

UFRRJ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

DISSERTAÇÃO

**Influência da densidade populacional de larvas no conteúdo de triacilglicerol,
fecundidade e tamanho de fêmeas em *Aedes aegypti* (Linnaeus) (Diptera: Culicidae)**

Elaine Rodrigues Miranda Nery da Silva

Novembro/2020



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

**Influência da densidade populacional de larvas no conteúdo de
triacilglicerol, fecundidade e tamanho de fêmeas em *Aedes aegypti*
(Linnaeus) (Díptera: Culicidae)**

Elaine Rodrigues Miranda Nery da Silva

Sob a Orientação do Professor

Emerson Guedes Pontes

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Seropédica, RJ
Novembro/2020

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Divisão de Processamentos Técnicos

Ficha catalográfica elaborada com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

R 691i Rodrigues Miranda Nery da Silva, Elaine, 1994-
Influência da densidade populacional de larvas no
conteúdo de triacilglicerol, fecundidade e tamanho de
fêmeas em *Aedes aegypti* (Linnaeus) (Diptera:
Culicidae) / Elaine Rodrigues Miranda Nery da Silva.
Rio de Janeiro, 2021.
51 f.: il.

Orientador: Emerson Guedes Pontes.
Dissertação(Mestrado). -- Universidade Federal Rural
do Rio de Janeiro, Pós graduação em Biologia Animal,
2021.

1. *Aedes aegypti* . 2. conteúdo de triacilglicerol.
3. densidade populacional de larvas . 4. Fecundidade.
I. Guedes Pontes, Emerson , 1974-, orient. II
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Pós
graduação em Biologia Animal III. Título.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de
Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL



TERMO Nº 482 / 2020 - PPGBA (12.28.01.00.00.00.42)

Nº do Protocolo: 23083.064781/2020-45

Seropédica-RJ, 03 de dezembro de 2020.

Seropédica, 03 de dezembro de 2020

ELAINE RODRIGUES MIRANDA NERY DA SILVA

Dissertação submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre(a)**, no Programa de Pós Graduação em Biologia Animal, Área de Concentração em Biodiversidade Animal.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 30/11/2020

Conforme deliberação número 001/2020 da PROPPG, de 30/06/2020, tendo em vista a implementação de trabalho remoto e durante a vigência do período de suspensão das atividades acadêmicas presenciais, em virtude das medidas adotadas para reduzir a propagação da pandemia de Covid-19, nas versões finais das teses e dissertações as assinaturas originais dos membros da banca examinadora poderão ser substituídas por documento(s) com assinaturas eletrônicas. Estas devem ser feitas na própria folha de assinaturas, através do SIPAC, ou do Sistema Eletrônico de Informações (SEI) e neste caso a folha com a assinatura deve constar como anexo ao final da tese / dissertação.

EMERSON GUEDES PONTES
(Orientador)

JACENIR REIS DOS SANTOS MALLET - FIOCRUZ

MARISE MALECK DE OLIVEIRA - UNIVERSIDADE DE VASSOURAS

JULIA DOS SANTOS SILVA - FIOCRUZ

(Assinado digitalmente em 04/12/2020 11:50)

EMERSON GUEDES PONTES
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DBQ (11.39.00.24)
Matrícula: 1555317

(Assinado digitalmente em 21/12/2020 10:10)

JACENIR REIS DOS SANTOS MALLET
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 710.008.957-34

(Assinado digitalmente em 05/12/2020 08:15)

MARISE MALECK DE OLIVEIRA
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 327.488.337-91

(Assinado digitalmente em 04/12/2020 09:47)

JÚLIA DOS SANTOS SILVA
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 050.253.846-56

Para verificar a autenticidade deste documento entre em <https://sipac.ufrrj.br/public/documentos/index.jsp> informando seu número: **482**, ano: **2020**, tipo: **TERMO**, data de emissão: **03/12/2020** e o código de verificação: **612a7a798d**

RESUMO

SILVA, Elaine Rodrigues Miranda Nery da. **Influência da densidade populacional de larvas no conteúdo de triacilglicerol, fecundidade e tamanho de fêmeas em *Aedes aegypti* (Linnaeus) (Díptera: Culicidae). 2020.** Dissertação (Mestrado em Biologia Animal). Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 2020.

Dada a importância do mosquito *Aedes aegypti* como vetor de arboviroses emergentes, é fundamental compreender o impacto de fatores abióticos, como a densidade populacional na criação larval durante o seu desenvolvimento, para melhorar os métodos de controle. Os objetivos deste trabalho foram analisar os efeitos da densidade populacional nas reservas de triacilglicerol (TAG), fecundidade e tamanho dos mosquitos. Para avaliar a influência da densidade na quantidade de triacilglicerol nos diferentes estágios de desenvolvimento de *A. aegypti*, as larvas foram criadas nas seguintes densidades: 0,04, 0,32 e 0,8 larva / ml, representadas por D1, D2 e D3, respectivamente. Observou-se que nas diferentes criações larvais a quantidade de triacilglicerol, nos diferentes estágios de desenvolvimento desse inseto, foi afetada. O grupo criado em alta densidade populacional (D3) apresentou maior armazenamento de triacilglicerol, exceto ao analisar a quantidade de triacilglicerol μg / proteína do corpo gordo em fêmeas alimentadas com sangue. Além disso, foi possível observar maior resistência ao jejum, maior quantidade de ovos postos e que os insetos criados em D2 e D3 eram maiores que em D1. Este estudo forneceu dados que contribuirão para futuras investigações sobre como a densidade da criação larval afeta o metabolismo lipídico em relação à síntese e mobilização do estoque de triacilglicerol em *A. aegypti* e como isso influencia seu tamanho e a reprodução.

Palavras-Chave: *Aedes aegypti*, triacilglicerol, densidade, mosquitos

ABSTRACT

SILVA, Elaine Rodrigues Miranda Nery da. **Influence of the population density of larvae on the content of triacylglycerol, fecundity and size of females in *Aedes aegypti* (Linnaeus) (Díptera: Culicidae)**. 2020. Dissertation (Master in Animal Biology). Institute of Biological and Health Sciences, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 2020.

Given the importance of the *Aedes aegypti* as arboviroses vector, understanding the impact of abiotic factors, such as population density in the larval rearing s, during larval development, is fundamental to improve control methods. The aims of this work were to analyze the effects of population density on the triacylglycerol (TAG) reserves, fecundity and the size of mosquitos. To evaluate the influence of density on the amount of triacylglycerol in the different stages of development of *A. aegypti*, the larvae were reared in the following densities 0.04, 0.32 and 0.8 larvae / ml, represented by D1, D2 and D3, respectively. It was observed that different larval rearing affected the amount of triacylglycerol on the different development stages of this insect. The group reared in a high population density (D3) presented greater storage of triacylglycerol, except when analyzing the amount of triacylglycerol $\mu\text{g}/\text{protein}$ of fat body in blood-fed females. In addition, it was possible to observe a higher resistance to fasting, higher amount of laid eggs. Insects reared on D2 and D3 were larger than D1. This study provided interesting data for future investigations as to how density of larval rearing affect the lipid metabolism concerning to synthesis and mobilization of triacylglycerol store in *A. aegypti* and how does it influences it size and the reproduction.

Keywords: *Aedes aegypti*, triacylglycerol, density, mosquitoes

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. O ciclo de vida do mosquito.....	3
Figura 2. Mapa global da distribuição prevista de <i>A. aegypti</i>	4
Figura 3. Eventos hormonais durante o primeiro ciclo reprodutivo da fêmea de <i>A. aegypti</i>	6
Figura 4. Ilustração do experimento	16
Figura 5. Landmarks da asa direita da fêmea de <i>A. aegypti</i>	18
Figura 6. Efeito da densidade populacional sobre a quantidade de TAG e TAG $\mu\text{g}/\text{proteína}$ em larvas de último estágio.	20
Figura 7. Quantidade de TAG e TAG $\mu\text{g}/\text{proteína}$ em pupas identificadas como fêmeas através da análise do último segmento abdominal.	21
Figura 8. Quantidade de triacilglicerol em pupas fêmeas coletadas em dois diferentes tempos do desenvolvimento de D1 e D3 em μl por indivíduo.....	22
Figura 9. Análise de conteúdo de TAG em D1 em dois tempos diferentes do desenvolvimento.....	23
Figura 10. Conteúdo de triacilglicerol em larvas, pupas e adultos de <i>A. aegypti</i> em diferentes densidades.....	25
Figura 11. Conteúdo de triacilglicerol nas diferentes densidades submetidas ao jejum..	27
Figura 12. Ovos postos por fêmeas em diferentes densidades..	28
Figura 13. Tamanho das asas de fêmeas adultas de <i>A. aegypti</i> de larvas criadas em diferentes densidades.....	29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dieta disponibilizada durante a criação larval aos diferentes tratamentos 14

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 – Ciclo de vida de <i>A. aegypti</i>	3
2.1.1- Ovos de <i>A. aegypti</i>	3
2.1.2 – Fases imaturas	5
2.1.3- Mosquitos adultos	5
2.2- Metabolismo lipídico em insetos	7
2.3 – Fatores que influenciam no <i>fitness</i> do mosquito.....	8
2.3.1 Densidade populacional	8
2.3.2- Efeito da densidade no metabolismo lipídico de <i>A. aegypti</i>	9
2.3.3- Relação das reservas lipídicas com a interação parasito-vetor	10
2.4- Influência da densidade sobre o tamanho corporal do mosquito.....	11
3. OBJETIVOS	13
3.1- Objetivo Geral	13
3.2- Objetivos específicos.....	13
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	14
4.1 Manutenção da colônia de <i>A. aegypti</i>	14
4.2- Densidades larvais	14
4.3- Resistência a fome	15
4.4- Isolamento do corpo gorduroso de fêmeas adultas.....	15
4.5 Extração de Lipídio e Cromatografia de Camada Fina (TLC)	15
4.6 Dosagem de proteína	16
4.7 Contagem de ovos.....	16
4.8- Tamanho por determinação da morfometria geométrica.....	17
4.9- Análise estatística	18

5. RESULTADOS	19
5.1- Caracterização dos experimentos	19
5.2- Efeitos da densidade sobre o conteúdo de triacilglicerol nos estágios imaturos de desenvolvimento do <i>A. aegypti</i>	20
5.2.1 Larvas L4.....	20
5.2.2 Pupas fêmeas	20
5.3- Efeitos da densidade sobre o conteúdo de triacilglicerol sobre fêmeas adultas de <i>A. aegypti</i>	23
5.4- Análise do conteúdo de triacilglicerol de fêmeas submetidas ao jejum	26
5.5 Contagem de ovos.....	28
5.6- Determinação do efeito da densidade populacional sobre o tamanho das asas de fêmeas de <i>A. aegypti</i>	29
6. DISCUSSÃO	30
7. CONCLUSÃO.....	34
8. AGRADECIMENTOS	35
9. REFERÊNCIAS	36

1. INTRODUÇÃO GERAL

O mosquito *Aedes aegypti*, descrito por Linnaeus em 1756, é uma espécie pertencente à família Culicidae, originário da África, vetor dos vírus da Dengue, febre amarela, Zika e Chikungunya (KANTOR, 2016) e possivelmente do Mayaro vírus (LONG et al., 2011). Possui ampla distribuição nas zonas tropicais e subtropicais do planeta, influenciada a princípio pelas grandes explorações humanas e modificações antropogênicas na paisagem (eventos que facilitaram a criação de novos nichos a essa espécie e facilitaram o processo de adaptação urbana do mosquito) (BROWN et al., 2013).

Seus hábitos encontram-se associados a ambientes urbanos e domésticos, onde há elevada concentração populacional humana e alta concentração de residências, o que proporciona ao mosquito uma fácil adaptação ao ambiente urbano, visto que há alta disponibilidade de alimento e reservatórios de água (DICKENS et al., 2018; HEINISCH et al., 2018).

Os criadouros são, geralmente, recipientes artificiais preenchidos com água da chuva ou doméstica, a exemplo de pneus, latas, vidros, garrafas, pratos de vasos, caixas d' água, tonéis, piscinas e aquários abandonados, entre outros, além de já terem sido observados também focos do mosquito em axilas das folhas de bromeliáceas (SANTOS et al., 2011; WILKE et al., 2018), o que viabiliza a proliferação do mosquito e sua futura emergência bem próxima ao homem.

A característica antropofílica, a adaptação do mosquito ao meio urbano, sua ampla dispersão geográfica, assim como a hematofagia obrigatória das fêmeas adultas, torna esse animal um vetor em evidência nos dias de hoje. No Brasil, a relação epidemiológica com *A. aegypti* é considerada como uma emergência em saúde pública devido ao aumento do número de casos nos últimos anos (QUARESMA, 2017).

Segundo o boletim epidemiológico de arboviroses do estado do Rio de Janeiro, em levantamento realizado na 6ª semana epidemiológica, o estado do RJ se encontra em alerta (dos 92 municípios, 37 (46,3%) foram classificados como satisfatórios e 38 (47,5%) em alerta e 05 (6,3%) em risco. Neste ciclo, 12 municípios não informaram (13,0%). (Secretaria de estado de saúde do Rio de Janeiro, 2020).

Nesse contexto, o objetivo dessa dissertação envolveu avaliar o efeito de uma criação larval submetida a diferentes densidades populacionais sobre o conteúdo de triacilglicerol (TAG) estocado e de proteína em diferentes fases do desenvolvimento desse mosquito, incluindo

larvas de último estágio, pupas fêmeas, e fêmeas adultas em diferentes condições, além de inferir os efeitos sobre o tamanho das fêmeas adultas e fecundidade.

Desse modo, após submetidas aos diferentes tipos de densidade larval nos criadouros artificiais, realizou-se a extração de lipídeo por cromatografia de camada fina e quantificação de proteína. Foram avaliados também os tamanhos das fêmeas provenientes dos diferentes criadouros larvais por morfometria geométrica e feita a contagem dos ovos das fêmeas alimentadas com sangue.

De modo geral, os resultados obtidos apontaram que o grupo de animais submetido em altas densidade apresentou maior capacidade de armazenamento de TAG, mas quando avaliado em fêmeas alimentadas com sangue o padrão TAG/proteína do corpo gorduroso do menor grupo de densidade teve uma concentração maior do lipídeo. Foi possível observar também, diferenças significativas quando os animais foram submetidos ao jejum, na quantidade de ovos postos e no tamanho das asas das fêmeas.

Portanto, com base nos dados apresentados acima, é possível concluir a influência que a densidade larval em um criadouro de *A. aegypti* tem a afetar aspectos importantes relacionados ao metabolismo energético e fisiologia do inseto.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 – Ciclo de vida de *A. aegypti*

O *A. aegypti* é um inseto da ordem Diptera e pertencente à família Culicidae. Seu ciclo de vida varia de acordo com a temperatura, disponibilidade de alimento e densidade de larvas existentes no mesmo criadouro e compreende a quatro fases: ovo, larva (quatro estágios larvários), pupa e adulta (Figura 1).

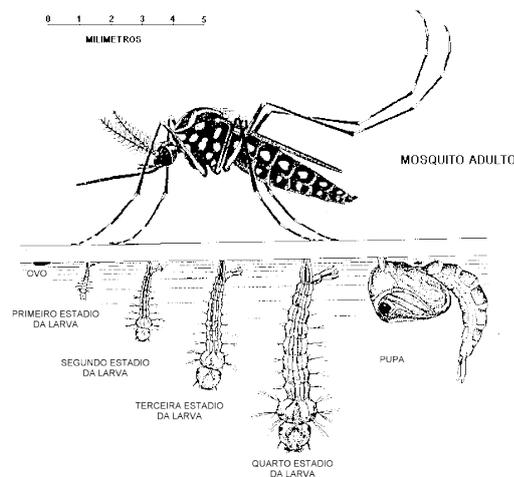


Figura 1. O ciclo de vida do mosquito; Disponível em: https://dengue.cecom.unicamp.br/?page_id=215

2.1.1- Ovos de *Aedes aegypti*

Os ovos do *A. aegypti* são depositados pela fêmea, individualmente, nas paredes internas de um recipiente úmido acima da coluna de água que servirá de criadouro em uma infinidade de microhabitats, naturais e artificiais (FARNESI et al., 2018; CLEMENTS, 1992). Em condições favoráveis de umidade e temperatura, o desenvolvimento do embrião deste mosquito é concluído em até 48 horas (FIOCRUZ, 2001).

Após o término do desenvolvimento do embrião, o ovo pode entrar em um estado quiescente e se tornar resistente à dessecação, resistindo assim a períodos de seca sem perder significativamente sua viabilidade (ZARA et al., 2016; REZENDE et al., 2008). Forma-se também uma cutícula serosa, semelhante a uma casca de ovo constituída por uma matriz extracelular de quitina, que impede a perda de água (REZENDE et al., 2008). Essa característica fisiológica dá a espécie a capacidade de manter a quantidade de ovos postos viáveis sem que

isso seja influenciado negativamente por meses com baixos índices pluviométricos e retomar o desenvolvimento logo após as condições ambientais permitirem.

Durante esse período de quiescência, embora a morfologia do ovo permaneça quase inalterada, mudanças metabólicas ocorrem. Já foi documentado que as atividades enzimáticas das enzimas Piruvato quinase (PK) e Hexoquinases (HK), enzimas chave durante a via da glicólise, diminuíram em ovos desidratados, sugerindo uma redução da glicólise nesse estágio de dormência o que pode ser uma estratégia para reduzir o metabolismo geral e garantir a sobrevivência pós seca (MARTINS et al., 2018).

Em outro estudo, com o intuito de identificar possíveis fatores que permitem a dessecação, verificou-se que a melanização tem forte influência sobre a resistência à dessecação comparando mosquitos de espécies diferentes (dentre eles *A. aegypti*) e diferentes graus de melanina presente o ovo (FARNESI et al., 2017). Com isso, os autores conseguiram identificar que a melanina pode proteger da dessecação e possíveis explicações para isso envolvem sua estrutura química.

Pode-se destacar também que resistência à seca, característica dos ovos de *A. aegypti*, principalmente no passado, permitiu a grande distribuição geográfica atual do inseto (Figura 2), pois os ovos eram transportados acidentalmente pelo homem através de embarcações e outros meios de transporte ou objetos ao longo da história (ZARA et al., 2016).

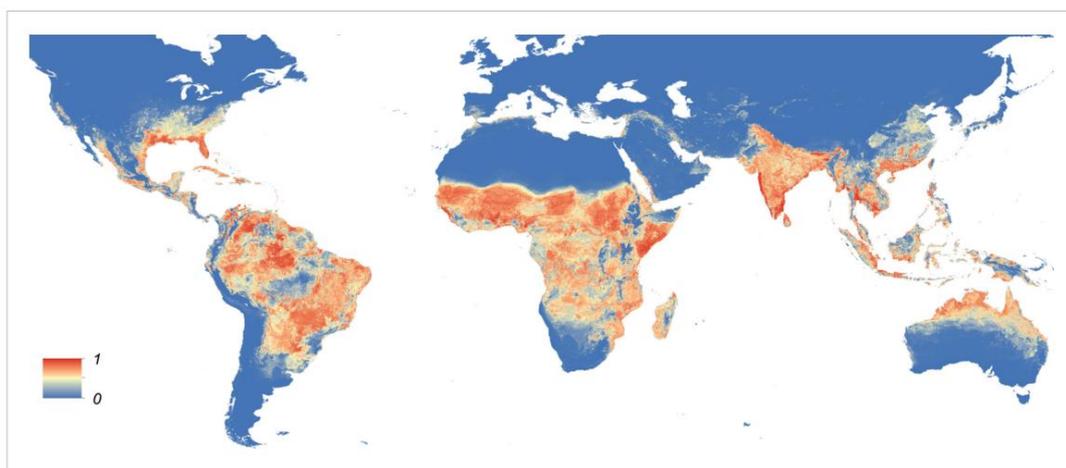


Figura 2. Mapa global da distribuição prevista de *A. aegypti*. O mapa mostra a probabilidade de ocorrência (de 0 azul para 1 vermelho) em uma resolução espacial de 5 km × 5 km (KRAEMER et al., 2015).

2.1.2 – Fases imaturas

Seguida à eclosão dos ovos, dá-se início a fase larvária do inseto onde passam a maior parte do tempo se alimentando de matéria orgânica acumulada na superfície e/ou fundo do criadouro. As larvas eclodem em 6-12h e o tempo necessário para completar o desenvolvimento larval varia de 7 a 23 dias, dependendo da temperatura, alimentação e densidade das larvas (IMAM et al., 2014). Essa fase se divide em quatro estágios chamados L1, L2, L3 e L4 e sua duração depende da temperatura, disponibilidade de alimento e densidade populacional de larvas no criadouro.

Em condições normais, o período entre eclosão do primeiro estágio larval e pupa pode durar até cinco dias (IMAM et al., 2014). Na fase de pupa, vai ocorrer a metamorfose do estágio larval para o adulto que dura em média 2,6 dias (TELANG et al., 2007).

2.1.3- Mosquitos adultos

O *A. aegypti* tem a fase adulta como seu estágio reprodutivo, e é classificado como uma espécie de mosquito com fêmeas anautógenas obrigatórias, necessitando de sangue para completar a maturação de seus ovócitos. (TELANG e WELLS, 2004). Assim, o repasto sanguíneo constitui um processo fisiológico essencial no ciclo de vida desta espécie. Em contrapartida, este modo alimentar acarreta na maior suscetibilidade de transmissão de arboviroses e outros patógenos, obtidos de um vertebrado infectado (BRIEGEL, 2003).

Após a emergência das pupas em mosquitos adultos, as fêmeas entram em um estágio chamado pré-vitelogênico (PV) que vai até uma alimentação sanguínea. Nesse momento as fêmeas vão em busca de um hospedeiro afim de realizar uma alimentação sanguínea (CLIFTON e NORIEGA, 2012; WANG et al., 2017).

Além disso, esse período de pré-vitelogênese é marcado fisiologicamente com uma preparação reprodutiva, onde há o total desenvolvimento dos seus ovários nas primeiras 60 horas devido a um aumento gradual do hormônio Juvenil (HJ) que vai promover o crescimento dos folículos ovarianos primários e a maturação reprodutiva geral da fêmea (Figura 3). (CLIFTON e NORIEGA, 2012; ATTARDO et al., 2006; ROY et al., 2016).

Em condições de vida livre, macho e fêmea alimentam-se de sacarose encontrada na seiva dos vegetais (FIOCRUZ, 2001). Outrossim, já foi descrito que uma alimentação rica em açúcares no período anterior a primeira alimentação sanguínea, influencia na fecundidade e quantidade de ovos produzidos pelas fêmeas (MOSTOWY e FOSTER, 2004). Isso se explica

porque esses açúcares ingeridos antes de uma alimentação com sangue permitem que a fêmea acumule energia em forma de lipídeos suficiente para ser usada para completar seu ciclo gonadotrófico (BRIEGEL et al., 2002), onde pode produzir individualmente até 150 ovos por ciclo (LING et al., 2017).

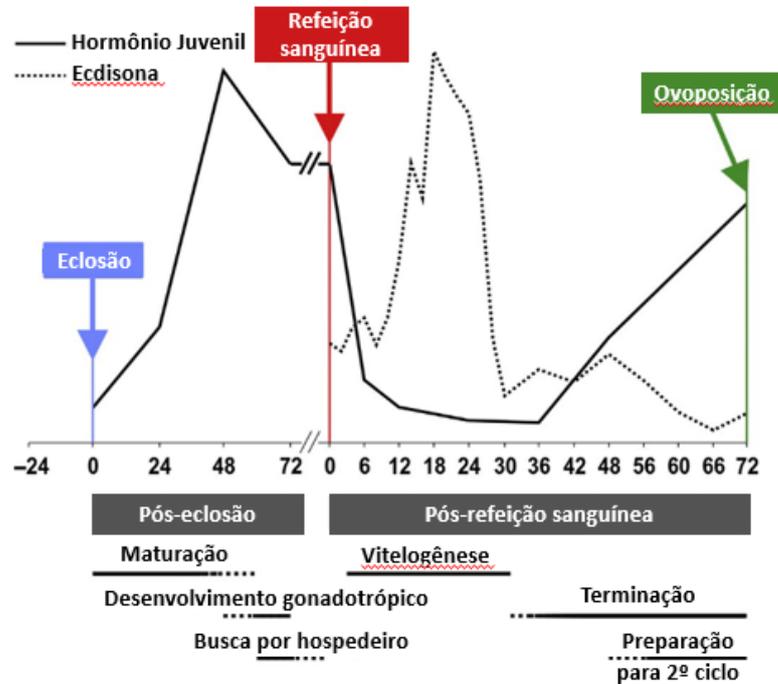


Figura 3. Eventos hormonais durante o primeiro ciclo reprodutivo da fêmea de *A. aegypti*. Adaptado de Roy et al, 2016.

A partir de uma alimentação com sangue a fêmea de *A. aegypti* entra em um estágio chamado de pós-alimentação sanguínea (PBM) onde interrompe a síntese de JH e, ao mesmo tempo, ativa a síntese de 20-hidroxecdisona (20E) no ovário, que é o principal regulador da fêmea tendo seu pico às 18h PBM e diminuição da sua concentração às 30h PBM. Com o baixo nível de ecdisona, ocorre o término da vitelogênese e início da fase final do ciclo reprodutivo quando os ovos se desenvolvem totalmente e estão prontos para serem postos em torno de 72h PBM (Figura 3) (ROY et al., 2016).

É possível destacar ainda, que a produção de vitelogenina no corpo gorduroso, em até 24h após a alimentação sanguínea, é feita em resposta aos aminoácidos do sangue do hospedeiro (CLIFTON e NORIEGA, 2012). Sem os aminoácidos provenientes do sangue como leucina, triptofano, metionina, valina, entre outros, mostra-se que o percentual de expressão da vitelogenina pode chegar a menos de 5% (ATTARDO e HANSEN, 2006), demonstrando dessa

forma que esses aminoácidos ingeridos são constituintes importantes para formação da vitelogenina.

2.2- Metabolismo lipídico em insetos

Os insetos, assim como outros animais, possuem necessidades energéticas constantes para suprir atividades como voo, acasalamento, ovogênese e seu desenvolvimento corpóreo. E no momento em que não estão se alimentando, eles vão depender de reservas acumuladas em períodos de abundância de alimentos, como por exemplo o glicogênio e os triacilgliceróis (TAG) principais reservas energéticas em células animais (ARRESE e SOULAGES, 2011).

De modo semelhante ao tecido adiposo de mamíferos, o TAG nos insetos é armazenado em sua maior parte no corpo gorduroso, que é um órgão aonde uma série de processos metabólicos acontecem suportando eventos como ovogênese, voo, diapausa e metamorfose. Nesse sentido, a demanda de síntese e mobilização de lipídios é importante no atendimento dessas demandas (GONDIM et al., 2018).

Durante o processo de digestão nos insetos, por exemplo, no lúmen intestinal, lipídeos complexos da dieta, como triacilgliceróis, diacilgliceróis e fosfolipídeos, são hidrolisados e ácidos graxos livres são liberados (GONDIM et al., 2018; PETERSON, 1977) os quais são absorvidos pelo epitélio intestinal.

A utilização das reservas lipídicas em animais depende de reações catalisadas por grupos específicos de enzimas – as lipases (ARRESE e SOULAGES, 2011). Essa enzima hidrolisa os triacilgliceróis liberando principalmente ácidos graxos e diacilglicerol (BRIEGEL et al., 2002).

Em *A. aegypti*, a triacilglicerol lipase encontra-se no intestino médio e pode ser regulada pela alimentação sanguínea, possuindo alta atividade em insetos hematófagos nos primeiros dias depois de uma alimentação com sangue que antecede o aumento das taxas de lipídeo disponível na hemolinfa (GONDIM et al., 2018).

Nos insetos, independente do hábito alimentar, existem duas possibilidades de mecanismos para digestão: hidrólise completa de TAG para gerar ácidos graxos e glicerol, ou hidrólise de TAG em monoacilglicerol e ácidos graxos (GONDIM et al., 2018). Quando requeridos para produção de ovos, por exemplo, são transportados do corpo gorduroso ou diretamente da absorção do lúmen intestinal por lipoproteínas hemolinfáticas, denominadas lipoforinas (LF), que carregam essas moléculas para suprir a ovogênese e outras demandas metabólicas (GILBERT e CHINO, 1974; GONDIM et al., 2018).

2.3 – Fatores que influenciam no *fitness* do mosquito

Um entendimento sobre a influência das condições ambientais e ecológicas nas fases larvais sobre o comportamento, fecundidade e metabolismo energético dos adultos pode gerar novas informações para um melhor entendimento da biologia do inseto, já que este está envolvido com a transmissão de doenças e suas características fisiológicas são importantes para questões de saúde pública (WEAVER et al., 2017).

Nesse sentido, variáveis como: temperatura, densidade populacional e disponibilidade de alimento têm se mostrado como grandes influenciadores sobre o desenvolvimento, tamanho das larvas, metabolismo, fecundidade e longevidade de adultos (BORASH e HO, 2001; COURET et al., 2014; ZIRBEL et al., 2018). E dentro desses fatores pode-se destacar a densidade larval, ou seja, o número de larvas em um mesmo criadouro.

2.3.1 Densidade populacional

Vários são os estudos que mostram a relação densidade de criação com seus efeitos em longevidade, desenvolvimento, tamanho de adultos, fecundidade, e até mesmo capacidade como vetor (ALTO et al., 2012; BALDAL et al., 2005; COURET e BENEDICT, 2014; PRICE et al., 2015).

Esses trabalhos vêm mostrando que indivíduos criados em locais onde há alta densidade populacional, terão maior competição intraespecífica, o que pode ocasionar em deficiências nutricionais, alteração no tempo de longevidade, aumento de amônia no meio aquático e até mesmo a interação entre vetor-patógeno em estudos com outras espécies do gênero *Aedes sp.* (ALTO et al., 2012; COSTA et al., 2008).

A competição intraespecífica ocasionada por alta densidade populacional influencia diretamente na fisiologia e metabolismo de insetos e de outros animais, por proporcionar um estresse nutricional que pode redefinir destinos para a energia adquirida através da alimentação. Em *Drosophila melanogaster*, larvas criadas de uma linhagem que foi submetida a altas densidades de criação, se mostraram mais resistentes a fome, com desenvolvimento mais lento e maior quantidade de reserva lipídica, além de maior eficácia dos ovos colocados na fase, resultantes de um contexto ambiental com recurso limitado (BORASH e HO, 2001).

Evidências adicionais de um estudo com *Culex pipiens*, no qual os mosquitos foram divididos em grupos experimentais que recebiam diferentes concentrações de nutrientes e eram criados em diferentes densidades, estabeleceram que sob condições de laboratório, a competição proporcionada pela densidade e alterações na disponibilidade de nutrientes, influenciaram o desempenho e fisiologia de maneira que houve consequências na longevidade do inseto (ALTO et al., 2012).

Couret et al. (2014), cita em sua pesquisa sobre a relação entre temperatura, dieta larval e densidade em *A. aegypti*, que existem várias hipóteses que buscam explicar a diferença no desenvolvimento de mosquitos que foram criados em densidades altas, incluindo interferência tátil, esforço da partição de alimentos (menor alimento per capita) e toxinas de resíduos químicos como amônia que pode acelerar ou retardar o desenvolvimento (MOORE e FISHER, 1969).

Outra consequência de uma densidade populacional alta sobre uma população de larvas é o atraso no desenvolvimento. Uma das explicações para esse atraso no desenvolvimento das larvas é que elas precisariam atingir um certo limiar de alimentação para disparar uma cascata hormonal como ecdisteóides que induziriam a muda para a próxima fase ou instar (TELANG et al., 2007).

2.3.2- Efeito da densidade no metabolismo lipídico de *Aedes aegypti*

A quantidade de nutrientes estocada durante o ciclo de vida do inseto tem importantes consequências para a vida adulta e à próxima geração, como por exemplo no tamanho do mosquito tempo de desenvolvimento e na fecundidade da fêmea (COURET et al., 2014; ZIRBEL et al., 2018). Nesse sentido, é possível ressaltar que condições ambientais que influenciam na disponibilidade de nutrientes, como a densidade populacional, necessitam de uma atenção para melhor entendimento sobre a biologia do mosquito.

Como já dito, em fêmeas de mosquitos adultos, todo ciclo gonadotrófico ocorre em duas etapas: a fase de pós-eclosão, onde há a maturação reprodutiva da fêmea através do HJ (CLIFTON e NORIEGA, 2012). E a segunda é a fase pós- alimentação sanguínea, que começa a partir de uma ingestão de sangue e é controlada principalmente pelo hormônio esteróide 20-hidroecdissona (20E), que estimulará o rápido desenvolvimento dos ovos. Estas funções

fisiológicas de reprodução de mosquitos fêmeas requerem um nível de energia alto suportado pelo metabolismo (WANG et al., 2017).

Logo, o estoque lipídico e o histórico nutricional das fases imaturas de um mosquito adulto estão relacionados diretamente com a definição das características que influenciarão na reprodução e longevidade.

A interação entre temperatura, dieta larval e densidade em *A. aegypti* mostrada por Couret et al.(2014) observou que uma criação de larvas sob densidade populacional alta e alimentação deficiente em relação ao número de indivíduos, gera um retardamento no tempo de desenvolvimento e aumento de mortalidade. Tal fato pode ser justificado na capacidade das larvas de *A. aegypti* apresentarem uma plasticidade significativa no tempo de desenvolvimento e poderem desenvolver-se muito rapidamente ou resistir à fome e desenvolver-se muito lentamente (ALTO et al., 2018)

É possível observar também os efeitos de um criadouro com uma alta taxa populacional de larvas, e alimentação desproporcional a esse número sobre o metabolismo, em mosquitos que foram, enquanto larvas, submetidos a altas densidades e apresentam altos níveis de glicerol no corpo gorduroso, o que pode indicar aumento na quebra de triglicerídeos, através da lipólise, no intuito de obter mais energia (PRICE et al., 2015).

2.3.3- Relação das reservas lipídicas com a interação parasito-vetor

Outro ponto a ser abordado, é a relação das condições energéticas do mosquito com a eficácia na transmissão de patógenos. Já são vistos alguns trabalhos nos quais sugerem que as mudanças metabólicas causadas por uma criação larval sob estresse pode resultar na alteração da capacidade de vetor e imunidade do mosquito (ALTO et al., 2012; COURET e BENEDICT, 2014; PRICE et al., 2015).

Uma análise abrangente realizada em células de insetos já mostrou que a infecção resulta em extenso remodelamento do perfil lipídico, em particular no que diz respeito a alterações nos níveis de lipídios que estavam associados à alteração da curvatura da membrana ou permeabilidade (PERERA et al., 2012). A infecção por DENV, por exemplo, resulta em remodelação significativa das membranas para fornecer estruturas para o complexo de replicação, bem como possivelmente proteger o complexo de replicação do sistema imune inato celular do hospedeiro (JUNJHON et al., 2014). Dessa forma, esses patógenos podem manipular

o metabolismo do hospedeiro e conseqüentemente afetar características como fecundidade e capacidade de voo (HURD, 2003; ROWLAND; BOERSMA, 1988).

Um estudo feito com mosquitos de campo da espécie *Anopheles gambiae*, mostrou que quando infectados por *Plasmodium falciparum* sofrem um aumento transcricional nos níveis de lipoforina, que é a proteína circulante na hemolinfa responsável pelo transporte de lipídeos (ARRESE e SOULAGES, 2011; MENDES et al., 2008). Isso indica que os lipídeos podem estar sendo mobilizados como uma resposta imune.

Em adição as informações anteriores, é possível destacar um estudo feito por Tongluan et al. (2017), que ao buscar determinar se a expressão de genes relacionados ao metabolismo lipídico era alterado em células de mamíferos sob infecção do vírus da Dengue (DENV), mostrou que ao iniciar-se a infecção, a expressão desses genes aumentava e quando silenciada a proteína ácido graxo sintase a infecção era reduzida. Isso pode indicar que o vírus DENV pode estar necessitando, de alguma maneira ainda não bem esclarecida, do lipídeo para continuar infectando uma célula.

Além disso, já foi observada, uma acumulação de gotículas de lipídeos induzida por infecção em resposta a infecções virais e bacterianas em *A. aegypti* (BARLETTA et al., 2016).

Portanto, visto que atualmente o mosquito *A. aegypti* em sua fase madura tem sido motivo de alarme para as instituições de saúde e pesquisa por conta de sua rápida adaptação ao ambiente doméstico e alta capacidade de transmitir arboviroses (QUARESMA, 2017; WEAVER et al., 2017), estimar como os efeitos de condições ambientais acerca de sua fisiologia e metabolismo energético tornam-se informações importantes para seu atual controle.

2.4- Influência da densidade sobre o tamanho corporal do mosquito

A densidade populacional que atua nos estágios larvais de *A. aegypti* encontra-se também relacionada com o tamanho corporal (JIRAKANJANAKIT et al., 2007). Um estimador de tamanho pode ser o peso, mas pode variar bastante dependendo da alimentação. A medida linear do comprimento da asa tem sido historicamente usada como estimador do tamanho corporal em mosquitos (LEHMANN et al., 2006; LOUNIBOS et al., 1995). Porém, atualmente o 'tamanho do centróide' é o estimador frequentemente utilizado na morfometria geométrica que aborda questões de entomologia médica (DUJARDIN J. P e SLICE D, 2007).

A morfometria geométrica é uma ferramenta confiável e de baixo custo para detectar diferenças de conformação e tamanho em várias características morfológicas e é particularmente adequada para o estudo de asas de insetos, que são estruturas bidimensionais

(ROHLF & ARCHIE, 1984). Tal análise baseada em landmarks, tem sido usada para investigar muitos vetores de insetos, como por exemplo flebotomíneos, moscas tsé-tsé, mosquitos e triatomíneos (SANTOS et al., 2015; KABA et al., 2016; LORENZ et al., 2017; NATTERO et al., 2017).

Nesse sentido, o presente trabalho visa determinar a influência da densidade populacional de *A. aegypti* sob aspectos da sua biologia, como a formação e mobilização das reservas de TAG e a variabilidade morfológica de asas.

3. OBJETIVOS

3.1- Objetivo Geral

Analisar os efeitos de uma criação larval em diferentes densidades populacionais sobre o conteúdo de TAG armazenado e de proteína em adultos e larvas de *A. aegypti*, e seus efeitos sobre o tamanho e fecundidade das fêmeas adultas.

3.2- Objetivos específicos

- Determinar o conteúdo de reservas de TAG total (nas fases imaturas) e no corpo gorduroso dos insetos (fêmeas submetidas recém emergidas, alimentadas com sacarose e alimentadas com sangue) sob diferentes densidades populacionais;
- Analisar a fecundidade fêmeas alimentadas com sangue através da soma de ovos postos;
- Avaliar o tamanho das fêmeas adultas após serem mantidas nas diferentes densidades populacionais através da morfometria geométrica de asas;

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Manutenção da colônia de *Aedes aegypti*

Os mosquitos da espécie *A. aegypti* (Rockefeller) foram mantidos na incubadora do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Artrópodes (LBBMA), Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil, com um fotoperíodo de 16h: 8h claro-escuro a 28 ° C e 60-80% de umidade relativa. As larvas foram mantidas em recipientes com 1,5 L de água desclorada, com adição diária de 0,766 mg / larva / dia de ração comercial para peixes. Os adultos foram alimentados com uma solução com sacarose a 10% ad libitum. Camundongos foram anestesiados com 0,4ml de uma solução de 10ml com 75% Anasedan e 25% Ketalex. Após anestesiados foram disponibilizados para as fêmeas se alimentarem de sangue e completar o ciclo gonadotrófico. Todos os experimentos foram realizados de acordo com as normas e ética da experimentação animal, com aprovação do Comitê de Ética em Uso Animal (CEUA) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, sob o número de protocolo: 005/2017.

4.2- Densidades larvais

As larvas do estágio L1 foram separadas em diferentes recipientes contendo 250 ml de água desclorada em três densidades populacionais diferentes. Em cada copo, 10, 80 e 200 larvas foram colocadas separadamente, correspondendo a 0,04 larva / ml (D1), 0,32 larva / ml (D2) e 0,8 larva / ml (D3), respectivamente. Todas as larvas foram mantidas durante todas as etapas do desenvolvimento com a mesma quantidade de ração (0,766 mg/larva/dia) (tabela 1).

Os estágios avaliados foram larvas em último estágio (L4), pupas fêmeas e corpo gorduroso de adultas recém eclodidas, alimentadas com sacarose e após alimentação sanguínea criadas nas diferentes densidades (Figura 4).

Tabela 1. Dieta disponibilizada durante a criação larval aos diferentes tratamentos

Densidade	Ração (mg)	Dieta/larva	larva/ml
D1	7,66	0,766	0,04
D2	61,33	0,766	0,32
D3	153,325	0,766	0,80

4.3- Resistência a fome

Para avaliar a resposta ao jejum, animais recém-emergidos criados nas condições D1, D2 e D3 foram submetidos a jejum por 4h, 30h e 42h. Os animais foram coletados ao final de cada momento, dissecados e o corpo gorduroso separado, homogeneizado em NaCl 0,15 M e quantidade de TAG determinada. Para cada condição, foram realizadas 4 ou mais repetições com 10 indivíduos em cada.

4.4- Isolamento do corpo gorduroso de fêmeas adultas

Após a emergência em adulto, os mosquitos machos e fêmeas foram mantidos na mesma gaiola de acordo com seu grupo de densidade larval. Para a verificação dos impactos da densidade larval no estoque de TAG das fêmeas adultas nos grupos anteriormente estabelecidos (D1, D2 e D3), foi necessário o isolamento do corpo gorduroso a partir da separação do abdome e remoção dos órgãos presentes no local com auxílio de microscópio estereoscópio.

Foi utilizada uma lâmina de microscópio côncava e adicionadas duas gotas de PBS ao centro. A fêmea foi transferida para a superfície das gotas de PBS com o auxílio de uma pinça e segurando cuidadosamente o mosquito pelo tórax, com a pinça na mão esquerda, posicionada de modo que o lado ventral ficasse para cima. Mantendo o corpo firme junto ao tórax, os dois últimos segmentos abdominais foram segurados e, com a pinça na mão direita, puxados delicadamente. A partir desse procedimento há a retirada do abdômen e dos ovários, dos túbulos de Malpighi, do intestino grosso e do intestino médio (CHUNG et al., 2017).

4.5 Extração de Lipídio e Cromatografia de Camada Fina (TLC)

Larvas (L4), pupas fêmeas de 1 dia de idade e corpos gordurosos da fêmea adulta pós-emergência, fêmea adulta 5 dias após a emergência alimentada com açúcar e fêmea pós-refeição de sangue (72 h após alimentação com sangue), foram homogeneizados em água destilada e os lipídios foram separados por cromatografia de camada fina em placa de sílica para lipídios neutros, usando os solventes hexano, éter etílico e ácido acético, e então imerso em solução aquosa contendo 14% de sulfato de cobre e 8% de ácido fosfórico. Em seguida, a placa foi completamente seca sob uma corrente de ar quente até que as manchas lipídicas se tornassem evidentes. Então, a placa foi imediatamente aquecida a 200 ° C durante aproximadamente 5 min e os pontos correspondentes às amostras assim como à curva padrão de TAG foram

submetidos a análise densitométrica (Pontes et al., 2008). Para cada condição, 4 repetições foram realizadas com 10 indivíduos em cada. Os pontos correspondentes às amostras e à curva padrão TAG foram submetidos à análise densitométrica (Pontes et al., 2008) através do programa ImageLab 5.1. Para cada condição, foram realizadas 4 ou mais repetições com 10 indivíduos em cada.

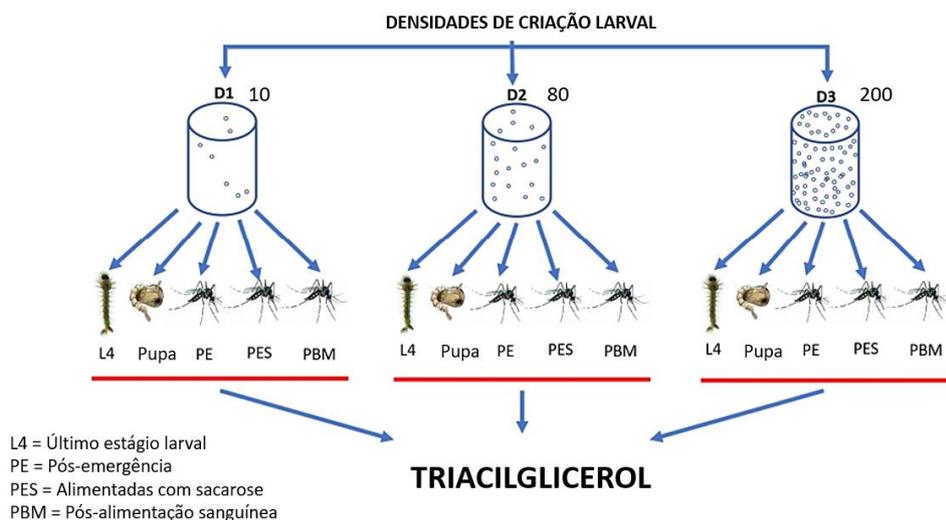


Figura 4. Ilustração do experimento

4.6 Dosagem de proteína

Larvas (L4), pupas fêmeas e corpos gordurosos da fêmea adulta pós-emergência, fêmea adulta pós-emergência alimentada com açúcar por 5 dias e fêmea 78h pós-refeição de sangue foram homogeneizadas em NaCl 0,15 M e a concentração de proteínas determinada usando albumina sérica bovina como padrão de acordo com o método de Lowry (PETERSON, 1977). Para cada condição, foram realizadas 4 ou mais repetições com 10 indivíduos em cada.

4.7 Contagem de ovos

Fêmeas e machos recém-emergidos de *A. aegypti* foram separados pela densidade de criação das larvas, mantidos juntos em gaiolas e alimentados com sacarose a 10% por 5 dias. No sexto dia, as fêmeas foram alimentadas com sangue e 48 horas depois, 10 fêmeas de cada gaiola foram separadas individualmente em recipientes com algodão umedecido coberto com uma camada de filtro de papel. Elas foram mantidas com 16: 8 h de fotoperíodo claro-escuro a uma temperatura constante de 28 °C e umidade entre 70% e 80%. O número total de ovos postos

por fêmea durante 4 dias foi registrado para calcular a média de ovos postos por 10 fêmeas de cada grupo de densidade.

4.8- Tamanho por determinação da morfometria geométrica

Asas direitas das fêmeas foram extirpadas do tórax. As asas foram colocadas em lâmina limpa, em escala milimétrica, e posicionadas no microscópio estereoscópico (LEICA, EZ4HD), com lente 35x. Foi utilizada uma câmera digital (480 megapixels), adaptada ao microscópio para capturar as imagens das asas. Um conjunto de 13 pontos de referência (Figura 4), cobrindo a maior parte da superfície da asa, foi selecionado e digitalizado usando o software TPSdig (<http://life.organic.sunysb.edu/moph>).

Foram feitas comparações para o estimador de tamanho conhecido como "tamanho do centróide", para os grupos formados pelas densidades larvais estabelecidas anteriormente, totalizando 83 asas, agrupadas da seguinte forma: D1: n = 27; D2: n = 27 e D3: n = 29. As comparações entre densidades populacionais foram realizadas através de uma análise de variância ANOVA, com uma suposição paramétrica anterior do teste de Levene. A significância entre os grupos foi testada com o teste de Tukey.

As séries TP Subtil e TPSdig foram usadas para escanear os pontos anatômicos (disponíveis em <http://life.bio.sunysb.edu/ee/rohlf/software.html>). Um MOG, disponível no pacote CLIC v97, foi usado para obter o tamanho do centróide (disponível em www.mome-clic.com). As análises estatísticas foram realizadas no JMP v10 (SAS Institute, Inc., Cary, NC, EUA).

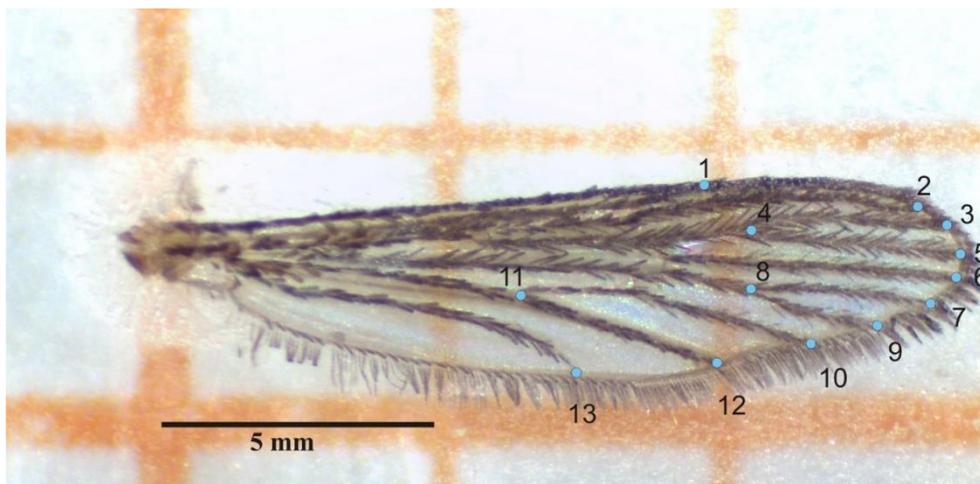


Figura 5. Landmarks da asa direita da fêmea de *A. aegypti* com marcação dos 13 pontos anatômicos de referência.

4.9- Análise estatística

A análise de variância oneway ANOVA foi utilizada na análise comparativa de TAG e proteína entre diferentes grupos de densidade, seguida do teste de Tukey alfa = 0,05, utilizando o software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, EUA). Para cada condição, foram realizadas 4 ou mais repetições com 10 indivíduos cada.

5. RESULTADOS

5.1- Caracterização dos experimentos

Para analisar a variação de TAG em relação à densidade populacional em cada recipiente foram divididos grupos desde uma densidade baixa a uma mais alta com respectivamente 10, 80 e 200 larvas. E assim foi considerado para análise cada fase do ciclo de vida do mosquito a partir do quarto instar de desenvolvimento (L4), as quais receberam a mesma quantidade de alimentação durante toda a análise como descrito na metodologia.

A quantidade de ração dada aos grupos experimentais aqui analisados, se encontra adequada com o número médio em miligramas (mg) que trabalhos de pesquisa anteriores utilizaram. Esses dados foram verificados por Couret e Benedict (2014), os quais realizaram uma meta-análise dos fatores que influenciavam a taxa de desenvolvimento em *Ae. aegypti* e dentre esses fatores estava a densidade populacional.

De acordo com os autores, 96% das pesquisas com criações experimentais de mosquitos usam de 0,01 mg/larva/dia a 6,8 mg/larva/dia. É possível ressaltar também que a quantidade de larvas por ml de água no criadouro de 69% das criações por densidades citadas pela pesquisa está entre 0,1 larva por ml e 1 larva por ml (COURET e BENEDICT, 2014).

Com o intuito de se verificar o efeito da densidade populacional de um criadouro artificial de *A. aegypti* sobre o estoque de TAG (das larvas de último estágio, as pupas e as fêmeas adultas recém eclodidas, alimentadas com sacarose e alimentadas com sangue), foram colocados ovos para eclodir em recipientes de plástico com água desclorada e sob temperaturas e luminosidade adequadas.

O triacilglicerol é a forma mais concentrada de energia disponível para os tecidos biológicos. Além de se mostrar mais vantajoso do que os carboidratos por não ter afinidade com água e assim, diferente dos carboidratos, não ter interferência osmótica, ainda exibem baixa toxicidade biológica em comparação aos ácidos graxos e é bem tolerado, no curto e médio prazo (GIBBONS et al., 2000). A quantidade de TAG foi determinada como TAG μg / animal (larva ou pupa) ou corpo gorduroso e como TAG μg / proteína.

5.2- Efeitos da densidade sobre o conteúdo de triacilglicerol nos estágios imaturos de desenvolvimento do *Aedes aegypti*

5.2.1 Larvas L4

O estágio larval é o momento em que as reservas energéticas são formadas e será determinante no sucesso do animal na fase adulta. A quantidade de TAG μg / larva em L4 foi significativamente maior nas condições de criação D2 e D3, quando comparada com D1 (teste de Tuckey, $p < 0,05$) (Fig. 6 A). Quando foi determinado TAG $\mu\text{g}/\text{proteína}$ de larva, o teste revelou uma diferença significativa ($p < 0,05$) entre os três grupos, com D3 mostrando maior quantidade de TAG (Fig. 6 B).

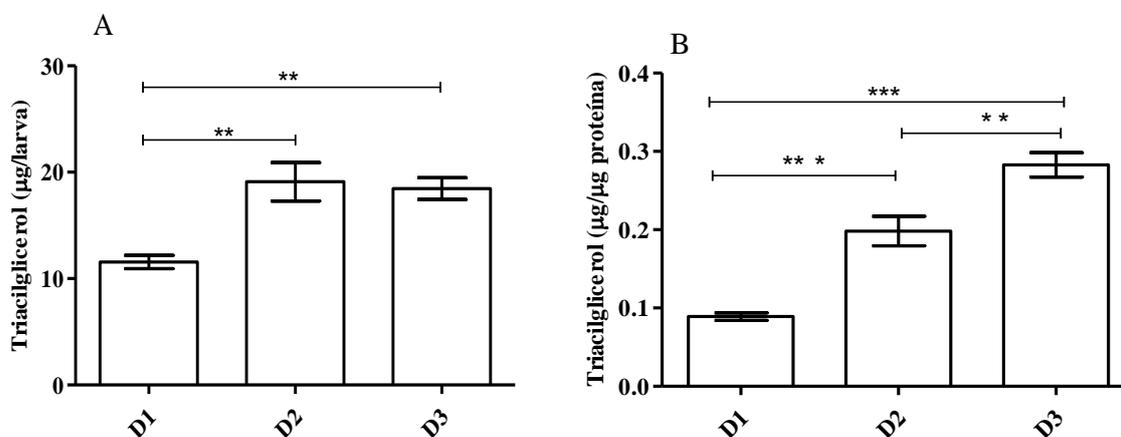


Figura 6. Efeito da densidade populacional sobre a quantidade de TAG e TAG $\mu\text{g}/\text{proteína}$ em larvas de último estágio. Quantidade de TAG (A) e TAG $\mu\text{g}/\text{proteína}$ (B). As barras das colunas representam o erro padrão em torno das médias com teste estatístico de one-way ANOVA e para medir as diferenças entre os grupos foi realizado o teste de Tukey (p value $< 0,05$). As condições experimentais foram as descritas na seção Materiais e Métodos, e os resultados são médios \pm S.E.M para 4 determinações. Asteriscos indicam diferenças de significância entre os grupos.

5.2.2 Pupas fêmeas

A quantidade de TAG μg / pupa aumentou significativamente (teste de Tukey, $p < 0,05$) entre as condições de criação D1 para D3 (Fig. 7 A) e, quando determinado por TAG μg / proteína das pupas, mostrou um aumento ainda maior de D3 em relação a D1 e D2, mas estes não mostraram diferenças significativas entre eles (Fig. 7 B).

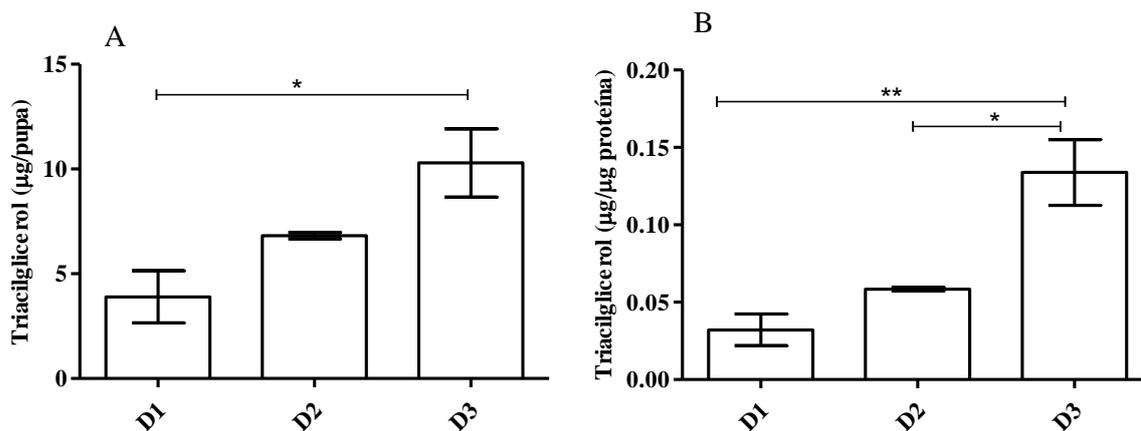


Figura 7. Quantidade de TAG e TAG µg/proteína em pupas identificadas como fêmeas através da análise do último segmento abdominal. TAG (A) e TAG µg/proteína (B). As barras das colunas representam o erro padrão em torno das médias com teste estatístico de one-way ANOVA e para medir as diferenças entre os grupos foi realizado o teste de Tukey (p value<0,05).

Como o estágio de desenvolvimento de pupa dura por volta de 2 a 3 dias, uma outra análise foi realizada a fim de verificar se houve alguma variação caso as pupas analisadas estivessem em tempos diferentes de desenvolvimento. Sendo assim, coletou-se pupas recém-emergidas, coletadas até 1 hora após pupação, e na fase pré-adulta, a partir de 36 horas de pupação. Essa análise foi realizada com as densidades D1 e D3 (Figura 8). A quantidade de TAG µg / pupa foi maior em pupas criadas na densidade D3 recém emergidas em comparação a D1 recém emergidas, e assim também ocorreu entre as densidades D1 e D3 tardias. Pode-se ressaltar também que quando comparamos as recém emergidas e as pré-fase adulta na mesma densidade, o grupo D1 não apresentou diferenças entre si, ao passo que em D3 o conteúdo de TAG diminui comparando o grupo D3 recém emergida com a quantidade disponível em D3 pré- fase adulta (Figura 8).

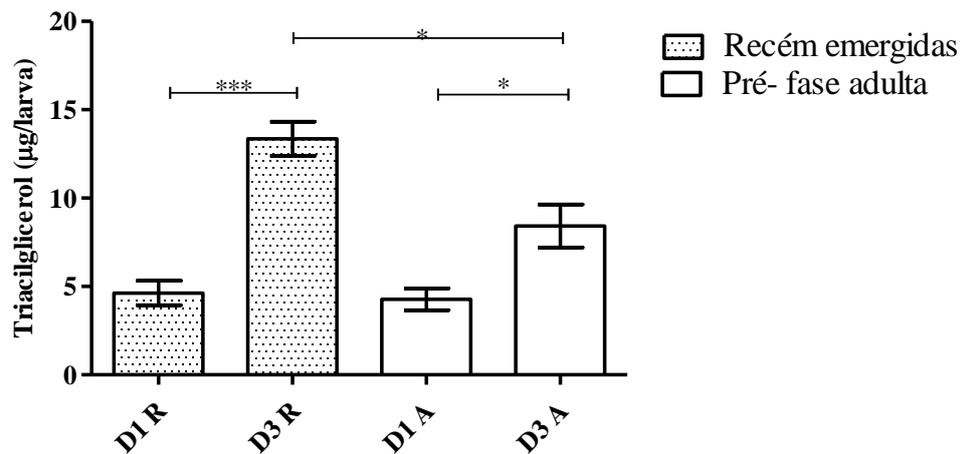


Figura 8. Quantidade de triacilglicerol em pupas fêmeas coletadas em dois diferentes tempos do desenvolvimento de D1 e D3 em µl por indivíduo. As barras das colunas representam o erro padrão em torno das médias com teste estatístico de one-way ANOVA e para medir as diferenças entre os grupos foi realizado o teste de Tukey (p value<0,05).

A partir do resultado acima, foi feita uma análise com o objetivo de identificar em que momento ocorreria a mobilização das reservas de D1 para que a muda ocorresse. Logo, ao analisar pupas do grupo D1 no momento pré-adulta com fêmeas adultas recém emergidas em jejum (até 15 horas de emergência em adulto), observou-se uma diminuição significativa no conteúdo de lipídeos (Figura 9). Desse modo, observa-se que há diminuição de TAG entre pupas recém emergidas da densidade D3 e pupas prestes a eclodirem em adultos e que, embora não houvesse o mesmo resultado entre as pupas D1 nos dois tempos de desenvolvimento da fase, observou-se que essa diminuição se dá um pouco depois (Figura 9), sugerindo que em D1 pode estar havendo uma mobilização das reservas mais tardia do que em D3.

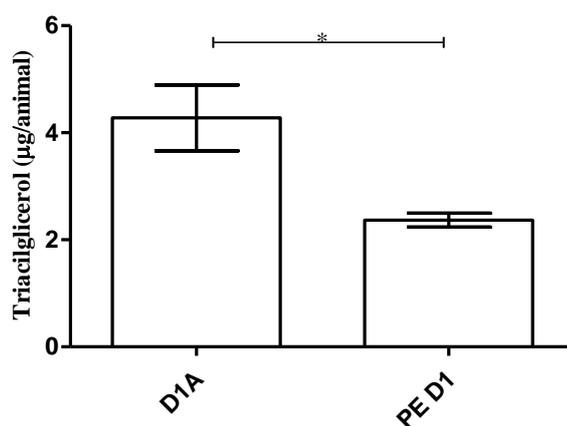


Figura 9. Análise de conteúdo de TAG em D1 em dois tempos diferentes do desenvolvimento. Conteúdo de triacilglicerol em pupas fêmeas no momento de pré- muda que vai 30-36h após emergência em pupa (D1A) e fêmeas adultas recém emergidas com até 15h de emergência em adulto (PE). As barras representam o erro padrão entorno das médias e o teste de Tukey ($\alpha = 0,05$).

5.3- Efeitos da densidade sobre o conteúdo de triacilglicerol de fêmeas adultas de *Aedes aegypti*

Variações no armazenamento de TAG do corpo gorduroso e TAG por quantidade de proteína, em fêmeas adultas não alimentadas após a emergência, também foram avaliadas (Fig. 10 A e B). Nas fêmeas adultas pós-emergência, o conteúdo de TAG foi significativamente maior em D2 e D3 em comparação com D1, mas não mostrou diferenças entre elas (teste de Tukey, $p < 0,05$) (Fig. 9 A). Quando analisado o TAG $\mu\text{g}/\text{proteína}$, D2 mostrou um conteúdo de TAG significativamente maior que o D1, mas não mostrou diferença significativa em comparação ao D3 (Fig. 10 B).

Além das fêmeas pós-emergência não alimentadas, avaliamos o conteúdo de TAG nas fêmeas pós-emergência criadas em diferentes densidades, alimentadas ad libitum com 10% de sacarose. Elas foram alimentadas por 5 dias e, após esse tempo, a quantidade de TAG foi determinada no corpo gorduroso. Em ambas as análises, TAG/corpo gorduroso e TAG $\mu\text{g}/\text{proteína}$, a condição de criação D3 mostrou uma quantidade maior de TAG que D1 e D2 (Fig. 10 C e D).

Também foi avaliado se a quantidade de TAG foi alterada em fêmeas alimentadas com sangue criadas nas diferentes densidades. Após 5 dias alimentadas com sacarose a 10%, as fêmeas foram alimentadas com sangue e após 72 horas a quantidade de TAG foi determinada. A quantidade de TAG foi significativamente maior na condição D3, em comparação com D1 e D2, que não mostraram uma mudança significativa entre eles (Fig. 10 E). O inverso foi observado quando a quantidade de TAG $\mu\text{g}/\text{proteína}$ do corpo gorduroso foi analisada, em que D1 foi significativamente maior do que em D2 e D3 (Fig. 10 F).

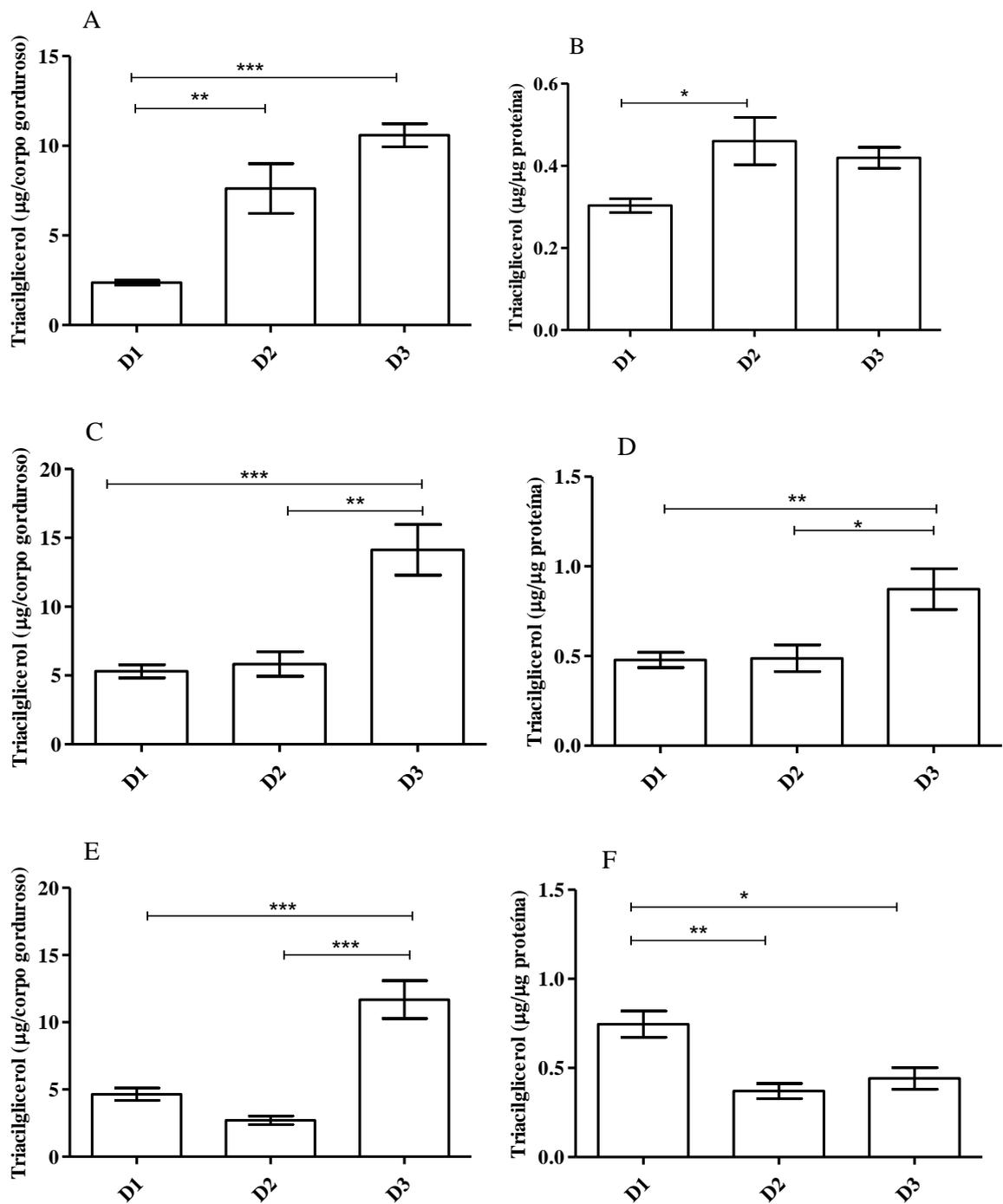


Figura 10. Conteúdo de triacilglicerol em larvas, pupas e adultos de *A. aegypti* em diferentes densidades. A quantidade de TAG foi determinada pelo animal (A, C, E) e por proteína (B, D, F). Foram analisados os seguintes estágios de desenvolvimento: corpo gorduroso pós-emergência (PE) (A) e (B); pós-emergência alimentada com açúcar (PES) por cinco dias (C) e (D); 72h fêmeas adultas após refeição de sangue (PBM) (E) e (F). As condições experimentais foram as descritas na seção Materiais e Métodos, e os resultados são médios \pm S.E.M para 4 determinações. Asteriscos indicam diferenças de significância entre os grupos.

5.4- Análise do conteúdo de triacilglicerol de fêmeas submetidas ao jejum

Como foi observado acima, fêmeas de *A. aegypti* criadas sob a densidade D3, indicam maior estoque de TAG no corpo gorduroso comparadas aos demais grupos de densidades exceto após uma alimentação com sangue. Logo, com o intuito de verificar como estaria a eficiência em mobilizar essas reservas caso essas fêmeas passassem por uma privação alimentar, foi feito um ensaio em tempos diferentes com as densidades D1, D2 e D3 imediatamente após sua emergência, onde não foi oferecido alimento por até 42h.

A análise foi realizada com corpo gorduroso de fêmeas submetidas ao jejum e coletadas aproximadamente nos tempos 4h, 30h e 42h após a emergência em adulta. Na densidade D1, a quantidade de TAG caiu depois de 4h, foi para menos da metade no período de 30h e foi quase completamente esgotada em 42h (Fig. 11 A). Na densidade D2 a quantidade de TAG ficou perto da metade em 30h e ficou bem abaixo da metade em 42h (Fig. 11 B). Em D3, por outro lado, a quantidade de TAG, quando comparada a 4h pós-emergência, teve um leve declínio, mas permaneceu acima da metade nos dois tempo posteriores (30h e 42h) (fig. 11 C).

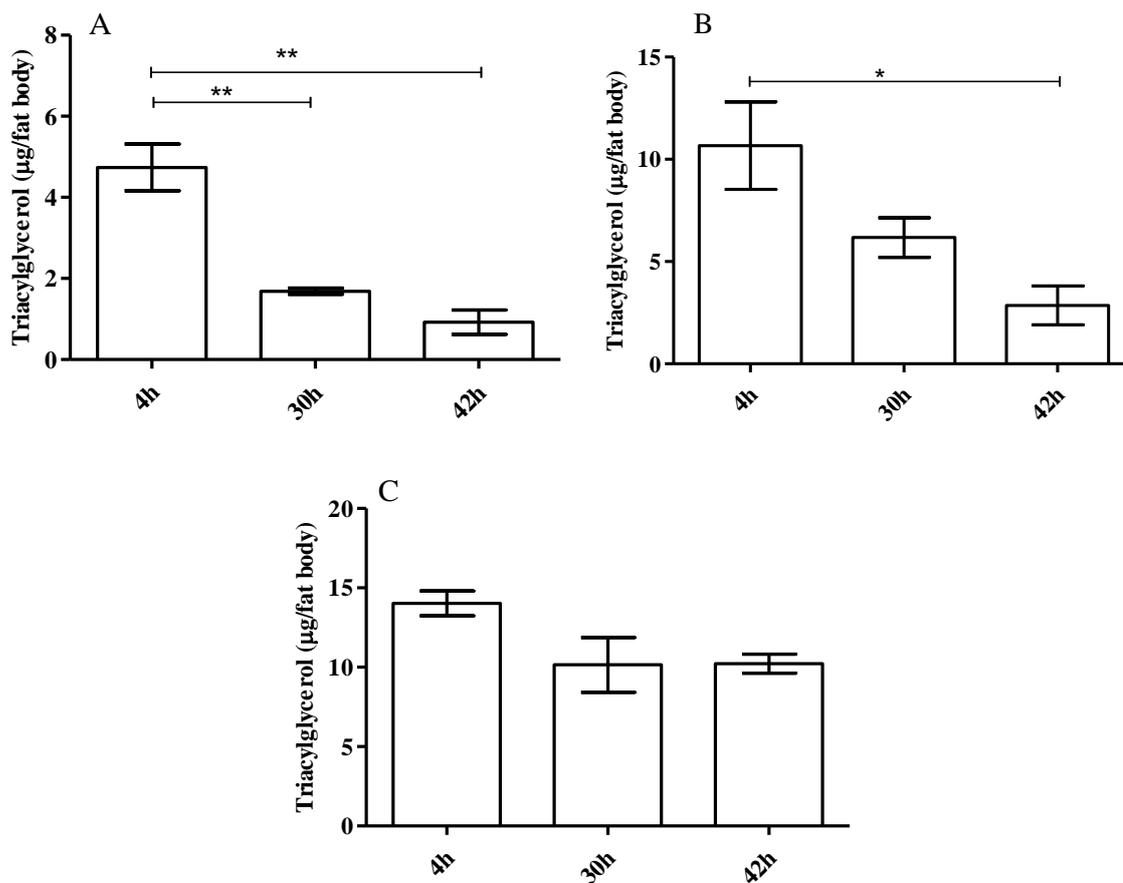


Figura 11. Conteúdo de triacilglicerol nas diferentes densidades submetidas ao jejum. As larvas de *A. aegypti* foram criadas nas seguintes densidades: 0,04 larvas / ml, 0,32 larvas / m L e 0,8 larvas / ml representadas por D1 (A), D2 (B) e D3 (C), respectivamente. A quantidade de TAG foi determinada no corpo adiposo de fêmeas adultas submetidas a jejum originário de larvas mantidas em diferentes densidades. Elas foram analisadas nos períodos 4h, 30h e 42h pós emergência. As condições experimentais foram as descritas na seção Materiais e Métodos, e os resultados são médios \pm S.E.M para 4 determinações. A ausência de asteriscos indica que não houve diferença significativa entre os tratamentos.

5.5 Contagem de ovos

As fêmeas de *A. aegypti* precisam das proteínas presentes no sangue do hospedeiro para a maturação dos ovos. A digestão do sangue fornecerá os aminoácidos que serão transportados para os ovários e incorporados nos oócitos para a produção de ovos. No quarto dia após a alimentação com sangue, a soma de ovos depositados para cada fêmea durante um período de quatro dias foi registrada e tirada uma média das repetições. Foram observadas diferenças significativas no número de ovos colocados entre as diferentes densidades de criação, onde as fêmeas de D3 depositaram mais ovos que D1 ($p < 0,001$) e D2 ($p < 0,01$). Também observou-se diferença significativa entre D1 e D2 (fig. 12).

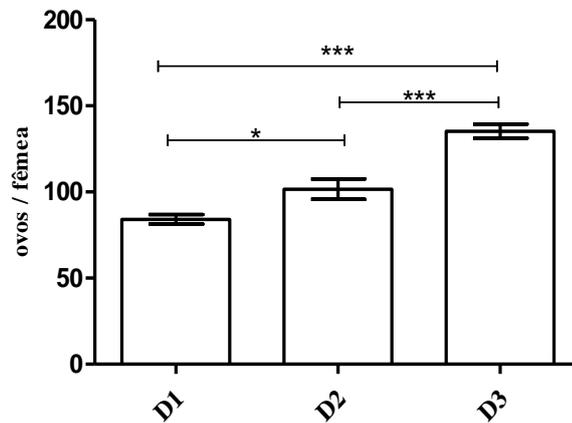


Figura 12. Ovos postos por fêmeas em diferentes densidades. Os ovos foram coletados das fêmeas mantidas individualmente no quarto dia após a alimentação do sangue. As condições experimentais foram as descritas na seção Materiais e métodos, e os resultados são médios \pm S.E.M para 10 determinações. Asteriscos indicam diferenças de significância entre os grupos.

5.6- Determinação do efeito da densidade populacional sobre o tamanho das asas de fêmeas de *Aedes aegypti*

Na análise morfométrica das asas, o teste de homogeneidade de variância não foi significativo (teste de Levene, $p = 0,1127$), permitindo a análise paramétrica da ANOVA. O teste de Tuckey a seguir ($p < 0,001$) revelou que o tamanho do centróide das asas, de insetos criados em D1, era significativamente menor do que os criados em D2 e D3 (Fig. 13). Entretanto, não foram observadas diferenças significativas para esse estimador de tamanho entre insetos criados em D1 e D2.

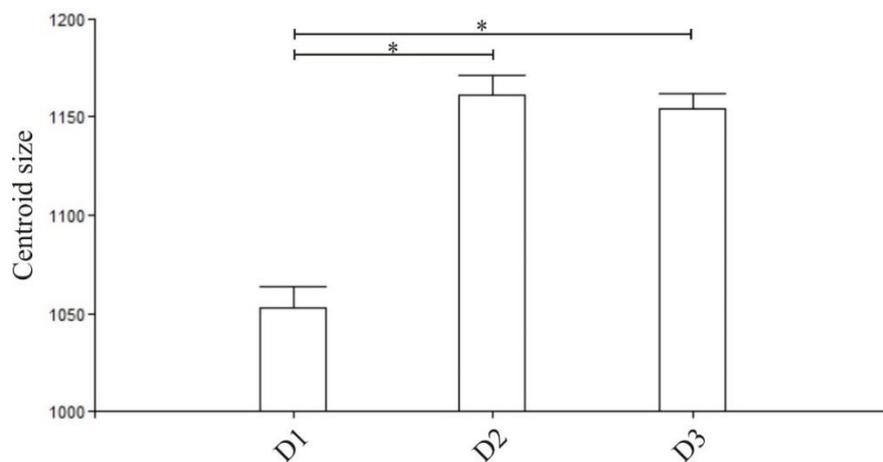


Figura 13. Tamanho das asas de fêmeas adultas de *A. aegypti* de larvas criadas em diferentes densidades. Variação do tamanho [tamanho do centróide] em fêmeas de *A. aegypti* de larvas criadas em diferentes densidades (D1, D2 e D3). As condições experimentais foram as descritas na seção Materiais e Métodos, e os resultados são médios \pm S.E.M para 4 determinações. Asteriscos indicam diferenças de significância entre os grupos.

6. DISCUSSÃO

A longevidade, o número de ovos postos e a capacidade do vetor estão relacionados ao tamanho da fêmea do mosquito e às reservas estabelecidas. A densidade populacional é um fator de estresse que exerce influência no desenvolvimento de insetos, e seus efeitos sobre os indivíduos impactam em diferentes aspectos, como reprodução, tamanho e formação de reservas (BALDAL et al., 2005; BALEBA et al., 2019; GILLES et al., 2011). Estudos que avaliaram apenas o aumento da densidade, sem um aumento correspondente na disponibilidade de recursos alimentares, levaram os animais a um comprometimento nutricional, interferindo na captação e incorporação de nutrientes, canibalismo, morte por fome e no tamanho adulto (BESERRA et al., 2009; BRIEGEL, 1990; PRICE et al., 2015). Nosso estudo teve como objetivo avaliar o estresse causado pela densidade populacional nas reservas de TAG em fases imaturas do mosquito (larva L4 e pupa fêmea) e adultas em diferentes condições, mantendo a mesma proporção nutricional por larva em durante criação larval e excluindo desse contexto a competição por recursos alimentares.

O corpo gorduroso é um órgão secretório e de armazenamento de energia com múltiplas funções metabólicas, destacando o metabolismo lipídico, que garante energia para o desenvolvimento, voo e reprodução dos insetos, regulando sua homeostase (ARRESE e SOULAGES, 2010). Durante a vida adulta de um inseto, a quantidade de lipídios no tecido adiposo varia consideravelmente, e essa variação está relacionada ao sucesso reprodutivo ou até à capacidade do vetor (CLIFTON e NORIEGA, 2012; PRICE et al., 2015).

Geralmente, a nutrição larval está positivamente associada ao tamanho corporal, taxa de desenvolvimento e formação de reservas (BRIEGEL, 1990). Entretanto, nossos resultados mostraram que não apenas a nutrição adequada, mas também a densidade populacional influencia na formação de reservas de TAG e, conseqüentemente, impactam a resistência ao jejum, o número de ovos postos e o tamanho das asas das fêmeas.

Observou-se que o aumento da densidade nas condições de criação de larvas teve uma correlação positiva na formação de reservas de TAG das larvas no estágio L4. As reservas de TAG formadas durante os estágios larvais nas diferentes densidades (D1, D2 e D3) influenciaram os demais estágios de desenvolvimento de *A. aegypti*.

Em todos os estágios de desenvolvimento do mosquito aqui avaliados, nas condições de criação D1, D2 e D3, observou-se correlação positiva na quantidade de TAG com o aumento

da densidade. Em relação à quantidade de TAG μg / corpo gorduroso em fêmeas alimentadas com sangue, observou-se que D3 mantém uma reserva maior que D1 e D2. No entanto, quando foram avaliados os níveis de TAG μg / proteína do corpo gorduroso de fêmeas alimentadas com sangue, D1 apresentou uma quantidade maior de TAG que D2 e D3. É possível ressaltar que nos animais criados em D1 e dissecados para remoção do corpo adiposo, três dias após a alimentação sanguínea, os ovários não se desenvolveram como em D3 e o intestino apresentava um conteúdo sanguíneo não digerido superior ao observado em D3 (dados não mostrados).

Logo, como existe um possível atraso na digestão em D1, isso pode refletir uma menor quantidade de proteína/vitelogenina no corpo adiposo e, conseqüentemente, a proporção TAG/proteína é maior em D1. Sabe-se que a proteína vitelogenina e outras proteínas são sintetizadas em resposta aos aminoácidos fornecidos pelo sangue (CLIFTON e NORIEGA, 2012), com isso, o atraso na digestão sanguínea deve afetar a quantidade de proteína no corpo gorduroso, fato que corrobora nosso resultado. Essa influência da densidade de criação larval na fisiologia de *A. aegypti* foi relatada em estudos anteriores (COURET et al., 2014; PRICE et al., 2015; YOSHIOKA et al., 2012).

Essa condição de estresse permitiu que uma maior reserva de TAG fosse estabelecida na idade adulta e, portanto, mais resistência às condições de jejum. Em ambas as densidades D1 e D2, as reservas praticamente se esgotaram após 36 horas após a emergência, enquanto em D3 menos da metade dessas reservas foi mobilizada nas primeiras 24 horas e mantida nos períodos seguintes. Este resultado mostrou uma resistência à fome no grupo D3.

Experimentos com *Drosophila sp* também mostram um aumento na resistência a situações de inanição e seus efeitos na história de vida de moscas sujeitas a diferentes densidades (BALDAL et al., 2005). Isso pode ser justificado pela competição intraespecífica causada pela alta densidade populacional, que influencia diretamente a fisiologia e o metabolismo de insetos e outros animais, fornecendo um estresse fisiológico que redefine os destinos da energia adquirida através dos alimentos (MOORE e FISHER, 1969). As larvas de *Drosophila melanogaster*, sujeitas a altas densidades de criação, foram mais resistentes à fome, com desenvolvimento mais lento e maior quantidade de reservas lipídicas, além de maior eficiência na postura dos ovos, resultante desse contexto ambiental (BORASH e HO, 2001).

Beserra et al. (2009), mostraram que em *A. aegypti*, quando apenas a densidade larval é variada, mas a relação alimento / larva oferecida não muda, não há efeitos sobre a duração do

desenvolvimento larval, taxa de sobrevivência e mortalidade larval. No caso dos adultos, esses mesmos autores não observaram alterações na longevidade e na fertilidade. No entanto, um ponto observado que se mostrou semelhante ao nosso trabalho foi que, com o aumento da densidade, foi observado um aumento no tamanho das asas nas fêmeas.

Alterações induzidas pelo ambiente afetam o tamanho do inseto e também, a variação no comprimento das asas entre as populações naturais de *A. aegypti* está associada a diferentes capacidades de vetores (JIRAKANJANAKIT et al. 2007). A morfometria geométrica nos permitiu usar um estimador robusto do tamanho da asa para descrever os efeitos da densidade larval. Nossos resultados indicam que o tamanho da asa é maior à medida que a densidade aumenta.

Nossos dados mostram que o número de ovos postos no quarto dia após a alimentação sanguínea é maior no D3, corroborando as vantagens apresentadas pelas fêmeas maiores. Zhou et al., (2004) e Roy et al. (2016), mostraram que o armazenamento de energia preexistente contribui significativamente para as fêmeas em seu primeiro ciclo gonadotrópico. Nossos resultados mostram que, em densidades mais elevadas, as larvas apresentaram maior reserva de TAG, o que contribuiu para o seu tamanho e, conseqüentemente, maior número de ovos postos.

Para estabelecer correlações nas condições de densidade de criação, podemos observar que o processo de digestão (dados não mostrados) e o número de ovos postos é mais acelerado na condição D3. Nesse sentido, podemos sugerir que as condições de criação podem exercer influência na produção hormonal. Também é possível apontar que outras hipóteses buscam explicar a diferença no desenvolvimento do mosquito criado em diferentes densidades, incluindo interferência tátil e toxinas de resíduos químicos excretados, como amônia, que podem acelerar ou retardar o desenvolvimento (COURET et al., 2014).

Assim, são necessários mais estudos para estabelecer uma relação entre as reservas de TAG, estabelecidas em diferentes condições, e seus efeitos na regulação hormonal por esses animais, nas fases larval e adulta. Briegel (1990) mostrou que o conteúdo lipídico em *A. aegypti* estava exponencialmente relacionado ao tamanho corporal em ambos os sexos, mas era consistentemente 2 a 4 vezes maior nos homens do que nas mulheres do mesmo tamanho. Para atingir essas condições, esses insetos foram forçados a crescer em um ambiente de alta densidade e com restrições nutricionais, o que levou a indivíduos de diferentes tamanhos. Por outro lado, nossos resultados mostraram que o aumento no tamanho dos indivíduos, decorrente

exclusivamente do aumento da densidade populacional, resultou em maior quantidade de TAG no corpo gordo, nos estágios larvais e nas fêmeas adultas.

Esses resultados trazem um debate muito interessante sobre a capacidade vetorial de adultos, de larvas mantidas em diferentes densidades populacionais e o papel dos lipídios.

7. CONCLUSÃO

Neste estudo foi possível concluir que a densidade populacional do recipiente em que larvas de *A. aegypti* são criadas, influencia no conteúdo de TAG, proteínas e tamanho das fêmeas adultas mesmo que haja equidade na disponibilidade de alimento.

Quando submetidas a diferentes densidades e mantidas as mesmas quantidades de alimento proporcional ao número de larvas por recipiente, foi concluído que as larvas ficaram sujeitas a uma espécie de “seleção por densidade” definida por alguns autores citados acima, que de certa forma reflete um resultado de fêmeas adultas com maior estoque de TAG e proteínas no corpo gorduroso e maior número de ovos postos.

Pode-se concluir também que as fêmeas que possuíram uma fase imatura sob densidade alta alcançaram tamanhos maiores do que aquelas que haviam se desenvolvido em um ambiente mais “tranquilo” de menor densidade populacional.

Logo, torna-se crucial para o entendimento da biologia e medidas de controle de doenças relacionadas ao mosquito, a especial atenção para o fator da densidade populacional, já que essa é verificada neste presente trabalho afetando o metabolismo energético do inseto, no qual é intimamente relacionado com a capacidade de vetor, fecundidade e ainda seu tamanho.

8. AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por seu amor e bondade que em todos os momentos da minha vida se mostrou mais presente do que eu poderia descrever em palavras, e é por isso que toda a minha vida dedico a honrá-lo.

Agradeço também aos meus pais, Luis Antônio e Deise Lucia, por sempre cuidarem de mim e, dentro das suas condições me darem uma ótima educação, me ensinando princípios e valores os quais contribuíram para que eu fosse a pessoa que sou hoje.

Ao meu marido Marcelo Henrique, que sempre me apoiou e me estimulou a não olhar para as dificuldades, mas sim correr atrás dos meus sonhos, os quais hoje vivo um deles por estar em sua companhia.

Agradeço também ao meu querido orientador e professor por disponibilizar seu tempo, paciência e conhecimento.

Outros agradecimentos vão para CAPES pela oportunidade de receber uma bolsa de mestrado.

À todos os amigos do laboratório: Luan, Luana, Regina, Daniele, Marcela, Juliana, Wellington e todos que passaram por lá e contribuíram de alguma maneira com meu trabalho e amadurecimento profissional.

Instituto Nacional de Ciência e Técnica - Entomologia Molecular / CNPq, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). A ALCF é membro da Carreira do Pesquisador “Consejo Nacional de Ciência e Técnica da República Argentina” (CONICET).

9. REFERÊNCIAS

- ALTOB, W.; MUT, E. J AND LAMPMAN, R. L. Effects of nutrition and density in *Culex pipiens*. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 7200, p. 396–406. 2012.
- ARRESE, E. L.; SOULAGES, J. L. Insect fat body: energy, metabolism, and regulation. **Annual Review of Entomology**, v. 55, n. 87, p. 207–225. 2010.
- BALDAL, E. A.; LINDE, K. VAN DER; ALPHEN, J. J. M. VAN. The effects of larval density on adult life-history traits in three species of *Drosophila*. **Mechanisms of Ageing and Development** 126 v. 126, p. 407–416. 2005.
- BALEBA, S. B. S., MASIGA, D., TORTO, B., WELDON, C. W., & GETAHUN, M. N.. Effect of larval density and substrate quality on the wing geometry of *Stomoxys calcitrans* L. (Diptera: Muscidae). **Parasites & Vectors**, 12(1), 222. 2019.
- BARLETTA, A. B. F. et al. Emerging role of lipid droplets in *Aedes aegypti* immune response against bacteria and Dengue virus. **Scientific Reports**, v. 6, n. September 2015, p. 1–13. 2016.
- BESERRA, E. B.; FERNANDES, C. R. M.; RIBEIRO, P. S. Relação entre densidade larval e ciclo de vida, tamanho e fecundidade de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) em laboratório. **Neotropical Entomology**, v. 38, n. 6, p. 847–852. 2009.
- BORASH, D. J.; HO, G. T. Patterns of selection: Stress resistance and energy storage in density-dependent populations of *Drosophila melanogaster*. **Journal of Insect Physiology**, v. 47, n. 12, p. 1349–1356. 2001.
- BRIEGEL, H. Metabolic relationship between female body size, reserves, and fecundity of *Aedes aegypti*. **J.Insect.Physiol.**, v. 36, n. 3, p. 165–172. 1990.
- BRIEGEL, H. Physiological bases of mosquito ecology. **Journal of Vector Ecology**. p. 1–11. 2003.
- BRIEGEL, H.; HEFTI, M.; DIMARCO, E. Lipid metabolism during sequential gonotrophic cycles in large and small female *Aedes aegypti*. **Journal of Insect Physiology**.v. 48, p. 547–554. 2002.
- BROWN, J. E.; EVANS, B. R.; ZHENG, W.; OBAS, V.; MARTINEZ, L. B.; EGIZI, A.;

- ZHAO, H.; CACCONI, A.; POWELL, J. R. et al. Human impacts have shaped historical and recent evolution in *Aedes aegypti*, the dengue and yellow fever mosquito. **The Society for the Study of Evolution**. p. 514–525. 2013.
- CHUNG, H.-N. et al. Fat Body Organ Culture System in *Aedes Aegypti*, a Vector of Zika Virus. **Journal of Visualized Experiments**, n. 126, p. 1–8. 2017.
- CLIFTON, M. E.; NORIEGA, F. G. The fate of follicles after a blood meal is dependent on previtellogenic nutrition and juvenile hormone in *Aedes aegypti*. **Journal of Insect Physiology**, v. 58, n. 7, p. 1007–1019. 2012.
- COSTA, F. S. et al. Dinâmica populacional de *Aedes aegypti* (L) em área urbana de alta incidência de dengue. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 3, p. 309–312. 2008.
- COURET, J.; BENEDICT, M. Q. A meta-analysis of the factors influencing development rate variation in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **BMC Ecology**, 2014, p. 1–15. 2014.
- COURET, J.; DOTSON, E.; BENEDICT, M. Q. Temperature, larval diet, and density effects on development rate and survival of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **PLOS ONE**, 9(2). 2014.
- DICKENS, B. L. et al. Determining environmental and anthropogenic factors which explain the global distribution of *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*. **BMJ Global Health**, v. 3, n. 4, p. 2018.
- FARNESI, L. C. et al. Darker eggs of mosquitoes resist more to dry conditions: Melanin enhances serosal cuticle contribution in egg resistance to desiccation in *Aedes*, *Anopheles* and *Culex* vectors. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 10, p. 1–20. 2017.
- FARNESI, L. C. et al. The influence of a light and dark cycle on the egg laying activity of *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae). **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v. 113, n. 4, p. 4–9. 2018.
- FIOCRUZ. Dengue. Instruções para Pessoal de Combate ao Vetor. Manual de Normas Técnicas. **FUNASA**. 2001.

- ATTARDO, G. M.; HANSEN, I. A. S. H. S.; RAIKHEL, A. S Identification of two cationic amino acid transporters required for nutritional signaling during mosquito reproduction. **Journal of Experimental Biology**, v. 209, n. 16, p. 3071–3078. 2006.
- GIBBONS, G. F.; ISLAM, K.; PEASE, R. J. Mobilisation of triacylglycerol stores. **Biochimica et biophysica acta** v. 1483. 2000.
- GILBERT, L. I.; CHINO, H. Transport of lipids in insects. **J. Lipid Res.**, v. 15, n. 5, p. 439–456, set. 1974.
- GILLES, J. R. L. et al. Density-Dependent Effects in Experimental Larval Populations of *Anopheles arabiensis* (Diptera: Culicidae) Can Be Negative, Neutral, or Overcompensatory Depending on Density and Diet Levels. **Journal of Medical Entomology**, v. 48, n. 2, p. 296–304. 2011.
- GONDIM, K; ATELLA, G, PONTES, E; MAJEROWICZ, D. Lipid metabolism in insect disease vectors. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 101, 108–123. 2018.
- HEINISCH E SILVA, M. R. et al. Seasonal and spatial distribution of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in a municipal urban park in São Paulo, SP, Brazil. **Acta Tropica**. 2018.
- HURD, H. Manipulation of medically important insect vectors by their parasites. **Annual Review of Entomology**, v. 48, n. 1, p. 141–161, 2003.
- IMAM, H.; SOFI, G.; AZIZ, S. The basic rules and methods of mosquito rearing (*Aedes aegypti*). **Tropical Parasitology**. v. 4, n. 1, p. 53–55. 2014.
- JIRAKANJANAKIT, N. et al. Influence of larval density or food variation on the geometry of the wing of *Aedes (Stegomyia) aegypti*. **Tropical Medicine and International Health**. volume v. 12, n. 11, p. 1354–1360. 2007.
- JUNJHON, J. et al. Ultrastructural characterization and three-dimensional architecture of replication sites in dengue virus-infected mosquito cells. **Journal of Virology**. 88, 4687–4697. 2014.
- KABA, D., BERTE, D., Ta Bi Tra, D., TELLER´ 1a, J., SOLANO, P., DUJARDIN, J.-P., The wing venation patterns to identify single tsetse flies. 2016. doi:10.1016/j.meegid.2016.10.008
- KANTOR, I. N. Dengue, Zika and Chikungunya. **Medicina**, p. 1–5. 2016.

- KRAEMER, M. U. G. et al. The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*. p. 1–18. 2015. doi: 10.7554/eLife.08347
- LEHMANN, T.; DALTON, R.; KIM, E. H.; DAHL, E.; DIABATE, A.; DABIRE, R.; DUJARDIN, J. P. Genetic contribution to variation in larval development time, adult size, and longevity of starved adults of *Anopheles gambiae*. **Infection, Genetics and Evolution**. v. 6, p. 410–416. 2006.
- LING, L.; KOKOZA, A. V.; ZHANG, C.; ARKZOY, E.; RAIKHEL, A. S. MicroRNA-277 targets *insulin-like peptides 7* and *8* to control lipid metabolism and reproduction in *Aedes aegypti* mosquitoes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 38, p. E8017–E8024. 2017.
- LONG, K. C. et al. Experimental Transmission of Mayaro Virus by *Aedes aegypti*. v. 85, n. 4, p. 750–757. 2011. doi: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2011.11-0359>
- LORENZ, C.; ALMEIDA, F.; LOPES, F. A.; LOUISE, C.; PEREIRA, S. N.; PETERSEN, V.; VIDAL, P. O.; SUESDEK, F. V. L.; Geometric morphometrics in mosquitoes: What has been measured?. **Infection, Genetics and Evolution**. 2017. doi: 10.1016/j.meegid.2017.06.029
- LOUNIBOS, L P; NISHIMURA, N; CONN, J; OLIVEIRA, R. Life history correlates of adult size in the Malaria Vector *Anopheles darlingi*. **Mémórias Instituto Oswaldo Cruz**, vol 90 (6): 769 - 774. 1995.
- MARTINS, R. et al. Hypometabolic strategy and glucose metabolism maintenance of *Aedes aegypti* egg desiccation. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B**, p. 2018.
- MENDES, A. M. et al. Conserved mosquito/parasite interactions affect development of *Plasmodium falciparum* in Africa. **PLoS Pathogens**, v. 4, n. 5. 2008.
- MOORE, C. G AND FISHER, B. R. Competition in Mosquitoes. Density and Species Ratio Effects on Growth, Mortality, Fecundity, and Production of Growth Retardant. **Annals of the entomological society of America**, v. 62, n. 6. 1969.
- MOSTOWY, W. M.; FOSTER, W. A. Antagonistic effects of energy status on meal size and egg-batch size of *Aedes aegypti* (Diptera : Culicidae). **Journal of Vector Ecology**. p.

84–93. 2004.

- NATTERO, J.; PICCINALI, R. V.; LOPES, C. M.; HERNÁNDEZ, M. L.; ABRAHAN, L.; LOBBIA, P. A.; RODRÍGUEZ, C. S.; FUENTE, A. L. C. Morphometric variability among the species of the *Sordida subcomplex* (Hemiptera : Reduviidae : Triatominae): evidence for differentiation across the distribution range of *Triatoma sordida*. **Parasites & Vectors** p. 1–14. 2017.
- PERERA R, RILEY C, ISAAC G, HOPF-JANNASCH AS, MOORE RJ, et al. Dengue Virus Infection Perturbs Lipid Homeostasis in Infected Mosquito Cells. **PLoS Pathogens** 8(3): e1002584. 2012. doi:10.1371/journal.ppat.1002584
- PETERSON, G. L. A Simplification of the Protein Assay Method of Lowry et al . **Analytical Biochemistry**. Which is More Generally Applicable. v. 356, p. 346–356. 1977.
- PRICE, D. P. et al. Small mosquitoes, large implications: crowding and starvation affects gene expression and nutrient accumulation in *Aedes aegypti*. **Parasites & vectors**, v. 8, n. 1, p. 252. 2015.
- QUARESMA, M. A. **Avaliação da implantação do componente controle vetorial do Programa de Controle da Dengue em Porto Seguro-BA/Brasil**. [s.l.] FIOCRUZ. 2017.
- REZENDE, G. L. et al. Embryonic desiccation resistance in *Aedes aegypti*: Presumptive role of the chitinized Serosal Cuticle. **BMC Developmental Biology**, v. 8, p. 1–14. 2008.
- ROWLAND, M.; BOERSMA, E. Changes in the spontaneous flight activity of the mosquito *Anopheles stephensi* by parasitization with the rodent malaria *Plasmodium yoelii*. **Parasitology**, v. 97, n. 2, p. 221–227. 1988.
- ROY, S. et al. Regulation of Reproductive Processes in Female Mosquitoes. In: **Advances in Insect Physiology**. [s.l: s.n.]. v. 51p. 115–144. 2016
- SANTOS, C.; LEITE, G.; FALQUETO, A. Does native bromeliads represent important breeding sites for *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) in urbanized areas? **Neotropical Entomology**, v. 40, n. 2, p. 278–281, 2011.
- SOULAGES, J. L.; ARRESE. E. L. Insect fat body: energy, metabolism, and regulation. **Annu Rev Entomol**. 55: 207–225. 2011. doi:10.1146/annurev-ento-112408-085356.

- TELANG, A. AND WELLS, M. A. The effect of larval and adult nutrition on successful autogenous egg production by a mosquito. **Journal of Insect Physiology**. v. 50, p. 677–685. 2004.
- TELANG, A.; FRAME, L.; BROWN, M. R. Larval feeding duration affects ecdysteroid levels and nutritional reserves regulating pupal commitment in the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* (Diptera : Culicidae). **The Journal of Experimental Biology**. p. 854–864. 2007.
- WANG, X. et al. Hormone and receptor interplay in the regulation of mosquito lipid metabolism. **PNAS**. e2709–e2718. 2017.
- WEAVER, S. C. COSTA, F., et al. Zika Virus: History, Emergence, Biology, and Prospects for Control. **Antiviral research**. p. 69–80. 2017.
- WILKE, A. B. B. et al. Ornamental bromeliads of Miami-Dade County, Florida are important breeding sites for *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Parasites & Vectors**, v. 11, n. 1, p. 283. 2018.
- YOSHIOKA, M. et al. Diet and density dependent competition affect larval performance and oviposition site selection in the mosquito species *Aedes albopictus* (Diptera : Culicidae). **Parasites & Vectors**. p. 1–11. 2012.
- ZARA, L. S. A. SANTOS, M.; OLIVEIRA, S. F. Estratégias de controle do *Aedes aegypti*: uma revisão. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 25, n. 2, p. 1–2, 2016.
- ZHOU, G.; PENNINGTON, J. E.; Ã, M. A. W. Utilization of pre-existing energy stores of female *Aedes aegypti* mosquitoes during the first gonotrophic cycle. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 34, p. 919–925, 2004.
- ZIEGLER, R.; ANTWERPEN, R. VAN. Lipid uptake by insect oocytes. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. 36 (2006) 264–272. 2006.
- SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE DO RIO DE JANEIRO. Boletim epidemiológico arboviroses. Nº 004. n. 85, p. 1–17. 2018.
- ZIRBEL, K.; EASTMOND, B.; ALTO, B. W. Parental and offspring larval diets interact to influence life-history traits and infection with dengue virus in *Aedes aegypti*. **R. Soc. open sci.** 5: 180539. 2018.