

BIOLOGIA DE ANOFELINOS AMAZÔNICOS. XV. LEUCINA AMINOPEPTIDASE EM *ANOPHELES (NYSSORHYNCHUS) NUÑEZ-TOVARI*: ONTOGENIA E VARIAÇÃO GENÉTICA. (1).

Vera Margarete Scarpassa (2)

Wanderli Pedro Tadei (3)

Eucléia Primo Betioli Contel (4)

RESUMO

Dados sobre a leucina aminopeptidase durante o desenvolvimento ontogenético em *Anopheles nuñez-tovari* evidenciaram seis zonas de atividade, sendo a LAP1, LAP2, LAP4 e LAP5 presentes nos estádios larvais, pupas e adultos e a LAP3 e LAP6 características desses dois últimos estágios. Diferenças na intensidade de coloração foram detectadas conforme o estágio considerado. A LAP1 e LAP5 apresentam intensidade fraca em todos os estágios e a LAP2 e LAP4 mostram atividade intensa nos estádios larvais, diminuindo nos dois estágios subseqüentes. Considerando-se as funções das enzimas, foi admitido que a LAP3, no estágio de pupa, possa estar relacionada com a histólise dos tecidos larvais. Dos seis loci detectados, variação alélica foi constatada apenas para o locus LAP5, sendo detectados dois alelos de ação codominante. As frequências genotípicas de progênies de fêmeas inseminadas naturalmente desviam-se significativamente do equilíbrio de Hardy-Weinberg.

INTRODUÇÃO

A leucina aminopeptidase (E.C.3.4.1.1) tem sido estudada em diferentes grupos de insetos. No gênero *Drosophila*, amplos estudos sobre a ontogenia foram realizados por Beckman & Johnson (1964), Johnson & Sakai (1964), Sakai et al. (1968, 1969) e Loreto & Oliveira (1988), em que diferentes padrões de atividade enzimática foram relatados para estágios específicos. Considerando-se outros grupos de insetos, estudos sobre alterações na expressão gênica da leucina aminopeptidase, durante o desenvolvimento, foram realizados em *Plodia interpunctella* (Pataryas et al., 1971), em meliponídeos (Falcão, 1984) e em *Spodoptera frugiperda* (Lima, 1989).

Em mosquitos, os dados da literatura sobre a leucina aminopeptidase relatam aspectos da ontogenia e da variabilidade genética, em *Aedes aegypti* (Scott & MacClelland, 1975), em *Anopheles gambiae* (Miles, 1978), em *Anopheles aquasalis* (Narang et al., 1979a; Steiner et al., 1981), em *Culex pipiens fatigans* (Bhalla & Narang, 1981), e em *Anopheles darlingi* (Narang et al., 1979b; Contel et al., 1984).

¹ Trabalho subvencionado pelo CNPq/ELETRONORTE/POLONOROESTE.

² Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA, CPCS, Manaus (AM) - CEP 69011-970

³ Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA, CPCS, Manaus (AM) - CEP 69011-970/UNESP-S.J.P.P. (SP)

⁴ Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP, Ribeirão Preto, (SP).

Considerando-se *Anopheles nuñez-tovari*, a leucina aminopeptidase foi estudada em populações do eixo central da Amazônia - Manaus, por Narang et al. (1979b), e em populações da Venezuela e do Suriname, por Steiner et al. (1980). Os primeiros autores analisaram a enzima no desenvolvimento, constatando variação na intensidade de coloração das bandas para cada um dos estágios. Steiner et al. (op. cit.) relatam variação de alelos para locus específico da leucina aminopeptidase, com diferentes frequências, considerando populações da Venezuela, onde a espécie é vetora da malária humana, e populações do Suriname, onde não é vetora.

Nos estudos realizados neste experimento, a leucina aminopeptidase foi analisada em populações de *A. nuñez-tovari* da Amazônia, de localização geográfica marginal, sendo considerados o desenvolvimento, nos diferentes estágios, e a variação genética.

MATERIAL E MÉTODOS

O material utilizado para estudo foi coletado na Base 4 da hidrelétrica de Tucuruí (Pará), a qual está situada à margem direita do reservatório. No preparo das amostras para a análise eletroforética dos diferentes estágios do desenvolvimento, as larvas de 1ª, 2ª e 3ª estágios foram homogeneizadas em conjuntos ('pool') de 80, 40 e 10 larvas, respectivamente. As preparações passaram a ser de um indivíduo apenas para as larvas de 4ª estágio, pupas e adultos. Para as larvas de 4ª estágio, as análises foram feitas em três fases dentro do estágio: jovem, intermediária e velha. Na fase de pupa também foram analisados indivíduos em três momentos diferentes, dentro do estágio. Foram reconhecidas pupas jovens, que tinham 4 horas após a passagem do 4ª estágio; pupas intermediárias, com 12 horas, e pupas velhas com 24 horas após a mudança do estágio. No estágio adulto foram analisados machos e fêmeas recém-emergidos. Para a alimentação e a manutenção das larvas até atingirem o estágio adulto foi empregada a técnica usual do laboratório (Scarpassa, 1988), que apresenta modificações em relação à descrita por Rabbani et al. (1976) e Santos (1979).

Para análise eletroforética o material foi coletado nas cubas de manutenção e mantido sob congelamento em um freezer a -70°C (Forma Scientific, Ohio USA). Para as larvas de 1ª estágio, dado o pequeno tamanho das mesmas, as amostras não foram congeladas. As amostras foram homogeneizadas em placas escavadas de porcelana, com o auxílio de um fino bastão de vidro. Na homogeneização dos estágios larvais e do estágio de pupa utilizou-se 20 µl de 2-mercaptoetanol a 0,5% (V:V) e para os adultos empregamos 25 µl. Durante a preparação das amostras, as placas permaneciam sobre o gelo. Após a homogeneização colocamos lenços de papel cortados em quadrados, medindo 1,5 x 1,5 cm e, sobre esse, o papel de filtro Whatman nº 3, medindo 5 x 6 mm. Estes últimos eram inseridos verticalmente no gel para aplicação do material.

No preparo dos géis, utilizamos como suporte de fracionamento o gel de amido, na concentração de 12,5%. O amido era suspenso em 200 ml do tampão Tris-citrato 0,0193M (Tris - 0,017M, Ácido cítrico - 0,0023M), pH 8.0. Nas cubas empregamos o tampão Borato 0,3M pH 8.0 (Smithies, 1955; Lima, 1978; Contel, 1980; Falcão, 1984; Contel et al., 1984), com modificações.

A migração eletroforética era realizada em um refrigerador à temperatura de aproximadamente 4°C, durante 12 horas, com uma diferença de potencial de 45 V entre os dois extremos do gel.

A solução de revelação foi preparada contendo 100 ml do tampão Tris-maleato 0,05M, pH

6.0, 25 mg de L-leucil B-naftilamida (previamente dissolvidos em 0,5 ml de dimetil sulfóxido) e 50 mg de Fast Garnet Salt. Posteriormente, o gel era mergulhado nesta solução e incubado por aproximadamente uma hora, à 37°C, até a visualização das zonas de atividade que apresentam a coloração vermelha sobre o gel. Após a incubação, o gel era fixado em solução de 1:5:5 (V:V) de ácido acético, etanol e água destilada, respectivamente.

RESULTADOS

Os padrões eletroforéticos das isoenzimas de leucina aminopeptidase, durante o desenvolvimento ontogenético, apresentaram seis zonas de atividade que foram denominadas de LAP1 a LAP6, todas eletronegativas.

Na Figura 1 (A e B) são apresentados os perfis eletroforéticos das larvas de 1ª, 2ª, 3ª e 4ª estádios. Para os quatro estádios larvais verifica-se uma repetição dos padrões eletroforéticos, embora na fase jovem do 4ª estádio as isoenzimas apresentam menor intensidade de coloração quando comparadas com as fases intermediárias e velha deste estádio. Nestas duas últimas, não se observa diferenças de intensidade entre as mesmas. A LAP1 é a zona de migração mais anódica e a LAP2 e LAP4 apresentaram coloração mais intensa sobre o gel. A LAP5 é de intensidade fraca. A LAP1 foi a zona que apresentou a menor intensidade de coloração, em todos os estágios.

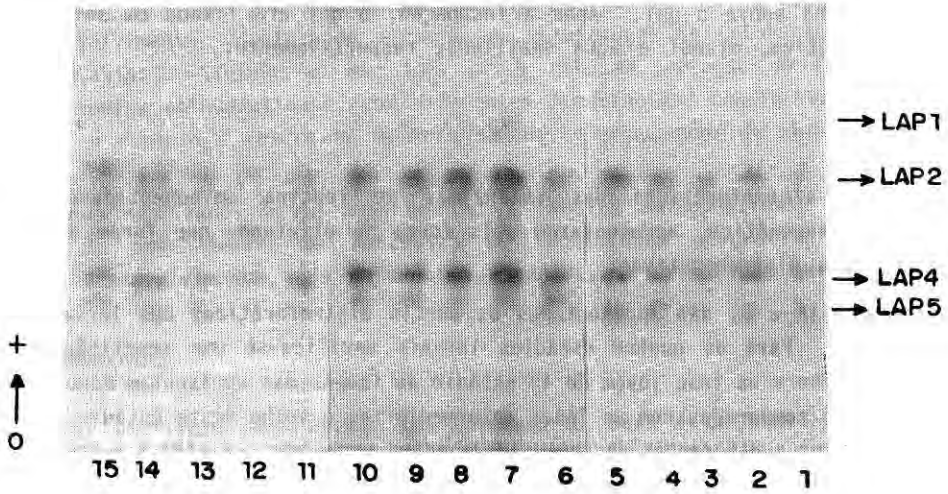
A LAP3 é característica do estágio de pupa (Figura 2A), sendo revelada em posição intermediária de migração entre a LAP2 e LAP4, porém mais próxima desta última. Trata-se de uma zona de coloração pouco intensa e levemente difusa sobre o gel. Esta zona foi também registrada em alguns géis nas três fases de larva de 4ª estádio. Ainda, registrou-se em pupas a presença de uma zona de migração mais catódica em relação à LAP5, porém apresentando mobilidade eletroforética muito próxima desta última que foi denominada de LAP6. Igualmente à LAP3, esta zona parece ser característica do estágio de pupa. Perfil eletroforético idêntico ao obtido para o estágio de pupa foi observado nos adultos.

O quadro de leucina aminopeptidase, nos diferentes estágios do desenvolvimento, é observado na Figura 3. A LAP1 e LAP5 foram visualizadas em todos os estágios e em intensidade fraca. A LAP2 e LAP4 apresentaram comportamento idêntico durante o desenvolvimento, sendo registradas em intensidade ótima até a fase de larva de 4ª estádio velha. A partir do estágio de pupa, a LAP2 e LAP4 passam a ser pouco freqüentes, sendo a primeira em freqüência menor ainda. A LAP3 parece ser característica de pupa e adultos, porém alguns registros foram feitos em larva de 4ª estádio, envolvendo as três fases. A LAP6 é constatada em pupas e adultos, sendo registrada em freqüências baixas e em intensidade fraca. Em nenhum gel dos estádios larvais esta isoenzima foi verificada como ocorreu para a LAP3.

Das seis zonas de atividade isoenzimática que foram reveladas durante o desenvolvimento, apenas a LAP5 não foi monomórfica. Para esta, foi detectada variação sendo constatada a presença de dois alelos que foram denominados LAP5*F e LAP5*S. Provavelmente, tratam-se do produto de dois alelos de ação codominante e os fenótipos foram denominados LAP5 F, LAP5 S e LAP5 FS. Na Figura 2B constam os fenótipos LAP5 F (1), LAP5 S (8 e 9) e LAP5 FS (2, 3, 4, 5, 6, 7 e 10), que correspondem aos genótipos LAP5*F/LAP5*F, LAP5*S/LAP5*S e LAP5*F/LAP5*S.

Para análise das freqüências dos alelos deste locus (Tabela 1), as leituras foram

A



B

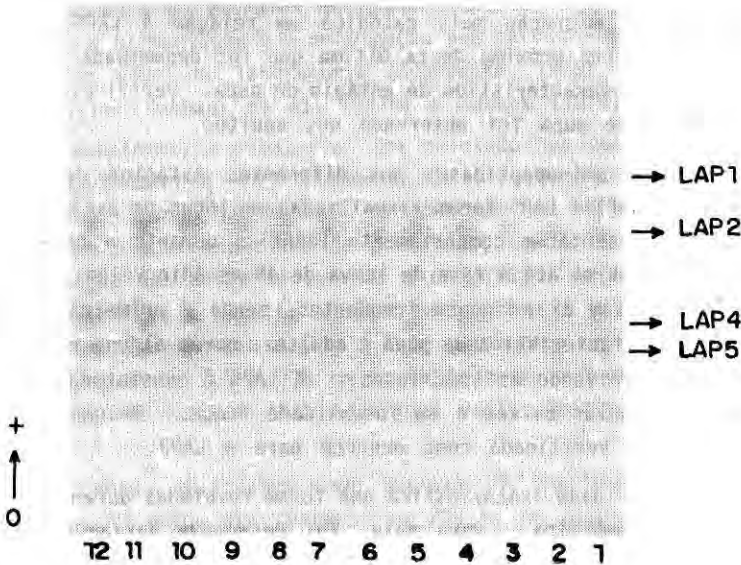


Figura 1 - Perfis eletroforéticos das isoenzimas de leucina aminopeptidase no estágio de larva de *Anopheles nuñez-lovari*. Em A, larvas de 1° estágio (1 a 5), 2° estágio (6 a 10) e 3° estágio (11 a 15). Em B, larvas de 4° estágio jovem (1 a 3), 4° estágio intermediária (4 a 8) e 4° estágio velha (9 a 12). Sistema tampão Tris-citrato-borato, pH 8.0. Migração nos sentidos indicados.

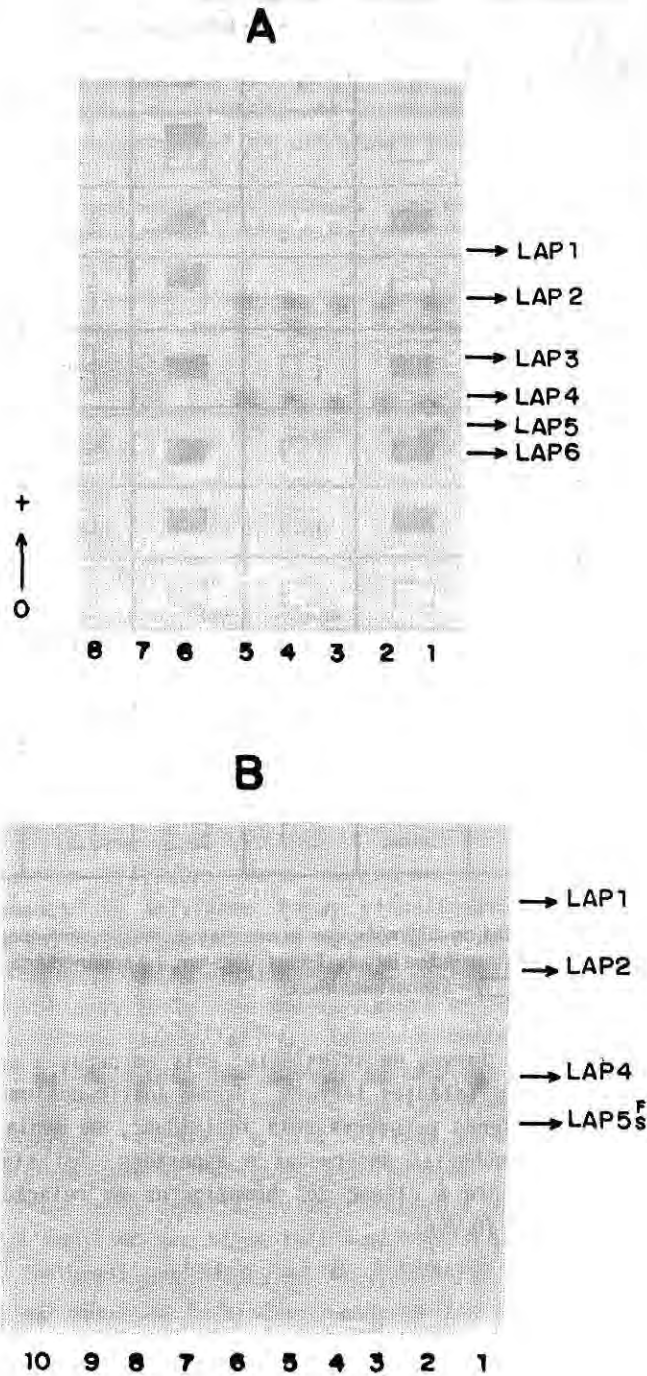


Figura 2 - Perfis eletroforéticos das isoenzimas de leucina aminopeptidase dos estágios de larva e pupa de *Anopheles nuñez-tovari*. Em A, larvas de 4º estágio velha (1 a 5), pupa com 4 horas (6), pupa com 12 horas (7) e pupa com 24 horas (8). Em B, a fotografia mostra a variação alélica no locus LAP5, em larvas de 4º estágio velha. Sistema tampão Tris-citrato-borato, pH 8.0. Migração nos sentidos indicados.

Substrato	Estágio	LEUCINA			AMINOPEPTIDASE		
		1	2	3	4	5	6
Nofilamido	1º	□	□		■	□	
	2º	□	■		■	□	
	3º	□	□		■	□	
	4º	□	■	□	■	□	
Beta	J	□	■	□	■	□	
	I	□	■	□	■	□	
	V	□	■	□	■	□	
L-leucil	J	□	□	□	□	□	□
	I	□	□	□	□	□	□
	V	□	□	□	□	□	□
	Adulto	□	□	□	□	□	□

Figura 3 - Esquema das intensidades de coloração das isoenzimas de leucina aminopeptidase de *Anopheles nuñez-tovari*, durante a ontogênese. 1º a 4º = estádios larvais. Fases: J=jovem, I = intermediária, V = velha. ■ = intensidade ótima, □ = intensidade regular e □ = intensidade fraca).

realizadas nas três fases das larvas de 4º estágio, pois em pupas e adultos a LAP5 apresenta-se menos nítida em relação aos estádios larvais. Foram analisados um total de 128 indivíduos procedentes de 63 posturas, sendo estudados dois indivíduos, em média, de cada uma. O valor do χ^2 , calculado para as freqüências observadas e esperadas, foi significativo ($\chi^2_1 = 5,964$; $P < 0,05$), sendo mais freqüente a classe dos homocigotos em relação ao esperado. O alelo LAP5*F foi o mais freqüente (0,766).

DISCUSSÃO

Os dados da leucina aminopeptidase evidenciaram seis zonas de atividade durante o desenvolvimento ontogenético de *A. nuñez-tovari*, as quais mostram mudanças na expressão gênica, conforme os estágios considerados. Os padrões foram consistentes nos estádios larvais, pupas e adultos. O perfil eletroforético não mostrou diferenças entre machos e fêmeas.

Para os quatro estádios larvais, os padrões eletroforéticos foram muito semelhantes, sendo detectados quatro loci. A LAP2 e a LAP4 coram-se intensamente e a LAP1 e a LAP5 de

coloração fraca. Nos estágios de pupa e adultos, os perfis eletroforéticos foram semelhantes entre si, diferindo, no entanto, do estágio larval pela presença de dois loci - LAP3 e LAP6, ambos com intensidade fraca. Os demais loci encontrados nas larvas, também encontram-se nas pupas e adultos, porém sendo visualizados em intensidade fraca. Portanto, o perfil eletroforético possibilitou caracterizar os principais estágios do desenvolvimento.

Tabela 1 - Distribuição das freqüências observadas e esperadas e valores de qui-quadrado do locus LAP5 da leucina aminopeptidase de *Anopheles nuñez-tovari*. gl = graus de liberdade. * = P < 0,05.

Locus	Classe genotípica	Obs	Esp	Freqüência do alelos		gl	x ²
				F	S		
LAP5	LAP5 ^F /LAP5 ^F	80	75,20	0,766	0,234	1	5,964*
	LAP5 ^F /LAP5 ^S	36	45,80				
	LAP5 ^S /LAP5 ^S	12	7,00				
	TOTAL	128	128,00				

Padrões eletroforéticos específicos para leucina aminopeptidase em diferentes estágios do desenvolvimento foram apresentados por Bhalla & Narang (1981) em *Cx. p. fatigans*. Nesta subespécie os dados mostram sete zonas de atividade durante o ciclo evolutivo, sendo encontradas 20 bandas nas larvas de 4º estágio, 13 bandas nas pupas, e três nos adultos mais velhos. Contudo, padrões distintos foram observados para os três estágios. Em *D. melanogaster*, sete bandas de atividade foram visualizadas durante a ontogenia, sendo detectadas mudanças na expressão gênica, e um número maior de bandas foi revelado no estágio de larva (Loreto & Oliveira, 1988). Resultados semelhantes ao presente estudo foram obtidos por Narang et al. (1979b) analisando esse mesmo sistema em populações de *A. nuñez-tovari* de Manaus (AM). Foram detectados quatro loci nas larvas e denominados de LAP1 a LAP4. Durante os estágios de pupa e adultos, a LAP1 está ausente ou em baixa atividade e a LAP2 é específica da fase larvária. A LAP2-PA ocorre em pupas e adultos e mostra localização mais catódica em relação à LAP2 das larvas. A LAP3 e a LAP4, da fase larvária, estão presentes nas pupas e adultos embora com intensidade de coloração bem reduzida. Além destas, foi observada uma zona com intensidade fraca e de localização mais catódica em relação à LAP4. Com base no perfil de migração, foi admitido que sejam loci homólogos a LAP3 (encontrada na população de Tucuruí) e a LAP2-PA (relatada por Narang et al., 1979b).

Considerando-se os dados da literatura, pode-se admitir que a LAP3, específica dos estágios de pupa e adultos, possa desempenhar alguma função na histólise dos tecidos larvais. Esta observação corrobora a hipótese de Pataryas et al. (1971) em *P. interpunctella*. Esses autores observaram uma zona de coloração forte da leucina aminopeptidase no estágio de pupa, particularmente nas fases de pupa média e pupa velha, e admitiram que a atividade elevada da enzima nesse estágio possa estar relacionada com a intensa histólise dos tecidos larvais, ao mesmo tempo que ocorre a diferenciação dos tecidos do adulto. Essa mesma hipótese está de acordo com a sugestão de Sakai et al. (1969).

A leucina aminopeptidase, conforme tem sido ressaltado na literatura, é uma enzima proteolítica e que provavelmente apresenta uma considerável importância na degradação de proteínas, durante o desenvolvimento. No entanto, os estudos em diferentes organismos possibilitam verificar que, no processo evolutivo, as espécies tomaram caminhos diferentes, sendo detectados (1) grupos em que a enzima está presente em todos os estágios do desenvolvimento, e (2) grupos em que a produção está limitada a estágios específicos (Johnson & Sakai, 1964). Em *Drosophila busckii*, o mesmo perfil eletroforético foi obtido para os estágios de larvas, pupas e adultos; no entanto, para *D. melanogaster*, intensa atividade da leucina aminopeptidase foi constatada no estágio de pupa (Johnson & Sakai, op. cit.). Em meliponídeos, Falcão (1984) relata dois grupos de aminopeptidases, sendo um deles de regiões de atividade mais catódica, com mobilidade eletroforética mais variável, e as bandas com baixa resolução de coloração. O outro grupo, inclui regiões mais eletronegativas, uniformes quanto à migração, e que mostram bandas que são coradas intensamente.

Variação para leucina aminopeptidase neste trabalho foi detectada apenas para a LAP5, na fase de larva. Esses resultados mostram que em *A. nuñez-tovari* essa enzima apresenta um nível baixo de variação, em comparação com outros sistemas de enzimas já estudados nesta espécie (Narang et al., 1979b; Steiner et al., 1980). Para populações de Manaus, Narang et al. (1979b) também relatam seis loci, seguindo-se as denominações deste trabalho, e não relatam variação ressaltando-se, contudo, que a amostra analisada por aqueles autores foi muito pequena. Para as populações do Suriname e Venezuela, Steiner et al. (1980) descrevem apenas o locus LAP-F, em adultos que corresponde, provavelmente, à LAP3 deste trabalho, e registram variação em ambas as populações. Os autores não se reportam aos demais loci. Em *A. aquasalis*, de quatro loci descritos, variação foi registrada também em apenas um (Narang et al., 1979a). Para *A. darlingi*, Santos (comunicação pessoal) detecta cinco loci para a espécie e descreve variação para LAP3. Ainda nesta espécie, Contel et al. (1984), reforçando os dados de que a enzima apresenta baixa variação quando comparada à esterase, verificaram que dos três loci encontrados todos foram monomórficos em populações procedentes de Ariquemes (Rondônia) e da Rodovia PA-422 (Pará).

Para o locus LAP5 foram detectados o produto de dois alelos de ação codominante, cuja estrutura da proteína é tida como monomérica. O alelo LAP5*F foi observado na frequência 0,766 e as frequências genotípicas das progênias desviam-se significativamente do equilíbrio de Hardy-Weinberg. Foi verificado que os indivíduos homocigotos mostraram frequências observadas maiores que as esperadas. Provavelmente, este fato seja consequência de alterações ambientais que ocorreram na região. O reservatório da hidrelétrica de Tucuruí é recente e modificações na densidade populacional de anofelinos na localidade de coleta foram registradas (Tadei, 1987). Os dados da estação de controle Base 4 do reservatório evidenciam que a população de *A. nuñez-tovari*, no decurso de dois anos, teve sua densidade reduzida, paralelamente ao aumento da população de *Anopheles triannulatus*. Os resultados mostraram que no início a primeira espécie predominava no local e, no período mencionado, a segunda espécie passou a ser mais frequente. As flutuações na densidade populacional, inclusive tendo consequências no processo de substituição de espécie no local estudado, devem interferir nas frequências genotípicas.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Wladimir João Tadei e ao Professor Jorge Arturo Lobo Segura pela leitura crítica do manuscrito e sugestões.

SUMMARY

Data on the leucine aminopeptidase system during ontogenetic growth in *Anopheles nunez-tovari* revealed six areas of activity, of which LAP1, LAP2, LAP4 and LAP5 were present in the larval, pupal and adult stages and LAP3 and LAP6 were characteristics of the last two stages. Differences in intensity were detected according to the stage considered. LAP1 and LAP5 show a weak intensity in all the stages and LAP2 and LAP4 show intense activity in the larval stages, decreasing in the pupa and adult. Considering the functions of the enzymes, admitted that LAP3 in the pupae stage may be related to hystolysis of the larval tissues. Of the six loci detected, allelic variation was observed only for the LAP5 locus, with of codominant action. The frequências of genotypes among the progeny of females inseminated naturally deviate significantly from the Hardy-Weinberg equilibrium.

Referências bibliográficas

- Beckman, L. & Johnson, F. M. - 1964. Genetic control of aminopeptidases in *Drosophila melanogaster*. *Hereditas*, 51:221-230.
- Bhalla, S. C. & Narang, S. - 1981. Isozymes of *Culex p. fatigans*. III. Genetics of Leucine - Amino - Peptidase. *Can. J. Genet. Cytol.*, 23:705-713.
- Contel, E. P. B. - 1980. Variabilidade proteica em populações naturais de abelhas da Amazônia. Tese de Livre Docência. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. 120 p.
- Contel, E. P. B.; Santos, J. M. M.; Tadei, W. P. - 1984. Biologia de Anofelinos Amazônicos. VI. Variabilidade enzimática em *Anopheles darlingi* Root (Diptera, Culicidae). *Acta Amazonica*, 14(1-2):238-243.
- Falcão, T. M. M. A. - 1984. Polimorfismos proteicos em populações naturais de abelhas brasileiras. Tese de Doutorado, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Unversidade de São Paulo. 231 p.
- Johnson, F. M. & Sakai, R. K. - 1964. A leucina aminopeptidase polymorphism in *Drosophila buskii*. *Nature*, 203(4943):373-374.
- Lima, L. M. K. S. - 1978. Investigação de esterases e proteínas não catalíticas em várias espécies de abelhas. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.
- - 1989. Variabilidade proteica em populações naturais de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). Tese de Doutorado, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. 158 p.
- Loreto, E. L. S. & Oliveira, A. K. - 1988. Selection of *D. melanogaster* for extreme developmental rates. I. Structural and regulatory genetic divergence. *Rev. Brasil. Genet.*, 11(2):253-265.

- Narang, S.; Kitzmiller, J. B.; Galler, R.; Rios, R. I.; Narang, N. - 1979a. Genética de populações de anofelinos. III. Análise eletroforética de *Anopheles aquasalis* (Diptera: Culicidae). *Rev. Bras. de Pesquisas Méd. e Biol.*, 12(4-5):303-309.
- Narang, S.; Santos, J. M. M.; Garcia, J. C.; Cristakou, H. D.; Narang, N. - 1979b. Genética de populações de anofelinos. IV. Estudos eletroforéticos de populações naturais de *Anopheles nuñez-tovari* e *Anopheles darlingi*. Correlação genética entre espécies. *Acta Amazonica*, 9(3):529-542.
- Pataryas, H. A.; Haritos, A. A.; Gelti-Douka, H. - 1971. Esterase and Leucine Amino-peptidase Zymograms in the Indian Meal Moth *Plodia interpunctella* During Development. *Experientia*, 27(3):344-345.
- Rabbani, M. G.; Seawright, J. A.; Leatherwood, L. B. - 1976. A method for culturing single families of *Anopheles albimanus*. *Mosq. News*, 36(1):100-102.
- Sakai, R. K.; Tung, D. A.; Scandalios, J. G. - 1968. Genetic and developmental studies of aminopeptidases in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 60:219.
- - 1969. Developmental genetic studies of aminopeptidase in *Drosophila melanogaster*. *Molec. Gen. Genetics*, 105:24-29.
- Santos, J. M. M. - 1979. Aspectos biológicos e isoenzimáticos de *Anopheles (N.) darlingi* Root, 1926 (Diptera: Culicidae). Dissertação de Mestrado, INPA/FUA. 87 p.
- Scarpassa, V. M. - 1988. Estudo do ciclo biológico e de isoenzimas na ontogênese de *Anopheles (Nyssorhynchus) nuñez-tovari* Gabaldon, 1940 (Diptera, Culicidae). Dissertação de Mestrado, INPA/FUA. 172 p.
- Scott, J. A. & MacClelland, G. A. H. - 1975. Electrophoretic differences between sympatric ecotypes. *Nature*, 256:405-406.
- Smithies, O. - 1955. Zone electrophoresis in starch gels: group variations in the serum proteins of normal human adults. *Biochem. J.*, 61:629-641.
- Steiner, W. W. M.; Kitzmiller, J. B.; Osterbur, D. L. - 1980. Gene differentiation in Chromosome Races of *Anopheles nuñez-tovari* (Gabaldon). *Mosq. Systematics*, 12(3):306-319.
- - 1981. On the genetic identity and evolution of the malaria vectors *Anopheles aquasalis* Curry and *Anopheles emilianus* Komp. In: Pal, R.; Kitzmiller, J. B. & Kand, T. (eds.). *Cytog. Genet. Vectores*. New York, ed. Elsevier Science Publishing - INC. p. 75-90.
- Tadei, W. P. - 1987. Vetores da Malária. Relatório Eletronorte. Hidrelétrica de Tucuruí (PA). Biblioteca do INPA, Manaus. (AM), 45p.

(Aceito para publicação em 22.05.1990)