

UFRRJ
INSTITUTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOLOGIA ANIMAL

DISSERTAÇÃO

Ultraestrutura dos ovos de mosquitos do gênero
Ochlerotatus (DIPTERA:CULICIDAE)

JULIANA SOARES SARMENTO DOS SANTOS

2013



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL**

**ULTRAESTRUTURAS DE OVOS DE MOSQUITOS DO
GÊNERO *OCHLEROTATUS* (DIPTERA:CULICIDAE)**

JULIANA SOARES SARMENTO DOS SANTOS

Sob a Orientação da Doutora
Jacenir Reis dos Santos Mallet

e Co-orientação do Doutor
Jerônimo Augusto Alencar

Dissertação submetida como
requisito parcial para obtenção do
grau de **Mestre em Ciências**, no
Programa de Pós-Graduação em
Biologia Animal

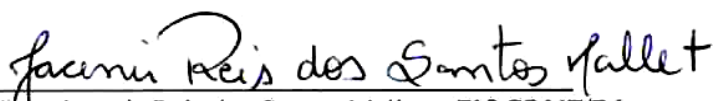
Seropédica, RJ
Fevereiro de 2013

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL**

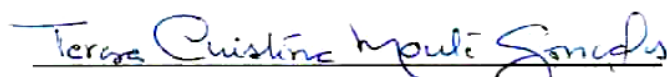
JULIANA SOARES SARMENTO DOS SANTOS

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências, no Curso de Pós-Graduação em Biologia Animal, área de Concentração em Biologia Animal.

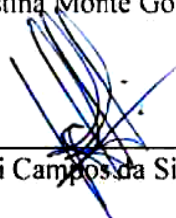
DISSERTAÇÃO APROVADA EM 26/02/2013



Dra. Jacenir Reis dos Santos Mallet – FIOCRUZ/RJ
(Orientadora)



Dra. Teresa Cristina Monte Gonçalves – FIOCRUZ/RJ



Dr. Vanderlei Campos da Silva – FIOCRUZ/RJ

*À minha rainha Vovó Neide (in memorian),
por ter me apoiado em todos os momentos da minha vida e por ter me ensinado a ser
uma eterna guerreira.*

Dedico

Ao meu Vovô Aristides por sempre acreditar no meu potencial e nunca hesitou em me ajudar, obrigada por fazer parte da sua vida.

Dedico

*Ao meu amor, João Paulo Azevedo
dos Santos pela compreensão,
amizade, credibilidade e alegria,
pois desde o momento que o conheci
me tornei uma pessoa melhor.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

À **Deus** por iluminar sempre a minha vida.

À **CAPES** pelo apoio financeiro recebido.

À minha orientadora Dra. **Jacenir Reis dos Santos Mallet** por todo ensinamento, amizade, parceria, compreensão e carinho.

Ao meu co-orientador Dr. **Jeronimo Augusto Alencar** pelos conselhos, sugestões, sabedoria, amizade e confiabilidade.

À Dra. **Simone Freitas** pela sua competência e momentos de ensinamentos na parte técnica deste trabalho.

À Dra. **Júlia da Silva** pela amizade e atenção.

Ao técnico **Adalberto** pelas explicações.

Ao Dr. **Carlos Brisola** pela parceria nos trabalhos.

Aos meus amigos da Fiocruz, **Fabiana, Margareth, Maria Luiza, Nathanielly, Luciana Reboredo, Alice, Danielle Misael, Ariane, Cristina, e Willian** pela amizade e momentos de descontrações.

Aos meus amigos do Curso de Pós-Graduação em Biologia Animal **Adriana, Sérgio, Vinícius, Isabela, César, Rodrigo, Márcia, Luiz e Maíra** pelos momentos de estudos e amizade.

À todos meus **amigos** que de forma direta ou indireta auxiliaram minha caminhada.

Aos **Professores do Curso de Pós-Graduação em Biologia Animal** da UFRRJ pelos importantes ensinamentos.

Aos meus avós **Neide** (*in memoriam*) e **Aristides** por serem meu alicerce, minha fonte de sabedoria, obrigado por todo amor e atenção dedicados a mim.

Ao meu marido **João Paulo** por ser esse companheiro excepcional em minha vida.

À minha mãe **Noralice** e meu pai **Ozéas** pelo apoio e carinho.

À minha irmã **Danieli** pela amizade, atenção e confiabilidade.

Aos meus sogros **Vicente Paulo e Julia** pelo afeto, carinho e dedicação.

À toda minha **família** por toda alegria.

Ao meu cachorro **Negão** por todo o amor e momentos de alegria.

Aos meus tios **Marcelo e Vânia** por toda amizade e credibilidade.

À todas as minhas crianças **Gabriel** (meu afilhado lindo), **Luan** e **Letícia** por todos os momentos felizes.

RESUMO

SANTOS, Juliana Soares Sarmiento. **Ultraestrutura dos ovos de mosquitos do gênero *Ochlerotatus* (Diptera: Culicidae)**. 2013. 67p. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal, Biologia Animal). Instituto de Biologia, Departamento de Biologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

Culicídeos são insetos pertencentes à ordem Diptera, Subordem Nematocera, família Culicidae, distribuídos em duas subfamílias, Anophelinae e Culicinae. Os culicídeos são incriminados como vetores de patógenos causadores de doenças como Dengue, Febre Amarela dentre outras, e abrangem cerca de 3000 espécies, distribuídas em 11 tribos, constituídas por 38 gêneros. A Tribo Aedini inclui três gêneros que ocorrem no Brasil: *Aedes*, *Psorophora* e *Haemagogus*. O gênero *Aedes* apresenta uma grande diversidade, compreendendo mais de 900 espécies atualmente distribuídas por 44 subgêneros. Reinert (2000), com base em estudos morfológicos, dividiu o gênero *Aedes* em dois gêneros: *Aedes* e *Ochlerotatus*. No presente estudo adotamos a proposta de Reinert (2000). Foram analisados morfológicamente os ovos de quatro espécies do gênero *Ochlerotatus* observadas ao Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV). As espécies *Oc. albifasciatus*, *Oc. fluviatilis*, *Oc. scapularis* e *Oc. taeniorhynchus* apresentaram algumas diferenças morfológicas bem significativas comprovadas através da morfometria e da microscopia eletrônica de varredura. *Oc. albifasciatus* apresentou células coriônicas com formatos assemelhando a um relógio de pulso e uma raquete. Este ovo contém um aparelho micropilar contínuo e proeminente com cerca de 9,6µm de espessura e disco da micrópila bem evidente com cerca de 20,3 µm de diâmetro. Os ovos apresentaram um contorno elíptico com aproximadamente cerca de 615,7 ± 37,24 µm de comprimento e uma largura de 180,7 ± 22,87 µm na sua região central. *Oc. fluviatilis* apresentou células coriônicas de formas irregulares, observando-se que os tubérculos da superfície ventral são maiores, o que pode contribuir para sua adesão ao substrato, não sendo possível visualizar a micrópila nesta espécie. Estes ovos apresentaram uma coloração negra com formato elíptico, 722,8 ± 39,5µm de comprimento e largura de 177,9 ± 9,78µm, apresentando um afinamento em uma de suas extremidades. A ornamentação das células coriônicas consiste em células de formas irregulares, cada uma contendo 2,65 ± 0,41µm tubérculos na superfície ventral, e com medidas de 6,04 ± 0,60 na superfície dorsal. O ovo de *Oc. scapularis* possui muitas semelhanças com *Oc. albifasciatus* nas superfícies dorsal e ventral. O aparelho micropilar com 11,1 µm, mostrou um colar com uma moldagem evidente e não contínuo, e um disco micropilar também evidente como o de *Oc. albifasciatus* medindo 1,41 µm. *Oc. scapularis* apresentaram a coloração negra, contorno elíptico medindo 620,4 ± 16,74 µm de comprimento e 163,7 ± 16,90 µm de largura, com um índice (comprimento / largura) de 3,79µm. *Oc. taeniorhynchus* apresentou células coriônicas de formas irregulares, superfície ventral mais convexa que a dorsal, e a micrópila possui um colar contínuo completo. Na parte central do ovo os tubérculos tem diâmetros maiores. Estes ovos apresentam 607,1 ± 29,3 µm de comprimento e largura de 213,7 ± 13,7 µ. A micrópila medindo 1,4 ± 0,31 µm está rodeada por um disco micropilar (5,2 ± 1,37 µm) e por um colar micropilar completo (5,4 ± 0,99 µm).

Palavras-chave: Morfologia, Ultraestrutura, Culicini, Aedini

ABSTRACT

SANTOS, Juliana Soares Sarmiento. **Ultrastructure of eggs the mosquitoes of the genus *Ochlerotatus* (Diptera: Culicidae)** 2013. 67p. Dissertation (Master Science in Animal Biology, Animal Biology). Instituto de Biologia, Departamento de Biologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

Mosquitoes are insects belonging to the order Diptera, suborder Nematocera, Culicidae family, divided into two subfamilies, Anophelinae and Culicinae. The culicíneos are incriminated as vectors of pathogens that cause diseases such as Dengue, Yellow Fever among others, and include about 3000 species in 11 tribes, consisting of 38 genera. The Tribe Aedini includes three genera that occur in Brazil: *Aedes*, *Psorophora* and *Haemagogus*. The genus *Aedes* is highly diverse, comprising more than 900 species currently distributed in 44 subgenera. Reinert (2000), based on morphological studies, divided the genus *Aedes* in two genera: *Aedes* and *Ochlerotatus*. In the present study we adopt the proposed by Reinert (2000). Were morphologically analyzed eggs of four species of the genus *Ochlerotatus* observed by Scanning Electron Microscope (SEM). The species *Oc. albifasciatus*, *Oc. fluviatilis*, *Oc. scapularis* and *Oc. taeniorhynchus* showed some significant morphological differences comproved by morphometry and scanning electron microscopy. *Oc. albifasciatus* presented chorionic cells with shapes resembling a wristwatch and a racket. This egg contains a continuous and prominent micropylar apparatus with 9.6 μm thick and evident micropyle disc with approximately 20.3 μm in diameter. The eggs had an elliptical outline with $615.7 \pm 37.24 \mu\text{m}$ in length and a width of $180.7 \pm 22.87 \mu\text{m}$ in its central region. *Oc. fluviatilis* showed chorionic cells of irregular shapes, observing that the tubercles of the ventral surface are larger, which may contribute to their adhesion to the substrate, it is not possible to visualize the micropyle in this species. These eggs had a black coloration with elliptical, $722.8 \pm 39.5 \mu\text{m}$ in length and width of $177.9 \pm 9.78 \mu\text{m}$ presenting a bottleneck at one of its ends. The ornamentation of chorionic cells consists of cells of irregular shapes, each containing $2.65 \pm 0.41 \mu\text{m}$ tubecles on the ventral surface, and measures 6.04 ± 0.60 on the dorsal surface. The egg of *Oc. scapularis* has many similarities with *Oc. albifasciatus* in the dorsal and ventral surfaces. The micropylar apparatus with 11.1 μm showed a necklace with a evident and discontinuous frame, and a micropilar disc also evident as *Oc. albifasciatus* measuring 1.41 μm . *Oc. scapularis* showed black color, elliptical contour, measuring $620.4 \pm 16.74 \mu\text{m}$ in length and $163.7 \pm 16.90 \mu\text{m}$ in width, with a ratio (length / width) of 3.79 μm . *Oc. taeniorhynchus* showed chorionic cells with irregular shapes, ventral surface more convex than the dorsal, and the micropyle showing a complete and continuum collar. In the central part of the egg tubercles have larger diameters. These eggs have $607.1 \pm 29.3 \mu\text{m}$ in length and width of $213.7 \pm 13.7 \mu\text{m}$. The micropyle measuring $1.4 \pm 0.31 \mu\text{m}$ is surrounded by a micropilar disk ($5.2 \pm 1.37 \mu\text{m}$) and a complete micropylar collar ($5.4 \pm 0.99 \mu\text{m}$)

Keywords: Morphology, Culicini, Aedini.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Captura de larvas com pipeta	07
Figura 2. Captura de larvas em bambu	07
Figura 3. Captura de mosquitos adultos com armadilha de Shanon	07
Figura 4. Captura de larvas com concha	08
Figura 5. Captura com isca humana	08
Figura 6. Capela de exaustão	09
Figura 7. Capela de exaustão	09
Figura 8. Microscópio eletrônico de varredura Jeol 5310®	09
Figura 9. Ovo de <i>Oc. albifasciatus</i> . Vista ventral; extremidade posterior localizado no canto superior esquerdo da imagem.	17
Figura 10. Ovo de <i>Oc. albifasciatus</i> . Vista ventral; extremidade posterior	19
Figura 11. Detalhe do aparelho micropilar de <i>Ochlerotatus albifasciatus</i>	20
Figura 12. Ornamentação do aparelho micropilar de <i>Ochlerotatus albifasciatus</i> .	20
Figura 13. Ornamentação típica do retículo exterior coriônica. Detalhe das células-raquete e em forma de relógio de pulso na região ventral.	21
Figura 14. Região dorsal mostrando tubérculos de diferentes formas de <i>Ochlerotatus albifasciatus</i>	21
Figura 15. Região lateral do ovo mostrando ornamentação do dorsal e ventral de <i>Ochlerotatus scapularis</i>	23
Figura 16. Ornamentação da célula coriônica de <i>Ochlerotatus scapularis</i> da região dorsal com os tubérculos centrais	24
Figura 17. Detalhe do aparelho micropilar de <i>Ochlerotatus scapularis</i>	24
Figura 18. Ovo inteiro de <i>Oc. scapularis</i> .	25
Figura 19. Detalhe da região posterior e anterior de <i>Oc. scapularis</i>	27
Figura 20. Ovo inteiro de <i>Oc. taeniorhynchus</i>	28
Figura 21. Observação da micrópila de <i>Oc. taeniorhynchus</i> , situado na zona anterior do ovo formado por um colar com um contorno bem evidenciado	28
Figura 22. Ornamentação típica do retículo coriônico exterior mostrando dois a quatro tipos de tubérculos de <i>Oc. taeniorhynchus</i>	28
Figura 23. Ovo inteiro de <i>Ochlerotatus fluviatilis</i>	30
Figura 24. Transição entre superfície dorsal e ventral de <i>Oc. fluviatilis</i> .	31
Figura 25. Detalhe das células coriônicas de <i>Oc. fluviatilis</i>	31
Figura 26. Região posterior de <i>Oc. fluviatilis</i>	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Análise comparativa de ovos de oito espécies de culicídeos através da microscopia eletrônica de varredura.	29
--	----

SUMÁRIO

1 Introdução	1
1.1 Culicídeos	1
1.2 Situação taxonômica e características do gênero <i>Aedes</i>	2
1.3 Características taxonômicas do gênero <i>Ochlerotatus</i>	3
1.4 Biologia de <i>Ochlerotatus albifasciatus</i>	4
1.5 Biologia de <i>Ochlerotatus scapularis</i>	5
1.6 Biologia de <i>Ochlerotatus taeniorhynchus</i>	5
1.7 Biologia de <i>Ochlerotatus fluviatilis</i>	6
2 Revisão de Literatura	7
3 Metodologia	10
3.1 Captura das fêmeas	10
3.2 Determinação Específica por Taxonomia Clássica	11
3.3 Metodologia para Determinação Específica por Microscopia Eletrônica de Varredura	11
3.4 Procedência dos ovos	13
4 Resultados e Discussão	14
5 Conclusões	32
6 Considerações finais	34
7 Referências bibliográficas	35
Anexos	39
A – Scanning Electron Microscopy of the Egg of <i>Ochlerotatus albifasciatus</i> (Diptera: Culicidae)	
B – Scanning electron microscopy of the eggs of <i>Aedes scapularis</i> from southern South América.	
C – Scanning electron microscopy of eggs of <i>Ochlerotatus taeniorhynchus</i> (Diptera: Culicidae, Aedini)	

1-INTRODUÇÃO

1.1 Culicídeos

Os culicídeos são insetos pertencentes à ordem Diptera, Subordem Nematocera, família Culicidae. Distribuídos em duas subfamílias, Anophelinae e Culicinae, existem aproximadamente 40 gêneros, disseminados por todas as regiões do globo, inclusive no círculo polar do Norte, sendo a área Neotropical a que detém o maior nível de endemidade (WARD, 1982).

Os culicídeos, importante grupo de vetores conhecidos popularmente como mosquitos, pernilongos, muriçocas e carapanãs, são insetos alados e na grande maioria as fêmeas são hematófagas, enquanto as formas imaturas são aquáticas. Desde a antiguidade vêm sendo apontados como agentes etiológicos na transmissão de doenças ao homem e/ou a outros animais, e apresentando por isso, ameaça à saúde pública global. Incontáveis são as citações na literatura histórica e/ou científica, sobre a ocorrência de mosquitos desde que o homem se fez presente nesses relatos (Forattini, 2002).

As primeiras descrições científicas de mosquitos ocorreram em meados do século XVIII. No Brasil, os primeiros estudos datam do final do século passado e foram realizados na Serra do Cubatão (SP), atualmente Serra do Mar, quando o *Anopheles cruzii* foi incriminado como responsável pela transmissão do agente etiológico causador da malária na epidemia ocorrida durante a construção da estrada de ferro Santos-São Paulo (Lutz, 1903). No ano seguinte, Lutz tornaria a associar três espécies de mosquitos amazônicos com a malária (Lutz, 1904).

A família Culicidae, segundo Harbach & Kitching (1998), atualmente compreende duas subfamílias, Anophelinae e Culicinae. Na primeira encontramos os anophelinos, mosquitos responsáveis pela transmissão de patógenos causadores da malária. A subfamília Anophelinae reúne três gêneros: *Anopheles*, cosmopolita;

Chagasia, restrito à região neotropical e *Bironella*, existente apenas na região australiana. (Consoli & Lourenço – Oliveira, 1994)

Já os culicíneos são incriminados vetores de patógenos causadores de doenças como a Filariose Bancroftiana, Dengue, Febre Amarela, assim como mais de 150 arboviroses (Luz & Lourenço-de-Oliveira, 1996), abrangendo cerca de 3000 espécies (Consoli & Lourenço-de-Oliveira 1994), distribuídas em 11 tribos, constituídas por 38 gêneros, sendo 34, dentre os relacionados por Harbach & Kitching (1998).

A Tribo Aedini Inclui três gêneros que ocorrem no Brasil: *Aedes*, *Psorophora* e *Haetnagogus*. Várias espécies dos gêneros *Aedes*, *Psorophora* e *Haetnagogus* produzem ovos resistentes à dessecação. Neste caso, após o período necessário para o desenvolvimento embrionário inicial, passado em ambiente ainda úmido, os ovos podem permanecer mais de um ano em locais secos. As larvas nascem facilmente, com um posterior contato dos ovos com a água (Consoli & Lourenço – Oliveira, 1994 & Forattini, 2002).

1.2 Situação taxonômica e características do gênero *Aedes*

O gênero *Aedes* apresenta uma grande diversidade, compreendendo mais de 900 espécies atualmente distribuídas por 44 subgêneros. Entretanto, a classificação desses mosquitos continua a ser problemática, existem dúvidas sobre a validade dessas categorias taxonômicas, no sentido de realmente representarem grupos naturais (Forattini, 2002).

Os espécimes deste gênero em geral apresenta uma diapausa sucedendo ao desenvolvimento embrionário e antecedendo à eclosão. As fêmeas não ovipõem em ambiente aquático e sim em áreas de possíveis criadouros. Os Aedini têm os criadouros transitórios, que são condicionados diretamente pelas chuvas, como os seus preferenciais. Decorrente disso, sua população de alados sofre flutuação grande e abrupta de densidade no ciclo anual, isto é, seu ciclo anual é controlado pela quantidade

de chuvas e pela temperatura ambiente. As fêmeas são hematófagas vorazes, apresentam um grande poder de vôo (Forattini, 2002; Consoli & Lourenço-de-Oliveira 1994).

Reinert (2000), com base em estudos morfológicos, dividiu o gênero *Aedes* em dois gêneros: *Aedes* e *Ochlerotatus*. Um exemplo temos *Aedes scapularis* (Rondani, 1848) que passaria a pertencer ao gênero *Ochlerotatus*. Existem ainda controvérsias quanto à mudança na reclassificação da tribo Aedini, proposta por Reinert (2000), como Forattini que ainda considera como um subgênero e outros cientistas sugerem um estudo mais completo até mesmo incluindo evidências moleculares nas interpretações para a mudança da nomenclatura do gênero *Aedes*. Nesse presente estudo adotamos a proposta de Reinert (2000).

1.3 Características taxonômicas do gênero *Ochlerotatus*

As fêmeas desse taxa apresentam palpos maxilares curtos enquanto os machos possuem palpos longos, não acentuadamente clavados distalmente e frequentemente de comprimento ultrapassando o da própria probóscida. Entretanto, esse aspecto não é absoluto, uma vez que em vários gêneros e espécies pode-se observar os dois sexos, quando adultos, portanto palpos curtos.

Diante do exposto, decidiu-se realizar descrições morfológicas ultraestruturais de ovos de algumas espécies do gênero *Ochlerotatus* (Diptera: Culicidae), visando a identificação da espécie de forma mais rápida, sem que haja a necessidade de se ter um mosquito adulto. Para isso, será utilizada a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) que tem demonstrado excelentes resultados, surgindo como uma metodologia de estudo complementar da taxonomia morfológica clássica, uma vez que estruturas como, diversas cerdas, textura de tegumento, presença de poros, etc não visíveis através da microscopia ótica, estão enfim podendo ser contempladas. Adicionalmente através de

programas acoplados aos microscópios, é possível realizar mensurações com grande precisão.

Desta forma, objetivamos neste trabalho (i) descrever morfológicamente o exócorio os ovos do gênero *Ochlerotatus*, através da Microscopia Eletrônica de Varredura; (ii) realizar a análise morfométrica das principais estruturas dos ovos do gênero *Ochlerotatus*; (iii) estabelecer padrões que possibilitem a diferenciação das espécies, com o objetivo futuro de montar uma chave dicotômica.

1.4 Biologia de *Ochlerotatus albifasciatus*

As fêmeas de *Ochlerotatus albifasciatus* (Macquart, 1838) são hematófagas agressivas, tanto sobre o homem como animais domésticos. Atividade diária da hematofagia é claramente bimodal, com picos correspondentes aos crepúsculos, matutino e vespertino. É o principal vetor da encefalite equina tipo oeste (WEE) e de outros arbovírus, na Argentina e pode ainda ser responsabilizado por perdas econômicas substanciais da região. Diante da irritação provocada pelas suas picadas sobre o gado, resultando em perda ou redução na produtividade de leite e carne (Avilés et al. 1990, 1992).

Os criadouros dessa espécie situam-se no solo e são representados por coleções líquidas temporárias, de extensão média ou grande, pouco profundas e localizadas em planícies ou terrenos pouco acidentados. As fêmeas ovipõem em solo úmido, e ovos podem entrar em diapausa ou então dar lugar à eclosão das primeiras larvas, após a inundação do terreno e compreende-se que as estações chuvosas propiciam a eclosão dos ovos existentes. Essa espécie é amplamente distribuída nas regiões meridionais do continente sul-americano, desde da Bolívia até limítrofe com Paraguai, a região sudeste e sul do Brasil (Gleiser et al. 2007).

1.5 Biologia de *Ochlerotatus scapularis*

Ochlerotatus scapularis (Rondani) é um mosquito Neotropical. , sendo a América do Sul oriental a região onde é realmente abundante. Existe do norte da Argentina até a Colômbia e em Trinidad e Tobago. Na América Central, ocorre da Costa Rica ao México, nas Grandes Antilhas, Bahamas e Sul dos E.U.A. (Texas). Existe em todos os Estados do Brasil. É muito comum nas matas secundárias, plantações e outros ambientes parcialmente modificados pelo homem e nas baixadas. (Arnell, 1976).

Possui competência vetora para diversos arbovírus prejudicando animais e humanos, assim como encefalite equina venezuelana e febre amarela (Arnell, 1976). É suspeito de transmitir o vírus do Rocio no vale do Ribeira, Brasil na década de 70 (Forattini, et al. 1981). É vetor de *Dirofilaria immitis* (Leidy) no Rio de Janeiro (Labarthe et al.1998). Devido ao fato de ter uma tendência para se adaptar às áreas residenciais (Forattini et al. 1989), *Oc. scapularis* é potencialmente de grande importância para a transmissão de agentes patogênicos para os seres humanos.

1.6 Biologia de *Ochlerotatus taeniorhynchus*

É distribuído perto do mar da costa, no litoral Atlântico, de Massachussets, EUA, para Santa Catarina, Brasil, e suas formas imaturas estão associadas a solos salinos, onde os ovos são depositados (Forattini, 2002). Este mosquito tem sido incriminado como um vetor de vírus Encefalite Equina do Leste e é suspeito como vetor. Seus criadouros são sempre as coleções líquidas no solo, de caráter transitório e dotadas de certo grau de salinidade, como poças d'água, valas de drenagem, alagadiços e charcos de água salobra. Seus ovos são bastante resistentes à dessecação, são colocados em locais úmidos de solo sujeito a alagamento. Por seu criadouro apresentar uma grande transitoriedade, sua população de adultos aparece quase somente no verão de chuvas torrenciais (Forattini, 2002, Lourenço-de-Oliveira et al., 1996).

Ochlerotatus taeniorhynchus foi descrito originalmente do México, e foi relatado em áreas costeiras na maioria dos países do continente americano, a partir dos Estados Unidos para o sul do Brasil (Forattini 1965). Ele tem sido incriminado como vetor de *Dirofilaria immitis* nas cidades do Rio de Janeiro e Maranhão - Brasil (Labarthe et al. 1998 & Ahid & Lourenço-de-Oliveira, 1999), no México (Manrique-Saide et al. 2010) e nos Estados Unidos (Parker, 1993). É também um vetor de vários tipos arbovírus (Causey et al. 1962, Rivas et al. 1997, Coffey & Weaver, 2005).

1.7 Biologia de *Ochlerotatus fluviatilis*

Ochlerotatus fluviatilis é encontrado em ambientes florestais, áreas modificadas, incluindo as urbanas. Suas fêmeas são ecléticas em suas fontes de alimentação, e as suas formas imaturas podem ser encontrados em escavações em rochas perto do solo. Eles foram experimentalmente infectados por febre amarela e vírus da dengue e *Plasmodium gallinaceum*. Possui distribuição a partir do Sul do México ao norte da Argentina, incluindo a encosta oriental dos Andes (Forattini, 2002). Os ovos de *Oc. fluviatilis* não resistem à dessecação por muitos dias (no máximo 30, em laboratório) (Lourenço-de-Oliveira, 1996).

2-REVISÃO DE LITERATURA

Das 10 tribos existentes de uma maneira geral, ainda é muito escasso o estudo sobre morfologia de ovos de culicídeos, enquanto que aproximadamente 16% das espécies da Tribo Aedini tem os seus ovos já caracterizados (Reinert, 2005).

As imagens em MEV do exocório tem se mostrado excelente parâmetro de comparação entre espécies. A ornamentação do exocório tem revelado significativas diferenças, principalmente no que se refere à presença de tubérculos nas células coriônicas.

HORSPAL & CRAIG, JR (1956) já apontavam a descrição de ovos como uma ferramenta rápida para o diagnóstico através da estrutura morfológica, já que algumas espécies de mosquitos passam a maior parte de suas vidas na fase de ovo. Muitas espécies vivem para um ano ou mais, como ovos em esteiras de restos de plantas ou em rachaduras no solo.

BARATA (1995) enfatiza a importância da caracterização das espécies a partir dos ovos, uma vez que, durante as medidas de controle, monitoramento e levantamento das populações de vetores é frequente o encontro de ovos, exocórios de ovos e exúvias sendo o detalhamento de informações morfológicas de suma importância para uma maior precisão na identificação de material coletado.

A importância da obtenção e registro sistemático de dados morfológicos pode ser demonstrada pela possibilidade da confecção de chaves taxonômicas para separação das espécies envolvidas, como demonstrada por KALPAGE & BRUST (1968) ao fornecer chave para os ovos de *Aedes* da região de Manitoba, Canadá.

Os ovos de mosquitos são vistos como grandes apontamentos da taxonomia clássica devido a utilização da (MEV) ter apresentado excelentes resultados. O primeiro

estudo de ovos de mosquitos utilizando esta técnica foi realizado por MATSUO & KUNOU (1972), onde foram descritos o exocório de cinco espécies de *Aedes*.

LINLEY (1989) descreve o ovo de *Aedes triseriatus* observando que este apresenta uma superfície ventral de forma hexagonal, e apresenta uma delimitação entre as células coriônicas como se fosse uma parede elevada.

Pela primeira vez LINLEY (1989) fez um estudo comparando algumas estruturas de ovos das espécies *Aedes albopictus*, *Aedes aegypti* e *Aedes bahamensis*; afirmando que é necessário mais pesquisas para determinar as diferenças das estruturas de diversos ovos.

CHADEE & BENNETT (1990) estudando os ovos de *Hg. celeste* (Dyar & Nunez Tovar, 1926) e *Hg. equinus* (Theobald, 1903) observaram que algumas estruturas dessas duas espécies se diferem em suas características morfológicas, e reforçou a idéia que MEV é uma excelente ferramenta taxonômica.

Analisando os resultados obtidos com o estudo dos ovos de *Aedes notoscriptus* (Skuse, 1889), LINLEY *et al.* (1991) chamaram a atenção para o fato de que informações importantes podem ser perdidas pelo exame incompleto dos mesmos. Esses autores enfatizaram a importância do exame tanto da superfície dorsal quanto da estrutura da superfície lateral nos ovos de culicídeos.

LINLEY & CHADEE (1991) observaram que em *Hg. equinus* e *Hg. janthinomys* (Dyar, 1921), apresentam filamentos altamente desenvolvidos que ocorrem nos ovos dessas espécies, a presença de tais estruturas pode melhorar a aderência do ovo, efetivamente, incrementar a área de superfície de adesão por ocasião da oviposição.

Observações realizadas por ALENCAR *et al.* (2003) forneceram pela primeira vez visualização por MEV, de detalhes dos ovos de *Hg. leucocelaenus* (Dyar &

Shannon, 1924), evidenciando que a ornamentação do exócorio apresenta diferenças em relação aos tubérculos das células coriônicas e do retículo coriônico, quando comparado com algumas espécies de *Haemagogus*, além de analisar por morfometria suas principais estruturas.

ALENCAR *et al.* (2005) realizaram observações sobre ultraestrutura de ovos de *Ochlerotatus terreus* (Walker, 1856), analisando morfometricamente as principais estruturas com o auxílio do software Semafore. Alencar *et al.* (2008) descreveu através da MEV os ovos de *Hg. tropicalis* (Cerqueira & Antunes) fornecendo dados que podem permitir a construção de chaves dicotômica para ovos do gênero *Haemagogus*.

Estudos realizados por HADDOW *et al.* (2009) descreveram o ovo de *Oc. japonicus* (Theobald, 1901) e sendo levantado neste trabalho a discussão sobre os aspectos dos tubérculos, sugerindo os autores, mais investigações dessas estruturas.

Apesar da existência destes estudos, os caracteres morfológicos de ovos de culicídeos são ainda pouco conhecidos (Forattini, 2002), o que tem servido de estímulo na comunidade científica à descoberta e descrição de ovos.

3- METODOLOGIA

3.1 Captura das fêmeas

As capturas foram realizadas de acordo com a metodologia padrão estabelecida em estudos anteriores desenvolvidos pela equipe do laboratório de Diptera, com amostragens em três períodos ao longo do dia: diurnos (10h às 12h e 14h às 16h) e noturno (18h às 20h). A cada período das amostragens, os mosquitos atraídos pelos membros da equipe ou que venham a pousar na circunvizinhança eram capturados com auxílio do tubo de sucção manual ou capturador de castro. Foram utilizadas também armadilhas luminosas de CDC e Armadilha de shannon, em períodos crepusculares noturnos.

Os espécimes vivos levados para o laboratório foram triados, separando-se as fêmeas para ovoposição, para se obter a geração F1. Elas foram isoladas individualmente em tubos de vidro de fundo plano de medição de 25 mm de diâmetro e 50 mm de altura, que, na parte inferior, continha um pedaço de algodão humedecido coberto com papel de filtro. Isto tinha a função de servir como substrato para a postura de ovos. Os ovos provenientes dessas fêmeas foram processados para Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

As capturas que envolvem a participação de humanos foram realizadas mediante as normas determinadas pelos Códigos Internacionais de Ética para esse tipo de estudo.



Fig. 1 Captura de larvas



Fig. 2 Captura de larvas no bambu



Fig. 3 Captura de adulto com armadilha de shanon



Fig.4 Captura com concha para larvas de culicídeos

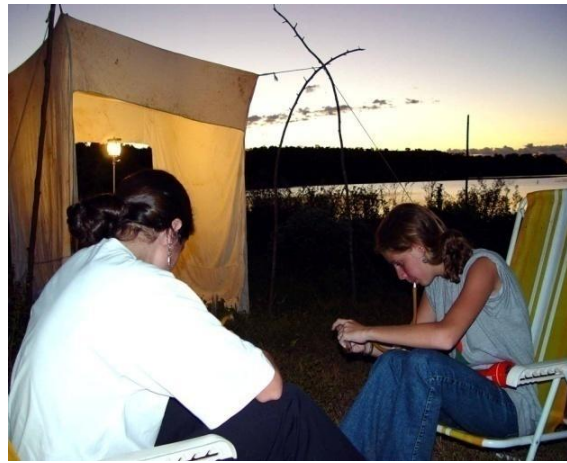


Fig.5 Captura com isca humana

3.2 Determinação Específica por Taxonomia Clássica

Considerando que a identificação de algumas espécies poderá ser dificultada pela captura quase que exclusiva de fêmeas e que os caracteres diferenciais específicos mais conclusivos somente são encontrados na genitália dos espécimes machos em muitos casos, os caracteres dessas últimas foram estudados nas populações pesquisadas. Para elucidar, foram selecionados espécimes machos em criações no laboratório a partir de fêmeas ingurgitadas no campo que foram trazidas para o laboratório em gaiolas de papelão, acondicionadas em caixas de isopor e com a umidade mantida por chumaços de algodão umedecido com água açucarada.

3.3 Metodologia para descrição específica por Microscopia Eletrônica de Varredura

Os ovos foram fixados em glutaraldeído 2,5% e pós-fixados em tetróxido de ósmio 1%, ambos em tampão cacodilato de sódio 0.1M, pH 7,2. Após a lavagem no mesmo tampão os ovos foram desidratados em série crescentes de etanol ou acetona (10, 20, 30, 50, 60, 70, 80, 90 e 100%) e submetidos ao método de secagem pelo ponto crítico utilizando CO₂ superseco em aparelho Balzers. Todo esse processamento foi feito na capela de exaustão. A seguir os ovos foram montados em suportes metálicos em diferentes posições recobertos com ouro e observados ao microscópio eletrônico de varredura (Jeol 5310®).



Fig. 6 Capela de exaustão



Fig. 7 Capela de exaustão



Fig. 8 Microscópio eletrônico de varredura Jeol 5310®

As medições foram realizadas diretamente das imagens obtidas, com o auxílio do software de análise Semafore acoplado ao microscópio. Foram utilizados os seguintes parâmetros: comprimento total, largura total, espessura do colar micropilar e tamanho da micrôpila, sendo citadas na tabela os máximos, mínimos, médias e desvio padrão.

3.4 Procedência dos ovos

Os ovos usados nesse estudo de *Oc. albifasciatus* são provenientes de fêmeas coletadas na Província de Córdoba, Argentina. A área de estudo está caracterizada por uma região que apresenta uma mistura de pastagem e Floresta Xerófitas. As espécies de vegetais deste ambiente possuem uma estrutura especial, o reforço nas paredes celulares, devido à abundância de tecidos mecânicos, o que lhe protege contra a carência de água do habitat onde vive, permitindo ter a capacidade de reter água (Luti et al. 1979). Entretanto, o cenário foi modificado pelo desenvolvimento urbano, agricultura e atividades industriais. O clima da região está classificado de acordo com Köppen, sendo considerado inverno seco (Bshw 2006). Apresenta uma temperatura média anual de 19 °C.

Já os ovos de *Oc. scapularis* utilizados neste estudo foram de fêmeas coletadas no Ambiente Unidade de Conservação Desterro, em Florianópolis, Estado de Santa Catarina, Brasil e do bairro da cidade de Córdoba, na parte central da Argentina. A primeira área tem mata atlântica secundária em recuperação e clima subtropical úmido (Cfa) de acordo com a classificação Köppen. A cidade de Córdoba tem uma latitude média-inverno seco clima (CWA), com uma temperatura média de verão 24°C de temperatura e de inverno 11°C.

Os ovos de *Oc. fluviatilis* utilizados neste estudo vieram de fêmeas que foram capturadas na Reserva Ecológica de Guapiaçu (REGUA), situada no município Cachoeiras de Macacu, RJ, foi criada em 1996 e seu tamanho atual é de 6500 ha, com altitude variando de 30 a 2000 m. parte da área da reserva, especialmente acima de 700 m, é coberta por floresta pouco alterada e abriga grande diversidade de plantas e animais. mais de 80% da reserva está acima da cota 400 m e faz parte do parque estadual dos três picos, situado no

corredor central da serra do mar, do bioma mata atlântica. Apresentando um temperatura média anual de 23 °C.

E os ovos de *Oc. taeniorhynchus* foram obtidas do sangue alimentado fêmeas coletadas no Bairro Goiabeira, município de Vitória, no estado brasileiro do Espírito Santo, atualmente é um dos bairros mais populosos de Vitória. Possui cerca de 7,7 milhões de metros quadrados e antes do loteamento da região era composta por fazendas, em suas maiorias produtoras de gado de corte e de leite. O clima da cidade é tropical, com temperatura média anual de 23 °C e ocorrência de precipitações pluviométricas, principalmente nos meses de outubro a janeiro.

4-RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os ovos de *Oc. albifasciatus* apresentam coloração negra, contorno elíptico com aproximadamente um comprimento de cerca de $615,7 \pm 37,24 \mu\text{m}$ e uma largura de $180,7 \pm 22,87 \mu\text{m}$ na sua região central. Nas extremidades, a região anterior apresenta $50 \mu\text{m}$ na altura da micrópila e $61,9 \mu\text{m}$ na região posterior. O índice do ovo, ou seja, a razão entre o comprimento e a largura, foi calculado utilizando-se a largura da região central obtendo-se 2.9 a 3.7 μm . A extremidade posterior tem um afilamento maior que na extremidade anterior (Fig. 8).

A superfície ventral (superior) do revestimento coriônico apresenta células com 2 formatos: 1) com uma porção dilatada e outra tubular, lembrando a forma de uma raquete (Fig.11); 2) uma porção dilatada central com duas porções tubulares laterais, semelhante à forma de um relógio de pulso. A maior parte das células coriônicas que apresentam formato de raquete tem na porção mais dilatada um pequeno tubérculo central rodeado por 5-8 tubérculos maiores, todos eles, arredondados, com um diâmetro longitudinal de 1,95 a 4,10 μm . Na porção tubular deste tipo de célula vê-se 5-6 pequenos tubérculos. O 2º tipo de célula coriônica que lembra um formato de relógio de pulso, apresenta na porção dilatada central 4 a 5 tubérculos grandes e nas regiões tubulares 3-4 tubérculos menores. As células coriônicas laterais são formadas por três a cinco tubérculos. Estes estão presentes na maioria das células observadas e compreende um padrão regular. O mesmo padrão de célula é observado na região dorsal do ovo. Nesta região, o retículo coriônico exterior apresenta aspecto poroso e uma espessura variando de 2,5 a 4.1 μm na extremidade anterior próximo à micrópila.

Os tubérculos da região dorsal apresentam grandes variações de tamanho nas células coriônicas. Os tubérculos de maior diâmetro, localizados região central de algumas células são caracterizados com tubérculo central. O aparelho micropilar,

localizado na região anterior do ovo, apresenta colar proeminente e contínuo, com disco micropilar bem evidente de bordos sem extensão determinada e margens com área de transição bem definida, possuindo cerca de 9,6 µm de espessura; o disco micropilar apresenta cerca de 20,3 µm de diâmetro; o orifício da micrópila é evidente com 2.1 µm de diâmetro (Fig. 10).

As descrições desses ovos podem ser admitidas como auxílio na caracterização específica, pelo grau de dissimilaridade apresentado nas ornamentações no exocório das espécies.

Segundo Linley (1990) a maioria das espécies que compõem o gênero *Ochlerotatus* descritas apresentam diferenças dos caracteres morfológicos do exocório. Neste presente estudo foi observado em *Oc. albifasciatus*, apresenta pouca dissimilaridade entre as superfícies ventral e dorsal do ovo, como relatado em outros táxons que procriam também em ambientes de alagadiços, como o *Aedes vexans* (Meigen 1830).

Entretanto, espécies coletadas em recipientes de fitotelmata apresentam padrões mais diferenciados (Alencar et al, 2005), tais como tubérculos grandes e um retículo de formatos diferenciados na superfície ventral e tubérculos pouco proeminentes sobre a superfície dorsal, provavelmente ligados por uma processo de cimentação do substrato (Linley & Service, 1994).

A presença do tubérculo central nas células coriônicas tem sido descritas em algumas espécies de *Ochlerotatus*. Fato evidenciado também por Matsuo (1974) o qual observou que as células coriônicas de *Ae. aegypti* (Linnaeus), e *Ae. pseudalbopicta* apresentam grande tubérculo na área central e pequenos tubérculos na área periférica. Em *Haemagogus tropicalis*, estes são sempre de um a dois tubérculos de maior

diâmetro na área central cercados por tubérculos pequenos nas áreas periféricas, uma característica que diferencia das outras espécies do gênero.

Ochlerotatus albifasciatus tem um padrão diferenciado, porque a maioria das células coriônicas tem um pequeno tubérculo central cercado por tubérculos maiores. Tais estruturas como os filamentos parecem ter a função de manter a aderência do ovo e proteção contra insetos predadores. A adesão dos ovos também podem contribuir para a proteção contra o fluxo pela água da chuva. Esses filamentos foram observados sobre a superfície dorsal de ovos de *Haemagogus equinus* e parecem aumentar a adesão da área da superfície no momento da oviposição. As células coriônicas da região dorsal dos ovos de *Ochlerotatus terreus* (Walker, 1956) apresentam tubérculos alongados com um padrão muito regular. Estes são maiores na área periférica e são algumas vezes fusionados em grupos nas extremidades. Os tubérculos também parecem ter a função de manter a adesão dos ovos para fixar no substrato. Tais estruturas não foram relatadas nos ovos de *Oc. albifasciatus*, porque estas espécies realizam a oviposição em solos úmidos, que tem resistência a ambientes secos. Entretanto, estes ovos podem ser lavados com água em depressões, e assim podem não precisar desses filamentos que apresentam a função de fixação, apesar de Reinert (2005), considerar esta característica de oviposição desconhecida para estas espécies.

Haemagogus equinus (Theobald, 1903) apresenta pequenos tubérculos coriônicos distribuídos uniformemente no centro e periferia da célula, enquanto que em *Hg. janthinomys* (Dyar, 1921) eles se dispõem no centro das células. Não foram encontrada similaridade de distribuição dos tubérculos coriônicos em *Oc. albifasciatus*, muitos deles não se apresentam fusionados.

Esses ovos são lavados com água em depressões, e assim podem não precisar desses filamentos que apresentam a função de fixação, apesar de Reinert (2005), considerar esta característica de oviposição desconhecida para estas espécies.

Haemagogus equinus (Theobald, 1903) apresenta pequenos tubérculos coriônicos distribuídos uniformemente no centro e periferia da célula, enquanto que em *Hg. janthinomys* (Dyar, 1921) eles se dispõem no centro das células. Não foram encontrada similaridade de distribuição dos tubérculos coriônicos em *Oc. albifasciatus*, muitos deles não se apresentam fusionados.

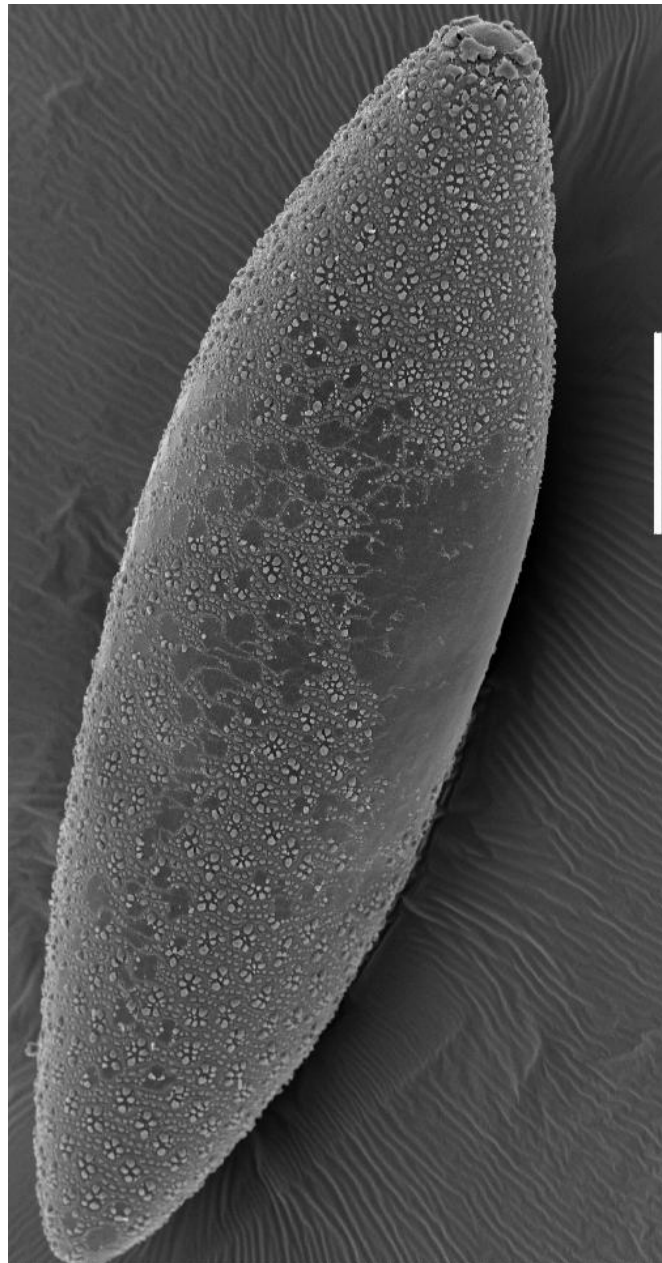


Fig. 9 *Ochlerotatus albifasciatus*, ovo inteiro. Escala de 100µm



Fig. 10 Ovo de *Oc. albifasciatus*. Vista ventral; extremidade posterior localizado no canto superior esquerdo da imagem. Escala de 10 μm

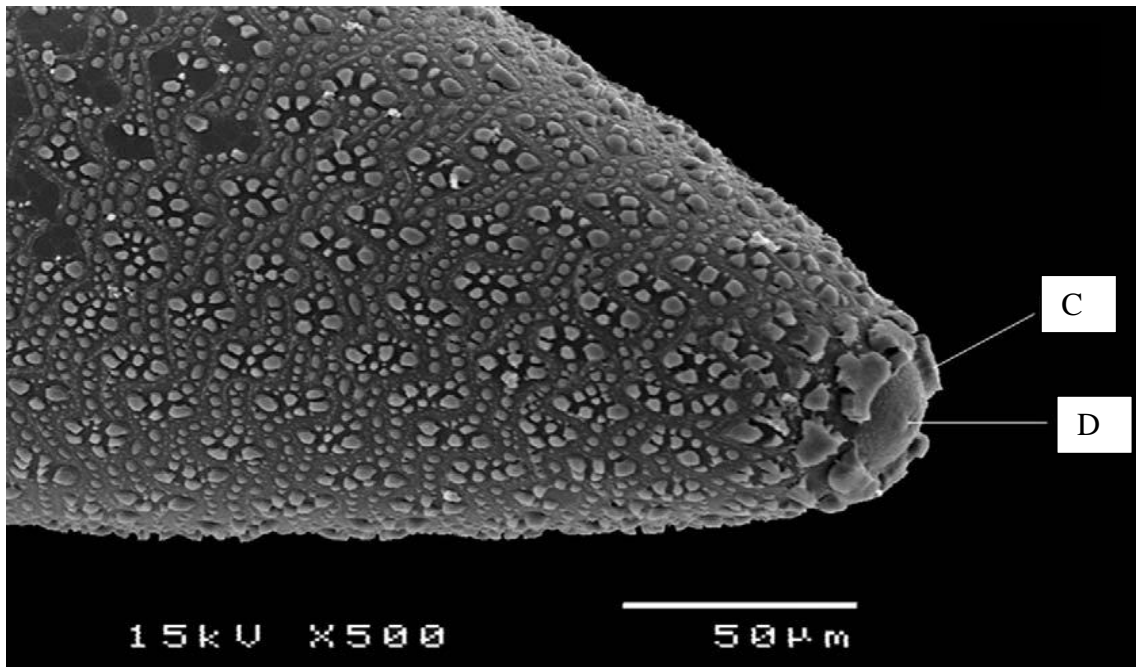


Fig. 11 *Oc. albifasciatus*, detalhe do aparelho micropilar. C: Colar da micrópila, D: Disco micropilar. Escala de 10 µm

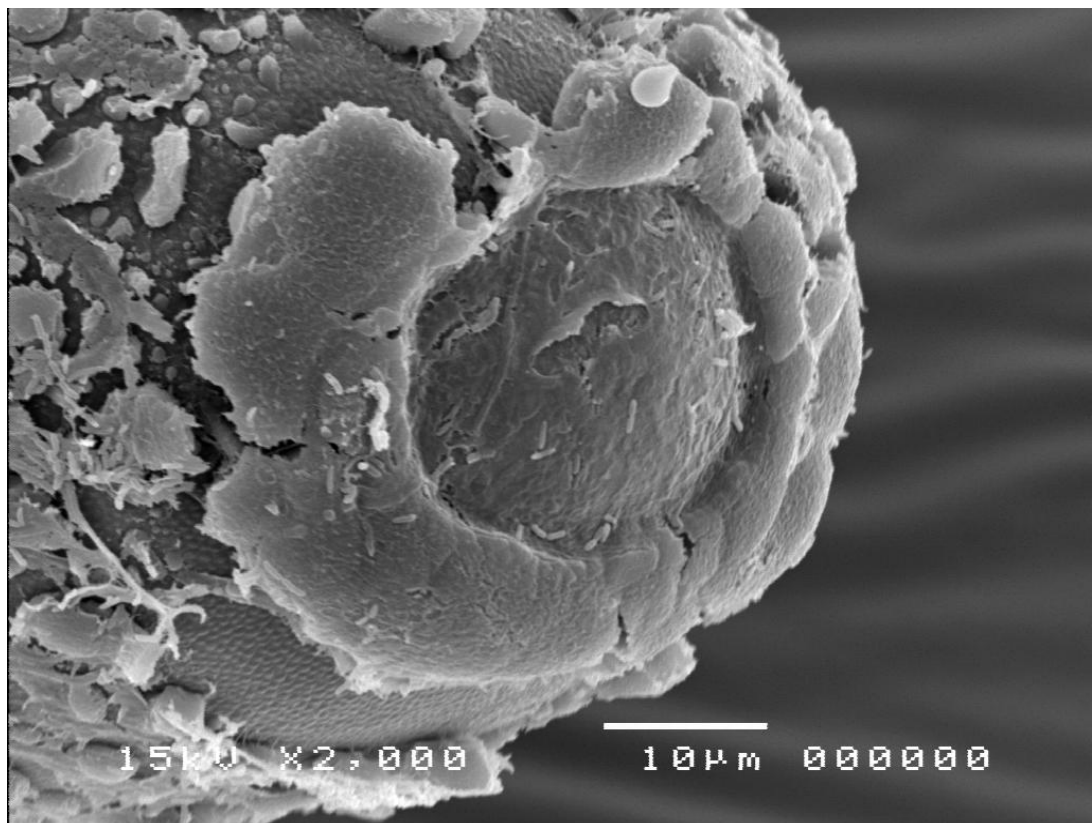


Fig. 12 Ornamentação do aparelho micropilar. Escala de 10 µm

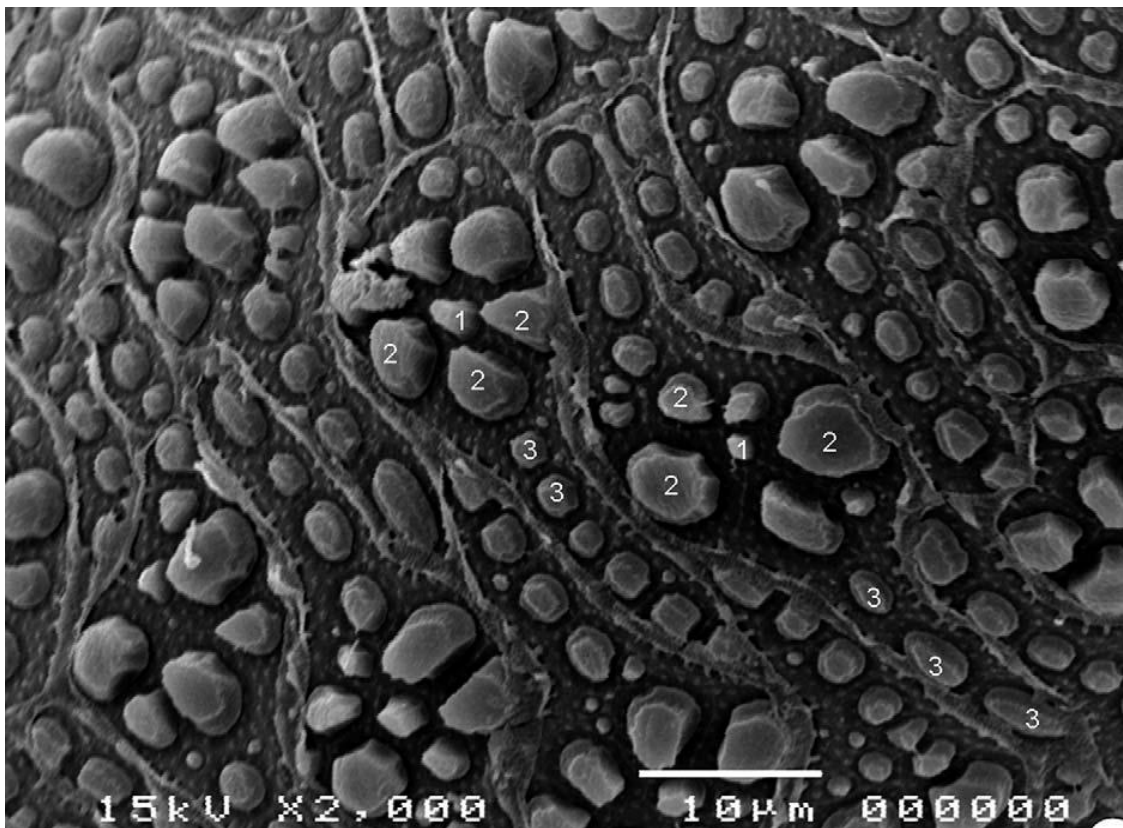


Fig. 13 Ornamentação típica do retículo exterior coriônica. Detalhe das células-raquete e em forma de relógio de pulso na região ventral. (1) tubérculo central. (2) tubérculos periféricos. (3) tubérculos no cabo da raquete. Escala de 10 µm

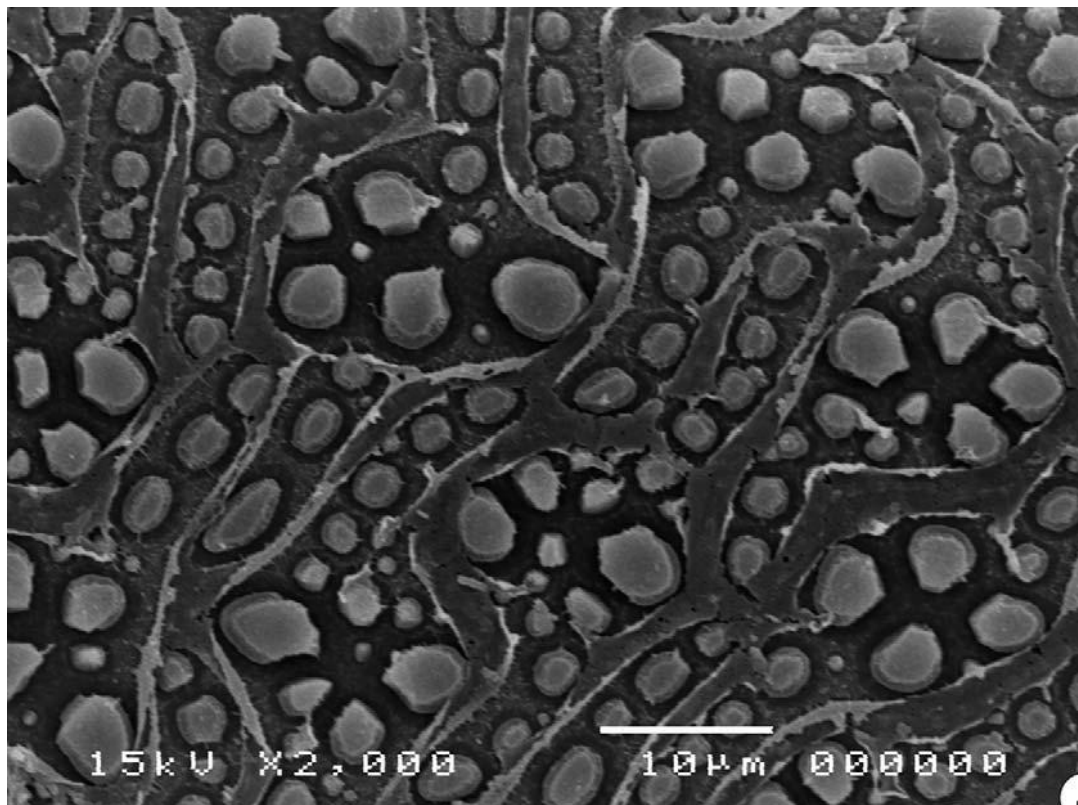


Fig. 14 Região dorsal mostrando tubérculos de diferentes formas. Escala de 10 µm

As espécimes de *Oc. scapularis* apresentam a coloração negra e de contorno elíptico medindo $620,4 \pm 16,74 \mu\text{m}$ de comprimento e $163,7 \pm 16,90 \mu\text{m}$ de largura ($n = 10$), com um índice (comprimento / largura) de $3,79\mu\text{m}$. A extremidade anterior é afilada abruptamente apresentando uma largura de $51,6 \mu\text{m}$, enquanto sua largura foi mais gradual em sua extremidade posterior com $61,4 \mu\text{m}$. A superfície ventral apresenta células coriônicas com um aspecto tubular contendo tubérculos definidos em linhas a uma densidade de 5-9 por células. Nesta região, os tubérculos dentro das células coriônicas apresentaram dois tamanhos diferentes, o maior medindo $7,23 \pm 0,98$ em um diâmetro longitudinal e o menor a $4,15 \pm 0,53 \mu\text{m}$ ($n = 30$).

O aparelho micropilar mostrou um colar com moldagem clara e arestas de comprimento determinado, embora irregular, com margens definidas para área de transição (Fig. 14) e uma espessura de cerca de $11,1 \mu\text{m}$. As margens do disco da micrúpila apresentam cerca de $17,8 \mu\text{m}$ de diâmetro e $229 \mu\text{m}$ de circunferência. O orifício da micrúpila foi muito evidente (Fig. 14), com um diâmetro de cerca de $1,41 \mu\text{m}$.

Na região dorsal do ovo, foram observados nas células coriônicas (Fig.13) filamentos não fusionados. Nesta região, o retículo coriônico externo mostrou uma aparência porosa, e a sua espessura variou entre $2,5-4,1 \mu\text{m}$ na extremidade anterior perto do aparelho micrúpila e na área mais mediana.

Os tubérculos isolados apresentaram grandes variações por célula. Na região central de algumas células coriônicas, alguns destes tubérculos apresentam um maior diâmetro que foi caracterizado em $8,45 \mu\text{m}$ $0,67 \mu\text{m}$ ($n = 30$) tubérculos centrais, rodeados por 3-5 menores tubérculos medindo $2,57 \mu\text{m}$ $0,26 \mu\text{m}$ ($n = 30$).

Com base nas variações descritas na morfologia de *Oc. scapularis*, foi proposto que esse pode ser um complexo de espécies, ou um dos primeiros estágios de

diferenciação fenotípica sendo apresentados (Forattini 2002), ao contrário da opinião de Arnell (1976), que o chamou de uma única espécie. As observações de duas populações não mostrou significante diferenças morfológicas entre os ovos de *Oc. scapularis* das áreas úmidas do Brasil e áreas secas Argentina. Entretanto, estudos mais detalhados sobre populações de outras áreas são necessárias para aceitar ou rejeitar a hipótese de complexo de espécies. As superfícies ventral e dorsal do ovo de *Oc. scapularis* mostrou relativamente pouca diferenciação, como foi observado em outros mosquitos tais como *Ochlerotratus albifasciatus*, descrito recentemente (Santos-Mallet et al. 2009). Caso contrário, o ovo de *Oc. scapularis* é bastante diferente daqueles de *Ochlerotatus albifasciatus*, porque estes apresentam suas células coriônicas em forma de raquete. Ambas as espécies encontram-se nos mesmos habitats larvais, pelo menos na Argentina (Campos et al. 2004). *Oc scapularis* nunca foi encontrado em buracos de árvores, mas a espécie é adaptada a mudanças ambientais antrópicas com uma forte tendência para os estabelecimentos humanos (Silva e Menezes, 1996), e, assim, o uso de recipientes como os habitats de larvas podem se tornar mais frequentes. (Forattini et al. 1998).

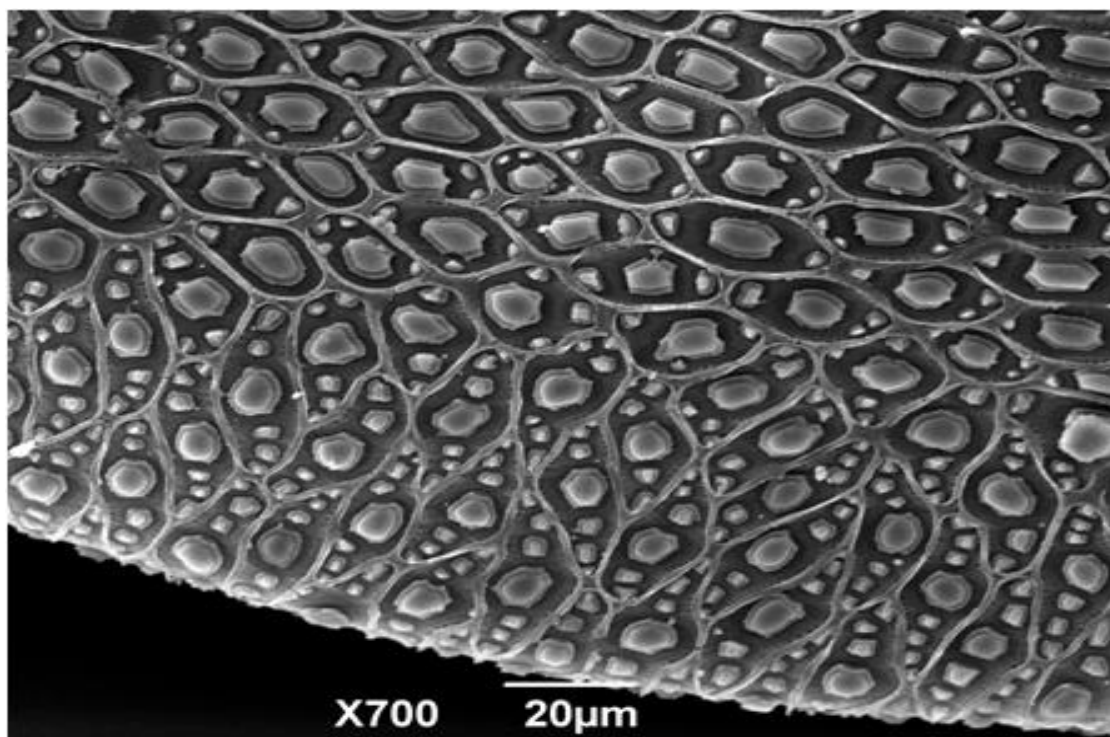


Fig. 15 Transição entre a superfície dorsal e ventral de *Ochlerotatus scapularis*.

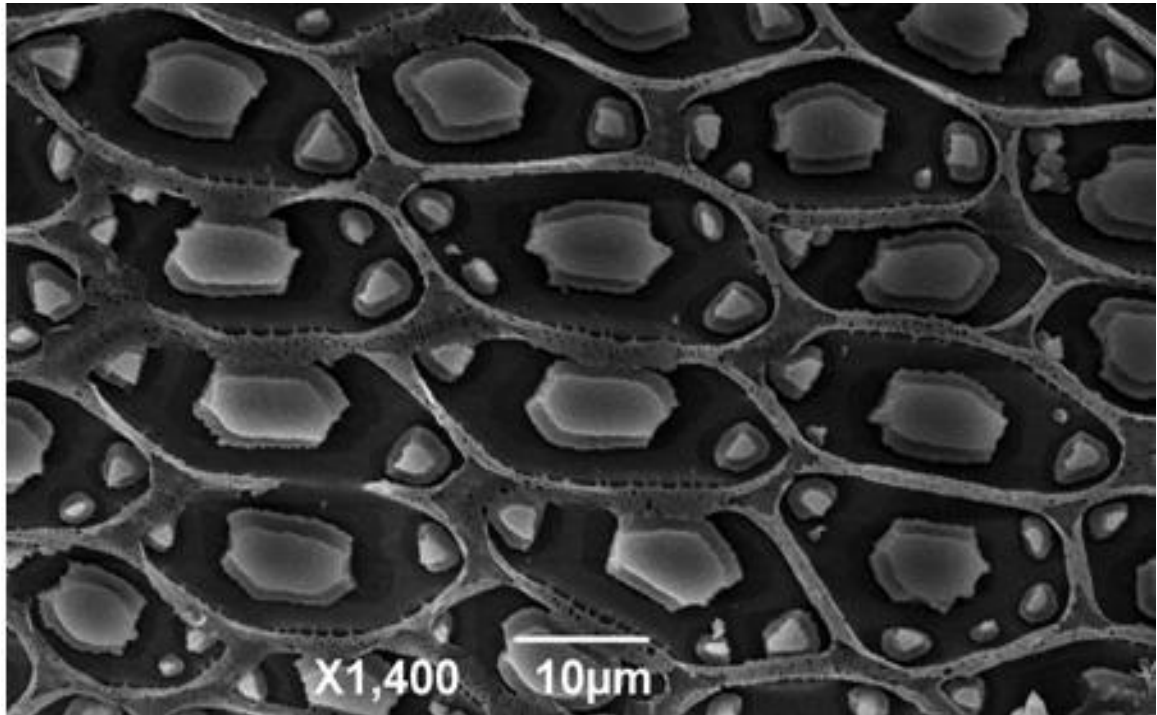


Fig. 16 Região lateral do ovo mostrando ornamentação do dorsal e ventral de *Ochlerotatus scapularis*.
Escala de 20 μm

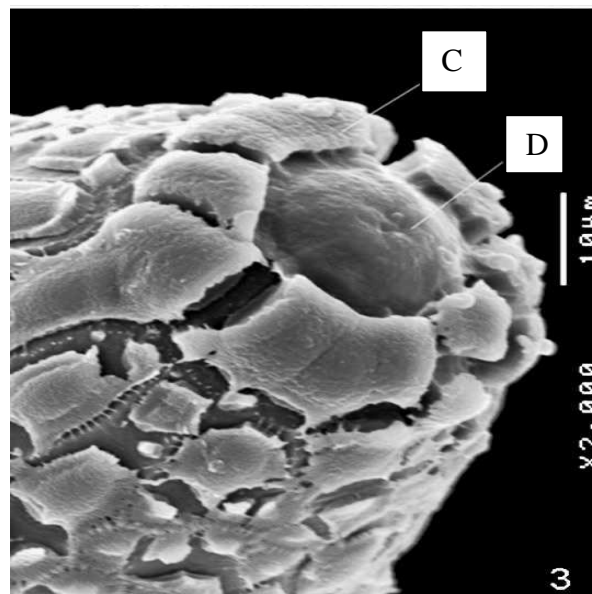


Fig. 17 Detalhe do aparelho micropilar de *Ochlerotatus scapularis*. C: Colar da micrópila e M: Disco micropilar. Escala 10 μm

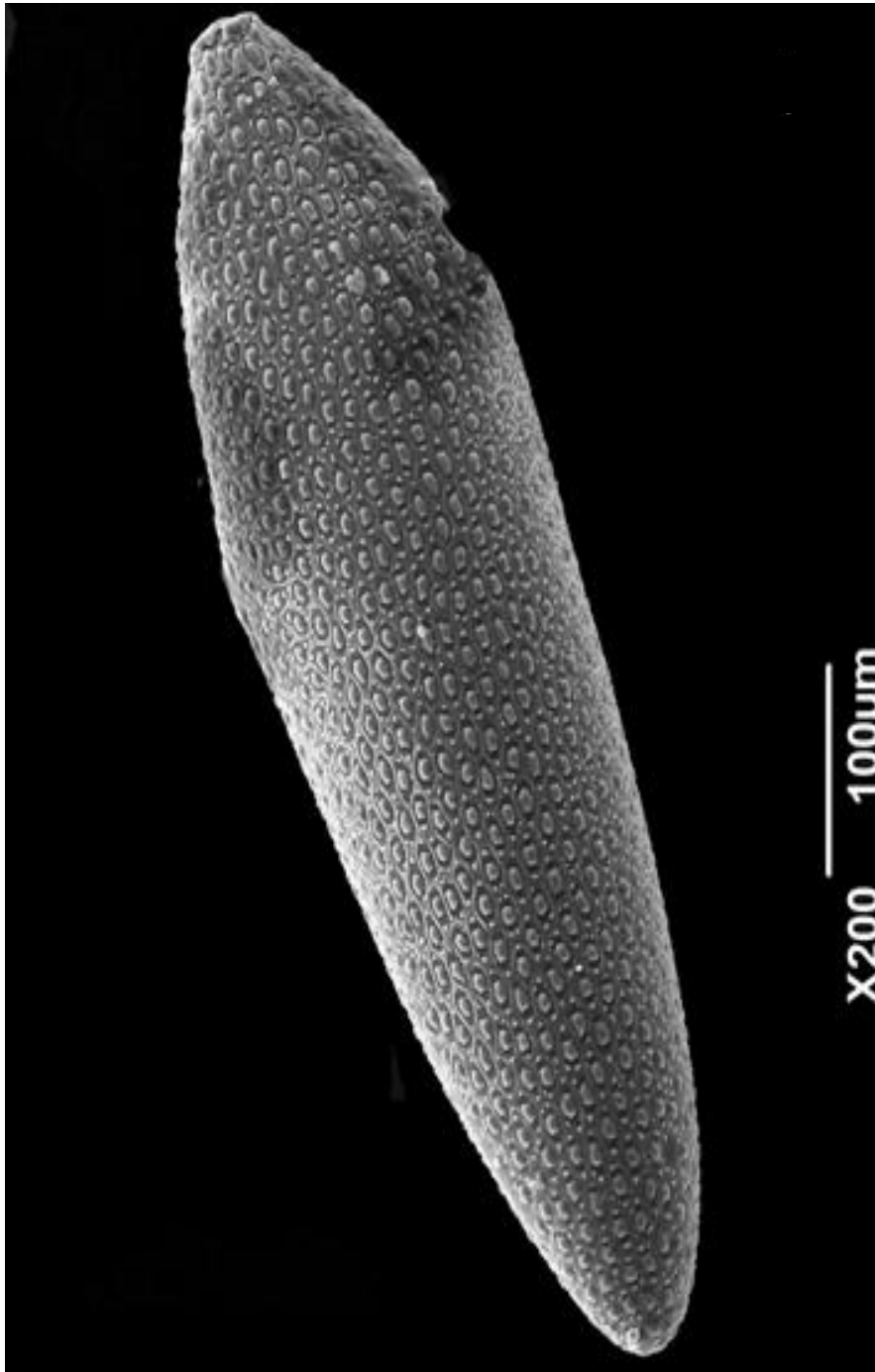


Fig. 18 Ovo inteiro de *Oc. scapularis*. Escala 100 µm

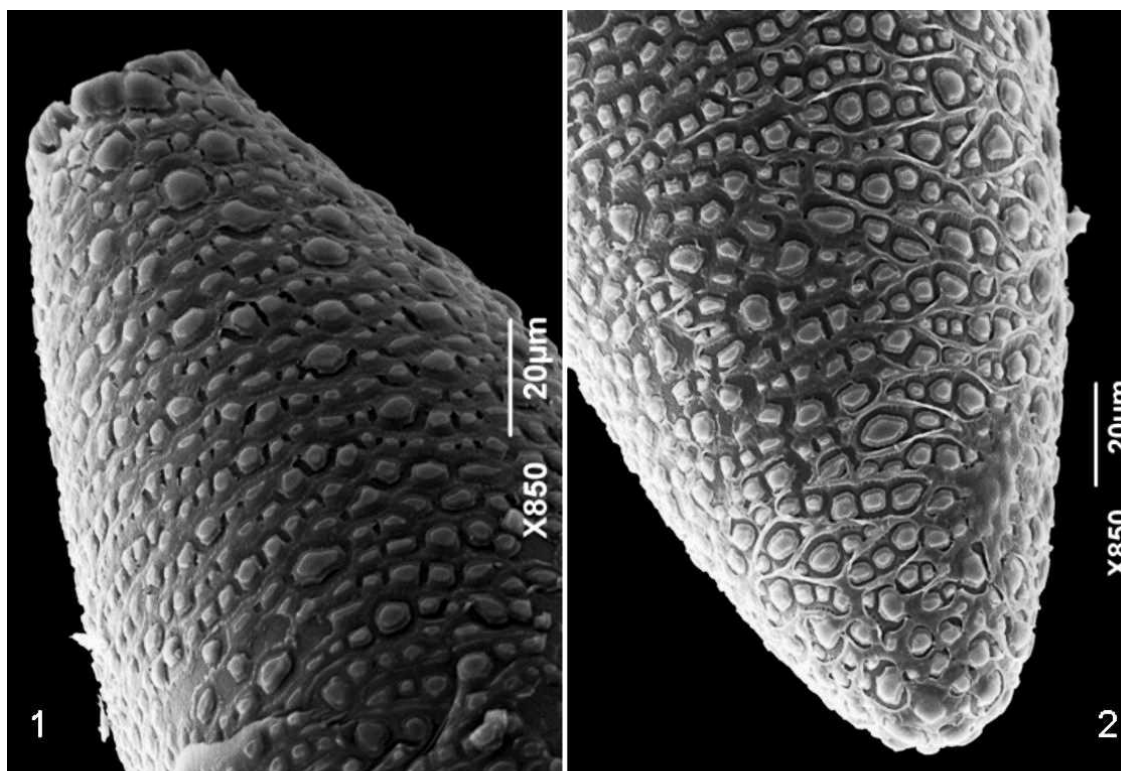


Fig. 19 Microscopia eletrônica de ovos de *Oc. scapularis* exibição: (1) região anterior/ micropilar e ornamentação típica do retículo coriônico externo com 2 tipos de tubérculos, (2) região posterior do ovo mostrando os tubérculos. Escala 20 µm

Ovos de *Ochlerotatus taeniorhynchus* apresentam (comprimento: $607,1 \pm 29,3$ µm; largura: $213,7 \pm 13,7$ µm; n = 35) têm a superfície ventral mais convexa do que a dorsal. A micrópila medindo ($1,4 \pm 0,31$ µm; n = 6) está rodeada por um disco micropilar ($5,2 \pm 1,37$ µm; n = 9) e por um colar micropilar completo (Fig. 17) ($5,4 \pm 0,99$ µm; n = 9). A ornamentação das células coriônicas consiste em células de formas irregulares, cada um contendo $21,33 \pm 2,08$ tubérculos. No meio do ovo, o diâmetro dos tubérculos maiores é $4,14 \pm 0,77$ µm e o diâmetro dos pequenos é $1,67 \pm 0,26$ µm. Não foi observada nenhuma estrutura relacionada com a adesão ao substrato.

As células coriônicas exteriores irregulares contendo tubérculos são semelhantes aos ilustrados para *Oc. taeniorhynchus* por Craig Jr. e Horsfall (1960, Plate II, fig. 11, 12) e esboçado por Forattini (1965, Fig. 18).

A ausência de estruturas possivelmente relacionados com a adesão, tais como filamentos observados em *Haemagogus capricornii* Lutz (Alencar et al. 2005), *Hg.*

janthinomys Dyar e *Hg. equinus* Theobald (Linley & Chadee 1991) indicam que os ovos são provavelmente livres para se mover quando o substrato é úmido ou inundado.

O colar da micrópila possui uma ornamentação bem semelhante ao encontrado em *Oc. albifasciatus* (Fig. 17) apresentando um colar proeminente e contínuo, com disco micropilar evidente.

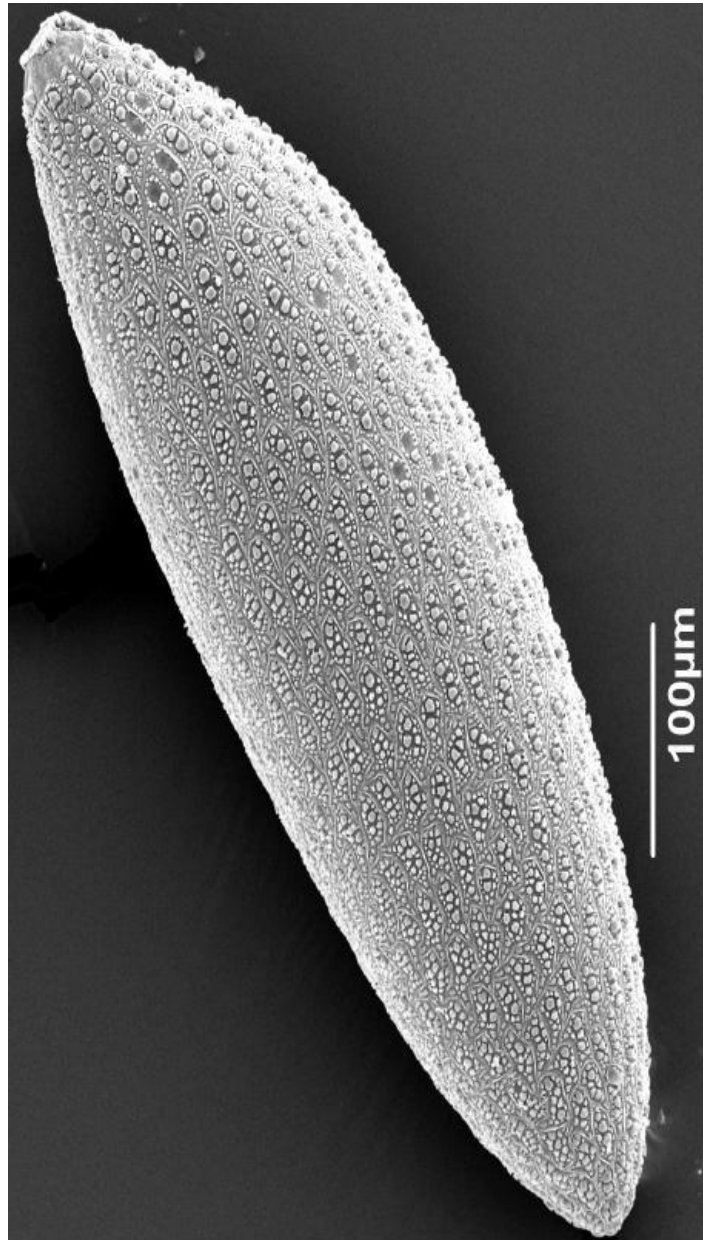


Fig. 20 Ovo inteiro de *Oc. taeniorhynchus*. Escala 100 μm

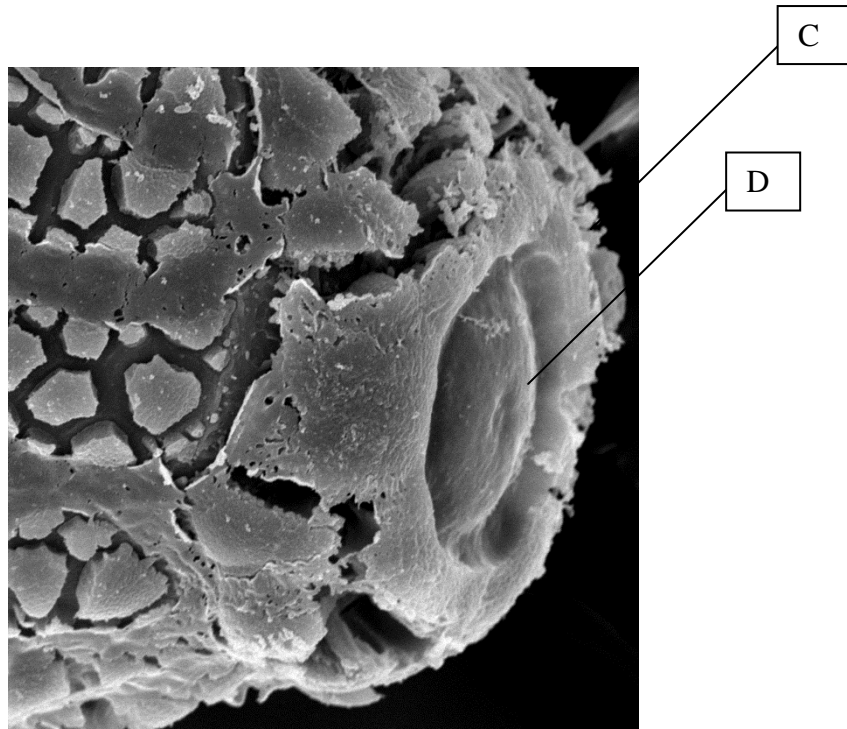


Fig. 21 Observação da micrópila de *Oc. taeniorhynchus*, situado na zona anterior do ovo formado por um colar com um contorno bem evidenciado

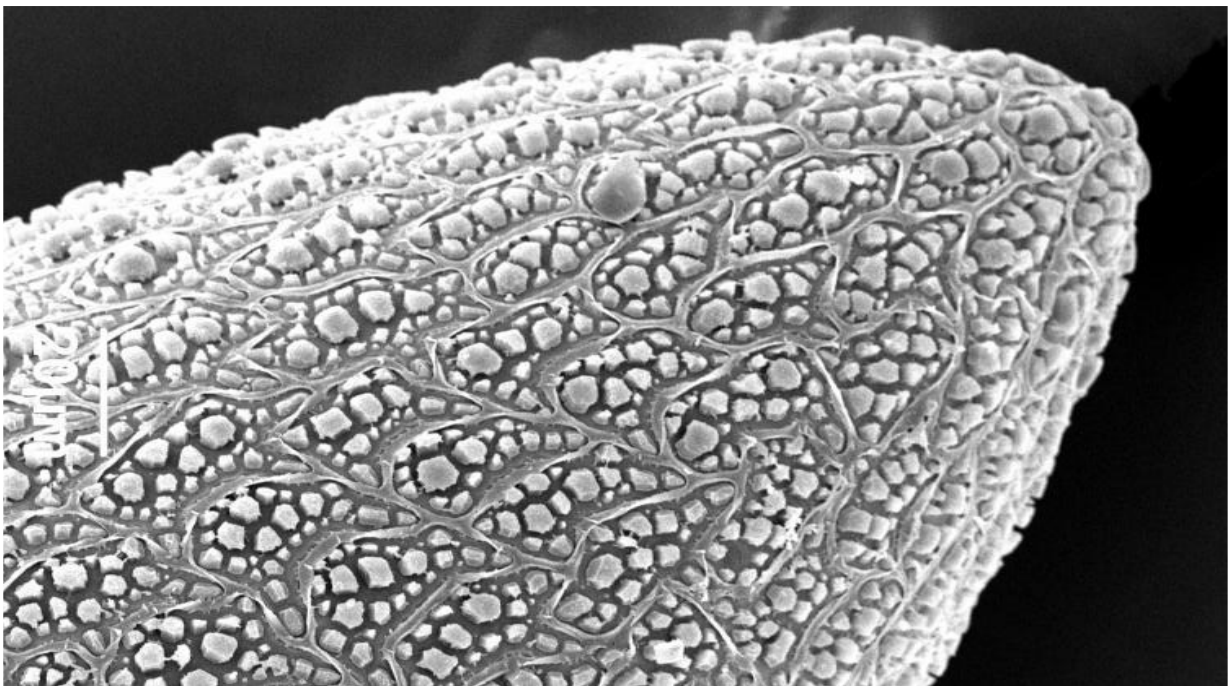


Fig. 22 Ornamentação típica do retículo coriônico exterior mostrando dois a quatro tipos de tubérculos.

As espécimes de *Oc. fluviatilis* apresentam seus ovos com uma coloração negra com formato elíptico (comprimento: $722,8 \pm 39,5\mu\text{m}$; largura: $177,9 \pm 9,78\mu\text{m}$) com um afinamento em uma de suas extremidades. A ornamentação das células coriônicas consiste em células de formas irregulares, cada um contendo $2,65 \pm 0,41 \mu\text{m}$ tubérculos na superfície ventral, e com medidas de $6,04 \pm 0,60$ na superfície dorsal. Foi observado que os tubérculos são maiores nas células coriônicas ventrais (Fig. 20), o que pode auxiliar em sua adesão ao substrato. Não foi possível visualizar a micrópila.

A presença do tubérculo central nas células coriônicas tem sido descritas em algumas espécies de *Ochlerotatus* (Fig. 21). Fato evidenciado também por Matsuo (1974) o qual observou que as células coriônicas de *Ae. aegypti* (Linnaeus), e *Ae. pseudalbopicta* apresentam grande tubérculo na área central e pequenos tubérculos na área periférica. Em *Hg. tropicalis*, estes são sempre de um a dois tubérculos de maior diâmetro na área central cercados por tubérculos pequenos na áreas periféricas, uma característica que diferencia das outras espécies do gênero. Este tipo de tubérculo também foi evidenciado em *Oc. fluviatilis* (Fig. 21).

As descrições dos ovos dessas quatro espécies podem ser admitidas como auxílio na caracterização específica, pelo grau de dissimilaridade apresentado nas ornamentações no exocório das espécies (Tabela 1).

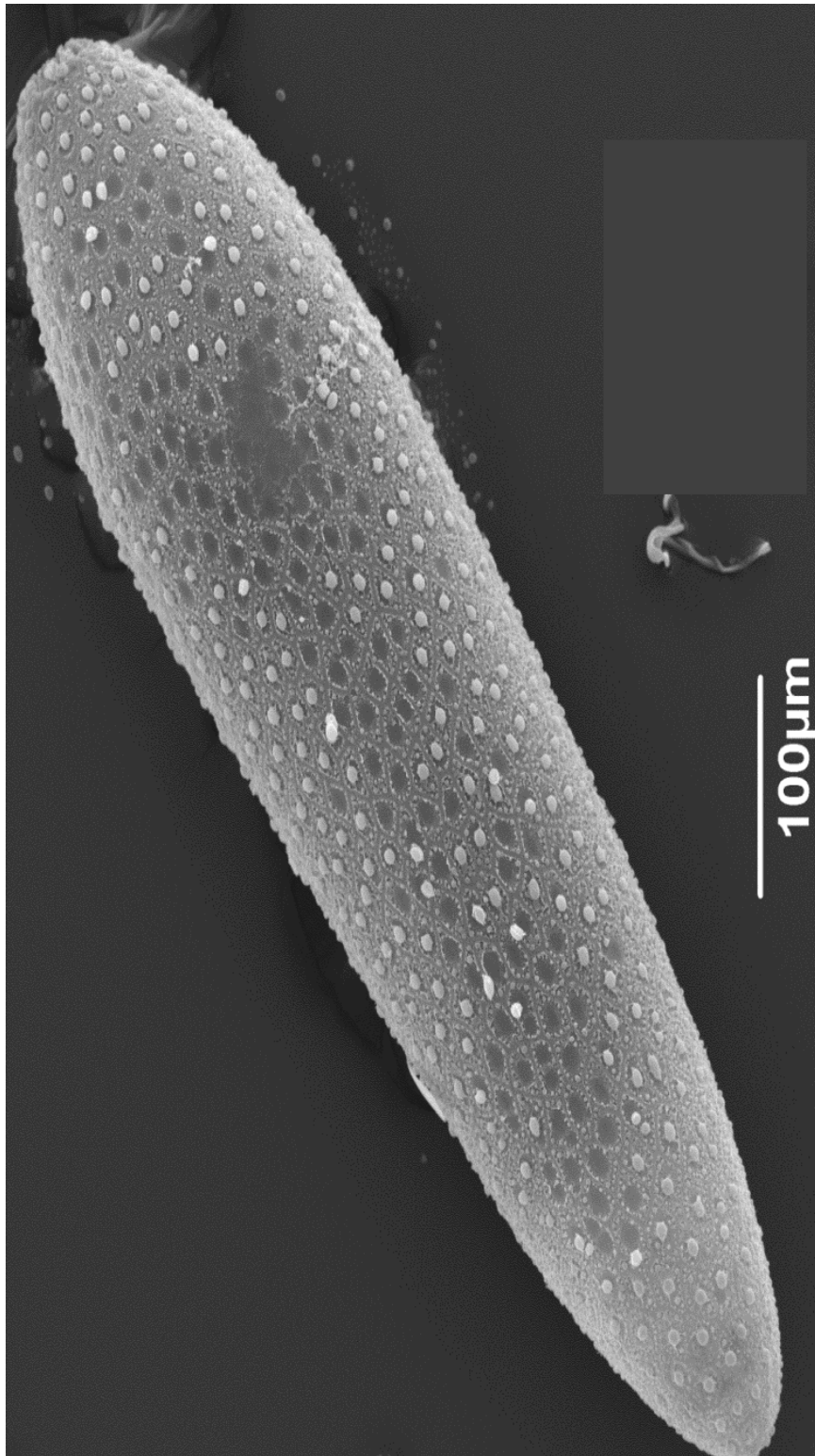


Fig. 23 Ovo inteiro de *Ochlerotatus fluviatilis*. Escala 100 μm

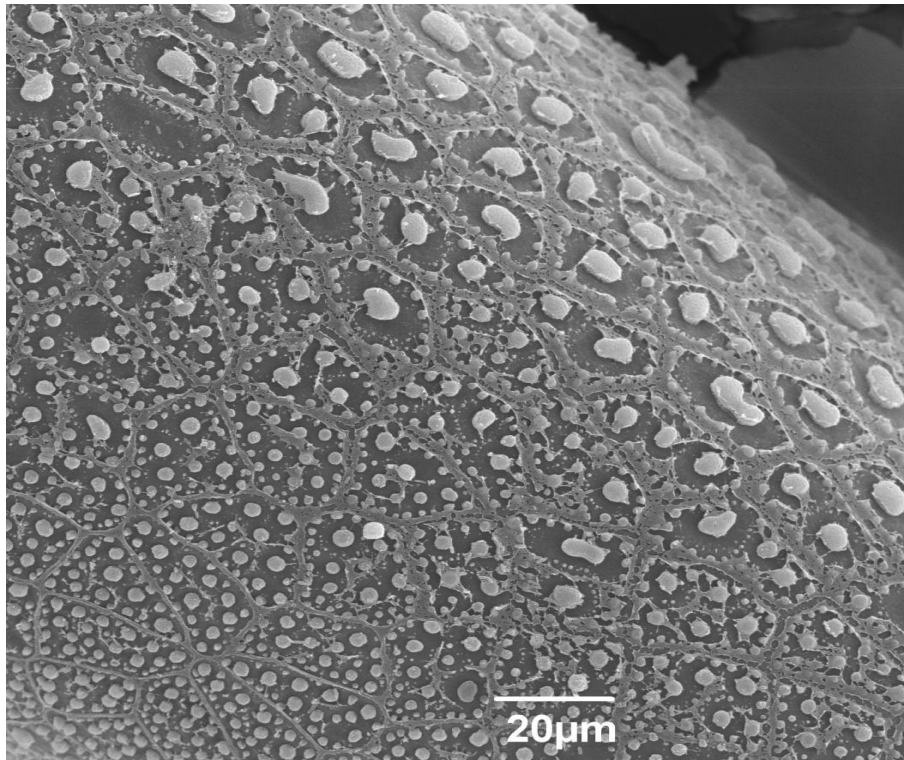


Fig. 24 Transição entre superfície dorsal e ventral.de *Oc. fluviatilis*. Escala 20 µm

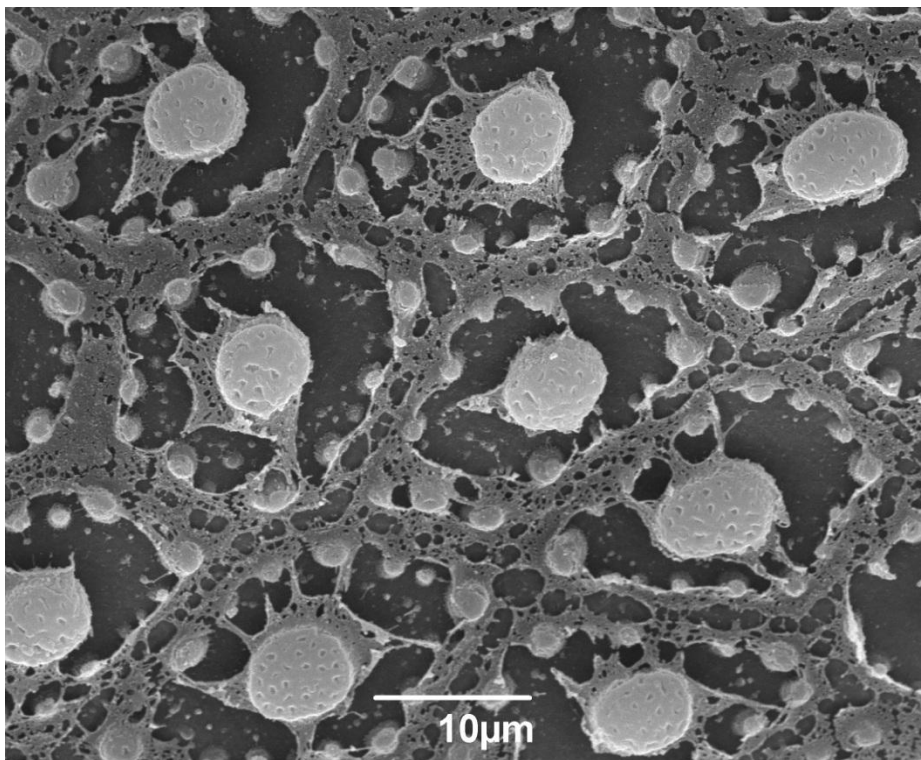


Fig. 25 Detalhe das células coriônicas de *Oc. fluviatilis*. Escala 10 µm

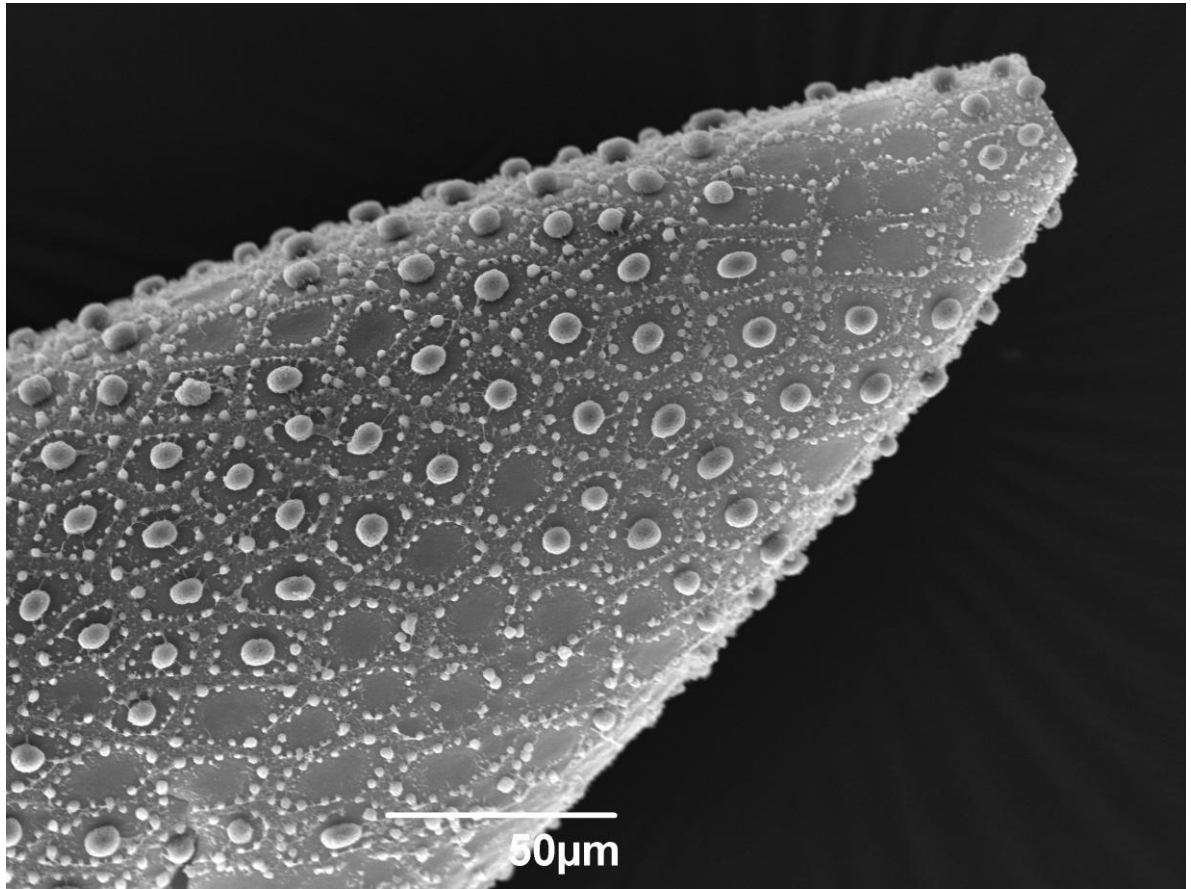


Fig. 26 Região posterior de *Oc. fluviatilis*. Escala 50 µm

Tabela 1. Análise comparativa de ovos de oito espécies de culicídeos através da microscopia eletrônica de varredura

Espécies	Comprimento, μm	Largura, μm	C/ L ratio	Fusão dos tubérculos	Disposição das células internas dos tubérculos	Colar da Micrópila (μm)	Orifício da Micrópila (μm)
<i>Oc. albifascitus</i> ^a	573,0 \pm 651,0	164,0 \pm 224,0	3,49	Não	Individualizados	10,7	Não evidenciado
<i>Oc. fluviatilis</i>	718,8 \pm 40,5	174,2 \pm 9,04	4,12	Não	Individualizados	Não observado	Não observado
<i>Oc. taeniorhynchus</i> ^e	607,1 \pm 29,3	213,7 \pm 13,7	2,84	Não	Individualizados	5,4 \pm 0,99	1,4 \pm 0,31
<i>Oc. terreus</i> ^b	649	168,7	3,84	Sim	Fusionadas na periferia	19,9	Não evidenciado
<i>Ae. aegypti</i> ^c	670,2 \pm 7,2	186,3 \pm 2,2	3,59	Não	Individualizados	Não observado	1,8
<i>Ae. albopictus</i> ^c	609,8 \pm 5,9	192,9 \pm 2,4	3,16	Não	Individualizados	Não observado	3,3
<i>Ae. bahemensis</i> ^c	859,2 \pm 8,4	179,6 \pm 2,6	4,78	Não	Fusionados	Não observado	2,6
<i>Ae. scapularis</i> ^d	620,4 \pm 16,74	163,7 \pm 16,90	3,78	Não	Individualizados	11,1	1,41

^a Santos-Mallet et al 2009

^b Alencar et al 2008

^c Linley 1989

^d Santos-Mallet et al 2010

^e Marcondes et al 2012

5- CONCLUSÕES

✓ Os aspectos das esculturas do exocório revestem-se de uma notável variedade quando examinada com a microscopia eletrônica, aumentando o poder de estudos morfológicos que eram anteriormente limitados a microscopia óptica. Com a microscopia eletrônica de varredura abriu-se a possibilidade de realizar estudos com detalhes morfológicos, com o objetivo entre outros, de contribuir para identificação de mosquitos.

✓ Os ovos das quatro espécies: *Ochlerotatus albifasciatus*, *Ochlerotatus fluviatilis*, *Ochlerotatus taeniorhynchus* e *Ochlerotatus scapularis* apresentaram estruturas morfológicas bem diferenciadas.

✓ A análise morfométrica dos ovos evidenciou as diferenças morfológicas ultraestruturais das espécies.

✓ *Oc. albifasciatus* apresenta em sua maioria das células coriônicas um pequeno tubérculo central cercado por tubérculos maiores, onde muitos tubérculos não se apresentam fusionados. Apresenta também um colar contínuo e proeminente em sua micrópila.

✓ *Oc. taeniorhynchus* apresentou algumas semelhanças com *Oc. albifasciatus* ambos não possuem estruturas possivelmente relacionadas com a adesão e apresentam um colar da micrópila bem proeminente e contínuo, com disco micropilar bem evidente.

✓ *Oc. fluviatilis* possui tubérculos maiores nas células coriônicas ventrais, o que pode auxiliar em sua adesão ao substrato. Esta espécie se assemelha a biologia de *Oc. scapularis* pois ambas depositam seus ovos em coleções líquidas no solo de caráter transitório ou não.

✓ *Oc. scapularis* na superfície ventral apresenta células coriônicas com um aspecto tubular contendo tubérculos bem definidos. O aparelho micropilar mostrou significativas diferenças apresentando um colar com moldagem clara e arestas de comprimento determinado, embora irregular, com margens definidas para o área de transição. Esta importante identificação através do (MEV) ajuda na identificação mais apurada desta espécie, por existir populações morfológicamente variáveis.

✓ Foram relatadas características morfológicas de ovos de algumas espécies, que possibilita confecção de chaves de identificação de ovos de mosquitos, em um período curto após a coleta destes e reduzindo portanto, o tempo de identificação das espécies.

6- CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nesta dissertação foram realizados estudos morfológicos ultraestruturais dos ovos de quatro espécies de mosquitos: *Ochlerotatus albifasciatus*, *Ochlerotatus fluviatilis*, *Ochlerotatus taeniorhynchus* e *Ochlerotatus scapularis*. Diante dos resultados obtidos com este estudo, podemos reafirmar que é possível distinguir a espécie em estágio de ovo através da utilização do Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV), verificando a ornamentação dos tubérculos, fazendo medidas das células, largura, comprimento, disco e colar da micrópila. Através desses resultados é de se apontar uma enorme contribuição para a comunidade científica e tempo hábil para prevenção de certas arboviroses.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHID, S. M. M. & R. LOURENÇO-DE-OLIVEIRA. Mosquitos vetores potenciais de dirofilariose canina na Região Nordeste do Brasil. **Rev Saúde Pública** 33: 560–565. 1999.
- ALENCAR, J.A.E. GUIMARÃES, R. P. MELLO, C. M. LOPES, N. DÉGALLIER, AND J. R. SANTOS-MALLET. Microscopia eletrônica de varredura de ovos de *Haemagogus leucocelaenus* (Diptera:Culicidae). **Rev Saúde Pública**. 37: 621-629. 2003.
- ALENCAR, J., A. E. GUIMARÃES, H. R. GIL-SANTANA, AND J. R. SANTOS-MALLET. Scanning electron microscopy of eggs of *Ochlerotatus (Protomacleaya) terreus* Walker. **J. Am. Mosq. Control Assoc.** 21: 355-359. 2005.
- ALENCAR, J., A. E. GUIMARÃES, R. P. MELLO, C. M. LOPES, N. DEGALLIER, AND J. R. SANTOS-MALLET. Scanning electron microscopy study of the egg of *Haemagogus (Haemagogus) capricornii* Lutz, 1904 (Diptera: Culicidae). **J. Med. Entomol.** 42: 1-46. 2005.
- ALENCAR, J., N. DEGALLIER, A. E. GUIMARÃES, J. M. COSTA, W. A. MARQUES, V. C. SILVA, AND J. R. SANTOS-MALLET. Scanning electron microscopy of the egg of *Haemagogus tropicalis*. **J. Am. Mosq. Control Assoc.** 24: 16-20. 2008.
- ARNELL, J.H. Mosquito studies (Diptera, Culicidae). XXXII. A revision of the genus *Haemagogus*. **Contributions of the American Entomological Institute**, 10, 1–174. 1973.
- ARNELL, J. H. Mosquito studies (Diptera, Culicidae) XXXIII. A revision of the scapularus group of *Aedes (Ochlerotatus)*. **Contributions of the American Entomology Institute** 13(3): 1-144. 1976.
- CAMPOS, S., SILVA, M., PIROLI, E.L., CARDOSO, L.G. & BARROS, Z.X. Evolução do uso da terra entre 1996 e 1999 no município de Botucatu-SP. **Engenharia Agrícola** 24:211-218. 2004.
- CAMPOS, R. E. Long-term storage and viability of *Ochlerotatus albifasciatus* eggs (Diptera: Culicidae). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 103: 115-117. 2008.
- CAUSEY, O R. The isolation of virus from natural and sentinel hosts, in the amazon valley. **Rev. Serv. Esp. Saúde Públ.** 12 (1) 25-31. 1962.
- CHADEE, D. D., AND P. S. CORBET. Seasonal incidence and diel patterns of oviposition in the Peld of the mosquito, *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) in Trinidad, West Indies: a preliminary study. **Ann. Trop. Med. Hyg.** 81: 151-161. 1987.

CHADEE, D. D., G. J. SMALL, AND S.L.C. O'MALLEY. The description of the eggs of *Toxorhynchites moctezuma* (Diptera: Culicidae) from Trinidad, West Indies with notes on other eggs. **Mosq. Syst.** 19: 1987-237. 1987.

CHADEE, BENNETT H. Scanning electron microscopy of the eggs of *Haemagogus celeste* and *Haemagogus equinus* (Diptera: Culicidae) from Trinidad, West Indies. **Mosq Syst** 22:11–14. 1990.

CHAPMAN & HALL. **Plasticity of crystals** by E. Schmid and W. Boas xiv 353 p. London 1968.

COFFEY LL. & WEAVER SC. Susceptibility of *Ochlerotatus taeniorhynchus* and *Culex nigripalpus* for Everglades virus. **Am J Trop Med Hyg.**73:11–6. 2005.

CONSOLI RAG. & OLIVEIRA RL. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil.** Rio de Janeiro, Brazil: Editora Fiocruz. 228 p. 1994.

FORATTINI OP, GOMES AC, SANTOS JLF, GALATI EAB, RABELO EX, NATAL D. Observações sobre a atividade de mosquitos Culicidae, em mata residual do Vale da Ribeira, São Paulo, Brasil. **Rev Saúde Pública** 15: 557-586. 1981.

FORATTINI OP, GOMES AC, NATAL D, KAKITANI I, MARUCCI D. Preferências alimentares e domiciliação de mosquitos Culicidae no Vale da Ribeira, São Paulo, Brasil, com especial referência a *Aedes scapularis* e a *Culex* (Melanoconion). **Rev Saúde Pública.** 23: 9- 19. 1989.

FORATTINI, O.P. **Entomologia médica.** Volume II. Culicini: Culex, Aedes e Psorophora.. São Paulo: Editora da USP/ Faculdade de Higiene e Saúde Pública, 506p. 1965.

FORATTINI, O. P.; MARQUES, G. R. A. Significado epidemiológico dos criadouros de *Aedes albopictus* em bromélias. **Revista de Saúde Pública,** São Paulo, 32(2):186-188. 1998.

FORATTINI, O. P. **Culicidologia médica.** Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil. 2002.

FRANCO, P. MICHAEL, S. **Computational geometry: an introduction.** New York: Springer –Verlag. 1985.

GLEISER, R. M. & D. E. GORLA. Predicting the spatial distribution of *Ochlerotatus albifasciatus* (Diptera: Culicidae) abundance with NOAA imagery. **Bull. Entomol.Res.** 97: 607-612. 2007.

HADDOW AD, MOULTON JK, GERHARDT RR, MCCUISTON LJ, JONES CJ. Description of the egg of *Ochlerotatus japonicus japonicus* (Diptera: Culicidae) using variable pressure scanning electron microscopy. **J. Med. Entomol** 46:9–14. 2009.

- HARBACH R E & KNIGHT KL. **Taxonomists glossary of mosquito anatomy.** 1980.
- HARBACH, R. E. & I. J. KITCHING. Phylogeny and classification of the Culicidae (Diptera). **Systematic Entomology** 23: 327–370. 1998.
- HORSFALL, W. R. & G. B. CRAIG, Jr. Eggs of floodwater mosquitoes IV. Species of *Aedes common* (Diptera: Culicidae). **Ann. ent. Soc. Am.** 49: 368-374, 1956.
- KALPAGE KS, BRUST RA. Mosquitoes of Manitoba. I. Descriptions and a key to *Aedes* eggs (Diptera: Culicidae). **Can J Zool** 46:699–718. 1968.
- KNIGHT, K. L. & STONE, A. A catalog of the mosquitoes of the world (Diptera:Culicidae). **The Thomas Say Foundation**, 611 p. v. 6. 1977.
- LABARTHE, N.; SERRÃO, M. L.; MELO, Y. F.; OLIVEIRA, S. J. & LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R., 1998.1504 BRITO, A. C. et al.**Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, 17(6):1497-1504. 2001.
- LINLEY, J. R. Comparative fine structure off the eggs of *Aedes albopictus*, *Aedes aegypti* e *Aedes bahamensis* (Diptera: Culicidae). **J. Med. Entomol.** 26: 5190-521. 1989.
- LINLEY, J. R. Scanning electron Microscopy of the egg of *Aedes vexans* and *Aedes infirmatus* (Diptera: Culicidae). **Proc. Entomol. Soc. Wash.** 92: 685-693. 1990.
- LINLEY, J. R. & D. D. CHADEE. Fine structure of the eggs of *Haemagogus equinus* and *Hg. janthinomys* (Diptera: Culicidae). **J. Med. Entomol.** 28: 434-445. 1991.
- LINLEY, J. R. & M. W. Service. Fine structure of the eggs of *Aedes durbanensis*, *Aedes woodi*, and *Eretmapodites quinquevittatus* (Diptera: Culicidae). **Mosq. Syst.** 26:59-72. 1994.
- LOURENÇO-DE-OLIVEIRA & R.; DEANE, L. Presumed *Dirofilaria immitis* infections in wild-caught *Aedes taeniorhynchus* and *Aedes scapularis* in Rio de Janeiro, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 90: 3, 387-388, 1995.
- LUTI, R., M.A. BERTRAN DE SOLÍS, F.C. GALERA, N. MULLER DE FERREIRA, M. BERZAL, M. NORES, M.A. HERRERA Y J.C. BARRERA Vegetación. En Vázquez, J.; Miatello, R. y M. Roqué (dirs.) Geografía Física de la Provincia de Córdoba, **Editorial Boldt. Buenos Aires.** 297-368. 1979.
- LUTZ, A. Nota preliminar sobre os insetos sugadores de sangue, observados nos Estados de São Paulo e Rio de Janeiro. **Brasil-Med.** 17:29, 281-282. 1903.
- LUTZ, A. Technica seguida nas experiências feitas com mosquitos. **Rev do Interno da Bahia.** 463-467. 1904.
- LUTZ, A. **Quadros dos gêneros da família Culicidae.** 78p. Bourroul. Tese de Doutorado. 78p. 1904. Mosquitos do Brasil.

LUZ SLB & LOURENÇO DE OLIVEIRA R. Forest Culicinae mosquitoes in the environs of Samuel Hydroelectric Plant, State of Rondônia, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 91:427-432. 1996.

MATSUO K, IWAKI M, KUNOU I. The scanning electron microscopy of mosquitoes. **I. Jpn J Sanit Zool** 22: 307 . 1972b

MATSUO, K., Y. YOSHIDA, & J. C. LIEN. Scanning electron microscopy of mosquitoes II. The egg surface structure of 13 species of *Aedes* from Taiwan. **J. Med. Entomol.**11: 179-188. 1974.

REINERT, J. F. New classification for the composite genus *Aedes* (Diptera: Culicidae: Aedini), elevation of subgenus *Ochlerotatus* to generic rank, reclassification of the other subgenera, and notes on certain subgenera and species. **J. Am. Mosq. Control Assoc.** 16: 175-188. 2000.

REINERT, J. F. List of species described in the egg stage of tribe Aedini (Diptera: Culicidae) with their literature citations. **J. Am. Mosq. Control Assoc.** 21: 252-262. 2005.

REINERT, J. F., R. E. HARBACH, AND I. J. KITCHING. Phylogen and classification of *Finlaya* and allied taxa (Diptera: Culicidae: Aedini) based on morphological data from all life stages. **Zool. J. Linn. Soc.** 148: 1-101. 2006.

REINERT, J. F., R. E. HARBACH, AND I. J. KITCHING. Phylogeny and classification of *Ochlerotatus* and allied taxa (Diptera: Culicidae: Aedini) based on morphological data from all life stages. **Zool. J. Linn. Soc.** 153: 29-11. 2008.

SANTOS-MALLET, J.R., GLEISER, R.M., ALENCAR, J., DE ALMEIDA MARQUES, W., SARMENTO, J.S., MÜLLER, G.A. & MARCONDES, C.B. Scanning electron microscopy of *Ochlerotatus albifasciatus* (Diptera: Culicidae). **J. Med. Entomol** 46, 980–985. 2009.

SANTOS-MALLET, J.R., MÜLLER, G.A., GLEISER, R.M., ALENCAR, J., DE ALMEIDA MARQUES, W., SARMENTO, J.S. & MARCONDES, C.B. Scanning electron microscopy of the eggs of *Aedes scapularis* from southern South America. **J. Am. Mosq. Control Assoc** 26, 205–209. 2010.

SPRINGER –VERLAG. **Computacional geometry: an introduction.** New York. 1985.

WARD, W. W., PRENTICE, H. J., ROTH, A. F., CODY, C. W., & REEVES, S. C. **Photochem. Photobiol.** 35, 803-808. 1982.