimento TF 1998. Anopheline species complexes in Brazil. Current knowledge of those related to malaria transmission. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 93: 651-5.
- Rosay B 1959. Gross external morphology of embryos of *Culex tarsalis* Coquillett (Diptera: Culicidae). *Annals Entomological Society Am* 52: 481-484.
- Rose RI 2001. Pesticides and public health: integrated methods of mosquito management. *Emerg Infect Dis* 7: 17-23.
- Ross HH 1951. Conflict with *Culex*. *Mosq News* 11:128-132.
- Rozendaal JA 1997. Vector control: methods for use by individuals and communities. World Health Organization, Geneva.
- Rueda LM 2004. Pictorial keys for the identification of mosquitoes (Diptera : Culicidae) associated with Dengue Virus Transmission. *Zootaxa* 589 : ISBN 1-877354-46-5.
- Ruppert E e Barnes RD 2008. Zoologia dos Invertebrados, Roca São Paulo.
- Rutledge CR e Meek CL 1998. Distribution of the *Anopheles quadrimaculatus* sibling species complex in Louisiana. *The Southwestern entomologist* 23: 161-167.
- Sahu SS, Gunasekaran K, HKRaju, Vanamail P, Pradhan MM e Jambulingan P 2014. Response of malaria vectors to conventional insecticides in the southern districts of Odisha State, India. *Indian J Med Res* 139:294-300.
- Sanchez-Ribas J, Parra-Henao G e Guimaraes AE 2012. Impact of dams and irrigation schemes in Anopheline (Diptera: Culicidae) bionomics and malaria epidemiology. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 54: 179-91.
- Schmidt-Ott U 2005. Insect serosa: a head line in comparative developmental genetics. *Curr Biol* 15: R245-7.
- Shililu JI, Grueber WB, Mbogo CM, Githure JI, Riddiford LM e Beier JC 2004. Development and survival of *Anopheles gambiae* eggs in drying soil: influence of the rate of drying, egg age, and soil type. *J Am Mosq Control Assoc* 20: 243-7.
- Sinka ME, Rubio-Palis Y, Manguin S, Patil AP, Temperley WH, Gething PW, Van Boeckel T, Kabaria CW, Harbach RE e Hay SI 2010. The dominant *Anopheles* vectors of human malaria in the Americas: occurrence data, distribution maps and bionomic precis. *Parasit Vectors* 3: 72.
- Slifer EH 1937. The origin and fatge of the Membrane surrounding the Grasshopper Egg; together with some Experiments on the Source of the Hatching Enzyme. *Quart J Micr Sci* 79: 493-506.
- Slifer EH 1948. Isolation of a wax-like material from the shell of the grasshopper egg. *Discussion of Faraday Soc* 182-187.

- Sota T e Mogi M 1992. Survival time and resistance to desiccation of diapause and non-diapause eggs of temperate *Aedes* (Stegomyia) mosquitoes. *Entomol Experimentalis et Applicata* 63: 155-161.
- Sugumaram M 2009. Complexities of cuticular pigmentation in insects. *News and Views* 1755-148X.2009.00608.x.
- Telford A 1957. The pasture *Aedes* of central and northern California the egg stage: gross embryology and resistance to desiccation. *Annals Entomol Society Am* 50: 537-543.
- Trpis M 1970. A new bleaching and decalcifying method for general use in zoology. *Can J Zool* 48: 892-893.
- Trpis M, Haufe W e Shemanchuk J 1973. Embryonic development of *Aedes* (*O.*) *sticticus* (Diptera: Culicidae) in relation to different constant temperatures. *Can Entomol* 105: 43-50.
- True JR 2003. Insect melanism: the molecules matter. *Trends in Ecol & Evol* 18: 640-647.
- Urbanski JM, Benoit JB, Michaud MR, Denlinger DL e Armbruster P 2010. The molecular physiology of increased egg desiccation resistance during diapause in the invasive mosquito, *Aedes albopictus*. *Proc Royal Soc B: Biol Sci* 277: 2683-2692.
- Valle D, Belinato TA e Martins AJ 2014. Dengue: teoria e prática. Capítulo 5: Controle químico de *Aedes aegypti*, resistência a inseticidas e alternativas. Editora Fiocruz. *No prelo*.
- Valle D, Monnerat AT, Soares MJ, Rosa-Freitas MG, Pelajo-Machado M, Vale BS, Lenzi HL, Galler R e Lima JBP 1999. Mosquito embryos and eggs: polarity and terminology of chorionic layers. *J Insect Physiol* 45: 701-708.
- Vargas HC, Farnesi LC, Martins AJ, Valle D e Rezende GL 2014. Serosal cuticle formation and distinct degrees of desiccation resistance in embryos of the mosquito vectors *Aedes aegypti*, *Anopheles aquasalis* and *Culex quinquefasciatus*. *J Insect Physiol* 62: 54-60.
- Vega-Rúa A, Zouache K, Girod R, Failloux AB e Lourenco-de-Oliveira R 2014. High level of vector competence of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from ten American countries as a crucial factor in the spread of Chikungunya virus. *J Virol* 88: 6294-306.
- Vital W, Rezende GL, Abreu L, Moraes J, Lemos FJA, Vaz Jr IS, Logullo C 2010. Germ band retraction as a landmark in glucose metabolism during *Aedes aegypti* embryogenesis. *BMC Developmental Biol* 10:25.
- Wiegmann BM, Trautwein MD, Winkler IS, Barr NB, Kim J-W, Lambkin C, Bertone MA, Cassel BK, Bayless KM, Heimberg AM, Wheeler BM, Peterson KJ, Pape T, Sinclair BJ, Skevington JH, Blagoderov V, Caravas J, Kutty SN, Schmidt-Ott U, Kampmeier GE, Thompson FC, Grimaldi DA, Beckenbach AT, Courtney GW, Friedrich M, Meier R e Yeates DK 2011. Episodic radiations in the fly tree of life. *PNAS* 1012675108.
- Wittkopp PJ e Beldade P 2009. Development and evolution of insect pigmentation: Genetic mechanisms and the potential consequences of pleiotropy. *Seminars in Cell & Devel Bio* 20: 65-71.

Wolpert L e Tickle C 2011. Principles of development, Oxford University Press, Oxford New York.

Woodhill AR 1948. Observations on the comparative survival of various stages of *Aedes (Stegomyia) scutellaris* Walker and *Aedes (Stegomyia) aegypti* Linnaeus at varying temperatures and humidities. *Linn. Soc. New South Wales Proc.* 13: 413-418.

7) ANEXO

Farnesi LC, Brito JM, Linss JG, Pelajo-Machado M, Valle D, Rezende GL (2012) Physiological and morphological aspects of *Aedes aegypti* developing larvae: effects of the chitin synthesis inhibitor Novaluron. PLoS ONE 7(1): e30363. doi:10.1371/journal.pone.0030363.

Physiological and Morphological Aspects of *Aedes aegypti* Developing Larvae: Effects of the Chitin Synthesis Inhibitor Novaluron

Luana C. Farnesi^{1,2,3}, José M. Brito⁴, Jutta G. Linss^{1,2,3}, Marcelo Pelajo-Machado¹, Denise Valle^{1,2,3*}, Gustavo L. Rezende^{1,3,5*}

1 Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, **2** Instituto de Biologia do Exército, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, **3** Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, **4** Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, **5** Centro de Biotecnologia e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

Abstract

Population control of the dengue vector mosquito, *Aedes aegypti*, is difficult due to many reasons, one being the development of resistance to neurotoxic insecticides employed. The biosynthesis of chitin, a major constituent of insect cuticle, is a novel target for population control. Novaluron is a benzoylphenylurea (BPU) that acts as a chitin synthesis inhibitor, already used against mosquitoes. However, information regarding BPU effects on immature mosquito stages and physiological parameters related with mosquito larval development are scarce. A set of physiological parameters were recorded in control developing larvae and novaluron was administered continuously to *Ae. aegypti* larvae, since early third instar. Larval instar period duration was recorded from third instar until pupation. Chitin content was measured during third and fourth instars. Fourth instars were processed histochemically at the mesothorax region, stained with hematoxylin and eosin (HE) for assessment of internal tissues, and labeled with WGA-FITC to reveal chitinized structures. In control larvae: i) there is a chitin content increase during both third and fourth instars where late third instars contain more chitin than early fourth instars; ii) thoracic organs and a continuous cuticle, closely associated with the underlying epidermis were observed; iii) chitin was continuously present throughout integument cuticle. Novaluron treatment inhibited adult emergence, induced immature mortality, altered adult sex ratio and caused delay in larval development. Moreover, novaluron: i) significantly affected chitin content during larval development; ii) induced a discontinuous and altered cuticle in some regions while epidermis was often thinner or missing; iii) rendered chitin cuticle presence discontinuous and less evident. In both control and novaluron larvae, chitin was present in the peritrophic matrix. This study showed quantitatively and qualitatively evidences of novaluron effects on *Ae. aegypti* larval development. To our knowledge, this is the first report describing histological alterations produced by a BPU in immature vector mosquitoes.

Citation: Farnesi LC, Brito JM, Linss JG, Pelajo-Machado M, Valle D, et al. (2012) Physiological and Morphological Aspects of *Aedes aegypti* Developing Larvae: Effects of the Chitin Synthesis Inhibitor Novaluron. PLoS ONE 7(1): e30363. doi:10.1371/journal.pone.0030363

Editor: Peter K. Dearden, University of Otago, New Zealand

Received: July 11, 2011; **Accepted:** December 15, 2011; **Published:** January 24, 2012

Copyright: © 2012 Farnesi et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (Faperj) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) within the program Pronex - Rede Dengue. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: dvalle@ioc.fiocruz.br (DV); grezende@uenf.br (GLR)

Introduction

The mosquito *Aedes aegypti*, an important vector of arboviruses such as dengue fever, urban yellow fever and chikungunya [1,2] is a holometabolous insect possessing a life cycle with four stages: egg, four larval instars, pupa and adult. Being fundamentally aquatic, this mosquito reaches the terrestrial environment only as an adult [3]. Mosquitoes in all stages of post-embryonic life, like any insect, have their bodies covered with an integument composed of an innermost epidermal monolayer and an outermost complex extracellular matrix called cuticle [4]. Proper growth and development after egg hatching requires periodic molting which begins with apolysis, followed by production of a new cuticle and ending with ecdysis, the shedding of the old cuticle *per se* [3,4].

Insect molting depends, among other factors, of a precise interplay between biosynthesis and degradation of chitin, a

polysaccharide composed of N-acetylglucosamine residues and regarded as one of the major components of the insect cuticle [5,6]. In mosquitoes, chitin is present in the integumental cuticle and peritrophic matrix of larvae and adults and in the serosal cuticle of eggs [7,8].

Concerning *Ae. aegypti* control, in addition to the recommended mechanical elimination of breeding sites, those permanent recipients that cannot be discarded are generally treated with chemical insecticides. These compounds, that largely target the insect's central nervous system, are applied against immature stages in water being also sprayed against adults, mainly during dengue outbreaks [9,10]. The intensive use of neurotoxic insecticides for decades culminated in the loss of effectiveness due to resistance acquisition in several vector populations [11–13]. Therefore, novel substances with different target sites have been evaluated for *Ae. aegypti* control as well as for other arthropod

vectors and agricultural pests. Among these substances, Insect Growth Regulators such as chitin synthesis inhibitors (CSI) have been tested with promising results [14–16]. The CSIs are, mostly, compounds belonging to the benzoyl-phenyl-urea (BPU) class which were discovered in the 1970s and affect chitin biosynthesis, cuticle formation and the molting process [14,17]. BPUs act in larvae and pupae, hampering survival for the next molting [18,19].

More than forty articles in the literature show BPUs efficacy for mosquito vector control (e.g. [18] and references therein, [20–24]), including populations that are resistant to neurotoxic insecticides [25]. However, only few investigations followed the outcome of the treatment and reported that adults surviving BPU treatment were physiologically debilitated [24,26–30]. Additionally, even fewer studies describe the direct effects of BPU treatment on the immature stages of mosquitoes [26,31–33].

In Brazil, the National Dengue Control Program, from the Ministry of Health (PNCB/MS) recommends, in case of resistance to neurotoxic insecticides, the use of alternative larvicides already evaluated by PNCB/MS (i.e. tested under Brazilian climatic and operational conditions) and approved by WHO for use in potable water. The BPU novaluron is, among others, one such compound [34,35]. Due to the effectiveness of BPUs and their current use in *Ae. aegypti* control, it becomes increasingly necessary to characterize BPU-induced physiological alterations on this vector. This study has a dual role, first to understand different aspects of the physiology of *Ae. aegypti*'s larval molting process and second, to show novaluron effects on instar duration, chitin content and the structure of both the integument and internal tissues of developing mosquito larvae.

Methods

1. Mosquito rearing and synchronous development of larvae

Aedes aegypti mosquitoes from the insecticide-susceptible Rockefeller strain were used in all tests. Adults were kept at $25 \pm 1^\circ\text{C}$ and 70–80% r.h. [8]. To obtain synchronized developing larvae, eggs from colony stocks were used. For each experiment approximately 2,000 eggs were stimulated to hatch for 30 minutes in 200 mL plastic cups with 100 mL of rearing water, inside a B.O.D. incubator at $28 \pm 0.5^\circ\text{C}$. After 30 minutes, groups of 500 first instar larvae were transferred to plastic bowls containing 1 L of dechlorinated water and 1 g of cat food (Friskies®, Purina, Camaquã, RS, Brazil) and kept inside a B.O.D. incubator at $28 \pm 0.5^\circ\text{C}$ until the third instar was reached. Larvae were then used in assays in a climatized room (see section 2) or inside a B.O.D. incubator (see sections 3–7).

2. Analysis of development and viability parameters

Tests described in this section were performed in a climatized room with a less precise temperature control ($26 \pm 2.0^\circ\text{C}$) than a B.O.D. incubator. In parallel to the novaluron bioassays performed inside a B.O.D. incubator (described below in section 5), four cups with 10 larvae each were prepared under the same conditions of novaluron bioassays (control, EI_{50} and EI_{99}) for each experiment. These simultaneous samples were followed with three aims; i) confirm emergence inhibition rates as indicated by probit analysis, ii) evaluate novaluron action over each instar or stage duration period and iii) evaluate novaluron action over emerging adults (males and females) percentage in the partially lethal EI_{50} concentration. All tests were monitored until all adults emerged or until no live larvae or pupae were observed. At least three experiments were performed.

Since these tests were performed under slightly different temperature conditions from the bioassays (section 5), it is not feasible to directly compare results shown in Section 2 of Results (linked to this section of Methods) with those presented in Section 3 of Results (related to bioassay conditions, as described in sections 3, 4 and 5 below).

3. Follow up of larval instar duration

The follow up of larval instar period duration was done by counting exuviae eliminated during the molting process [3]. Larvae reached the third instar inside plastic bowls at 48 hours after hatching (HAH) (see Results) when they were transferred to 300 mL transparent plastic cups at the density of 10 larvae/cup, containing 150 mL of dechlorinated water and approximately 0.15 g of cat food. Third instar larvae (L3) were periodically observed at hourly intervals until the first exuviae came out, indicating the emergence of the earliest fourth instar larvae (L4). At this moment larval development was monitored every two to four hours until the earliest pupae emerged. Exuviae arising of novaluron treated larvae (see section 5) was also followed from the third instar. Cups were kept in a B.O.D. incubator at $28 \pm 0.5^\circ\text{C}$.

4. Third and fourth instars subdivision: definition of collection time points

One of the aims of this work is related to the molting process of larval instars L3 and L4, which involves a sequence of biochemical events related to cuticle production and disposal. It was necessary to stage L3 and L4 in order to define experimental points representing the beginning, middle and end of each instar, to be used in subsequent analysis. Definition of sample collection time points was based on intervals between sequential molts and on control larva morphological characteristics observed before and after ecdysis [3]. The “early larvae” (L3e or L4e) were collected five hours after ecdysis from previous instar, “late larvae” (L3l or L4l) were collected two hours before ecdysis to the next instar (or stage) (see Results) and “intermediate larvae” (L3int or L4int) were collected in the middle of each larval period. Due to technical constraints, L4int larvae were collected with a 7.5 hours delay (see Results). The time points employed for novaluron-treated larvae collection were the same as those used for control larvae raised under physiological conditions.

5. Novaluron bioassays with synchronized larvae

Newly hatched 3rd instar larvae (see section 1), were carefully moved from bowls to cups with the aid of a Falcon cell strainer (70 μm Nylon, BD Biosciences catalog # 352350). Inside the cups, larvae were continuously exposed to novaluron (Rimon® 10 EC, Figure S1) as previously described [25]. Cups were kept inside a B.O.D. incubator at $28 \pm 0.5^\circ\text{C}$ with a controlled photoperiod (12 hours light/12 hours dark). Novaluron concentrations employed were defined by probit analysis matching emergence inhibition (EI) of 50 and 99% adults: 0.10–0.14 $\mu\text{g}/\text{L}$ for EI_{50} and 0.30 $\mu\text{g}/\text{L}$ for EI_{99} . Controls were performed with 90 μL of acetone (novaluron solvent) added in each cup, equal to the acetone volume used for the novaluron EI_{99} concentration. In each bioassay and for each condition, 24 cups with 10 larvae and 150 mL per cup, prepared as described above, were used. Due to technical constraints, L3 larvae were exposed to the insecticide from 51 HAH (3 hours after L2 to L3 ecdysis, see Results) on. Larvae from control and experimental groups were collected in the previously defined time points (L3e, L3int, L3l, L4e, L4int and L4l, see section 4 above) when they were processed for chitin quantification or histological analysis (sections 6 and 7). All assays were repeated at least three times.

6. Chitin quantitation

Novaluron effect over chitin content was analyzed in 15 larvae exposed to each condition (control, EI₅₀ and EI₉₉), in each test. These larvae were collected at the time points defined previously, L3e to L4l, and stored without water at -70°C until use. Chitin content was evaluated by quantification of glucosamine derivatives obtained by deacetylation, depolymerization and deamination of the N-acetyl-glucosamine polymer as previously described [32,36]. Briefly, chitin undergoes an alkaline digestion and is converted by deacetylation to chitosan (i.e., glucosamine polymer), through the joint action of high temperature (130°C) and high alkaline concentration (14 M KOH). Aldehydes derived from depolymerized chitosan and deaminated glucosamine, generated in a reaction with HNO₂ and with the further addition of MBTH and Fe⁺³, were measured colorimetrically at 650 nm. Chitin content was expressed as glucosamine equivalents, according to a standard curve obtained with commercial glucosamine (Sigma-Aldrich, catalog # G-4875). Before chitin quantification, larvae weight was determined to normalize the results.

7. Histological analysis

Since the effect of other BPUs is directly related to larval exposure time to the product [25], greater effects were expected to be found on L4l larvae after novaluron treatment. Control and EI₉₉ L4l larvae were fixed in Formoy (60% ethanol, 30% formaldehyde 37% and 10% glacial acetic acid) and stored at 4°C for up to five days. In order to avoid interference of after-death morphological alterations only alive larvae were collected for morphological analysis.

7.1. Histochemical processing. Fixed larvae were subjected to serial washes of 10 minutes each in solutions of 70, 80 and 90% ethanol followed by two washes of 10 minutes each in 100% ethanol and immersion in 100% ethanol for 40 minutes. Samples were passed through three washes in xylene (10, 10 and 40 minutes) and were embedded in Paraplast Plus® (Sigma-Aldrich, catalog # 76258) at 60°C for 24 hours. Serial microtome 7 µm thick sections were obtained for the mesothorax region, being collected on slides which were subsequently stained with hematoxylin and eosin (HE) or labeled with the lectin WGA coupled to FITC (see below).

The mesothorax region was chosen due to the presence of gastric caeca [3] and previous results showing abnormalities caused by BPU in this region [26]. The interpretation of internal larval structures at the mesothorax region was determined through a careful and detailed reading of chapters 9, 10, 13 and 14 of the *Aedes aegypti* book by Christophers [3].

7.2. Hematoxylin and eosin (HE) staining. In order to remove paraffin, slides containing larvae sections were bathed in the following series of solutions: xylene (2 washes of 5 minutes each), 100% ethanol (two washes of 3 min each), 95% ethanol (3 min), 70% ethanol (3 min) and distilled water (3 min). The HE staining was initiated with a bath in hematoxylin solution (Fisher Scientific, catalog # BP2523) (45 seconds), followed by tap water, Scott water (10 g of MgSO₄, 2 g of NaHCO₃ in 1 L distilled water) (2 min), distilled water (2 min), 70% ethanol (3 min), eosin solution (Polysciences, Inc, catalog # 09859) (2 min), 95% ethanol (30 seconds), 100% ethanol (2 washes of 30 seconds each) and xylene (2 washes of 30 seconds each) [37]. After xylene bath, slides were mounted with cover slips, using Entellan® (Merck, catalog # 100869). Sections were examined under an Axioplan (Zeiss) microscope with bright field or differential interference contrast (DIC) and images were captured with the digital camera AxioCam HRC (Zeiss).

7.3. Chitin labeling. Paraffin was removed from slides exactly as described above. Slides were then washed 3 times in PBS buffer containing 2 mg/mL BSA (PBSB). Slides were then incubated in PBSB solution with 100 µg/mL WGA-FITC (EY Laboratories) for 40 minutes. Slides were then washed three times with PBSB and mounted with the anti-fade Fluor Save™ Reagent (Calbiochem, catalog # 345789). Sections were examined under a fluorescent microscope Axioplan (Zeiss), FITC channel, with ratio of absorption/excitation 492 nm and emission at 517 nm. WGA (wheat germ agglutinin) is a lectin highly specific for N-acetylglucosamine polymers [38,39].

8. Statistical analysis

For all experiments, mean and standard deviation were calculated. One way analysis of variance (ANOVA) (P<0.05) followed by Bonferroni multiple comparison test was used in chitin quantification analysis. In the analysis of emergence inhibition and percentage of adults (males and females) after novaluron treatment, a one way ANOVA followed by Kruskal-Wallis test (P<0.05) was performed.

Results

1. Novaluron inhibits adult emergence and alters adult sex ratio

Novaluron (Figure S1) inhibited adult emergence and induced mortality in a dose-dependent manner (Figure 1). Besides this effect, a direct relationship between novaluron concentration and earlier mortality of immature specimens was observed: the proportion of dead larvae increased on EI₉₉ compared with EI₅₀ (Figure 1A). Adults that survived novaluron treatment (EI₅₀) emerged mostly as males (ANOVA; P<0,05) (Figure 1B).

2. Novaluron delays development of immature specimens

The experiments described in this section were performed to confirm whether novaluron affects the duration of immature stages, before adult emergence, as evaluated in bioassays (Figure 2). As stated in Methods, these experiments were conducted in a climatized room, with a slightly less precise temperature adjustment than B.O.D. incubators, used in further experiments. Under control conditions (Figure 2A), about 40% of larvae were at L4 on the 3rd day after hatching and all specimens became L4 on the 4th day. Ecdysis to pupa took place between days 5 and 10 and adult emergence occurred between days 6 and 11 after hatching. When the novaluron EI₅₀ was used (Figure 2B), larvae ecdysis to L4 was also initiated on the 3rd day but only on the 7th day it was completed. Pupa ecdysis also began on the 5th day but was prolonged until the 14th day and adults emerged between days 8 and 15. With the highest novaluron condition, EI₉₉ (Figure 2C), L4 larvae ecdysis began on the 3rd day and finished between days 4 and 5. However, only 60% of the larvae succeeded in completing the entire molting process, reaching L4. Only 2.5% of the specimens reached the pupal stage and no immature became adult.

3. Larval instars duration at 28°C

In order to perform chitin quantitation and histological analyses in developing L3 and L4 larvae, it was necessary to subdivide these stages to define experimental points representing the beginning, middle and end of these instars. Therefore, a follow up of larval instar period duration was performed from the end of L2 until pupation (Figure 3). The beginning of L2 to L3 ecdysis occurred

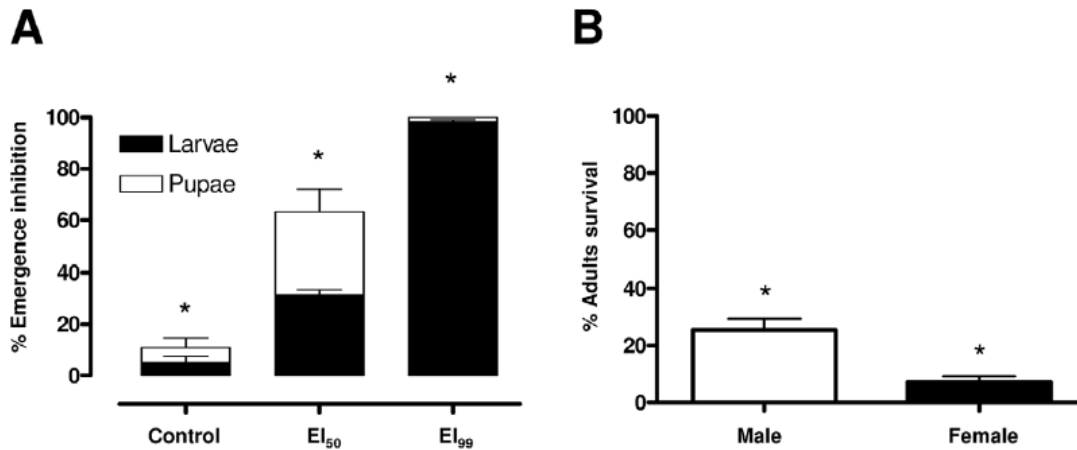


Figure 1. Novaluron inhibits *Ae. aegypti* adult emergence. (A) Dose-dependent effect of novaluron over emergence inhibition. EI₅₀ and EI₉₉ indicate novaluron concentrations resulting in emergence inhibition of 50 and 99% of adults, respectively. Black and white bars indicate death at larval and pupal stages, respectively (B) Percentage of surviving adults (males and females) after novaluron treatment (EI₅₀). Bars indicate mean and standard deviation of three experiments. Asterisks indicate significant differences (ANOVA, P<0.05). doi:10.1371/journal.pone.0030363.g001

48 hours after hatching (HAH) and, due to synchronic L2 larvae development, about 45% of the specimens reached the third instar simultaneously. From this point on, a follow-up of larval instar period duration was performed from L3 until pupation of all individuals. In our conditions, a synchronous ecdysis occurred at L3 to L4 where the first L4 emerged at 70 HAH while five hours later (75 HAH) all specimens were at the fourth instar. On the other hand, L4 to pupa ecdysis was asynchronous: while the first pupae appeared at 100 HAH, the last specimens pupated 44 hours later (144 HAH). All these ecdysis periods (L2 to L3 at 48 HAH, L3 to L4 at 70 HAH and L4 to pupa between 100 and 144 HAH) are in accordance with descriptions made by Christophers [3]. The third instar lasted 22 hours (between 48 and 70 HAH) and the minimum and maximum period duration of the fourth instar was 30 hours (between 70 and 100 HAH) and 74 hours (between 70 and 144 HAH), respectively. In order to perform biochemical analysis of control, EI₅₀ and EI₉₉ larvae, early (e), intermediate (int) and late (l) L3 and L4 experimental points were collected according to developmental timing of control larva (i.e. L3e, L3int, L3l, L4e, L4int e L4l being respectively 53, 59.5, 68, 75, 92.5 and 98 HAH). Histological analyses were performed on alive L4l from both control and novaluron-treated conditions. See Figure 3 and Materials and Methods, section 4 for details.

4. Novaluron exposed larvae have low chitin content

Chitin content was evaluated during L3 and L4 instars in control and novaluron exposed samples (Figure 4). There was an increase in chitin content during both the 3rd and 4th instars of control larvae. Although not significant (P>0.05) early 4th instar (L4e time point) presented a chitin content below that of late 3rd instar (L3l). It is important to highlight that the production of a new cuticle precedes the elimination of the old one (ecdysis) and the results found here seem to reflect the fact that L3l is a pharate larvae possessing two chitinous exoskeletons [3,4]. Larvae exposed to novaluron EI₅₀ and EI₉₉ showed a general chitin content profile similar to the controls, with exception of late instars. Two distinct analysis of variance were performed. The first (not represented in Figure 4) compared values of every time point with the first one obtained (L3e) at each corresponding experimental condition. In control larvae, intermediate and late L4 chitin content was significantly higher than L3e (P<0.05). In novaluron EI₅₀ and

EI₉₉ conditions, chitin content in all time points were equivalent, with exception of the EI₉₉ early 4th instar (L4e) content, being significantly lower than EI₉₉ early 3rd instar (P<0.05). The second analysis of variance was performed to verify novaluron’s dose-dependent effect on chitin formation comparing, at each experimental point, the control, EI₅₀ and EI₉₉ situations (asterisks in Figure 4). Chitin production in the third instar was affected only in late EI₉₉ larvae that exhibited diminished chitin content. During the fourth instar, early EI₉₉ and late larvae of both novaluron conditions showed lower amounts of chitin when compared to control samples.

5. Novaluron affects larval tissues and the integument

Serial cross sections of the mesothorax region were analyzed in alive late L4 larvae (L4l) in order to check for novaluron effects on internal organs and larval integument (Figure 5 and Figure S2). The mesothorax region was chosen since it is easily identified by the presence of gastric caeca (Figure 5A), also harboring several other organs and tissues that could be potentially affected by BPU treatment [26]. In control larvae, HE staining shows several mesothorax structures (Fig. 5B and B’). Immediately below the epidermis lies the fat body parietal layer located in the most dorsal and ventral regions, while the fat body visceral layer lies as lobes above salivary glands and the four most dorsal gastric caeca. Dorsal tracheal trunks are located above salivary glands and close to the most dorsal gastric caeca. Right above the middle line of the dorso-ventral axis are wing imaginal discs and right below the middle line, in the ventral region, are the other four gastric caeca, leg imaginal discs and the ventral nervous system (thoracic ganglion). Internally to the gastric caeca lies the midgut and within it, the peritrophic matrix. In novaluron treated larvae (Figure 5C and C’), fat body, salivary gland, tracheal trunks, gastric caeca, thoracic ganglion, midgut and peritrophic matrix are also observed, although their morphology are altered. Wing and leg imaginal discs are highly disorganized, not bearing a continuous tissue. See also Figure S2 for further details.

Regarding the integument of L4l larvae (Figure 6), in control samples the cuticle is closely associated with epidermis and the underlying fat body parietal layer can be observed (Figure 6A). In contrast, novaluron treated L4l larvae, show in some regions a translucent and discontinuous cuticle that is detached from the

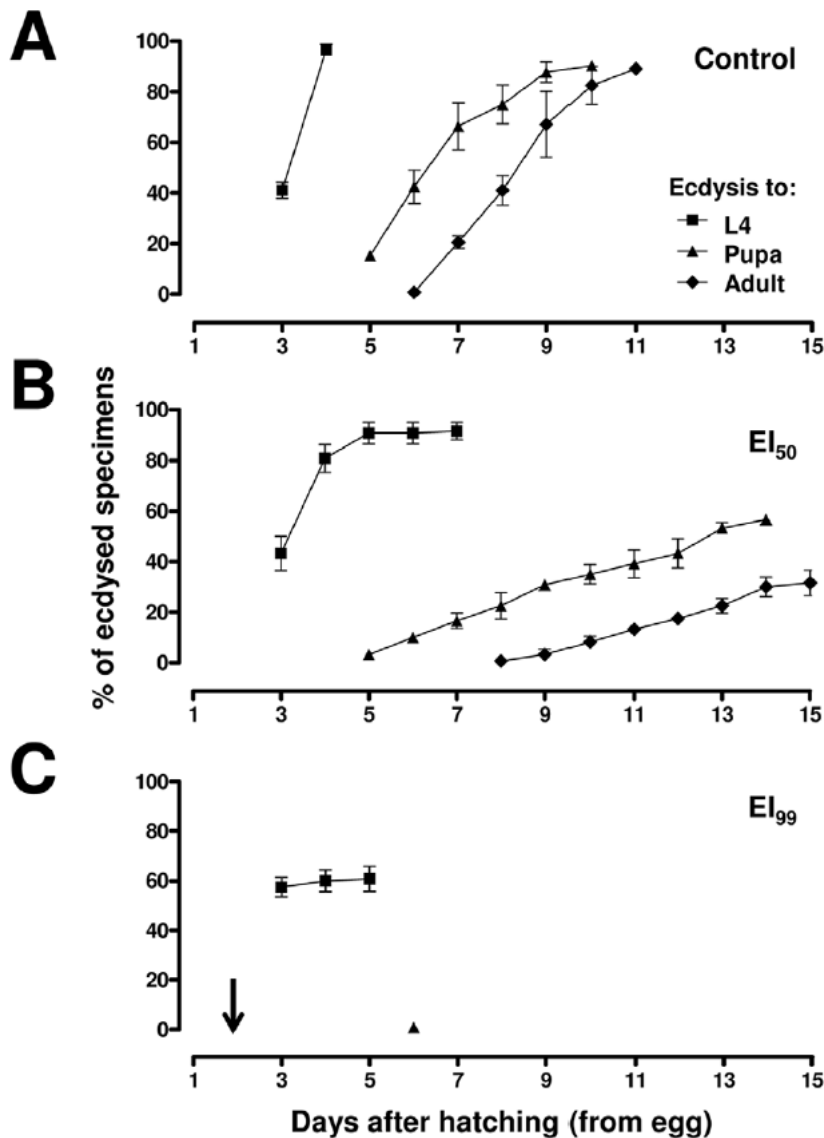


Figure 2. Novaluron induces delay in the development of *Ae. aegypti* immatures. Symbols represent the cumulative percentage of specimens in relation to eliminated exuviae of the preceding instar: squares, triangles and lozenges indicate newly emerged L4, pupae and adults, respectively. (A) control; (B) EI₅₀ and (C) EI₉₉. Bars represent the standard deviation of three independent experiments. Arrow indicates the moment of novaluron administration (see Methods). doi:10.1371/journal.pone.0030363.g002

epidermis (Figure 6B) or a thinner epidermis (Figure 6C); in some cases the epidermis seems to be degenerated and the cuticle is altered, presenting a rope-like structure (Figure 6D).

6. Novaluron affects the presence of cuticular chitin

Labeling with wheat germ agglutinin (WGA), a lectin that is highly specific for N-acetyl-D-glucosamine polymers [38,39], was performed to evaluate novaluron's effect in the presence of chitin in late L4 larvae (L4I) (Figure 7). WGA labeling was continuous throughout control larvae cuticle (Figure 7A, B) and was also observed in the peritrophic matrix (Figure 7A). Novaluron treated L4I cuticle labeling was uneven (Figure 7C–F), where some cuticle regions showed uniform labeling (Figure 7D), irregular labeling (Figure 7F) or no WGA labeling (Figure 7E). In these larvae, peritrophic matrix chitin labeling was not affected by novaluron treatment (Figure 7C).

Discussion

Despite recent advances in studies regarding the cuticle and the physiological and biochemical processes related to its production and/or shedding [6], literature about this topic is still scarce when compared to current descriptions of other aspects of insect biochemistry and physiology [40]. Insect larvae exposed to chitin synthesis inhibitors such as the benzoylphenylureas (BPUs) develop fragile cuticles unable to support the increased tension during the molting process. Such larvae have difficulty to shed their exuviae, dying due to starvation, suffocation or even rupture of the weak, malformed cuticle [15,17,26]. Therefore, the study of BPUs effects on immature insect stages can also contribute to better understand the physiological process of cuticle formation and elimination. Compounds such as the BPU diflubenzuron and other Insect

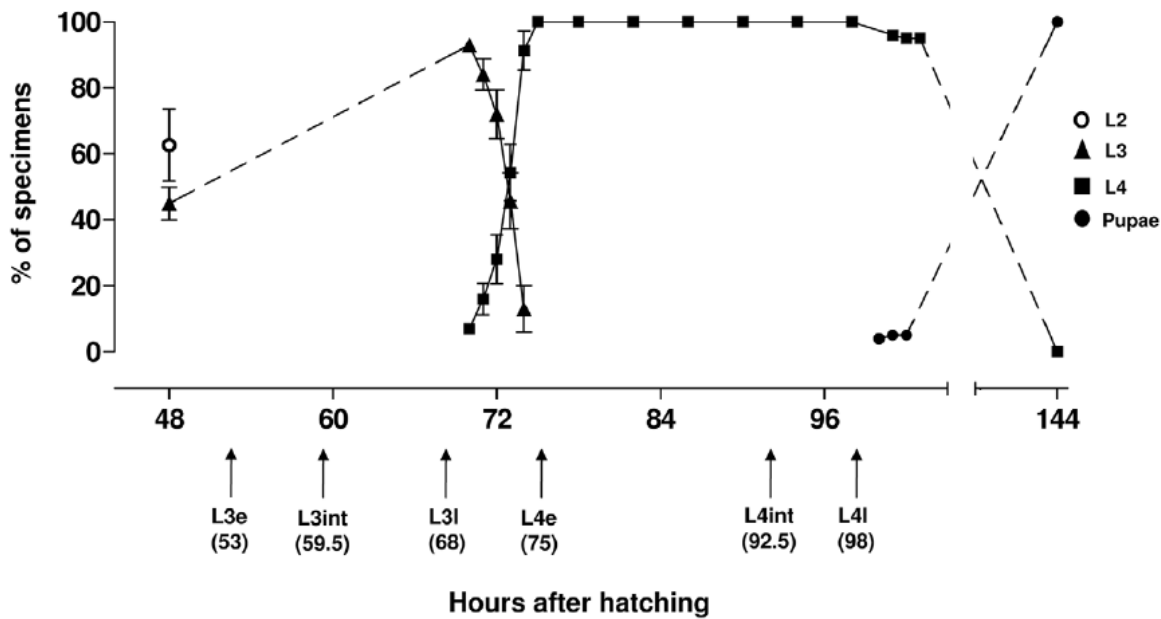


Figure 3. Period duration of *Ae. aegypti* larval ecdysis. Symbols represent the cumulative percentage of specimens at different immature stages. Bars represent the standard deviation of three independent experiments. Arrows indicate the experimental points, defined in hours, as early (e), intermediate (int) and late (l) moments for each instar. doi:10.1371/journal.pone.0030363.g003

Growth Regulators have already been recommended by WHO Pesticide Evaluation Scheme (WHOPES) for use against aquatic mosquito stages, some of them even in drinking water [9,34]. In Brazil the recent employment of BPUs in the national program of dengue control corroborates the need of a detailed knowledge about the potential effects and mechanisms of action of these compounds [21,23].

Novaluron efficacy was confirmed in this work, as previously described [19,35]. When exposed to a partial lethal concentration,

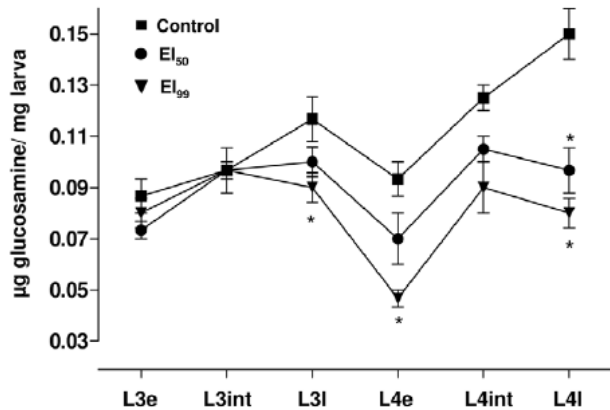


Figure 4. Effect of different novaluron concentrations on chitin production profile over *Ae. aegypti* L3 and L4 instars. Experimental time points are indicated horizontally. Symbols refer to the average value and standard deviation of three independent experiments. Asterisks indicate significant differences when compared to the control condition at the same experimental time point (ANOVA, $P < 0.05$). Each sample was collected on time points defined for the physiological instar development of the control group, according to Figure 3 (see section 4 of Methods). doi:10.1371/journal.pone.0030363.g004

surviving male and female emergence percentage differed significantly, occurring a higher percentage of male emergence (Figure 1), as already described for the BPU triflumuron [24]. This is attributed to the faster development of male, and their consequent shorter contact with the BPU (see below). The higher male emergence among novaluron exposed specimens is a parameter of epidemiological relevance since dengue transmission takes place through females.

Comparing to other BPUs, novaluron is very potent, inhibiting 99% of *Ae. aegypti* adult emergence in a concentration 6 to 12 times lower than other BPUs like triflumuron and diflubenzuron [25,28]. We believe that, as diflubenzuron [35,41], novaluron is a promising alternative to contribute for the control of the dengue vector and other epidemic diseases transmitted by mosquito in urban areas [34].

Novaluron EI₅₀ prolonged the duration of *Ae. aegypti* immature stages, which was also described for the mosquito *Culex pipiens pipiens* with another BPU [31]. In contrast to EI₅₀, in control larvae there was no overlapping in the timing of L3 to L4 ecdysis and L4 to pupa ecdysis. Larvae exposed to the novaluron EI₉₉ dose died mainly before reaching L4 to pupa ecdysis. Curiously, at the 3rd day after hatching, while 40% of control larvae had undergone L3 to L4 ecdysis, this rate was already 60% for EI₉₉ larvae. We believe this difference might be due to the stress induced by the presence of novaluron. Evidences for such physiological stress were observed in the histological analysis (see below).

In insects the progression through larval instars or stages is easily defined by the molt, an event that finishes punctually when the exuviae from the previous phase is released [4]. However, larval growth within any given instar is continuous, with steady gain of weight and constant increase in size of non sclerotized cuticle regions [4]. *Aedes aegypti* larvae follow this pattern throughout development; e.g. a L3 larvae exhibits a weight ratio increase of 4.7 and a volume ratio increase of 4.3 when early (right after L2 to L3 ecdysis) and late (right before L3 to L4) L3

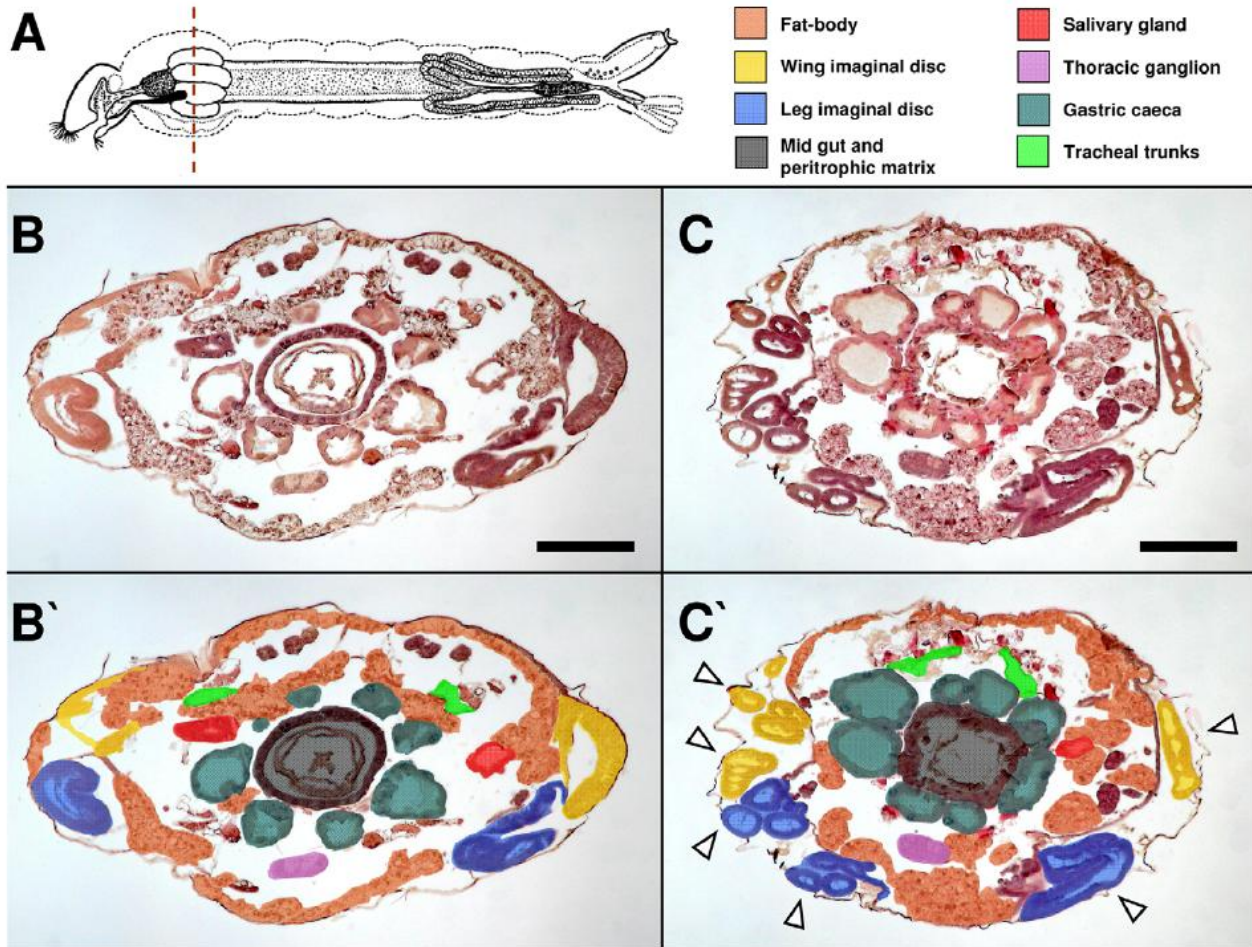


Figure 5. Novaluron induces histological alterations on *Ae. aegypti* larvae. Bright field microscopy. (A) Larva scheme with histological section region evaluated (mesothorax, dashed line) and color caption for identified organs and tissues. HE staining of live L4I larvae from control (B, B') and novaluron EI₉₉ (C, C') are shown. In (B') and (C') sections shown in the corresponding panels were colored to better identify structures. In (C') arrowheads indicate disorganized imaginal discs (see Figure S2 for further details). In (A), larva scheme adapted from Christophers [3]. Bar = 200 μm.
doi:10.1371/journal.pone.0030363.g005

specimens are compared [3]. Due to this continuous growth of developing larvae, which is a dynamic and complex process, a larva at the beginning of an instar is a physiological entity distinct from a larva at the end of the same instar. For this reason, it was necessary to follow the duration period of immature *Ae. aegypti* stages from L2 to L3 transition until pupation. This allowed the subsequent division of L3 and L4 in “early”, “intermediate” and “late” time points, to be used for the following analysis. Both L2 to L3 and L3 to L4 ecdysis occurred more synchronously that L4 to pupa ecdysis, corroborating the data described by Christophers [3]. The lower synchrony in L4 to pupa ecdysis can be attributed to the difference of developmental time requirements of each sex, that can be up to one day, with males emerging first [3,7,42].

In control larvae the chitin content increased gradual and significantly during each of the evaluated instars, L3 and L4. A reduction of 20% in chitin content was observed in early L4 when compared to late L3. This difference was already expected since at the end of each instar the insect larva has two cuticles, and the old one is lost at the end of the molting process [4]. Accordingly, Candy and Kilby [43] observed an increase in the chitin amount

during the fifth instar of the grasshopper *Schistocerca gregaria* and a reduction at the beginning of the next stage.

In novaluron treated *Ae. aegypti* larvae, the chitin content was effectively reduced in a dose-dependent manner. Similar results were described for *Anopheles quadrimaculatus* third instar larvae exposed to diflubenzuron [32,33].

Histological descriptions of *Ae. aegypti* larvae are scarce [3]. Moreover, to our knowledge this is the first report of histological analysis of internal larval alterations produced by any BPU in immature *Ae. aegypti*. The mesothorax region was chosen due to the presence of the easily recognizable gastric caeca [3] and since *Ae. aegypti* L4 larvae, when exposed to a BPU, show dorsal splitting and bulbous projection at the thorax [26], pointing out a sensibility in this region for chitin synthesis inhibitor treatments. We thus asked how novaluron would affect the internal structures of L4 larvae.

The methodology employed for histochemical fixation and processing preserved the exoskeleton and internal structures in both conditions tested (control and EI₉₉). Novaluron administration interfered with the cuticle structure, showing a rope-like

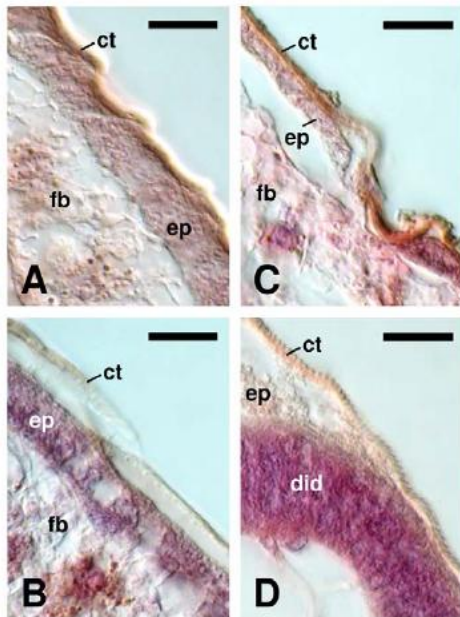


Figure 6. Novaluron modifies cuticle and epidermis aspect of *Ae. aegypti* larvae. DIC microscopy was performed on histological sections of late L4 larvae stained with HE. (A) Control. Note the close association among cuticle, epidermis and the subjacent fat body layer. (B–D) Novaluron EI₉₉. Cuticle presents a semitransparent and discontinuous aspect being detached from the epidermis (B); epidermis is thinner (C) or degenerated, with a rope-like cuticle (D). ct: cuticle, did: disorganized imaginal disc, ep: epidermis, fb: fat body. doi:10.1371/journal.pone.0030363.g006

aspect in some regions. It also altered the chitin presence in some cuticle regions. Chitin labeling in the peritrophic matrix of the midgut remained unchanged with novaluron, confirming reports on chitin quantitation in *An. quadrimaculatus* larvae exposed to diflubenzuron [33]. Novaluron effects were similar to the phenotype of *Drosophila melanogaster* mutants for genes implicated in cuticle formation [6,44,45] and to the beetle *Tribolium castaneum* silenced for the *TcCHS1* gene, coding for the chitin synthase responsible for cuticular chitin synthesis [46].

Novaluron affected the epidermis and other internal larval organs. These systemic alterations demonstrate how debilitated larvae are after novaluron treatment. Although histological analyses were performed on alive animals, all EI₉₉ larvae analyzed would probably die before completing ecdysis to pupae, since only 2.5% of specimens reach the pupal stage after EI₉₉ treatment (Figure 2C). Novaluron seems to particularly disrupt the development of imaginal discs, since leg and wing imaginal discs are not properly formed in novaluron treated larvae. Accordingly, adults surviving BPU treatment with curved tarsi and crippled wings were already shown [24,26].

Novaluron is among the few compounds presently recommended by WHO for use in drinking water against the main dengue vector, *Ae. aegypti* [34]. We confirmed the dose-response novaluron effect on adult emergence. Female mosquitoes, the epidemiologically relevant sex, are more affected than males. Additionally, we established a detailed protocol of synchronized rearing and quantified the chitin content along the development of strictly staged larvae. We demonstrated the interference of novaluron on cuticle deposition of chitin and confirmed the profile of chitin amount during the molting process. Finally,

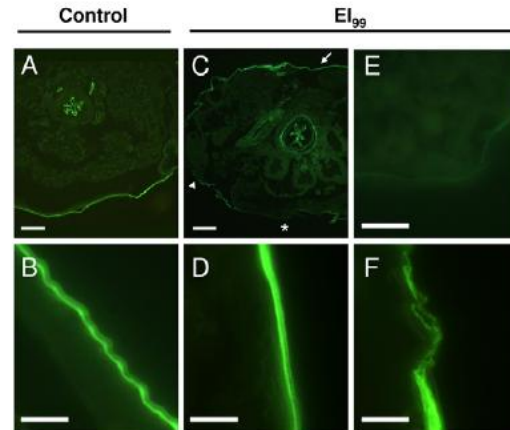


Figure 7. Novaluron alters cuticular chitin presence in late L4 larvae. WGA-FITC labeling was used to detect chitin by fluorescence microscopy. (A, B) Control larvae exhibiting continuous cuticle labeling. (C–F) Novaluron EI₉₉ larvae show uneven cuticle labeling. Chitin labeling of cuticle in distinct regions of the larva is rather uniform (arrow in C; panel D), absent (asterisk in C; panel E) or irregular (arrowhead in C; panel F). Peritrophic matrix chitin labeling was not altered (A, C). Bar = 100 μ m in A, C and 10 μ m in B, D–F. All images were also recorded in bright field, in order to assure that images were in focus and that a cuticle was present (data not shown). doi:10.1371/journal.pone.0030363.g007

histological alterations in a series of mosquito organs and internal structures were identified on larvae exposed to this BPU. Besides potential of BPUs towards vector control, their use as a tool to unravel both the complex physiologic molting process and details of the exoskeleton structure and function should be envisaged, in order to reveal novel potential targets against mosquito vectors.

Supporting Information

Figure S1 Novaluron chemical information. (A) Structure, (B) Molecular formula and (C) IUPAC name. Adapted from PubChem website (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>). (PDF)

Figure S2 Histological cross sections of control and novaluron-treated *Ae. aegypti* larvae at the mesothorax region. The following slides present 45 histological cross sections of 4 control and 3 novaluron-treated (EI₉₉) *Ae. aegypti* larvae at the mesothorax region. In all sections ventral side is down (i.e. the ventral thoracic ganglion is always at the bottom). Numbers in the panels denote the sequence of cross sections. For further details, please check Methods, section 7 and Figure 5 of the main text. (PDF)

Acknowledgments

The authors would like to thank Renata Schama and Rodolpho Mattos Albano for critical reading of the manuscript, Ademir Martins and Thiago Belinato for help with probit and BPUs analysis, Fabio Lopes Olivares for help with DIC microscopy, members of the laboratories of Denise Valle, Alexandre Peixoto, Marcelo Pelajo, José Brito, José Garcia and Carlos Logullo for constant support. We also acknowledge the two anonymous reviewers, whose comments greatly improved the quality of the work. This work is dedicated to the memory of the late Professor Henrique Leonel Lenzi, a fantastic human being that delighted everyone that crossed his path. In the vastness of space and the immensity of time, it was a joy and a privilege to share a planet and an epoch with him.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: LCF DV GLR. Performed the experiments: LCF JMB JGL. Analyzed the data: LCF JMB DV GLR.

Contributed reagents/materials/analysis tools: JMB MP-M DV. Wrote the paper: LCF DV GLR.

References

- Gould EA, Solomon T (2008) Pathogenic flaviviruses. *Lancet* 371: 500–509.
- Powers AM (2010) Chikungunya. *Clinics in Laboratory Medicine* 30: 209–219.
- Christophers SR (1960) The yellow fever mosquito. Its life history, bionomics and structure. London: Cambridge University Press.
- Chapman R (1998) The insect. Structure and Function. Cambridge: Cambridge University Press.
- Merzendorfer H, Zimoch L (2003) Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. *J Exp Biol* 206: 4393–4412.
- Moussian B (2010) Recent advances in understanding mechanisms of insect cuticle differentiation. *Insect Biochem Mol Biol* 40: 363–375.
- Clements AN (1992) The biology of mosquitoes. Development, nutrition and reproduction. London: Chapman and Hall.
- Rezende GL, Martins AJ, Gentile C, Farnesi LC, Pelajo-Machado M, et al. (2008) Embryonic desiccation resistance in *Aedes aegypti*: presumptive role of the chitinized serosal cuticle. *BMC Dev Biol* 8: 82.
- Chavasse D, Yap HH (1997) Chemical methods for the control of vectors and pests of public health importance. In: Diseases DoCoT, editor. Geneva: World Health Organization.
- Arunachalam N, Tana S, Espino F, Kittayapong P, Abeyewickreme W, et al. (2010) Eco-bio-social determinants of dengue vector breeding: a multicountry study in urban and periurban Asia. *Bull World Health Organ* 88: 173–184.
- Zaim M, Guillet P (2002) Alternative insecticides: an urgent need. *Trends Parasitol* 18: 161–163.
- Montella IR, Martins AJ, Viana-Medeiros PF, Lima JB, Braga IA, et al. (2007) Insecticide resistance mechanisms of Brazilian *Aedes aegypti* populations from 2001 to 2004. *Am J Trop Med Hyg* 77: 467–477.
- Limas GA, Seccacini E, Gardenal CN, Licastro S (2010) Current resistance status to temephos in *Aedes aegypti* from different regions of Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 105: 113–116.
- Cohen E (1987) Chitin Biochemistry: Synthesis and Inhibition. *Annual Reviews of Entomology* 32.
- Graf JF (1993) The role of insect growth regulators in arthropod control. *Parasitol Today* 9: 471–474.
- Oberlander H, Silhacek DL (2000) Alternatives to pesticides in stored-product Integrated Pest Management. In: Hagstrum BSA, editor. *Insect growth regulators*. Boston: Kluwer Academic Publishers. pp 147–163.
- Reynolds SE (1987) The Cuticle, growth and molting in insects - the essential background to the action of acylurea insecticides. *Pesticide Science* 20: 131–146.
- Mian LS, Mulla MS (1982) Biological and environmental dynamics of insect growth regulators (IGRs) as used against Diptera of public health importance. *Residue Review*. pp 27–112.
- Mondal KAMSH, Parween S (2000) Insect growth regulators and their potential in the management of stored-product insect pests. *Integrated Pest Management* 5: 255–295.
- van Daalen JJ, Meltzer J, Mulder R, Wellings K (1972) A selective insecticide with a novel mode of action. *Naturwissenschaften* 59: 312–313.
- Mulla MS, Thavara U, Tawatsin A, Chomposri J, Zaim M, et al. (2003) Laboratory and field evaluation of novaluron, a new acylurea insect growth regulator, against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *J Vector Ecol* 28: 241–254.
- Batra CP, Mittal PK, Adak T, Ansari MA (2005) Efficacy of IGR compound Starycide 480 SC (Triflumuron) against mosquito larvae in clear and polluted water. *J Vector Borne Dis* 42: 109–116.
- Arredondo-Jiménez JI, Valdez-Delgado KM (2006) Effect of Novaluron (Rimon® 10 EC) on the mosquitoes *Anopheles albimanus*, *Anopheles pseudopunctipennis*, *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* and *Culex quinquefasciatus* from Chiapas, Mexico. *Medical and Veterinary Entomology* 20: 377–387.
- Belinato TA, Martins AJ, Lima JB, Lima-Camara TN, Peixoto AA, et al. (2009) Effect of the chitin synthesis inhibitor triflumuron on the development, viability and reproduction of *Aedes aegypti*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104: 43–47.
- Martins AJ, Belinato TA, Lima JB, Valle D (2008) Chitin synthesis inhibitor effect on *Aedes aegypti* populations susceptible and resistant to organophosphate temephos. *Pest Manag Sci* 64: 676–680.
- Vasuki V, Rajavel AR (1992) Influence of short time exposure to an insect growth regulator, hexaflumuron, on mortality and adult emergence of vector mosquitoes. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 87: 275–283.
- Vasuki V (1999) Influence of IGR treatment on oviposition of three species of vector mosquitoes at sublethal concentrations. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 30: 200–203.
- Foumet F, Sannier C, Monteny N (1993) Effects of the insect growth regulators OMS 2017 and diflubenzuron on the reproductive potential of *Aedes aegypti*. *J Am Mosq Control Assoc* 9: 426–430.
- Kamal HA, Khater EI (2010) The biological effects of the insect growth regulators; pyriproxyfen and diflubenzuron on the mosquito *Aedes aegypti*. *J Egypt Soc Parasitol* 40: 565–574.
- Suman DS, Parashar BD, Prakash S (2010) Effect of sublethal dose of diflubenzuron and azadirachtin on various life table attributes of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* 47: 996–1002.
- Rehimi N, Soltani N (1999) Laboratory evaluation of Alysystin, a chitin synthesis inhibitor, against *Culex pipiens pipiens* L. (Dip., Culicidae): effects on development and cuticle secretion. *Journal of Applied Entomology* 123: 437–441.
- Zhang J, Zhu KY (2006) Characterization of a chitin synthase cDNA and its increased mRNA level associated with decreased chitin synthesis in *Anopheles quadrimaculatus* exposed to diflubenzuron. *Insect Biochem Mol Biol* 36: 712–725.
- Zhu KY, Heise S, Zhang J, Anderson TD, Starkey SR (2007) Comparative studies on effects of three chitin synthesis inhibitors on common malaria mosquito (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* 44: 1047–1053.
- World Health Organization W (2007) Novaluron in Drinking-water: Use for Vector Control in Drinking-water Sources and Containers. Geneva: WHO Press.
- Secretaria de Vigilância em Saúde S (2009) Nota Técnica 015/2009 Uso do larvicida Diflubenzuron (PM25%) para controle de *Aedes aegypti*. In: Gestão Dd, ed. Brasília: Ministério da saúde.
- Lehmann PF, White LO (1975) Chitin assay used to demonstrate renal localization and cortisone-enhanced growth of *Aspergillus fumigatus* mycelium in mice. *Infect Immun* 12: 987–992.
- White JT, Zhang B, Cerqueira DM, Tran U, Wessely O (2010) Notch signaling, *w1* and *foxc2* are key regulators of the podocyte gene regulatory network in *Xenopus*. *Development* 137: 1863–1873.
- Lis H, Sharon N (1973) The biochemistry of plant lectins (phytohemagglutinins). *Annu Rev Biochem* 42: 541–74.
- Wright CS (1984) Structural comparison of the two distinct sugar binding sites in wheat germ agglutinin isolectin II. *J Mol Biol* 178: 91–104.
- Willis JH, Muthukrishnan S (2010) Insect Cuticle. Foreword. *Insect Biochem Mol Biol* 40: 165.
- Secretaria de Vigilância em Saúde S (2010) Nota Técnica 109/2010. O uso racional de inseticidas no controle do *Aedes aegypti* e sua utilização oportuna em áreas com transmissão de dengue. In: Departamento de Vigilância Epidemiológica C-GdPndCdD, Departamento de Vigilância Ambiental C-GdVA, editors. Brasília: Ministério da saúde.
- Consoli R, Lourenço-de-Oliveira R (1994) Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Rio de Janeiro: Fiocruz.
- Candy DJ, Kilby BA (1962) Studies on chitin synthesis in the desert locust. *Journal of Experimental Biology* 39: 129–140.
- Moussian B, Schwarz H, Bartoszewski S, Nusslein-Volhard C (2005) Involvement of chitin in exoskeleton morphogenesis in *Drosophila melanogaster*. *J Morphol* 264: 117–130.
- Gangishetti U, Breitenbach S, Zander M, Saheb SK, Muller U, et al. (2009) Effects of benzoylphenylurea on chitin synthesis and orientation in the cuticle of the *Drosophila* larva. *Eur J Cell Biol* 88: 167–180.
- Arakane Y, Hogenkamp DG, Zhu YC, Kramer KJ, Specht CA, et al. (2004) Characterization of two chitin synthase genes of the red flour beetle, *Tribolium castaneum*, and alternate exon usage in one of the genes during development. *Insect Biochem Mol Biol* 34: 291–304.