

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE ZOOLOGIA
MESTRADO EM BIOLOGIA ANIMAL

EFEITO DA INDOMETACINA E TAMANHO DA FÊMEA
SOBRE A RESPOSTA DE ENCAPSULAMENTO DE *Culex*
***quinquefasciatus* INFECTADAS COM *Candida albicans*.**

SANDRA CADENGUE DE SANTANA

Dissertação apresentada ao Mestrado em Biologia Animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Biologia Animal.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª Cleide Maria Ribeiro de Albuquerque

RECIFE – 2003

A minha querida mãe “Elisabete” (*In
memorian*), pelos primeiros ensinamentos.

SANDRA CADENGUE DE SANTANA

**EFEITO DA INDOMETACINA E TAMANHO DA FÊMEA SOBRE A
RESPOSTA DE ENCAPSULAMENTO DE *Culex quinquefasciatus*
INFECTADAS COM *Candida albicans*.**

BANCA EXAMINADORA:

Prof.^{fa}. Dr.^a Cleide Maria Ribeiro de Albuquerque
Departamento de Zoologia/ UFPE

Prof. Dr.^o Simão Dias Vasconcelos
Departamento de Zoologia/ UFPE

Prof. Dr.^o Léucio Câmara Alves
Departamento de Medicina Veterinária/UFRPE

Prof.^{fa}. Dr.^a Eulália C. P. A. Ximenes
Departamento de Antibióticos/UFPE

SUPLENTES:

Prof.^{fa}. Dr.^a Mírian Camargo Guarnieri
Departamento de Zoologia/ UFPE

Prof.^{fa}. Dr.^a Luciana Iannuzzi
Departamento de Zoologia/UFPE

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom maravilhoso da vida.

A Dr^a Cleide Maria Ribeiro Albuquerque pela dedicada orientação, oportunidade e amizade durante todo o curso.

A minha grande amiga Cristina, pela ajuda e incentivo.

Aos grandes amigos Lucia Cleide e Luis Carlos, pelo incentivo e apoio, por mais uma conquista.

A minha família, por todo carinho.

Ao querido Prof. e amigo Pedro Falcão.

Aos colegas de Laboratório de Invertebrados Terrestres, Antônio, Artur, Bento, Cynthia, Débora, Elisame, Fausto, Márcia, Neto, Paulo Verçosa e Valdelira.

Aos colegas do Curso, Alessandra, Amaro, Antônio, Daniele, Eliane, Emanuel, Emerson, Isabele, Karina, Luiza, Marcelo, Marliete, Mércia, Raimundo, Samanta e Weber, pela amizade e companheirismo.

Ao Sr. Ramiro e Roberto pelo incentivo, ajuda e momentos descontraídos durante esta grande jornada.

A Walkiria Rejane, pela ajuda e amizade durante as análises estatísticas.

A Ethiene (Tininha) pela grande ajuda e companheirismo durante a finalização deste trabalho.

Aos amigos Angélica, Ayana, Charbel, Dorotéia, Francisco, Leyla, Rejane e Rodrigo, que mesmo distante me incentivaram.

Ao Prof. Drº Antonio Rossano, pela ajuda nos momentos finais deste trabalho.

Aos componentes da Banca Examinadora Drº Simão D. Vasconcelos, Drº Léucio C. Alves e a Drª Eulália C. P. A. Ximenes pela valiosa contribuição.

Aos Suplentes Profa. Drª Mírian Camargo Guarnieri e a Profa. Drª Luciana Iannuzzi.

A todos os professores do Mestrado em Biologia Animal, pelos valiosos ensinamentos.

Ao Mestrado em Biologia Animal/ UFPE, e o CNPq pela concessão da Bolsa.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

A formação de cápsulas é a primeira e qualitativamente, a mais intensa reação de defesa celular dos insetos contra infecções por microorganismos. Neste trabalho, foram testadas as hipóteses de que os eicosanóides e o tamanho dos indivíduos influenciam o número de cápsulas formadas em resposta à infecção fúngica no mosquito *Culex quinquefasciatus*. Injetando-se o inibidor da biossíntese dos eicosanóides, indometacina em fêmeas do mosquito infectadas com *Candida albicans*, obteve-se uma redução média de aproximadamente 54% no número de cápsulas formadas comparados aos insetos não tratados. Essa redução mostrou-se mais intensa 72h após o tratamento, embora o pico da resposta de encapsulamento tenha ocorrido 48h depois da inoculação do patógeno. Fêmeas provenientes da criação em condições diferenciadas de disponibilidade alimentar durante o desenvolvimento larval resultaram em adultos com tamanho que variaram entre 3,4 a 4,3mm. Uma correlação positiva entre tamanho e produção de cápsulas foi observada em mosquitos de tamanhos variados ($r=0,48$, $p<0,05$). Contudo, um número significativamente menor de cápsulas formadas foi obtido apenas em insetos com tamanho inferior a 3,9mm (Student t-test, $p<0,05$). A ação da indometacina mostrou-se independente do tamanho da fêmea. Estes resultados sugerem que a resposta imune celular da fêmea de *C. quinquefasciatus* é um processo mediado pelos eicosanóides e que existe um tamanho limite a partir do qual a resposta é mais intensa.

ABSTRACT

Nodulation is the first and qualitatively predominant insect cellular defense reaction against microorganism infection. In this work, the hypothesis that eicosanoids and mosquito size affect formulation of capsule reactions to fungi infection was tested, in the mosquito *Culex quinquefasciatus*. A reduction of about 54% in the number of capsules was obtained in females infected with *C. albicans* and treated with indometacin, relative to control insects. The inhibitory influence of indometacin was higher 72h after inoculation, although the major capsule production was at 48 h following fungi infection. Emerging females from larvae reared at different food availability, showed sizes ranging from 3,4mm to 4,3mm. Overall a positive correlation between body size and capsule formation was observed ($r=0,48$, $p<0.05$). However, a significant decreased in capsule formation was only found in insects smaller than 3.9mm (Student t-test, $p<0.05$). No relationship between female size and indometacin effect was registered in our observations. These results suggest that eicosanoids mediate cellular immune response in *C. quinquefasciatus* females and that there is a threshold size from what the immune response is more intense.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE ZOOLOGIA
MESTRADO EM BIOLOGIA ANIMAL

EFEITO DA INDOMETACINA E TAMANHO DA FÊMEA
SOBRE A RESPOSTA DE ENCAPSULAMENTO DE *Culex*
***quinquefasciatus* INFECTADAS COM *Candida albicans*.**

SANDRA CADENGUE DE SANTANA

RECIFE – 2003

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	iv
RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	vii
1- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	01
1.1- O Mosquito <i>Culex quinquefasciatus</i> Say 1823, (Diptera: Culicidae).....	01
1.2- Mecanismos de Defesa Imune dos insetos.....	02
1.3- Resposta Humoral.....	03
1.4- Mecanismo de Resposta Celular: Fagocitose, Encapsulamento e Nodulação.....	04
1.5- Fatores que Afetam a Defesa Celular.....	06
1.6- Tamanho do Corpo e a Resposta Imune.....	09
2- HIPÓTESES.....	11
3- OBJETIVOS.....	12
4- MATERIAL E MÉTODOS.....	13
4.1-Tamanho das Fêmeas e Duração do Período Pós-embrionário do <i>Culex quinquefasciatus</i> em Função da Densidade Larval.....	13
4.2- Relação entre Tamanho dos Mosquitos e Formação de Cápsulas.....	14
4.2.1- Infecção dos Insetos.....	14
4.2.2- Análise da Formação de Cápsulas em Resposta a Infecção com <i>C. albicans</i> ..	16
4.3- Formação das Cápsulas em Resposta ao Tratamento com Indometacina.....	17
4.4- Análises Estatísticas.....	17
5- RESULTADOS	19
5.1- Variação do Tamanho das Fêmeas e Duração do Período Pós-embrionário do <i>Culex quinquefasciatus</i> em Função da Densidade Larval.....	19
5.2- Relação entre o Tamanho do Corpo das Fêmeas e a Capacidade de Formação de Cápsulas.....	21
5.3- Efeito da Indometacina sobre a Formação de Cápsulas em Mosquitos Infectados.....	25
6- DISCUSSÃO.....	27
7- CONCLUSÃO.....	29
8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	30

1- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. *Culex quinquefasciatus* Say, 1823 (Diptera: Culicidae)

O mosquito *Culex quinquefasciatus* é um díptero da família Culicidae, que foi descrito originalmente em New Orleans (EUA) como *Culex pipens fatigans*. Esta espécie apresenta distribuição geográfica cosmopolita, sendo considerado um mosquito doméstico, cujo comportamento endofílico e antropofílico influencia sua abundância e prevalência, principalmente em áreas urbanas (Forattini *et al.*, 1993). No Brasil, distribui-se por todos os estados recebendo diferentes denominações como mosquito, pernilongo, muriçoca ou carapanãs (Consoli e Lourenço-de-Oliveira, 1994).

Culex quinquefasciatus possui desenvolvimento holometabólico, com duração do ciclo evolutivo de aproximadamente 13 dias, de acordo com as condições ambientais, como temperatura e umidade relativa do ar, que influenciam diretamente neste processo. Desenvolve-se em coleções de águas estagnadas ou de pouco movimento, ricas em matéria orgânica em decomposição e detritos, com aspecto sujo e de odor fétido (Consoli e Lourenço-de-Oliveira, 1994).

Em geral as fêmeas de *C. quinquefasciatus* realizam cerca de quatro oviposições durante a vida adulta, sendo a maioria dos ovos (aproximadamente 73,4%) produzidos no primeiro ciclo gonotrófico (Suleman e Reisen, 1979). Postos na lâmina d'água, de forma agrupada tomando o aspecto de jangada, os ovos passam por um período de embrionamento, após o qual eclodem as larvas, as quais apresentam quatro mudas ao longo de seu desenvolvimento. Nesta fase, alimenta-se indistintamente do microplâncton constituinte do ambiente como rotíferos, bactérias, esporos de fungos ou partículas orgânicas em suspensão. A fase de pupa é marcada pelo aspecto morfológico de vírgula, grande agilidade na água e ausência de alimentação. Os adultos possuem coloração marrom de tonalidades claras e escuras, presença de escamas amarelo-douradas que revestem principalmente o tórax. Os machos possuem antenas plumosas e palpos maiores que a probóscide, enquanto as fêmeas possuem antenas pilosas com poucas cerdas e palpos menores que a probóscide. As fêmeas são hematófagas e anautogênicas, portanto cada oviposição é precedida por um repasto

sangüíneo. A hematofagia é estimulada principalmente no crepúsculo vespertino (Consoli e Lourenço-de-Oliveira, 1994).

Culex quinquefasciatus é considerado o principal transmissor da *Wuchereria bancrofti* causadora da filariose linfática, em ambientes urbanos tropicais e seu vetor exclusivo nas Américas (WHO, 1987). Além da *W. bancrofti*, esta espécie de mosquito também é responsável pela veiculação do vírus Oropouche em áreas do Estado do Pará e Rondônia (Consoli e Lourenço-de-Oliveira, 1994). A região metropolitana do Recife é principal área endêmica para filariose bancroftiana veiculada por esta espécie no Brasil; no entanto, esta endemia apresenta-se também em Maceió e Belém (Dreyer *et al.*, 1989; Dreyer e Medeiros 1990; Fontes *et al.*, 1994; Maciel *et al.*, 1996; Rachou *et al.*, 1957; Rachou, 1960).

1.2. Mecanismos de Defesa Imune dos Insetos

Um dos fatores que contribuem decisivamente para a habilidade dos insetos em colonizar quase todos os tipos de nichos ecológicos Terrestres é sua capacidade em combater invasões de patógenos e parasitas (Lowenberger, 2001; Lowenberger *et al.*, 1996). Essa capacidade de defesa é denominada imunidade inata e compreende uma resposta humoral (Boman, 1998; Casteels *et al.*, 1990; Hultmark *et al.*, 1980; Hoffmann *et al.*, 1997; Meister *et al.*, 2000; Lowenberger, 2001) e outra celular (Götz e Vey, 1974; Ratcliffe e Rowley, 1979; Strand e Pech, 1995; Schmidt *et al.*, 2001; Wiesner e Götz, 1993).

A divisão da imunidade inata ou sistema imune dos insetos, em resposta celular e humoral, tem sido considerada inapropriada, desde que muitos fatores humorais afetam a função dos hemócitos, os quais, por sua vez, são uma fonte importante de muitas moléculas humorais (Lavine e Strand, 2002). Um bom exemplo da interação entre a resposta celular e humoral é o mecanismo de reconhecimento de corpos estranhos durante os processos infecciosos. Este reconhecimento é feito pelos hemócitos, podendo ser de forma direta, através da interação de receptores de superfície dessas células com as moléculas do organismo invasor, ou indiretamente, pelo reconhecimento de receptores humorais que se ligam e opsonizam a superfície do patógeno (Lavine e Strand, 2002). Contudo, para melhor entendimento do processo de defesa imune dos insetos, estes mecanismos continuam sendo tratados separadamente na literatura.

1.3. Resposta Humoral

O mecanismo de defesa humoral mais estudado nos insetos é a indução ou aumento temporário de peptídeos com atividade antimicrobiana na hemolinfa (Boman, 1998; Casteels *et al.*, 1990; Hultmark *et al.*, 1980; Hoffmann *et al.*, 1997; Hoffmann *et al.*, 1999; Lowenberger, 2001; Meister *et al.*, 2000).

Os peptídeos antimicrobianos produzidos pelos insetos são desprovidos de atividade citotóxica e apresentam grandes variações no tamanho, composição de aminoácidos e estrutura. Essas variações levaram ao agrupamento desses peptídeos em 3 categorias, baseando-se na seqüência e aspecto estrutural da molécula: I - peptídeos lineares formando α -hélice e desprovidos de cisteína (Ex. cecropinas); II - peptídeos contendo resíduos de cisteína (Ex. defensina, drosomicina, tanatina); III - peptídeos contendo grande número de resíduos de prolina (Ex. drosocina, lebocina e formacina) e glicina (gloverinas) (Bulet *et al.*, 1999).

As cecropinas foram os primeiros peptídeos induzidos caracterizados em insetos. Em mosquitos, os primeiros relatos de moléculas com características similares à cecropina foram realizados “in vitro” em linhagens de células de *Aedes albopictus* por Hernandez *et al.* (1994). No entanto, o isolamento dessa molécula em hemolinfa imunizada de *Aedes aegypti* só ocorreu em 1999 por Lowenberg e colaboradores. Em seguida, a cecropina também foi isolada em *Anopheles gambiae* (Vizioli *et al.*, 2000). Além de atividade contra bactérias Gram-positiva e Gram-negativa, a cecropina mostra-se eficaz na redução do *Plasmodium gallinaceum* (Gwadz *et al.*, 1989) e do parasita filarial *Brugia pahangi* (Chalk *et al.*, 1994).

Os primeiros relatos de defensina em insetos foram feitos simultaneamente por dois grupos de pesquisadores que trabalhavam independentemente. Assim, em 1988, Matsuyama e Natori descreveram a ocorrência deste tipo de peptídeo no díptero *Sarcophaga peregrina* e Lambert *et al.* (1989) registraram o mesmo peptídeo no díptero *Phormia terranova*. Desde então, mais de 30 defensinas foram descritas em várias espécies de insetos. Em mosquitos, defensinas foram primeiramente isoladas por Chalk *et al.* (1995) e Lowenberger *et al.* (1995) em *A. aegypti*. Posteriormente, Cho *et al.* (1996) isolaram e sequenciaram os genes da defensina nesta espécie de mosquito, o qual inclui 1400 pb (pares de base) na região de codificação. A defensina é ativa principalmente contra bactérias Gram-positivas e ocasionalmente possui ação contra fungos (Cociancich *et al.*, 1994; Rees *et al.*, 1997) e filária (Albuquerque e Ham, 1996).

Peptídeos ricos em cisteínas, como drosomicina e tanatina, apresentam ação antifúngica. A drosomicina foi o primeiro peptídeo com ação antifúngica isolado em um inseto, e até o presente só foi encontrada no díptero *Drosophila melanogaster* (Fehlbaum *et al.*, 1994). Além da propriedade antifúngica, as tanatinas atuam contra bactérias Gram-positiva e Gram-negativa, tendo sido isolada no hemíptero *Podinus maculiventris* (Fehlbaum *et al.*, 1996).

Os peptídeos ricos em prolina possuem peso molecular entre 2-4kDa, não apresentam resíduos de cisteínas, e atuam contra bactéria gram-negativa. Além da drosocina, lelocina e formacina citados anteriormente, inclui-se nesse grupo a abecina (Casteels *et al.*, 1990), a apidecinas (Casteels *et al.*, 1989) de abelhas e outros himenópteros (Casteels *et al.*, 1994), a metanikowins (Chernysh *et al.*, 1996) e a pirrocoricina de coleópteros (Cociancich *et al.*, 1994).

Peptídeos ricos em glicina apresentam peso molecular relativamente heterogêneo, variando entre 10-30kDa (Hetru *et al.*, 1998). A atacina de 22kDa descoberta no lepidóptero *Hyalophora cecropia*, é ativa contra bactérias Gram-negativas (Hultmark *et al.*, 1980; Engström *et al.*, 1984).

Além do aumento de peptídeos antimicrobianos na hemolinfa em resposta à invasão de um corpo estranho, outros mecanismos, como o estímulo da cascata enzimática que regula a coagulação e melanização (Muta e Iwanaga, 1996; Gillespie e Kanost, 1997) e a produção de reações mediadas por oxigênio e nitrogênio (Bogdan *et al.*, 2000; Vass e Nappi, 2001), cooperam nas reações para eliminar os agentes infecciosos.

1.4. Mecanismo de Resposta Celular: Fagocitose, Encapsulamento e Nodulação.

O processo de resposta imune celular é considerado complexo, por conter várias fases distintas e específicas de atuação. Em geral, a resposta celular está relacionada com compostos bioquímicos presentes na hemolinfa, além de depender do tamanho do microorganismo invasor, quantidade e propriedades da membrana do patógeno. Esta resposta desencadeia os seguintes mecanismos: fagocitose, encapsulamento e nodulação (Gotz e Vey 1974; Ratcliffe e Rowley, 1979; Ratcliffe e Waters, 1983; Wiesner, 1992).

Na maioria dos insetos, a fagocitose tem início quando hemócitos do tipo plasmatócito ou granulócito reconhecem o patógeno como invasor. O reconhecimento ocorre pela interação direta de receptores de superfície presentes no hemócito com moléculas do organismo invasor ou pelo reconhecimento de fatores humorais que se ligam à superfície do microorganismo (Lavine e Strand, 2002). Dentre as moléculas componentes da parede celular do invasor que servem como receptores de reconhecimento, destacam-se polissacarídeos (LPS), peptídeo glican, e 1,3-glucan. Além destes, lectinas e hemolinas são citadas como receptores de reconhecimento pelos hemócitos (Bulet *et al.*, 1999, Schmidt *et al.*, 2001).

Integrinas conhecidas como (α , β), glicoproteínas heterodiméricas, compostas de subunidades associadas não covalentemente, constituem a principal classe de receptores de reconhecimento presente no hemócito (Hynes, 1992). As integrinas ligam-se à matriz extracelular que contém a sequência Arg-Gly-Asp (RGD) (Humphries *et al.*, 1993). A ligação ativa a cascata que regula a formação de um fagossoma e ingestão do corpo estranho, via um mecanismo dependente da polimerização da actina. O fagossoma madura em fagolisossoma eliminando ou degradando o corpo estranho.

Além da fagocitose, o encapsulamento e a formação de nódulos são mecanismos celulares que auxiliam na eliminação de microorganismos invasores. Estes mecanismos requerem que hemócitos não adesivos se transformem em adesivos, de modo a se ligarem uns aos outros e envolverem o patógeno. Citoquinas e homólogos são considerados os mais importantes fatores de adesão dos insetos, atuando sobre os plasmatócitos que são as principais células envolvidas no encapsulamento e nodulação (Clark *et al.*, 1997; Strand *et al.*, 2000). Em insetos com baixo número de hemócitos circulantes, como os dípteros, o encapsulamento é dito humoral devido à baixa participação de hemócitos na nodulação (Vey e Götz, 1975) e a deposição de uma matriz homogênea ao redor do organismo invasor (Gotz, 1986; Ratcliffe *et al.*, 1986; da Silva *et al.*, 2000).

A formação de nódulos é quantitativamente a resposta mais eficiente contra infecções bacterianas (Horonov e Dunn, 1982), retendo um grande número de bactérias dentro do nódulo, tornando-as isoladas na hemocela do inseto. Então a cascata da profenoloxidase é estimulada, formando um depósito de melanina ao redor da bactéria, tornando o nódulo melanizado (Söderhall e Schmit, 1984; Mandato *et al.*, 1997). A intensidade desta melanização parece estar ligada à variação da quantidade de hemócitos envolvidos neste processo e do tempo de exposição do patógeno aos hemócitos.

No mosquito *C. quinquefasciatus* a resposta celular parece ser o principal mecanismo de defesa contra a bactéria *Micrococcus luteus* e o fungo *Candida albicans* (Araújo, 2000; da

Silva *et al.*, 2000). Os nódulos formados em resposta à infecção variaram de tamanho e intensidade de melanização, sendo encontrados preferencialmente no tegumento e traquéias (Araújo, 2000).

1.5. Fatores que Afetam a Defesa Celular

A atividade fagocítica e o processo de nodulação têm se mostrado fortemente influenciados pela produção de aminas biogênicas e eicosanóides. As aminas biogênicas, como octopamina e 5-hidroxitriptamina (5-HT), atuam mudando o comportamento e motilidade dos hemócitos, elevando a fagocitose *in vitro* e formação de nódulos *in vivo* na barata *Periplaneta americana* (Baines *et al.*, 1992). Um aumento na eliminação de bactérias da hemolinfa da mariposa *Galleria mellonella* devido à influência de octopamina sobre estes mecanismos de defesa celular foi descrito por Dunphy e Downer (1994).

Os eicosanóides, termo geral usado para caracterizar todos os metabolitos com atividade biológica derivados de ácidos graxos polinsaturados de C20: homo- γ -linolênico (20:3n-6), ácido araquidônico (20:4n-6) e eicosapentaenóico (20:5n-3), também têm sido citados como importantes na regulação de reações de eliminação microbiana da hemocele dos insetos (Stanley-Samuelson, 1991).

Segundo Stanley-Samuelson (1994a), são reconhecidos três grupos principais de eicosanóides: O primeiro é formado pelas prostaglandinas e tromboxanos e agem na via da cicloxigenase. O segundo é constituído pelo ácido epoxieicosatrienóico que atua na via epoxigenase. Finalmente, leucotrienos e lipoxinas influenciam a via da lipoxigenase responsável por grande quantidade de produtos que mediam os eventos de respostas celulares tanto em mamíferos como em invertebrados. Um esquema representando a biossíntese dos eicosanóides baseado no metabolismo do ácido araquidônico está representado na Figura 1.

Entre os mamíferos, os eicosanóides são conhecidos particularmente por atuar em eventos patofisiológicos, incluindo inflamações (Holtzan, 1992; Needleman *et al.*, 1986; Powell e Funk, 1987; Spector *et al.*, 1988). Nos insetos, o aspecto mais bem estudado refere-se à mediação dessas substâncias sobre as reações de defesa celular, nos processos de nodulação e fagocitose, em resposta a infecções bacterianas (Jurenka *et al.*, 1997; Mandato *et al.*, 1997; Miller *et al.*, 1994; Tunaz *et al.*, 1999; 2001). Além disso, os eicosanóides também parecem influenciar no comportamento de reprodução, transporte de íons e ecologia de vários

insetos (Stanley-Samuelson, 1994a,b; Stanley e Loher, 1986; Stanley e Howard, 1998; Howard e Stanley, 1999; Stanley, 2000).

A maioria dos estudos sobre a influência dos eicosanóides na resposta imune celular dos insetos tem sido realizada pelo grupo coordenado por Stanley-Samuelson. Usando inibidores da biossíntese dos eicosanóides, os pesquisadores têm mostrado uma redução no processo de formação de nódulos em vários insetos. A injeção de inibidores específicos da fosfolipase A₂, cicloxigenase e lipoxigenase, no lepidóptero *Manduca sexta* resultou na diminuição da capacidade da larva em produzir nódulos contra a bactéria *Serratia marcescens*, levando os autores a sugerirem que produtos da ciclo e lipoxigenase podem regular a resposta de adesão dos hemócitos a esta bactéria (Miller *et al.*, 1994). Estudos posteriores realizados por Miller *et al.* (1996), demonstraram que em larva do coleóptero *Zophobas atratus* as reações de microagregação e nodulação a infecção bacteriana é dependente dos eicosanóides. Resultados similares foram observados no bicho-da-seda, *Bombix mori* (Stanley-Samuelson *et al.*, 1997), nas mariposas *Agrotis ipsilon* e *Pseudaletia unipuncta* Jurenka *et al.* (1997), em larvas da *Colias eurytheme* (Stanley *et al.*, 1999), em adultos do grilo *Gryllus assimilis* (Miller *et al.*, 1999) e em duas espécies de cigarras, *Magicicada septende* e *M. cassini* (Tunaz *et al.*, 1999).

Outros mecanismos relacionados com a resposta celular, como a fagocitose também tem sido descrita como mediada por eicosanóides em *Galleria mellonella* (Mandato *et al.*, 1997). De acordo com Carton *et al.* (2002), os eicosanóides também mediam o processo de encapsulamento em ovos parasitados de *Drosophila*.

O modo de ação dos eicosanóides é pouco conhecido, embora possam mediar indução dos genes da cecropina e lisozima no corpo gorduroso do bicho-da-seda (Morishima *et al.*, 1997). Isto sugere que os eicosanóides possam ser elementos biológicos importantes nos processos de transdução que operam entre uma infecção bacteriana e o aparecimento de reações de defesa no inseto.

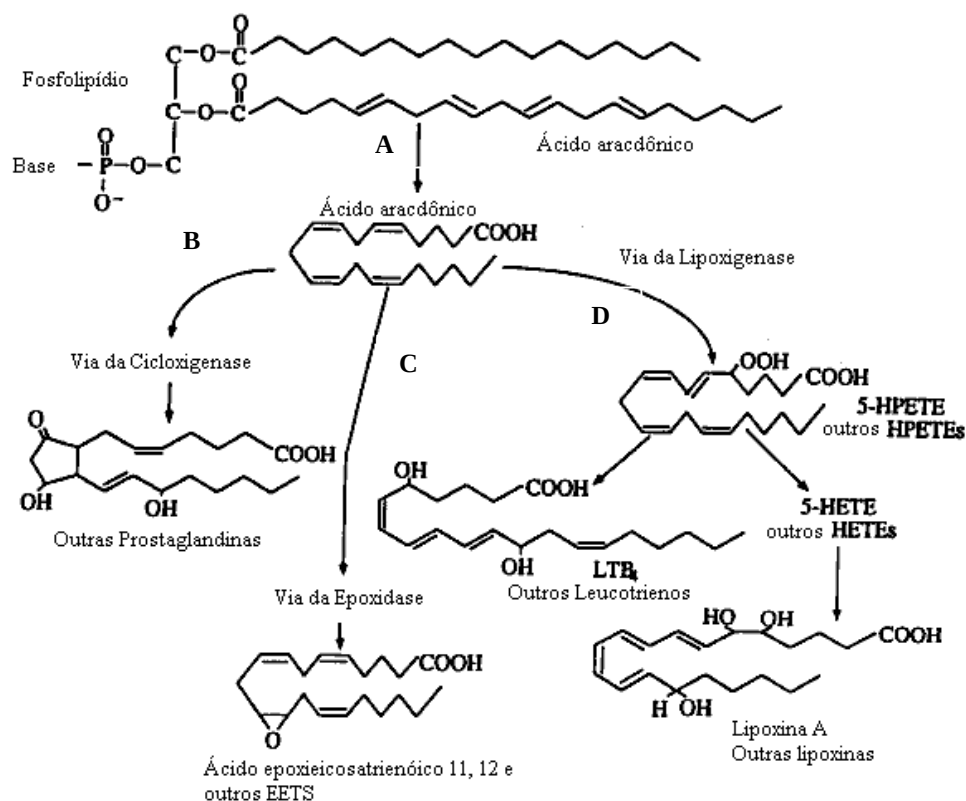


Figura 1- Esquema dos eicosanóides, baseado no metabolismo do ácido araquidônico, a partir de estudos em mamíferos. As principais famílias dos eicosanóides incluem as prostaglandinas, ácido epoxieicosanóico e vários produtos da via da lipoxigenase. As letras maiúsculas indicam os locais onde ocorrem as inibições seletivas, das vias metabólicas da biossíntese dos eicosanóides. **A** - via da fosfolipase A₂ (PLA₂) que é inibida pela dexametasona; **B** - via da ciclooxigenase, inibida pela indometacina, as aspirinas e naproxina; **C** - via da epoxigenase, inibida pela SKF-525A; **D** - via da lipoxigenase, inibida pela esculetina. HETE ácido hidroxieicosatetraenóico. **Fonte:** Stanley-Samuelson, 1994.

1.6. Tamanho do Corpo e a Resposta Imune

O tamanho do corpo dos insetos pode influenciar diversos aspectos fisiológicos como fecundidade, longevidade, atratividade para o hospedeiro e a capacidade de defesa imune contra infecções (Gleiser *et al.*, 2000), além da possibilidade de torna-se vetor (Paulson e Hawley, 1991; Nasci e Mitchell, 1994). Fish (1985), Gutiérrez e Menéndez (1997) também sugerem o tamanho como um fato determinante na sobrevivência e distribuição dos indivíduos no ambiente natural.

Em mosquitos, vários trabalhos têm relacionado o tamanho, com a quantidade de sangue ingerido (Ahmed *et al.* 1999; Lima, 2000), número de ovos postos (Briegel, 1990; Hurd *et al.*, 1995; Lima *et al.* 2003) e longevidade das fêmeas (Briegel, 1990a,b; Nasci, 1986; Van Handel e Day, 1988). Além disso, fêmeas grandes de *Ae. triseriatus* são mais resistentes à infecção pelos vírus Ross River ou La Cross (Grimstad e Walter, 1991; Nasci e Mitchell, 1994), enquanto fêmeas maiores de *Ae. aegypti* são menos susceptíveis ao vírus da dengue (Sumanochitrapon *et al.*, 1998). A influência do tamanho sobre a capacidade imune não se restringe a infecções virais. Assim, Lyimo e Koella (1992) verificaram que fêmeas grandes de *Anopheles gambiae* coletadas no campo continham menos esporozoítos de malária do que fêmeas menores. Resultados similares foram obtidos por Suwanchaichinda e Paskewitz (1998), estudando a mesma espécie de mosquito, com relação à capacidade de melanização de partículas de sefadex beads[®]. Adultos provenientes de larvas criadas em dietas variadas apresentaram capacidade de melanização de acordo com o tamanho, sendo os indivíduos maiores mais aptos a realizarem este processo. Os autores sugerem que tal diferença pode ser decorrente de mudanças na concentração de nutrientes críticos para a melanização.

De acordo com Nasci e Mitchell (1994), o tamanho do adulto é uma manifestação física da qualidade do habitat larval. Neste contexto, a disponibilidade de alimento, na maioria das vezes, relacionada com a densidade larval do habitat, é um fator determinante do tamanho do corpo como descrito para *Ae. cantans* por Renshaw *et al.* (1993) e *Ae. polynesiensis* (Mercer, 1999). A competição por alimento, dependente da densidade em diferentes estágios larvais do mosquito *Culex pipiens quinquefasciatus*, resultou no aumento da mortalidade e tempo de desenvolvimento, além de afetar negativamente o tamanho dos adultos (Gorla *et al.*, 1992). Este fator também foi demonstrado por Schneider *et al.* (2000) com larvas de *Anopheles arabiensis* e *An. gambiae* em estudo de laboratório.

Portanto, pode-se inferir que o tamanho do corpo do inseto influencia a susceptibilidade à infecção, estando na dependência das condições nutricionais dos estágios larvais. Desse modo, estudos que contribuam para um maior conhecimento das relações entre o tamanho e a capacidade de defesa contra infecção são fundamentais para o entendimento da capacidade vetorial de espécies de importância médica.

2 - HIPÓTESES

Considerando a influência da nutrição larval sobre o tamanho e fisiologia dos mosquitos, neste trabalho foram testadas três hipóteses para verificar a relação entre o tamanho de *C. quinquefasciatus* e a sua capacidade de resposta de encapsulamento.

a) Larvas criadas em diferentes densidades populacionais, apresentarão alterações na duração do período de desenvolvimento e no tamanho dos adultos.

b) O tamanho do corpo do adulto interfere na capacidade imunológica do inseto.

c) Se os eicosanóides atuam no processo de formação de cápsulas melanizadas, fêmeas infectadas com patógeno, terão a resposta de encapsulamento reduzida pelos inibidores das vias metabólicas dessa substância.

3 - OBJETIVOS

3.1. Geral

Estudar o efeito do tamanho de fêmeas adultas e da indometacina sobre a formação de cápsulas em *Culex quinquefasciatus* submetidos a infecção com o fungo *Candida albicans*.

3.2. Específicos

- 3.2.1. Verificar o tamanho das fêmeas e a duração do período pós-embrionário de *Culex quinquefasciatus* criados em diferentes densidades larvais.
- 3.2.2. Relacionar a variação de tamanho das fêmeas com a capacidade de formação de cápsulas melanizadas, em resposta à infecção pelo fungo *Candida albicans*.
- 3.2.3. Analisar a influência da indometacina (inibidor da via da cicloxigenase na biossíntese dos eicosanóides) sobre a formação de capsulas melanizadas em mosquitos infectados.

4 – MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Tamanho das Fêmeas e Duração do Período Pós-embrionário do *Culex quinquefasciatus* em Função da Densidade Larval.

Para analisar o efeito do tamanho da fêmea de *C. quinquefasciatus* sobre a capacidade de defesa celular na forma de cápsulas melanizadas contra *C. albicans*, três classes de tamanho de adultos foram induzidas, seguindo-se o protocolo descrito por Sumanochitrapon *et al.* (1998). Larvas recém eclodidas (até 12 horas) foram distribuídas em três grupos com densidade variável (Tabela I), recebendo doses de 60 mg de ração para gatos Whiskas® (triturada e autoclavada) nos dias 1, 3, 5 e 6 de desenvolvimento. A quantidade de alimento por larva nos diferentes grupos variou entre 1,2 a 4,8 mg/larva/cuba ao final do desenvolvimento (Tabela I).

Tabela I. Grupos experimentais e quantidade de alimento oferecido (60mg) nos dias 1, 3, 5 e 6 do desenvolvimento larval do *Culex quinquefasciatus* mantidas em 3 diferentes densidades.

Densidade larval	Quantidade de alimento por dia (mg)	Total de alimento por larva (mg)
50	60mg	4,8
100		2,4
200		1,2

Três réplicas de cada experimento foram realizadas. Durante o desenvolvimento, as larvas foram mantidas em cubas plásticas (20x30x5cm), contendo 1 litro de água destilada.

Pupas provenientes de cada grupo foram colocadas em recipientes plásticos (6x11cm), sendo acondicionadas em gaiolas separadas de acordo com seu grupo. Os recipientes foram introduzidos no interior de gaiolas (30x30x32cm), recobertas com Telacom para emergência dos adultos. Durante os experimentos todos os indivíduos permaneceram em

sala de criação com temperatura de $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, $80 \pm 5\%$ de umidade relativa e fotoperíodo de 12:12 horas (Figura 2). Todos os experimentos foram realizados no Laboratório de Invertebrados Terrestres da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE.

A estimativa do tamanho das fêmeas foi baseada na técnica de Lyimo e Koella (1992). A asa direita de cada exemplar foi removida e montada em lâmina com lamínula, sendo seu comprimento medido da álula (extremidade proximal) até a extremidade distal, excluindo-se a franja (Figura 3 A e B). O comprimento da asa foi medido através de lupa (Leica MZ6[®]). Antes das análises, o sistema foi calibrado com uma lâmina micrométrica.

Durante o desenvolvimento pós-embrionário foram realizadas observações diárias para o registro da duração do período larval e determinação dos índices de mortalidade em cada tratamento.

4.2. Relação entre Tamanho dos Mosquitos e Encapsulamento

4.2.1. Infecção dos insetos

Como estimulador do sistema imune foi utilizado *C. albicans*, linhagem 1007 DAUFPE (Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco). Fêmeas provenientes de cada uma das três classes experimentais (G50, G100 e G200), com idade entre 3-4 dias, foram divididas em dois grupos e submetidas aos seguintes tratamentos infecciosos:

- 1 - Infectadas com o patógeno, através da inoculação de $1\mu\text{l}$ da suspensão da levedura, preparada por diluição uma alçada (diâmetro de 2mm) do microorganismo retirado da solução estoque (ver abaixo) em 5ml de tampão fosfato 0,01M (0,027M de KCl; 137 de NaCl; pH7,4 - SIGMA[®]). Para padronizar a dose inoculada, a suspensão foi calibrada em espectrofotômetro (B-442, Micronal) a uma densidade ótica (DO) de 0.26 obtida na absorbância de 600nm de comprimento de onda. Estima-se que nestas condições o número de células do fungo em $1\mu\text{l}$ da suspensão seja equivalente a 1.5×10^3 (da Silva, 2000).

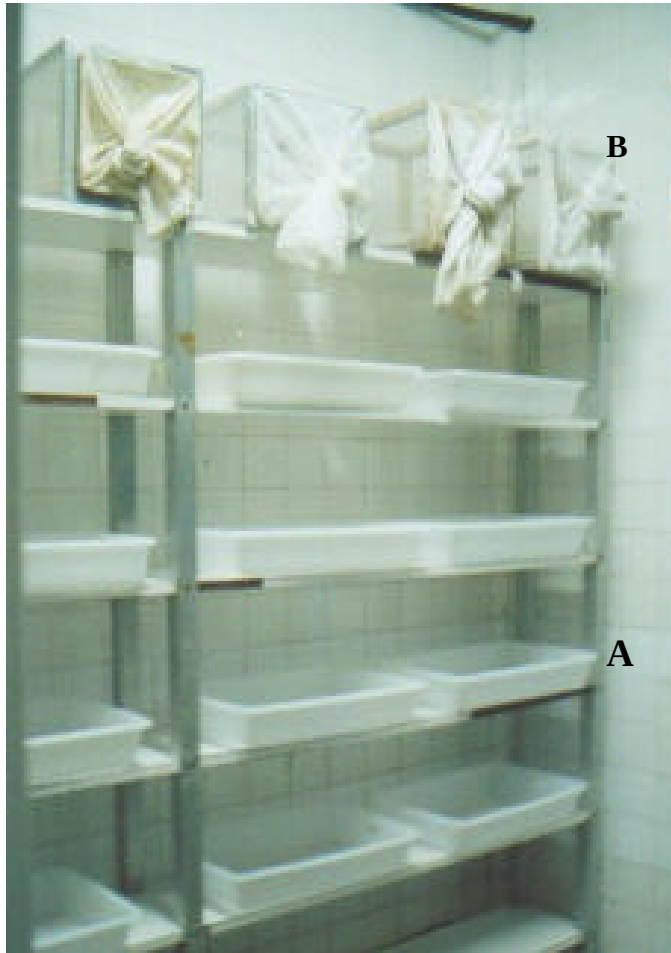


Figura 2. Sala de criação do mosquito *Culex quinquefasciatus*, Laboratório de Invertebrados Terrestres/ UFPE. **A** - Cubas plásticas para acondicionamento de larvas, **B** – Gaiolas para o acondicionamento das pupas.

2 - Injetado com tampão fosfato como controle para um possível efeito do trauma causado pela inoculação sobre a resposta imune do inseto.

A solução estoque consistiu de colônias de *C. albicans* mantidas em placa de Petri (9x 1,5cm) contendo 20ml de meio de cultura sólido Sabouraud Dextrose - Agar da DIFCO®, (Neopeptonas – 10%; Bacto-Dextrose – 40%; Bacto-Agar – 15%; pH – 5,6). A preparação do meio seguiu as especificações do fabricante, (65g em 1l de água destilada, fervido até a ebulição, autoclavado a 121°C por 15 minutos) e armazenado em geladeira a uma temperatura de 9°C. A cada 15 dias o material era repicado em uma nova placa, e incubado à 37°C por 24h e depois acondicionado em geladeira.

A infecção foi realizada através da inoculação intratorácica de 1µl da suspensão do patógeno em fêmeas anestesiadas em gelo por cerca de 2 a 3 minutos. Para inoculação, foram utilizadas microseringas confeccionadas a partir de microcapilares sem heparina (MICRON®). Após a infecção, os insetos foram mantidos em recipientes plásticos, 10x6cm, devidamente telados e alimentados com solução de sucrose até o momento das análises.

4.2.2. Análise da Formação de Cápsulas em Resposta à Infecção com *Candida albicans*

Para análise das cápsulas melanizadas formadas em resposta à infecção, o abdome das fêmeas dos grupos acima citados foi dissecado, fixado em lâmina histológica com solução de montagem (álcool a 70% + Glicerina na proporção de 1:1), e registradas as cápsulas melanóicas. Estas observações foram realizadas em três diferentes momentos após o tratamento (24, 48 e 72h) para estimar a duração da resposta imune. As cápsulas melanizadas foram contadas em microscópio óptico Leica DMLS®, com aumento de 20X.

4.3. Formação das Cápsulas em Resposta ao Tratamento com Indometacina

Para determinar o efeito da indometacina (inibidor da via da cicloxigenase) sobre a formação de cápsulas, fêmeas provenientes dos três grupos de tratamento larvais foram divididas em quatro grupos experimentais:

- 1 - Mosquitos inoculados com patógeno em tampão fosfato + indometacina (0.5% de etanol);
- 2 - Mosquitos inoculados com o patógeno em suspensão de tampão fosfato;
- 3 - Mosquitos injetados com tampão fosfato;
- 4 - Mosquitos injetados com 0.5% de etanol em tampão fosfato.

Os mosquitos foram inoculados com 1 μ l da suspensão do patógeno misturado a solução de indometacina a 10mM, dissolvidos em etanol absoluto. Os controles consistiram de insetos inoculados com a suspensão do patógeno diluído em salina e mosquitos injetados com etanol a 0,5% em tampão fosfato. As análises do efeito do inibidor foram realizadas 24, 48 e 72h após a infecção, onde os mosquitos foram mortos, dissecados e examinados para verificação e contagem das cápsulas melanizadas formadas.

4.4. Análise Estatística

Os dados foram analisados usando-se o programa Bio Estat versão 1.0. Quando aplicável, os dados foram transformados usando-se $\log_{10}$, e as diferenças das médias do número de cápsulas analisadas através de ANOVA (Teste t - LSD). A correlação de Spearman foi usada para relacionar variação de tamanho e produção das cápsulas. Diferenças entre as médias do número de cápsulas nos grupos tratados e controles foram comparadas pelo teste T de Student.



Figura 3. Asa esquerda de fêmeas de *Culex quinquefasciatus*. A- asa de indivíduos maiores que 3,9mm comprimento (a-b= medida da asa entre os pontos **a** e **b**). B- indivíduos menores que 3,9mm. Em aumento de 16x.

5 - RESULTADOS

5.1. Variação do Tamanho das Fêmeas e Duração do Período Pós-embrionário de *C. quinquefasciatus* em Função da Densidade Larval

O efeito da densidade larval sobre o tamanho do corpo das fêmeas adultas de *C. quinquefasciatus* foi investigado em 433 mosquitos provenientes dos três diferentes tipos de tratamento. Os resultados obtidos quanto à média e variação de tamanho das fêmeas em cada grupo estão representados na Tabela II.

Em todos os experimentos, os dados do comprimento de asa apresentaram uma distribuição normal. O tamanho das fêmeas sofreu forte influência do número de indivíduos/recipiente, diferindo estatisticamente entre as classes de tamanho ($F=800,16$; $p<0,01$).

O menor tamanho registrado foi de 3,4mm correspondendo a (11,1%, $n=139$) das fêmeas do G200, enquanto as maiores fêmeas foram obtidas no grupo G50 com tamanho de 4,29mm (12,5%; $n=143$).

A duração do período de desenvolvimento pós-embrionário nas diferentes densidades foi analisada numa amostra de 4.592 indivíduos, cuja distribuição por grupo está representada na Tabela II. A densidade das larvas influenciou a duração do desenvolvimento pós-embrionário, mostrando-se mais longo nos grupos com maior o número de indivíduos por recipiente. Embora a duração mínima do estágio larval tenha sido igual em todos os grupos (7 dias) o tempo máximo de desenvolvimento nesta fase foi de 10, 12 e 20 dias para os grupos com 50, 100 e 200 larvas/recipiente (Tabela II) respectivamente.

Independente do grupo analisado, o índice de mortalidade foi mais acentuado no período larval do que no estágio de pupa. Essa diferença, contudo, mostrou-se relacionada com o número de indivíduos por recipiente (Tabela II), sendo mais elevada nas cubas com 200 larvas. Neste grupo, a taxa de mortalidade foi similar entre larvas e pupas.

Tabela II. Duração do desenvolvimento pós-embrionário, mortalidade e tamanho das fêmeas de *Culex quinquefasciatus*, submetido a diferentes densidades populacionais durante o período larval.

Densidade larval (Grupo)	Desenvolvimento (dias)		N	Mortalidade (%)		Asa (mm)	
	Larva	Pupa		Larva	Pupa	Média± EP (variação)	N
G 50	7 – 10	1 – 2	1.200	4,33	0,41	4,15±0,06 (4,05-4,29)	143
G 100	7 – 12	1 – 2	1.500	5,40	3,20	3,96±0,09 (3,72-4,21)	151
G 200	7 – 20	1 – 2	2.400	6,95	6,45	3,62±0,01 (3,40-3,96)	139
Total			5.100				433

O percentual de pupação diária nos diferentes tratamentos está indicada na Figura 4. No grupo com 50 indivíduos/cuba a maioria das larvas (82,7%) puparam entre o 7º e 8º dias e o tempo máximo de desenvolvimento foi de 10 dias. Neste mesmo período, apenas 48,4% das larvas provenientes do G100 e 39,4% do G200, haviam sofrido metamorfose pupal, o que corresponde a uma redução de 35% e 57% respectivamente na taxa de pupação, quando comparado ao grupo com menor número de indivíduos por recipiente.

Nos grupos G100 e G200, os maiores índices de pupação ocorreram no dia 8º e 9º dias do desenvolvimento pós-embrionário (Figura 4), representando um retardo em torno de 24h no pico de pupação comparado ao G50. O efeito sobre a duração do período de desenvolvimento foi mais acentuado no grupo G200, onde larvas ainda foram visualizadas nas cubas 20 dias após a eclosão (dados não mostrados), indicando um prolongamento de até 10 dias no período larval em relação ao G50 e 8 dias comparado ao G100.

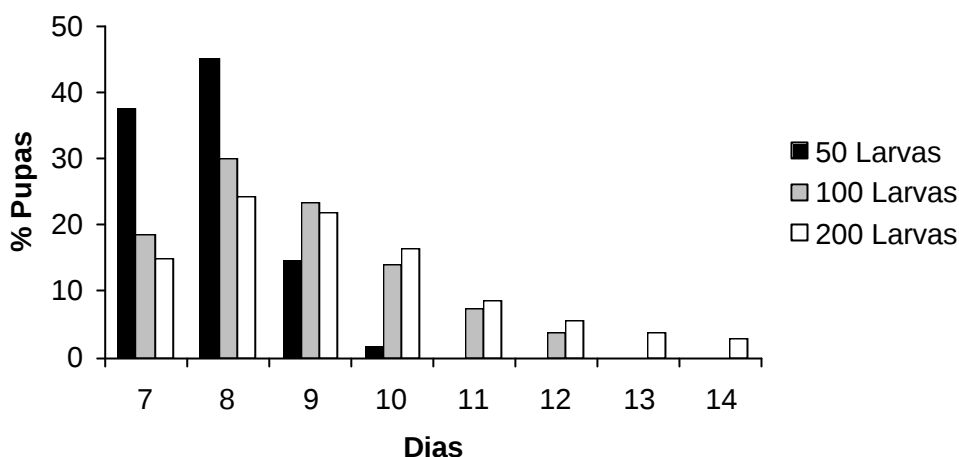


Figura 4. Percentual de pupas de *Culex quinquefasciatus* obtidas nos recipientes contendo 50, 100 e 200 larvas respectivamente, entre o 7º e 14º dias de desenvolvimento pós-embrionário.

5.2 – Relação entre o Tamanho do Corpo das Fêmeas e a Capacidade de Formação de Cápsulas Melanizadas

Um total de 105 fêmeas foi utilizado nas análises referente à relação entre o tamanho e a capacidade de formação de cápsulas. Inicialmente observou-se a formação de agregação das leveduras do fungo, seguindo-se o depósito de substância amorfa e finalizando com a deposição de melanina (Figura 5A e B). Na primeira fase foi quantificado o número de cápsulas produzidas por fêmeas provenientes de cada grupo (G50, G100 e G200) separadamente, para determinar se ocorria variação significativa intragrupo. Cápsulas melanizadas visualizadas por transparência no abdome do mosquito infectado são mostradas na Figura (6 A e B).

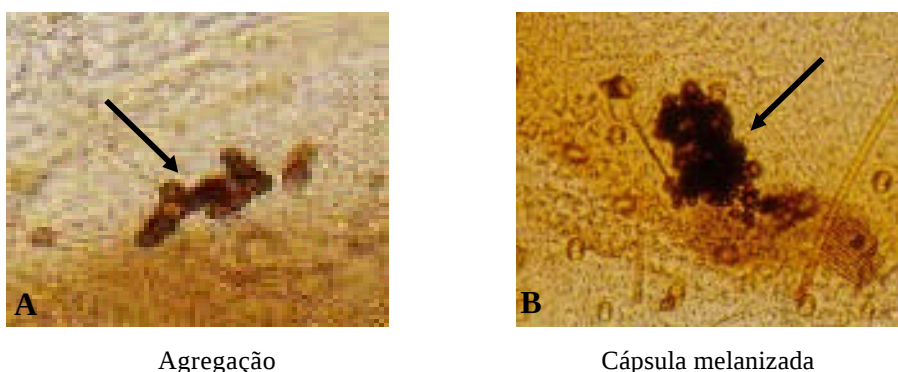


Figura 5. Agregação (A) e cápsula melanizada (B) induzida pela inoculação de *Candida albicans* em *Culex quinquefasciatus*.

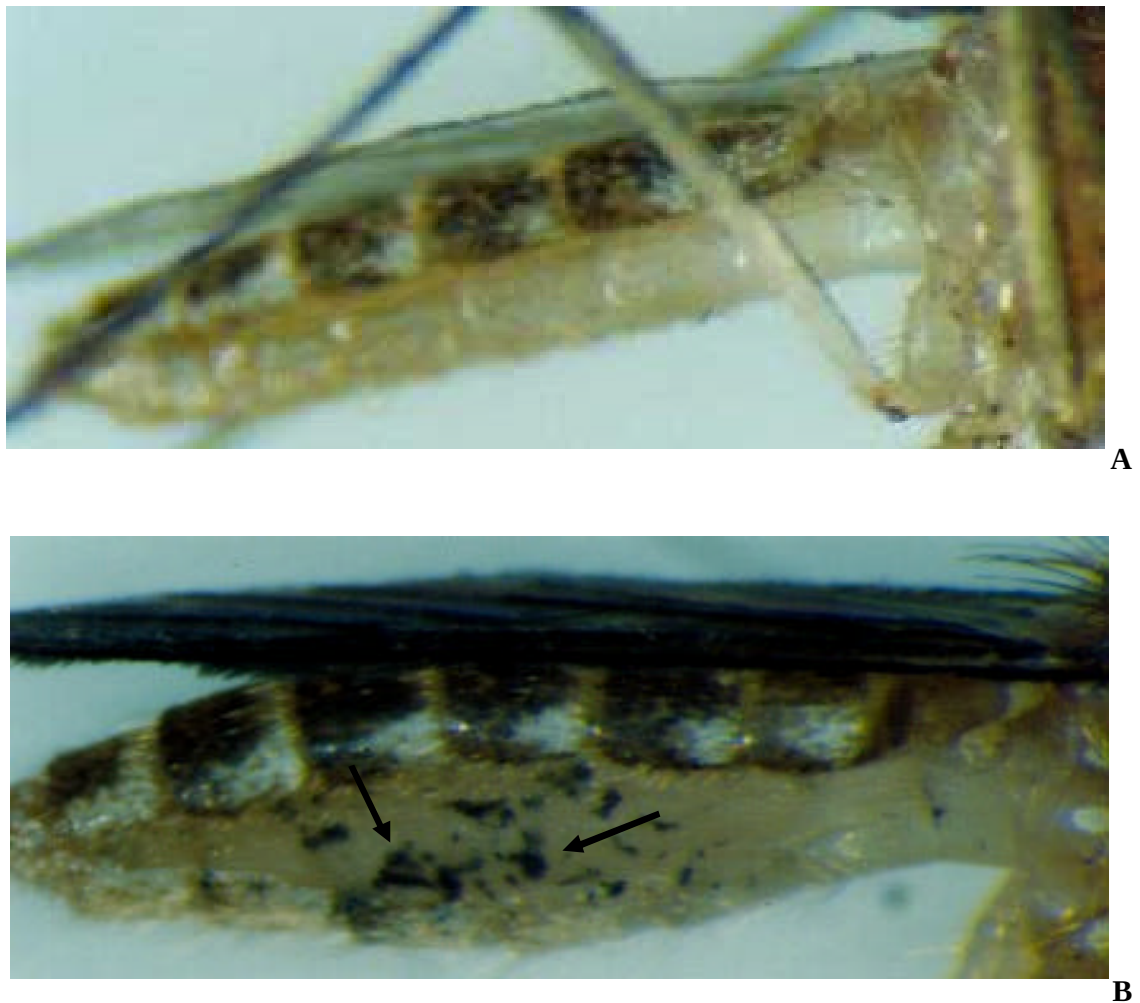


Figura 6. Cápsula melanizadas no abdome de *Culex quinquefasciatus* tratados com *Candida albicans* 48h após inoculação. (A)- mosquito não tratado; (B)- mosquito infectado.

Os resultados mostraram que dentro de cada grupo as variações de tamanho encontrado não afetou significativamente o número de cápsulas formadas. Entretanto, a formação de cápsulas melanizadas mostrou uma correlação positiva significativa com o tamanho através da regressão linear quando os diferentes grupos foram comparados ($r=0,48$, $p<0,05$).

Embora apresentem tamanhos diferentes, indivíduos dos grupos G50 e G100 produzem um número similar de cápsulas ($G50=151\pm48,1$; $G100=145,4\pm59,2$; Kruskal-Wallis $p=0,433$). No entanto, diferenças significantes foram encontradas quando estes grupos foram comparados ao G200 ($G200=91,2\pm27,7$; Kruskal-Wallis $p=0,0001$). O gráfico da Figura 7 mostra que o número de cápsulas maior do que 150/indivíduo só foi registrado em

fêmeas com tamanho superior a 3,9mm. Reagrupando-se os indivíduos da amostra estudada em dois grupos, considerando-se tamanhos maiores e menores que 3,9mm, encontra-se diferenças significativas no número de cápsulas melanizadas formadas entre os grupos.

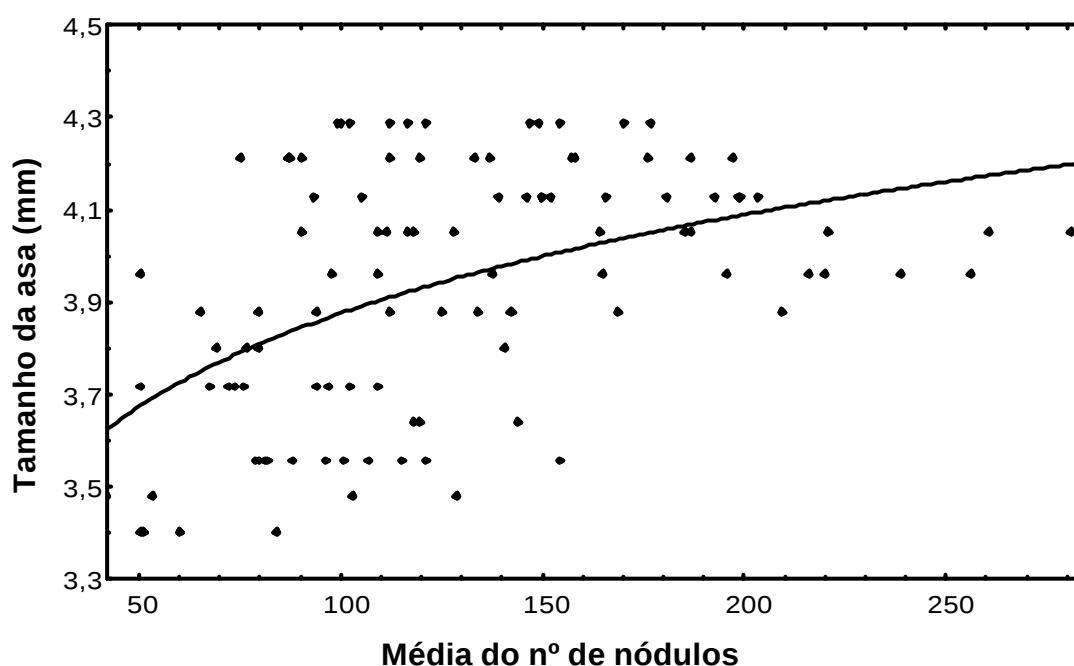


Figura 7. Correlação linear entre o tamanho da asa e produção de cápsulas em fêmeas de *Culex quinquefasciatus*, em resposta à infecção pelo fungo *Candida albicans*. ($r=0,48$, $p<0,05$).

Independente do grupo analisado, a resposta de formação das cápsulas foi mais elevada 48h após a infecção (Figura 8). No entanto, nas fêmeas do (G50) o número de cápsulas melanizadas formadas neste período foi significativamente maior ($F=6,96$, $p=0,002$) do que 24 e 72h. Nos demais grupos, não houve diferença significativa na resposta de formação destas cápsulas entre os períodos analisados.

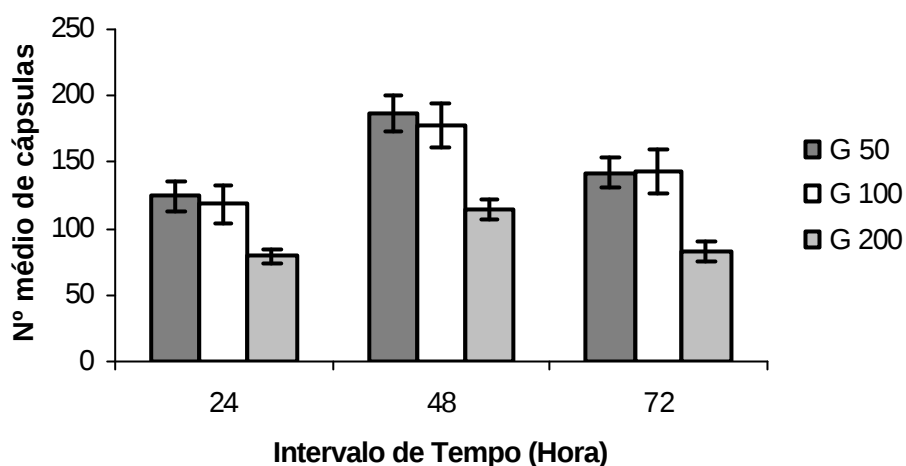


Figura 8. Número de cápsulas formadas por fêmeas de *Culex quinquefasciatus*, em resposta à infecção com *Candida albicans* nos diferentes grupos, durante 24, 48 e 72h após a infecção.

A variação no número de cápsulas formadas em resposta à infecção por *C. albicans* ao longo de 72h, considerando-se como referência o tamanho de 3,9mm está mostrada na Tabela III. A capacidade de encapsulamento sob a forma de cápsulas melanizadas foi significativamente menor entre as fêmeas com tamanho inferior a 3,9mm, em todos os momentos analisados. Em ambos os grupos, a maior atividade de defesa ocorre 48h após a infecção.

Tabela III. Formação de cápsulas em fêmeas de *C. quinquefasciatus* em resposta a infecção por *C. albicans* no período de 72h, considerando-se 3,9mm como tamanho limite para eficiência da resposta.

Tempo (h)	Média ± ER n.º de cápsulas	Média ± ER n.º de cápsulas	P
	< 3.9mm	>3.9mm	
24	92,5±9.37	125,2±9.52	0,018
48	148,9±13.36	179,3±11.40	0,045
72	103,6±12.07	144,1±10.16	0,003

5.3. - Efeito da Indometacina sobre a Formação de Cápsulas Melanizadas em Mosquitos Infectados

A presença do indometacina reduziu significativamente o número de cápsulas formadas em resposta a infecção com *C. albicans*, em todos os testes realizados. Esta redução mostrou-se independente do tamanho do inseto. Assim, foi formado um pool das diferentes amostras para análise do efeito do inibidor sobre a formação de cápsulas melanizadas. As variações na média de cápsulas formados ao longo de 72h de observação estão mostradas na Figura 9.

Nas primeiras 24h, o número médio de cápsulas registradas em mosquitos infectados com *C. albicans* e tratados com indometacina foi de $49,8 \pm 12,05$ apresentado uma redução de 52,6% (n=40) comparada ao grupo sem inibidor ($105,1 \pm 40,74$). No momento do pico da resposta, quando a média de cápsulas registradas no grupo controle foi de $162,3 \pm 53,98$ cápsulas/indivíduo, observou-se uma redução em 45% no número de cápsulas formadas no grupo tratado com indometacina ($88,5 \pm 19,45$). Após 72h, essa redução foi de 64,3% (n=40) (Figura 9). Diferenças significativas no número médio de cápsulas formadas foram encontradas entre todos os grupos ($p < 0,05$).

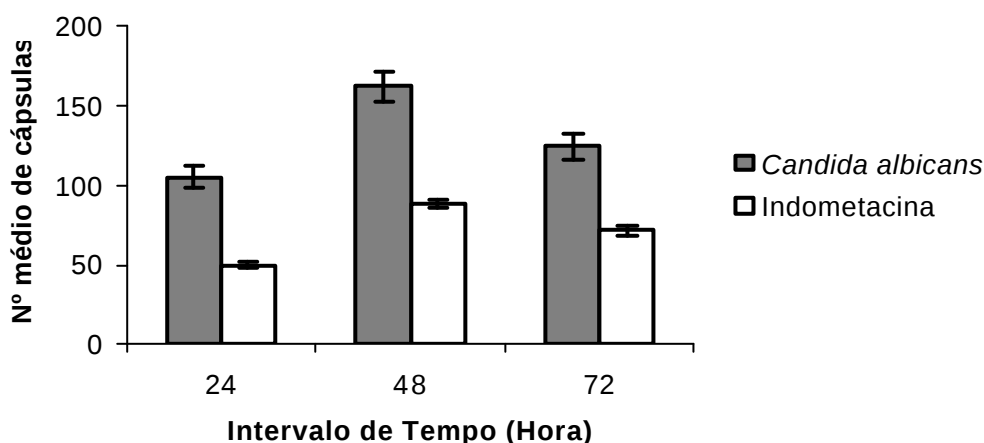


Figura 9. Número médio de cápsulas formadas por fêmeas de *Culex quinquefasciatus* infectadas com *Candida albicans*, em resposta ao tratamento com o inibidor da biossíntese dos eicosanóides, indometacina.

6 – DISCUSSÃO

A resposta de formação de cápsulas melanizadas no mosquito *Culex quinquefasciatus* infectado com as leveduras de *Candida albicans* e tratados com indometacina dão suporte a hipótese que os eicosanóides estão envolvidos no processo de resposta celular deste mosquito. Este mecanismo no entanto parece depender de fatores inerentes ao inseto, como a natureza do patógeno e o tamanho do corpo dos insetos (Ratcliffe e Walters, 1983; Rahmet-Alla e Rowley, 1989; Howard *et al.*, 1998).

Stanley-Samuelson (1991), foi o primeiro a sugerir o envolvimento dos eicosanóides na mediação da resposta celular dos insetos. Este autor verificou que a inoculação de inibidores das vias metabólicas da biossíntese dos eicosanóides reduziam intensamente a produção de nódulos contra a bactéria *Serratia marcescens* no lepidóptero *Manduca sexta*. A partir desse trabalho, vários estudos obtiveram resultados similares em diferentes espécies de insetos, enfocando especialmente, infecções bacterianas (Miller *et al.*, 1996; Jurenka *et al.*, 1997; Stanley *et al.*, 1999).

A mediação dos eicosanóides à resposta celular antifúngica em *C. quinquefasciatus* foi inicialmente estudada, em nosso laboratório, por Araújo (2000). Além da dexametasona, um inibidor da via metabólica da fosfolipase A_2 , na biossíntese dos eicosanóides, a autora tratou os mosquitos infectados pelo fungo *C. albicans*, com esculetina, um inibidor que atua na via da lipoxigenase nesta mesma biossíntese, para determinar o envolvimento dessas substâncias na nodulação. A indometacina, usada em nosso trabalho, amplia os estudos sobre o efeito dos eicosanóides na resposta celular desta espécie de mosquito e mostra que este inibidor reduz mais intensamente a capacidade do mosquito em formar cápsulas melanizadas contra a invasão do fungo, comparado aos inicialmente usados por Araújo (2000).

Além de *C. quinquefasciatus*, estudos relacionando eicosanóides e a formação de cápsulas melanizadas em resposta a infecção por fungos, foi encontrado apenas no lepidóptero *Manduca sexta* infectado com o *Metarhizium anisopliae* (Dean *et al.*, 2002). Similar ao descrito para este inseto, a formação de cápsulas em *C. quinquefasciatus* mostrou-se uma parte importante na resposta de defesa contra infecção por *C. albicans*. Apesar da grande diferença do tamanho, peso e dosagem do patógeno inoculado nessas duas espécies de insetos, a intensidade da resposta mediada 24h após inoculação pode ser considerada similar entre *M.*

sexta (108 nódulos) e *C. quinquefasciatus* (105 nódulos). Esta similaridade sugere a existência de uma alta especificidade na resposta celular a diferentes microorganismos entre os insetos e/ou um sistema de defesa mais eficiente no mosquito. Este processo de melanização de nódulos ou cápsulas tem sido descrito na maioria das espécies de insetos estudados (Gotz, 1986; Howard *et al.*, 1998; Kaaya e Ratcliffe, 1982; Mandato *et al.*, 1997; Tunaz *et al.*, 1999; Vey e Gotz, 1975)

Nos estudos com bactérias, vários trabalhos têm mostrado que linhagens patogênicas resultam em níveis maiores de nodulação do que as não patogênicas (Jurenka *et al.*, 1997; Miller *et al.*, 1999; Ratcliffe e Walters, 1983; Rahmet-Alla e Rowley, 1989; Stanley-Samuelson *et al.*, 1997). Além disso, a intensidade da resposta de nodulação também tem se mostrado variável no caso da bactéria estar viva ou morta (Rahmet-Alla e Rowley, 1989). Estas observações levaram Howard *et al.* (1998) a postular que a intensidade das reações de nodulação dos insetos está relacionada à natureza da bactéria invasora e a fatores intrínsecos dos indivíduos. Baseado em nossos resultados e nos dados descritos por Dean *et al.* (2002), podemos sugerir que esta regra aplica-se não apenas a bactérias, mas a qualquer tipo de patógeno. Os achados de Araújo (2000) reforçam esta hipótese. A autora verificou uma resposta duas vezes mais intensa contra infecções de *C. albicans* do que a bactéria *Micrococcus luteus* em fêmeas de *C. quinquefasciatus*.

Nos mosquitos, o tamanho do corpo das fêmeas, o qual está normalmente associado às condições do habitat larval, tem sido um parâmetro relacionado à sua capacidade vetorial (Nasci e Mitchell, 1994). Por ingerirem maior quantidade de sangue, fêmeas grandes teriam maior chance de se infectar por patógenos provenientes da dieta alimentar. Assim, nesse trabalho foi testada a hipótese de que a intensidade de formação de cápsulas estaria relacionada ao tamanho das fêmeas. De um modo geral, observou-se uma correlação positiva entre o comprimento da asa, usada como medida de tamanho, e a produção de cápsulas melanizadas em resposta a infecção por *C. albicans*. Contudo, nossos resultados sugerem que existe um tamanho médio a partir do qual esta relação teria uma importância significativa na capacidade imune do inseto. Fêmeas provenientes de larvas criadas em três densidades diferentes (50, 100, 200 indivíduos/recipientes) apresentaram tamanhos variados, dos quais só produziram nódulos em quantidade significativamente mais elevada os indivíduos de comprimento de asa maior que 3,9 mm. Trabalhando com fêmeas de *C. quinquefasciatus* infectadas com o parasito filarial *Wuchereria bancrofti*, Lima *et al.* (2003) verificaram que indivíduos de tamanho pequeno e médio foram mais susceptíveis a infecção do que fêmeas grandes. Embora, a natureza dos patógenos seja diferente entre nosso trabalho e o de Lima,

não se pode deixar de notar que o tamanho foi um fator importante na susceptibilidade deste inseto a infecção. Em outros mosquitos como o *Aedes aegypti*, fêmeas grandes provenientes de larvas criadas em baixa densidade populacional (50 indivíduos/recipientes) foram duas vezes mais susceptíveis à infecção com o vírus da dengue em condições de laboratório, do que adultos originados de larvas mantidas nas densidades de 100 e 200 indivíduos/recipientes (Sumanochitrapon *et al.*, 1998).

Finalmente, é importante notar que os inibidores da biossíntese dos eicosanóides não bloqueia completamente a habilidade de formação de cápsulas melanizadas nos mosquitos. Este fato também tem sido observado em outros insetos como na larva de *Zophobas atratus* (Miller *et al.*, 1996), no bicho-da-seda, *Bombix mori* (Stanley-Samuelson *et al.*, 1997), nas mariposas *Agrotis ipsilon* e *Pseudaletia unipuncta* (Jurenka *et al.*, 1997), em larvas da *Colias eurytheme* Stanley *et al.* (1999), em adultos do grilo *Gryllus assimilis* (Miller *et al.*, 1999) e em duas espécies de cigarras a *Magicicada septendecim* e *M. cassini* (Tunaz *et al.*, 1999). Estas observações reforçam o pressuposto da existência de outros parâmetros nas reações da resposta celular. Segundo Baines *et al.* (1992) as aminas biogênicas influenciam reações hemocíticas incluindo fagocitose e nodulação, sendo mais um fator envolvido na complexa reação celular contra infecção. Além dos eicosanóides e aminas outras moléculas ainda não identificadas podem interferir na imunologia dos insetos.

7 – CONCLUSÕES

Os resultados deste trabalho permitem concluir:

A formação de cápsulas melanizadas é um importante mecanismo de defesa imune do mosquito *Culex quinquefasciatus* contra infecções fúngica.

Embora o *C. quinquefasciatus* apresente uma eficiente resposta de encapsulamento, esta é significativamente maior em fêmeas com tamanho superior a 3,9mm.

Essa resposta de formação de cápsulas é mediada pelos eicosanóides.

O tamanho do indivíduo não interfere na mediação dos eicosanóides no processo de encapsulamento.

8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMED, A. M.; R. D. MAIGON; P. J. TAYLOR & H. HURD. 1999. The effects of infections with *Plasmodium yoelii nigeriensis* on reproductive fitness of the mosquito *Anopheles gambiae*. **Invertebrate Reproduction Development** **36**: 217-222.
- ALBUQUERQUE, C. M. R. & P. J. HAM. 1996. "In vivo" effect of a natural *Aedes aegypti* defesin on *Brugia pahangi* development. **Medical Entomology Vectors** **10**: 115-119.
- ARAÚJO, E. C. 2000. **Efeito dos eicosanóides sobre a resposta do *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) à infecção bacteriana e fúngica**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil, 55p.
- BAINES D. & R. G. H. DOWNER. 1992a. 5-Hydroxytryptamine-sensitive adenylate cyclase affects phagocytosis in cockroach hemocytes. **Insect Biochemistry and Physiology** **21**: 303-316.
- BAINES, D.; T. DeSANTIS & R. G. H. DOWNER. 1992b. Octopamin and 5-Hydroxytryptamine enhance the phagocytic and nodule formation activities of cockroach (*Periplaneta americana*) haemocytes. **Journal of Insect Physiology** **38**: 905-914.
- BOGDAN, C.; M. ROLLINGHOFF & A. DIEFENBACH. 2000. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. **Current Opinion Immunology** **12**: 64-76.
- BOMAN, H.G. 1998. Gene-encoded peptide antibiotics and the concept of innate immunity: an update review. **Scan. of Journal Immunology**. **48**: 15-25.
- BRIEGEL, H. 1990a. Metabolic relationship between female body size, reserves, and fecundity of *Aedes aegypti*. **Journal of Insect Physiology** **36**: 165-172.

- BRIEGEL, H. 1990b. Fecundity, metabolism, and body size in *Anopheles* (Diptera: Culicidae), vectors of malaria. **Journal of Medical Entomology** **27**: 839-85.
- BULET, P.; C. HETRU; J. DIMARCQ. & D. HOFFMANN. 1999. Antimicrobial peptides in insects; structure and function. **Developmental and Comparative Immunology** **23**: 329-344.
- CARTON, Y.; F. FREY; D. W. STANLEY; E. VASS & A. J. NAPPI. 2002. Dexamethasone inhibition of the cellular immune response of *Drosophila melanogaster* against a parasitoid. **Journal of Parasitology**. (In press.)
- CASTEELS, P.; C. AMPE; F. JACOBS; M. VAECK & P. TEMPST. 1989. Apindaecins: antibacterial peptides from honeybees. **EMBO Journal** **8**: 2387-2391.
- CASTEELS, P.; C. AMPE; L. RIVIERE; J. DAMME; C. ELICONE; M. FLEMING; F. JACOBS & P. TEMPST. 1990. Isolation and characterization of abaecin, a major antibacterial response peptide in the honey bee (*Apis mellifera*). **European Journal of Biochemistry** **187**: 381-3886.
- CASTEELS, P.; J. ROMAGNOLO; M. CASTLE; K. CASTELS-JOSSON; ERDJUMENT-BROMAGE & P. TEMPST. 1994. Biodiversity of apidaecin-type peptide antibiotics. **Journal of Biology Chemistry** **269**: 26107-26115.
- CHALK, R.; H. TOWSON; S. NATORI; H. DESMOND & P. J. HAM. 1994. Purification of an insect defesin from the mosquito, *Aedes aegypti*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology** **24**: 403-410.
- CHALK, R.; C. M. R. ALBUQUERQUE; P. J. HAM & H. TOWNSON. 1995. Full sequence and characterization of two insect defensins: immune peptides from the mosquito *Aedes aegypti*. **Proceedings of Research Society of London** **261**: 217-221.
- CHERNYSH, S.; S. COCIANCICH; J. P. BRIAND; C. HETRU & P. BULET. 1996. The inducible antibacterial peptides of the hemipteran insect *Palomena prasina*: identification

of a unique family of proline-rich peptides and of a novel insect defesin. **Journal of Insect Physiology** 42: 81-89.

CHO, W.;T. FU; J. CHIOU & C. CHEN. 1996. Loning and characterization of cDNAs encoding the antibacterial peptide, defesin A from the mosquito, *Aedes aegypti*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology** 26: 395-402.

CLARK, K.D.; L. L. PECH & M. R. STRAND. 1997. Isolation and identification of a plasmatocyte-spreading peptides from the hemolymph of the lepidopteran insect *Pseudoplusia includens*. **Journal of Biology Chemistry** 272: 23440-23447.

COCIANCICH, S.; P. BULET; C. HETRU & J. A. HOFFMANN. 1994. The antibacterial inducible peptides of insects. **Parasitology Today** 10: 132-139.

CONSOLI, R. G. B. & R. LOURENÇO-DE-OLIVEIRA. 1994. **Principais Mosquitos de Importância Sanitária**. Rio de Janeiro, Editora Fiocruz, 225 p.

Da SILVA, J. B.; C. M. R. ALBUQUERQUE; E. C. ARAÚJO; C. A. PEIXOTO & H. H. HURD. 2000. Immune defense mechanisms of *Culex quinquefasciatus* (Díptera: Culicidae) against *Candida albicans* infections. **Journal of Invertebrate Pathology** 76: 257-262.

DEAN P.; J. C. GADSDEN; E. H. RICHARDS; J. P. EDWARDS; A. K. CHARNLEY & S. E. REYNOLDS. 2002. Modulation by eicosanoid biosynthesis inhibitors of immune response by the insect *Manduca sexta* to the pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology** 79: 93-101.

DREYER, G.; A. COUTINHO & R. ALBUQUERQUE. 1989. Manifestações clínicas da filariose linfática bancroftiana. **Revista da Associação Médica do Brasil** 35: 189-196.

DREYER, G. & L. MEDEIROS. 1990. Filariose linfática: ainda um desafio. **Ciência Hoje** 12: 6-7.

- DUNPHY, G. B. & R. G. H. DOWNER. 1994. Octopamine, a modulator of the haemocytic nodulation response of non-immune *Galleria mellonella* larvae. **Journal of Insect Physiology** **40**: 267-272.
- ENGSTROM, P.; A. CARLSSON; A. ENSTROM; Z. J. TÃO & H. BENNICH. 1984. The antibacterial effect of attacins from the silk moth *Hyalophora cecropia* is directed against the outer membrane of *Escherichia coli*. **EMBO Journal** **3**: 3347-3351.
- FEHLBAUM, P.; P. BULET; L. MICHAUT; M. LAGUEUX; W. BROECKAERT; C. HETRU & A. J. HOFFMANN. 1994. Insect Immunity: septic injury of *Drosophila* induces the synthesis of a potent antifungal peptide with sequence homology to frog skin antimicrobial peptides. **Journal of Biological Chemistry** **269**: 33159-33163.
- FEHLBAUM, P.; P. BULET & S. CHERNYSH. 1996. Structure-activity analysis of thanatin, a 21-residue inducible insect defense peptide with sequence homology to frog skin antimicrobial peptides. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA** **93**: 1221-1225.
- FISH, D. 1985. An analysis of adult size variation within natural mosquito populations, p.419-429. In L. P Lounibos, J. R. Rey, J.H. Frank (eds). **Ecology of Mosquitoes: Proceedings of Workshop** Florida, xxii + 579pp.
- FONTES, G.; A. C. BRITO; C. M. L. CALHEIROS; C. M. F. ANTUNES; E. M. M. ROCHA. 1994. Situação atual da filariose bancroftiana na cidade de Maceió, estado de Alagoas, Brasil. **Caderno de Saúde Pública** **10**: 293-300.
- FORATITINI, O. P. 1993. **Entomologia Médica**, Vol. 1. Universidade de São Paulo, Brasil.
- GILLESPIE, J. P. & M. R. KANOST. 1997. Biological mediators of insect immunity. **Annual Review of Entomology** **42**: 611-643.
- GLEISER, R. M.; URRUTIA, J. & GORLA, D. E. 2000. Body size variation of the floodwater mosquito *Aedes albifasciatus* in Central Argentina. **Medical and Veterinary Entomology** **14**:38-43.

- GORLA, D. E.; F. F. LUDUENA ALMEIDA & G. SERRA. 1992. Effect of food competition on *Culex pipiens* under laboratory conditions. **Ecology of Australia** 2: 57-61.
- GÖTZ, A. P. 1986. Encapsulation in arthropods. p. 153-170. *In*: A. P. GÖTZ. **Immunity in Invertebrates**. Berlin, Ed. Brehélin M.
- GÖTZ, P. & A. VEY. 1974. Humoral encapsulation in Diptera (Insecta): defence reactions of *Chiromomus* larvae against fungi. **Parasitology** 68: 193-205.
- GRIMSTAD, P. R. & E. D. WALKER. 1991. *Aedes triseriatus* (Diptera: Culicidae) and La Crosse Virus, IV. Nutritional deprivation of larvae effects adult barriers to infection and transmission. **Journal of Medical Entomology** 28: 378-386.
- GUTIÉRREZ, D. & MENÉNDEZ, R. 1997. Patterns in the distribution, abundance and body size of carabid beetles (Coleoptera: Caraboidea) in relation to dispersal ability. **Journal of Biogeography** 24: 903-914.
- GWADZ, R.W.; D. KASLOW; J. Y. LEE; W. L. MALOY; M. ZASLOFF & L. H. MILLER. 1989. Effects of magainins and cecropins on the sporogonic development of malaria parasites in mosquitoes. **Infection and Immunity** 57: 2628-2633.
- HERNANDEZ, V.P.; A. GERENDAY & A. M. FALLON. 1994. Secretion of an inducible cecropin-like activity by cultured mosquito cells. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** 50: 440-447.
- HETRU, C.; D. HOFFMANN & P. BULET. 1998. Antimicrobial peptides from insects, p. 40-66. *In*: P. T. BREY & D. HULTMARK (eds.). **Molecular Mechanisms of Immune Response in Insects**. London, Chapman and Hall Press.
- HOFFMANN J. A.; B. LEMAITRE & M. REICHHART. 1997. *Drosophila* host defense: Differential induction of antimicrobial peptide genes after infection by various classes of microorganisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA** 94: 14614-14619.

- HOFFMANN, J. A.; F. C. KAFATOS; C. A. JANEWAY Jr & R. A. B. EZEKOWITZ. 1999. Phylogenetic perspective in innate immunity. **Science** **284**: 1313-1318.
- HOLTZMAN, M. J. 1992. Arachidonic acid metabolism in airway epithelial cell. **Annual Review of Physiology** **54**: 303-329.
- HOROHOV, D. W. & P. E. DUNN. 1982. Changes in the circulating hemocyte population of *Manduca sexta* larvae following injection of bacteria. **Journal of Invertebrate Pathology** **40**: 327-339.
- HOWARD, R. W.; J. S. MILLEER & D. W. STANLEY. 1998. The influence of bacterial species and Intensity of Infections on nodule formation in insects. **Journal of Insect Physiology** **44**: 157-164.
- HOWARD, R. W. & D. W. STANLEY. 1999. The tie that binds: eicosanoids in invertebrate biology. **Annals Entomological Society of America** **92**: 880-890.
- HURD, H.; J. C. HOGG & M. RENSHAW. 1995. Interactions between blood feeding, fecundity and infection in mosquitoes. **Parasitology Today** **11**: 411-416.
- HULTMARK, D.; H. STEINER; T. RASMUSON & H. G. BOMAN. 1980. Insect Immunity: Purification and properties of three inducible bactericidal proteins from haemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia*. **European Journal of Biochemistry** **106**: 7-16.
- HUMPHRIES, M. J.; A. P. MOULD & D. S. TUCKWELL. 1993. Dynamic aspects of adhesion receptor function-integrins both twist and shout. **BioEssays** **15**: 391-397.
- HYNES, R. O. 1992. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. **Cell** **69**: 11-25.
- KAAYA, G. P. & RATCLIFFE, N. A. 1982. Comparative study of hemocytes and associates cell of some medically important dipterans. **Journal of Morphology** **137**: 351-365.

- JURENKA, R. A.; J. S. MILLER; V. K. PEDIBHOTH; R. L. RANA & D. W. STANLEY-SAMUELSON. 1997. Eicosanoids mediate microaggregation and nodulation responses to bacterial infections in black cutworms, *Agrotis ipsilon*, and true armyworms *Pseudaletia unipuncta*. **Journal of Insect Physiology** **43**: 125-133.
- LAMBERT, J.; E. KEPPI; J.L. DIMARCQ; C. WICKER; J.M. REICHHART; B. DUNBAR; P. LEPAGE; A. VAN DORSSELAER; J.A. HOFFMANN; J. FOTHERGILL & D. HOFFMANN. 1989. Insect immunity: isolation from immune blood of the dipteran *Phormia terranova* of two insect antibacterial peptides with sequence homology to rabbit lung macrophage bactericidal peptides. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA** **86**: 262-266.
- LAVINE, M. D. & M. R. STRAND. 2002. Insect hemocytes and their role in immunity. **Insect Biochemistry and Molecular Biology** **32**: 1295-1309.
- LIMA, C. A. 2000. Efeito da infecção com *Wuchereria bancrofti* (Cobbold, 1877) (Nematoda: Onchocercidae) sobre a capacidade reprodutiva de *Culex quinquefasciatus* (Say, 1823) (Diptera: Culicidae). Dissertação de Mestrado em Biologia Animal, Universidade Federal de Pernambuco. 47 p.
- LIMA, C. A.; W. R. ALMEIDA; H. HURD & C. M. R. ALBUQUERQUE. 2003. Reproductive aspects of the mosquito *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) infected with *Wuchereria bancrofti* (Spirurida: Onchocercidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** **98**: 217-222.
- LOWENBERGER, C. A.; P. BULET; M. CHARLET; C. HETRU; B. HODGEMAN; B. M. CHRISTENSEN & J. A. HOFFMANN. 1995. Insect immunity: isolation of three novel inducible antibacterial defensins from the vector mosquito, *Aedes aegypti*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology** **25**: 867-873.
- LOWENBERGER, C. A.; M. T. FERDIG; P. BULET; S. KHALILI; J. A. HOFFMANN & B. M. CHRISTENSEN. 1996. *Aedes aegypti*: induced antibacterial proteins reduce the establishment and development of *Brugia malayi*. **Experimental Parasitology** **83**: 191-201.

- LOWENBERGER, C. A.; C. T. SMARTT; P. BULET; M. T. FERDIG; D. W. SEVERSON; A. J. HOFFMANN & B. M. CHRISTENSEN. 1999. Insect immunity: molecular cloning, expression, and characterization of cDNAs and genomic DNA encoding three isoforms of insect defensin in *Aedes aegypti*. **Insect Molecular Biology** **8**: 1-12.
- LOWENBERGER, C. A. 2001. Innate immune of *Aedes aegypti*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology** **31**(3): 219-229.
- LYIMO, E. O. & W. KOELLA. 1992. Relationship between body size of adult *Anopheles gambiae* s. l. and with the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **Parasitology** **104**: 233-237.
- MATSUYAMA, K. & S. NATORI. 1988. Purification of three antibacterial proteins from the culture medium of NIH-Sape-4, an embryonic cell line of *Sarcophaga peregrina*. **Journal of Biological Chemistry** **263**: 17112-17116.
- MACIEL, A.; A. ROCHA; K. B. F. MARZOCHI; Z. MEDEIROS; A. B. CARVALHO; L. REGIS; W. SOUZA & A. F. FURTADO. 1996. Epidemiological study of bancroftian filariasis in Recife, Northeastern Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** **91**: 449-455.
- MANDATO, C. A.; W. L. DIECHI-JONES; S. J. MOORE & R. G. H. DOWNIER. 1997. The effects of eicosanoid biosynthesis inhibitors on prophenoloxidase activation, phagocytosis and cell spreading in *Galleria mellonella*. **Journal of Insect Physiology** **43**: 1-8.
- MEISTER, M.; C. HETRU & J. A. HOFFMANN. 2000. The antimicrobial host defense of *Drosophila*. p. 17-36. In: L. DU PASQUIER & G. W. LITMAN. (eds.). **Origin and Evolution of the Vertebrate Immune System. Current Topic in Microbiology**, v.248. Berlin, Springer-Verlag.
- MERCER, D. R. 1999. Effects of larval density on the size of *Aedes polynesiensis* adults (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology** **36** (6): 702-708.

- MILLER, J. S.; T. NGUYEN & D. W. STANLEY-SAMUELSON. 1994. Eicosanoids mediate insect nodulation responses to bacterial infections. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA** **91**: 12418-12422.
- MILLER, J. S.; R. W. HOWARD; T. NGUYEN; A. NGUYEN; R. M. T. ROSARIO & D. W. STANLEY-SAMUELSON. 1996. Eicosanoids mediate nodulation responses to bacterial infections in larvae of the tenebrionid beetle, *Zophobas atratus*. **Journal of Insect Physiology** **42**: 3-12.
- MILLER, J. S.; R. W. HOWARD; R. L. RANA; H. TUNAZ & D. W. STANLEY. 1999. Eicosanoids mediate nodulation reactions to bacterial infections in adults of the cricket, *Gryllus assimilis*. **Journal of Insect Physiology** **45**: 75-83.
- MORISHIMA, I.; Y. YAMANO; K. KNOUE & N. MATSUO. 1997. Eicosanoids mediate induction of immune genes in the fat body of the silkworm, *Bombix mori*. **FEBS Letters** **419**: 83-86.
- MUTA, T. & S. IWANAGA. 1996. The role of hemolymph coagulation in innate immunity. **Current Opinion in Immunology** **8**: 41-47.
- NASCI, R. S. 1986. The size of emerging and host-seeking *Aedes aegypti* and the relationship of size to blood feeding success in the field. **Journal of American Mosquito Control Association** **2**: 61-62.
- NASCI, R. S. & C. J. MITCHELL. 1994. Larval diet, adult size and susceptibility of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) to infection with Ross River virus. **Journal of Medical Entomology** **31**: 123-126.
- NEEDLEMAN, P.; J. TURK; B. A. JAKSCHIC & A. R. MORRISON. 1986. Arachidonic acid metabolism. **Annual Review of Biochemistry** **55**: 69-102.
- PAULSON, S. L. & HAWLEY, W. A. 1991. Effect of body size on the vector competence of field and laboratory population of *Aedes triseriatus* for La Crosse virus. **Journal of American Mosquito Control Association** **7**: 170-175.

- POWELL, W. S. & C. D. FUNK. 1987. Metabolism of arachidonic acid and other polyunsaturated fatty acids by blood vessels. **Prog. Lipids Resources** 26: 183-210.
- RACHOU, R. G.; M. M. LIMA; J. A. FERREIRA NETO & C. M. MARTINS. 1957. Avaliação da domesticidade do *Culex pipens fatigans*, em Florianópolis (Santa Catarina) por meio de captura intra e extradomiciliares realizadas concomitantemente. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais** 9: 77-78.
- RACHOU, R. G. 1960. Conceito e Programa de profilaxia bancroftiana no Brasil. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais** 12: 11-40.
- RAHMET-ALLA, M. & A. F. ROWLEY. 1989. Studies on the cellular defense reaction of the cockroach *Leucophaea maderae*: nodule formation in response to infected bacteria. **Journal of Invertebrate Pathology** 54: 200-207.
- RATCLIFFE, N. A. 1986. Insect cellular immunity and the recognition of foreignness – In: “Immune mechanisms in invertebrate vectors” **Symposium of Zoology Society of London and Oxford Science Publish** 56: 21-43.
- RATCLIFFE, N. A. & A. F. ROWLEY. 1979. Role of hemocytes in defense against biological agents. p. 331-414. In: **Insect hemocytes: development, forms, functions and techniques**. Cambridge, Cambridge University Press.
- RATCLIFFE, N. A. & J. B. WATERS. 1983. Studies on the in vivo cellular reactions of insects: clearance of pathogenic and non-pathogenic bacteria in *Galleria mellonella* nodule. **Journal of Insect Physiology** 29: 407-415.
- REES, J. A.; M. MONIATTE & P. BULET. 1997. Novel antibacterial peptides isolated from a European bumblebee, *Bombus pascuorum* (Hymenoptera, Apoidea). **Insect Biochemistry and Molecular Biology** 25: 413-422.
- RENSHAW, M.; M. W. SERVICE & M. H. BIRLEY. 1993. Density-dependent regulation of *Aedes cantans* (Diptera: Culicidae) in natural and artificial populations. **Ecological Entomology** 18: 223-233.

- SCHIMIDT, O.; U. THEOPOLD & M. R. STRAND. 2001. Innate immunity and evasion by insect parasitoids. **BioEssay** **23**: 344-351.
- SCHNEIDER, W., TAKKEN, W. & MACCALL, P. J. 2000. Interspecific competition between sibling species larvae of *Anopheles arabiensis* and *An. gambiae*. **Medical and Veterinary Entomology** **14**: 165-170.
- SÖDERHALL, K. & V. J. SMITH. 1984. The prophenoloxidase activating system-a complement-like pathway in arthropods. p. 1-6. *In*: AIST & ROBERTS (eds.).
- SPECTOR, A. A.; J. A. GORDON & S. A. MOORE. 1988. Hydroxyeicosatetraenoic acids (HETEs). **Prog. Lipids Resources** **27**: 271-323.
- STANLEY-SAMUELSON, D. W. 1991. Comparative eicosanoids physiology in invertebrate animals. **American Journal of Physiology** **260**: 849-853.
- STANLEY-SAMUELSON, D. W. 1994a. Prostaglandins and related eicosanóides in insects. **Advances in Insect Physiology** **24**: 115-212.
- STANLEY-SAMUELSON, D. W. 1994b. Assessing the physiological significance of prostaglandins and eicosanóides in insects physiology. **Journal of Insect Physiology** **40**: 3-11.
- STANLEY-SAMUELSON, D. W. & W. LOHER. 1986. Prostaglandins in insect reproduction. **Annual Entomology Society of America** **79**: 841-853.
- STANLEY-SAMUELSON, D. W.; V. K. PEDIBHOTLA; R. L. RANA; N. A. A. RAHIM; W. W. HOBACK & J. S. MILLER. 1997. Eicosanoids mediate nodulation responses to bacterial infections in larvae of the silkworm, *Bombyx mori*. **Comparative Biochemistry and Physiology** **118(A)**: 993-100.
- STANLEY, D. W. & R. W. HOWARD. 1998. The biology of prostaglandins and related eicosanoids in invertebrates: cellular, organismal and ecological actions. **American Zoology** **38**: 369-381.

- STANLEY, D. W.; W. W. HOBACK; J. C. BEDICK; H. TUNAZ; R. L. RANA; A. R. NOR ALIZA & MILLER, J. S. 1999. Eicosanoids mediate nodulation reactions to bacterial infection in larvae of the butterfly, *Colias eurytheme*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, p.217-223.
- STANLEY, D. W. 2000. **Eicosanoids in Invertebrate Signal Transduction Systems**. Princeton, NJ, Princeton University Press. p. 277.
- STRAND, M. R. & L. L. PECH. 1995. Immunological basis for compatibility in parasitoid-host relationships. **Annual Review Entomology** **40**: 31-56.
- STRAND, M. R.; Y. HAYAKAWA & K. D. CLARK. 2000. Plasmacyte spreading peptide (PSP1) and growth blocking peptide (GBP) are multifunctional homologs. **Journal of Insect Physiology** **46**: 817-824.
- SULEMAN, M. & W. K. REISEN. 1979. *Culex quinquefasciatus* Say: life table characteristic of adults reared from wild-caught pupae from North West Frontier province, Pakistan. **Mosquito News** **39**: 756-762.
- SUMANOCHITRAPON, W.; D. STRICKMAN; R. SITHIPRASASNA; P. KITTAYAPOND & B. L. INNIS. 1998. Effect of size and geographic origin of *Aedes aegypti* on oral infection with dengue-2 virus. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** **58**: 283-286.
- SUWANCHAICHINDA, C. & S. PASKEWITZ. 1998. Effects of larval nutrition, adult body size, and adult temperature on the ability of *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) to melaize Sephadex Beads. **Journal of Medical Entomology** **35**: 157-161.
- TUNAZ, H.; C. J. BEDICK; S. J. MILLER; W.W. HOBACK; R. L. RANA & D. W. STANLEY. 1999. Eicosanoids mediate nodulation reactions to bacterial infections in adults of two 17-year periodical cicadas, *Magicicada septendecim* and *M. cassini*. **Journal of Insect Physiology** **45**: 923-931.

- TUNAZ, H.; R. A. JURENKA & D. W. STANLEY. 2001. Prostaglandin biosynthesis by fat body from true armyworms, *Pseudaletia unipuncta*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology** 31: 435-444.
- VAN HANDEL, E. & DAY, J. F. 1988. Assay of lipids, glycogen and sugars in individual mosquitoes: correlations with wing length in field-collected *Aedes vexans*. . **Journal of American Mosquito Control Association** 4:549-550.
- VASS, E. & A. J. NAPPI. 2001. Fruit fly immunity. **BioEssays** 51: 529-535.
- VEY, A. & P. GÖTZ. 1975. Humoral encapsulation in Diptera (Insecta): comparative studies in vitro. **Parasitology** 70: 77-86.
- VIZIOLI, J.; P. BULET; M. CHARLET; C. LOWEMBERGER; C. BLASS; H. MULLER; G. DIMOPOULOS; J. H. HOFFMANN; F. C. KAFATOS & H. RICHMAN. 2000. Cloning and analysis of cecropin gene from the malaria vector mosquito, *Anopheles gambiae*. **Insect Molecular Biology** 9: 75-84.
- WIESNER, A. 1992. Characteristics of inert beads provoking humoral immune responses in *Galleria mellonella* larvae. **Journal of Insect Physiology** 38: 533-541.
- WIESNER, A. & P. GÖTZ. 1993. Silica beads induce cellular and humoral immune responses in *Galleria mellonella* larvae and in isolated plasmatocytes, obtained by a newly adapted nylon wool separation method. **Journal of Insect Physiology** 39: 865-876.
- WHO World Health Organization. 1987. **Control of Lymphatic Filariasis: A Manual for Health Personnel**. Geneva, WHO, 89pp.