

UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS

DISSERTAÇÃO

Efeito de diferentes fontes de sangue sobre a performance reprodutiva de Aedes aegypti L., 1762 (Diptera: Culicidae) alimentados através de membrana de silicone

Isabelle Garcia Pina

1997



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS
PARASITOLOGIA VETERINÁRIA

**“EFEITO DE DIFERENTES FONTES DE SANGUE SOBRE A PERFORMANCE
REPRODUTIVA DE *Aedes aegypti* L., 1762 (DIPTERA: CULICIDAE)
ALIMENTADOS ATRAVÉS DE MEMBRANA DE SILICONE”**

ISABELLE GARCIA PINA

Sob Orientação do Professor
Adivaldo Henrique da Fonseca

Dissertação submetida como requisito parcial
para obtenção do grau de **Mestre em**
Ciências– Parasitologia Veterinária

SEROPÉDICA, RIO DE JANEIRO

1997

614.432

P645e

T

Pina, Isabelle Garcia, 1969-

"Efeito de diferentes fontes de sangue sobre a performance reprodutiva de *Aedes aegypti* L., 1762 (Díptera: Culicidae) alimentados através de membrana de silicone / Isabelle Garcia Pina - 1997.

22 f. : il.

Orientador: Adivaldo Henrique da Fonseca.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária - Parasitologia Veterinária.

Bibliografia: f. 13-14.

1. Inseto como transmissor de doenças - Teses. 2. *Aedes aegypti* - Teses. 3. Alimentação artificial - Teses. 4. Sangue - Análise - Teses. 5. Membranas (Tecnologia) - Teses. I. Fonseca, Adivaldo Henrique da, 1953-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária - Parasitologia Veterinária. III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

ISABELLE GARCIA PINA

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências, no curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Parasitologia Veterinária.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: 30 / 09 / 1997

Aivaldo Henrique da Fonseca (Dr) UFRRJ
(Orientador)

Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt

João Luiz Horácio Faccini

A meus pais, Cida e Carlos, pelo extremo amor e amizade;
Aos meus irmãos Carla, Du, Bile e Nando, pelo carinho e apoio;
A Nacha, Fátima, Fred, Fernanda e Fabrício, minha segunda família.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Adivaldo Henrique da Fonseca e à sua família, pelo carinho, amizade e orientação ao longo dos anos de convívio, essenciais para meu crescimento profissional e pessoal.

Ao Dr. Ricardo Lourenço de Oliveira, pela doação de material e intercâmbio de ideias.

Ao Professor Ary Elias Aboud Dutra, pela amizade, dedicação e auxílio nos primeiros passos de minhas atividades científicas.

Ao colega Douglas Marques de Macedo e sua família, pela amizade, pelo apoio e por me acolherem sempre com extremo carinho em todos os momentos.

Aos colegas Saulo Teixeira de Moura, Magda Alves de Medeiros, Adriana Moutinho Amorin, Álvaro Luiz Marinho Castro, Cleber Oliveira Soares e Márcia Mayumi Ishikawa pela grande ajuda e amizade durante a execução dos trabalhos.

Aos funcionários Luis de Oliveira e Francisco Ribeiro dos Santos pelo auxílio e dedicação.

Aos professores e colegas de curso que propiciaram um ambiente agradável de convívio e estudo, essenciais para meu aprendizado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo suporte financeiro para a realização deste trabalho.

A todos os que não foram citados mas sem os quais não seria possível a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

Isabelle Garcia Pina, nascida em Manaus – Amazonas em 22 de maio de 1969, filha de Carlos Fernando da Silva Pina (in memoriam) e Maria Aparecida Garcia Pina.

Iniciou seus estudos ainda em Manaus, no ano de 1976, e concluiu o segundo grau no Estado do Rio de Janeiro, Barra Mansa, em 1986.

Ingressou na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, após ter sido aprovada no vestibular de 1987, obtendo a primeira colocação entre os classificados para o curso de Medicina Veterinária.

Colou grau de Médica Veterinária no ano de 1991, ocasião em que recebeu o Prêmio Octávio Dupond, oferecido ao aluno que apresenta o melhor rendimento entre os concluintes do curso.

No ano seguinte foi selecionada para realização de projeto de aperfeiçoamento científico, financiado pelo CNPq, na Disciplina de Doenças Parasitárias da UFRRJ, tendo trabalhado durante dois anos no desenvolvimento de técnicas de alimentação artificial de artrópodes hematófagos.

Em 1994 ingressou no Curso de Mestrado em Parasitologia Veterinária da UFRRJ.

Atualmente reside em Barra Mansa e leciona a Disciplina de Biologia em colégios de segundo grau da região e é professora auxiliar de Parasitologia e Zoologia das faculdades de Biologia e Enfermagem, na Sociedade Barramansense de Ensino Superior – SOBEU.

RESUMO

PINA, Isabelle Garcia. **Efeito de diferentes fontes de sangue sobre a performance reprodutiva de *Aedes aegypti* L., 1762 (Diptera: Culicidae) alimentados através de membrana de silicone.** 1997. 14p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária, Parasitologia Veterinária). Instituto de Biologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1997.

Foi comparado o efeito do sangue de camundongos, bovino e humano sobre o ingurgitamento e oviposição do mosquito *Aedes aegypti* L., 1762 (Díptera: Culicidae). O aparato para alimentação artificial foi constituído por gaiolas de plástico, com 10 x 6 cm, com orifícios laterais cobertos com tela de tule, e uma abertura superior, através da qual foi oferecido o sangue contido em uma célula montada em lâmina de microscopia com cola de silicone e membrana de silicone. O sangue foi mantido aquecido a $37,5 \pm 0,5$ °C, durante o tempo de alimentação que variou de 20 a 30 minutos. O experimento foi conduzido dentro de uma câmara climatizada, com temperatura de $28 \pm 0,5$ °C, umidade relativa de $80 \pm 5\%$ e fotoperiodismo de 12 horas diárias. Um total de 16 grupos de 30 fêmeas de *A. aegypti*, com idades entre 4 a 7 dias, foram pré-alimentados com solução açucarada de sacarose. Em cada grupo foram adicionados 10 machos para realização de cópula. O sangue de cada hospedeiro foi coletado assepticamente e adicionado de citrato de sódio a 3,9%. O grupo controle foi alimentado diretamente em hospedeiro humano voluntário. Após a alimentação, as fêmeas ingurgitadas foram contadas e colocadas no interior de gaiolas com 50 x 50 x 50 cm, contendo frasco com água limpa para oviposição. Foram registrados o número de fêmeas alimentadas em cada tratamento, o período de pré-postura e o número médio de ovos por fêmea alimentada. Mosquitos alimentados com sangue de camundongos e de bovino tiveram performances de 22,5 e 25,8% de ingurgitamento e a postura foi em média de 9,2 e 10,3 ovos por fêmea, respectivamente. Fêmeas alimentadas com sangue humano através da membrana ou diretamente no hospedeiro humano tiveram comportamentos diferentes com índices de ingurgitamento de 89 e 95% e oviposição de, em média, 13,4 e 15,3 ovos por fêmea, respectivamente. Não houve variação no período de pré-postura (três dias) entre os tratamentos realizados.

Palavras-chave: *Aedes aegypti*. Alimentação artificial. Membrana de silicone.

ABSTRACT

PINA, Isabelle Garcia. **Effect of different blood sources on the reproductive performance of *Aedes aegypti* L., 1762 (Diptera: Culicidae) fed through silicone membrane device.** 1997. 14p. Dissertation (Master Science in Veterinary Medicine, Veterinary Parasitology). Instituto de Biologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1997.

This experimental work with *Aedes aegypti* L. (1762) was conducted in order to compare the effect of different blood sources on feeding and egg production of mosquitoes' females. The blood-feeding device consisted of a plastic cage – used for holding females during blood feeding – with two lateral windows recovered with thin cloth to allow air exchange during feeding. In the top of the cage, there was an opening where the food's container, recovered with silicone membrane, was attached. A larger vial filled with water at the initial temperature of 50 °C was used over the apparatus to keep the food source warm ($37,5 \pm 0,5\%$).

In each trial, three different treatments were tested: whole blood collected from mouse, bovine and human. To prevent coagulation, a 3,9% solution of sodium citrate was added to the blood. The control group was allowed to feed directly on human volunteers.

The experiment was conducted in a climatic chamber, with temperature and humidity controlled at $28 \pm 0,5$ °C and $80 \pm 5\%$, respective values and the photoperiod of 12 hours of light and 12 hours of darkness.

In each tested group, 30 females and 10 males mosquitoes were used. The females were allowed to feed during a period of 20-30 minutes and after that only the engorged females were transferred to another cages containing the oviposition sites.

To evaluate the effect of different sources of blood on *A. aegypti*, the percentage of engorged females, pre-oviposition time and the number of eggs per engorged female were measured. Highest percentage of engorged females were among mosquitoes fed on human citrated blood (89%) and control (95%). The media oviposition on both treatments were 13,4 eggs for females fed on human citrated blood and 15,3 eggs for females of control group. The lots fed on mice and bovine citrated blood presented the following results respectively: 22,5% of engorged females and 9,2 eggs per female and 25,8% of engorged females and 10,3 eggs per female.

Key-words: *Aedes aegypti*. Artificial feeding. Silicone membrane.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	2
Alimentação artificial de insetos hematófagos	2
Aspectos da biologia	3
3 MATERIAIS E MÉTODOS	4
Localização do experimento	4
Espécimes utilizados	4
Aparato alimentar	4
Procedimento alimentar	6
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	9
5 CONCLUSÕES	12
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	13

1 INTRODUÇÃO

Os registros de surgimento dos artrópodes sugadores de sangue remontam a épocas anteriores ao aparecimento do homem na Terra. Entretanto, o interesse pelo estudo sistematizado somente atingiu maiores proporções após o século XIX, quando foi descoberta a associação entre a transmissão de patógenos e o hábito hematofágico (LEHANE, 1991).

As atenções dos pesquisadores foram direcionadas para determinação das características comportamentais, visando buscar pontos vulneráveis em seu ciclo biológico que, quando atacados devidamente, permitiriam a erradicação ou controle desses ectoparasitos (CONSOLI & OLIVEIRA, 1994).

O estudo do desenvolvimento e comportamento de mosquitos em condições naturais é tarefa difícil. Um dos requisitos básicos para o sucesso é a criação e manutenção de colônias sob condições controladas, em laboratório, o que implica na necessidade de manutenção paralela de biotério para fornecimento de animais a serem empregados como fonte alimentar. Os inconvenientes gerados por esta necessidade vêm estimulando um aumento no estudo dos fatores relacionados ao hábito hematofágico, bem como dos requerimentos nutricionais básicos, a fim de que se possa desenvolver um aparato adequado para a alimentação artificial.

O emprego de técnicas de alimentação artificial apresenta vantagens sobre as técnicas tradicionais que empregam hospedeiros naturais porque permite: o estudo da concentração na qual um microorganismo deve ser encontrado no sangue para ser infectivo para o artrópode hematofago; a determinação da eficiência na transmissão de patógenos por diferentes espécies de parasitos; o estudo do desenvolvimento do parasito sem a influência do sistema imune do hospedeiro e o aumento na segurança e manuseio de patógenos e substâncias tóxicas, facilitando a determinação de doses mínimas efetivas (WETZEL, 1979 e BUTLER et al., 1984).

O objetivo deste trabalho foi conhecer o efeito do sangue de diferentes hospedeiros, fornecido através de aparato alimentar artificial empregando membrana de silicone, sobre *A. aegypti*, correlacionando o número de fêmeas ingurgitadas com média de ovos produzidos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Alimentação artificial de insetos hematófagos – Técnicas artificiais empregando diferentes tipos de membranas foram utilizadas primeiramente com outros artrópodes antes de serem aplicadas à alimentação de mosquitos. RODHAIM et al. (1912) foram os primeiros a relatar a utilização de aparatos artificiais empregando membranas para substituir os hospedeiros naturais na alimentação de artrópodes hematófagos, após terem conseguido alimentar com sucesso moscas do gênero *Glossina* com sangue de ovino desfibrinado, através de membrana preparada a partir de pele de ratos.

ST. JOHN et al. (1930) demonstraram a possibilidade de infectar *A. aegypti* com o vírus da dengue alimentando-os através de membrana da pele de cobaia com uma mistura de sangue e macerado de mosquitos naturalmente infectados. WOKE (1937) alimentou *A. aegypti* em sangue total de coelho submetido a diferentes tratamentos (não tratado, desfibrinado, adicionado de oxalatos e fluorito, citratado, heparinizado) através de membranas de pele de rato.

BISHOP & GILCHRIST (1946) conseguiram alimentar *A. aegypti* com sangue heparinizado de galinha através de membranas naturais, constituídas de pele de pintinhos de duas a três semanas e GREENBERG (1949) relatou a alimentação de *A. aegypti* em vários fluidos artificiais, através de membrana de Baudruche, utilizando principalmente o caráter termofílico da espécie como estímulo ao ingurgitamento.

Visando testar a transmissão de viroses animais através de insetos hematófagos, ROSS (1956) alimentou *A. aegypti* com suspensão viral obtida a partir de cérebro de ratos infectados e soro de coelho, em aparato artificial, empregando membrana de asa de morcego. Em trabalho publicado no mesmo ano, BOORMAN & PORTERFIELD (1956) relataram a infecção artificial de *A. aegypti* com vírus Zica utilizando membrana de pele de ratos adultos. BOORMAN (1958), também testando mecanismos de transmissão viral, utilizou *A. aegypti*, infectando-os artificialmente através de membrana de pele de rato com o vírus Uganda S.

BAR-ZEEV & SMITH (1959), ao estudarem o efeito de fatores repelentes, ofereceram a *A. aegypti* sangue citratado através de membrana constituída a partir de ceco de touro. GALUN et al (1963), demonstraram a importância de substâncias fagoestimulantes ao trabalharem com adenosinas fosfatadas e membrana “Silverlight” para alimentar *A. aegypti*. GALUN & RICE (1971) confirmaram o papel das adenosinas fosfatadas na alimentação de mosquitos ao obter ingurgitamento de espécimes alimentados com suspensão de plaquetas: corpúsculos sanguíneos que contém mais ATP (adenosina trifosfatada) que a maioria dos tecidos do corpo.

RUTLEDGE et al (1964) testaram a resposta alimentar de mosquitos a diferentes soluções nutritivas oferecidas através de um alimentador artificial, utilizando membranas de várias procedências. BEHIN (1967) comparou membranas sintéticas e naturais, dentre elas, membranas de pele de ratos e de galinhas, parafilme, bolsas para diálise e borracha fina, obtendo melhores resultados na alimentação ao empregar membrana preparada a partir de divertículo ou papo de galinha.

RUTLEDGE et al (1976) desenvolveram um sistema *in vitro* para teste de substâncias repelentes, utilizando membrana de Baudruche, no qual foram avaliadas grandes quantidades de substâncias químicas e de espécies e cepas de mosquitos. Vários fatores de influência na atração e indução da alimentação de artrópodes hematófagos foram descritos em uma revisão feita por FRIEND & SMITH (1977), tendo sido destacados como importantes aqueles relacionados à temperatura da superfície corporal, à liberação de dióxido de carbono, aos estímulos táteis, visuais e olfatórios, além da composição da dieta e da temperatura do fluido alimentar.

WETZEL (1979) descreveu o uso de membrana feita com silicone e malha de tecido para alimentação de *Glossina spp.* Ao trabalhar com alimentação de *Culicoides mississippiensis*, através de membrana de silicone reforçada, tendo como alimento sangue bovino desfibrinado e citratado, DAVIS et al (1983) verificaram que o rendimento da postura destes, quando comparado com o de fêmeas alimentadas diretamente em humanos voluntários, não apresentou diferença significativa.

Aspectos da biologia – O mosquito *A. aegypti* é uma espécie cosmopolita, de hábitos diurnos, especialmente antropofílica. Esta espécie encontra-se adaptada à vida em ambiente urbanizado, sendo frequentemente encontrada no interior de residências, utilizando com sítios para oviposição materiais manufaturados, abandonados pelo homem, ou outros utensílios que periodicamente contenham coleções de água. De acordo com McCLELLAND (1974), ocorreu fraca especiação em diferentes regiões geográficas, considerando sua adaptação a pequenas coleções de água limpa relacionadas ao ambiente doméstico. Os adultos alimentam-se de sucos vegetais e somente a fêmea necessita da realização de repastos sanguíneos para maturação de seus ovários e postura de ovos viáveis. O comportamento reprodutivo é estenogâmico, ou seja, são capazes de acasalar em pequenos espaços, o que facilita sua criação em gaiolas no laboratório sem a necessidade de procedimentos especiais para a realização da fecundação. Após a cópula, a fêmea deve realizar repastos sanguíneos previamente à postura dos ovos, ocorrendo harmonia gonotrófica, ou seja, após cada alimentação com sangue sucede-se uma oviposição. Os ovos são postos em superfícies inundáveis, geralmente pouco acima da linha d'água já existente e a eclosão das larvas não ocorre simultaneamente: poucas larvas eclodem após uma primeira imersão em água, sendo necessárias imersões subsequentes para estimular maior número de eclosões. A duração do período de desenvolvimento larval está relacionada à disponibilidade de alimentos e às condições climáticas do meio, podendo variar desde uma semana até um mês. As pupas são móveis e não se alimentam, estando o período pupal estritamente relacionado à variação de temperatura ambiental (GERBERG, 1970 e CONSOLI & OLIVEIRA, 1994).

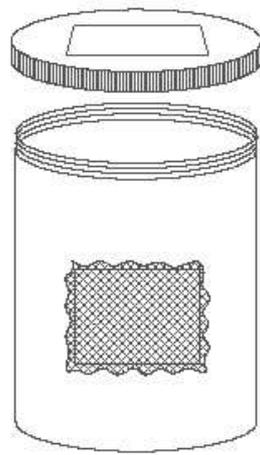
3 MATERIAIS E MÉTODOS

Localização do experimento – A etapa experimental foi realizada no Laboratório de Doenças Parasitárias do Convênio Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro e Embrapa – RJ, Km 47 da Antiga Rodovia Rio São Paulo, no Município de Seropédica, Rio de Janeiro.

Espécimes utilizados – Utilizaram-se mosquitos obtidos a partir de ovos gentilmente cedidos pelo Dr. Ricardo Lourenço, e procedentes do insetário da Fundação Instituto Oswaldo Cruz, onde colônias são mantidas durante várias gerações alimentadas diretamente em camundongos. Os procedimentos realizados para o estabelecimento de colônia estão de acordo com os indicados por GERBERG (1970). Os ovos foram transportados para o laboratório envoltos em papel de filtro, colocados em água desoxigenada e desclorada, na temperatura de aproximadamente 28 °C. Após a eclosão, as larvas foram transferidas para frascos plásticos arredondados contendo água filtrada e desclorada com uma profundidade de 10 cm a partir da lâmina d'água, onde recebiam alimento constituído por ração industrializada para gatos, sabor peixe, que era previamente triturada. A quantidade de alimento fornecida foi regulada por observação, tendo sempre o cuidado de não colocar ração em quantidade excessiva ou insuficiente. O período de desenvolvimento larval foi de dez dias, a partir de quando começaram a surgir as primeiras pupas. As pupas foram separadas das larvas remanescentes e colocadas em água filtrada e desclorada, dentro de gaiolas específicas, para que se aguardasse a emergência dos adultos. As gaiolas empregadas no experimento eram cúbicas, com dimensões de 30x30x30 cm, sendo o fundo fixo e constituído por lâmina de compensado. A parte frontal era de vidro transparente e o lado oposto, também de lâmina de compensado, possuía um orifício arredondado (aproximadamente 15 cm de diâmetro) que permitia o acesso ao interior da gaiola. Os três lados restantes foram recobertos com fina tela de pano que permitia ventilação adequada do ambiente interno. Desde o momento da emergência, as imagos recebiam como alimento solução de sacarose que era fornecida através de bolas de algodão embebidas, trocadas diariamente. A criação dos mosquitos foi realizada no interior de câmara climatizada, com temperatura e umidade controladas, $28 \pm 0,5$ °C e $80 \pm 5\%$, respectivamente, empregando fotoperiodismo de 12 horas diárias.

Aparato alimentar – O aparato alimentar utilizado neste experimento foi elaborado de acordo com as descrições de RUTLEDGE et al. (1964) e DAVIS et al. (1983), sendo constituído por um frasco para contenção dos espécimes a serem alimentados, por uma membrana constituindo a superfície de alimentação, pela fonte alimentar e por um sistema aquecedor.

A gaiola de contenção dos espécimes (Figura 1) era cilíndrica, de plástico claro, semitransparente, com dimensões de 9cm de altura e 8cm de diâmetro, no qual existiam duas janelas laterais recobertas por tela fina de pano a fim de permitir arejamento interno. O tampo, móvel, apresentava um orifício retangular de aproximadamente 2 x 6 cm, no qual foi possível encaixar o aparato contendo a fonte alimentar.



tampo móvel com orifício retangular

frasco de plástico transparente com janelas cobertas com tela

Figura 1. Gaiola de contenção

A câmara de alimentação foi constituída por uma lâmina de microscopia que tinha seus bordos preenchidos por uma camada de cola de silicone de modo a deixar uma célula em sua porção interna. Antes que essa camada de cola secasse, foi aplicada sobre a mesma a membrana de silicone, do mesmo tamanho da lâmina, de modo que se formasse no meio do sistema uma câmara na qual, após secagem devida, foi introduzido sangue para constituir a fonte alimentar (Figuras 2-a e 2-b).



membrana de silicone



cola de silicone



lâmina de vidro

Figura 2-a. Esquema de montagem da câmara de alimentação.

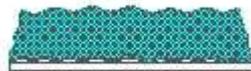


Figura 2-b. Câmara de alimentação pronta para uso.

As membranas de silicone utilizadas no presente trabalho tiveram a espessura de 0,056 mm e seguiram os padrões descritos por DAVIS et al. (1983). Como fonte alimentar, foram empregados sangue de camundongo, bovino e humano. Os animais empregados como doadores no experimento apresentavam-se em estado de higidez e tiveram seus sangues previamente avaliados, não tendo sido constatada a presença de hemoparasitas, o que poderia causar interferência nos resultados finais do teste. As coletas de sangue foram feitas imediatamente antes da alimentação (camundongos e humanos) ou, no máximo, com seis horas de antecedência (bovino), sendo que neste último caso realizou-se o resfriamento da alíquota a 10-14 °C até o momento de sua utilização, quando então foi novamente aquecido a temperatura de $37,5 \pm 1$ °C. Como anticoagulante em todos os casos foi utilizada solução estéril de citrato de sódio a 3,9%, na proporção de 1mL de solução anticoagulante para 9mL de sangue.

Para aquecimento das fontes alimentares foram empregadas garrafas plásticas do tipo usado para cultura de tecidos que foram preenchidas com água aquecida a 50 °C e colocadas sobre as câmaras de alimentação.

Procedimento alimentar – Mosquitos adultos, com idades entre 4 a 7 dias, tiveram sua alimentação com solução açucarada previamente suspendida por volta de 24 horas antes do oferecimento do repasto sanguíneo. Foram, então, transferidos para o interior dos frascos de alimentação de modo a formarem lotes constituídos por 30 fêmeas e dez machos cada.

Foram realizadas quatro repetições para cada um dos tratamentos que consistiram no oferecimento de sangue de camundongo, de bovino e de humano, através do aparato alimentar já descrito, e no lote controle que foi alimentado em hospedeiro humano voluntário.

O sangue dos diferentes hospedeiros foi inoculado no interior das câmaras de alimentação, que eram encaixadas nos orifícios existentes nos tampos dos frascos de contenção, de forma que o lado com a superfície de alimentação ficasse voltado para os mosquitos e o lado da lâmina ficasse em contato com a garrafa aquecedora que foi sobreposta ao conjunto (Figuras 3 e 4). Desta forma, evitou-se que as fêmeas viessem a se alimentar somente de plasma, o que poderia ocorrer em decorrência da hemossedimentação.

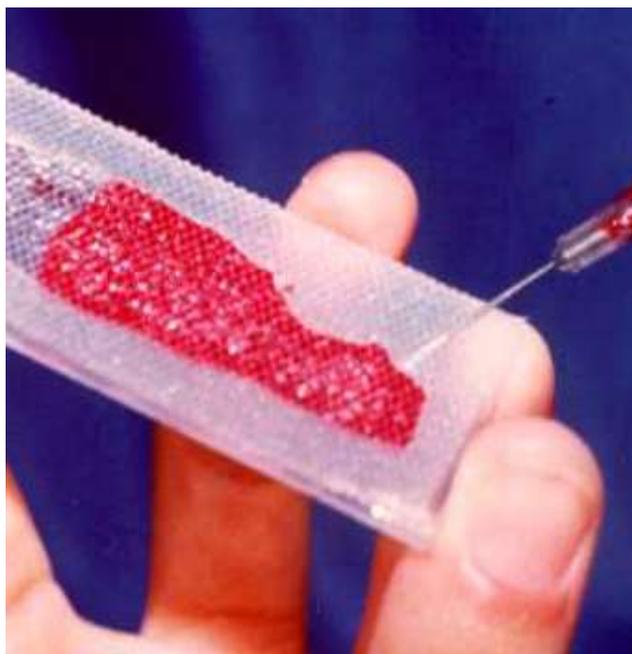


Figura 3. Preenchimento de câmara de alimentação com sangue citratado.



Figura 4. Gaiola de contenção com câmara de alimentação posicionada sobre o orifício do tampo.

O experimento foi realizado no interior de câmara climatizada, com temperatura de $28 \pm 0,5$ °C e umidade relativa de $80 \pm 5\%$. O período de alimentação foi de 20-30 minutos, findos os quais realizou-se a contagem das fêmeas ingurgitadas e seu remanejamento para novas gaiolas contendo em seu interior frascos plásticos revestidos com papel de filtro e parcialmente cheios de água, para realização da postura (Figuras 5 e 6). Os frascos foram avaliados a cada 12 horas sendo que quando se observou presença de ovos, procedeu-se a substituição do papel de filtro por um novo, mantendo-se as mesmas condições. O papel contendo a postura foi então seco para posterior contagem dos ovos, obtendo-se então a relação de número de ovos por fêmea alimentada. Quando transcorreram 24 horas sem a realização de novas posturas, as fêmeas foram descartadas.



Figura 5. Fêmea de *Aedes aegypti* em processo de ingurgitamento sugando através da membrana de silicone.



Figura 6. Mosquitos em repouso após o repasto.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi comparado o efeito do sangue de diferentes hospedeiros, oferecidos através de membrana de silicone, sobre a performance reprodutiva de *A. aegypti*. Os resultados obtidos encontram-se nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 1. Resultados obtidos na alimentação de lotes de 30 fêmeas de *Aedes aegypti*, através de membrana de silicone com sangue de diferentes hospedeiros e em humano (controle).

Tratamentos	Porcentagem de fêmeas alimentadas				Média
	I	II	III	IV	
Camundongo	16,7	30,0	23,3	20,0	22,5 b
Bovino	30,0	23,3	26,7	23,3	25,8 b
Humano	96,7	83,3	90,0	86,7	89,2 a
Controle	96,7	93,3	93,3	96,7	95,0 a

Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si ($p < 0,01$).

Tabela 2. Comparação dos resultados do número de ovos produzidos por fêmeas de *Aedes aegypti*, alimentadas através de membrana de silicone com sangue de diferentes hospedeiros.

Tratamentos	Número médio de ovos por fêmeas alimentadas				Média
	I	II	III	IV	
Camundongo	11,2	7,8	9,6	9,0	9,4 c
Bovino	8,5	12,0	10,2	11,1	10,5 b,c
Humano	14,1	13,0	12,9	13,2	13,3 a,b
Controle	15,7	15,8	13,5	16,1	15,3 a

Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si ($p < 0,01$).

Não foi aplicado sobre a membrana nenhum tipo de substância atrativa, o que a julgar pela ausência de diferenças entre o lote controle e o alimentado com sangue citratado humano, não interferiu no número de fêmeas alimentadas. O aumento de temperatura no topo da gaiola de contenção provocado pela colocação das garrafas contendo água aquecida produziu agitação dos mosquitos que passaram a realizar múltiplas cópulas, após as quais observou-se que as fêmeas pousaram sobre a superfície alimentar, testando aleatoriamente a membrana até encontrar o local adequado para ingestão de sangue. Esta característica termofílica está de acordo com o descrito por GREENBERG (1949) e, especialmente no caso da espécie estudada, parece ter sido o fator crucial para desencadeamento do processo alimentar, ou seja, aquele responsável pela atração dos espécimes até a superfície alimentar. A importância do aquecimento do sangue para garantia do ingurgitamento, foi descrita por GALUN (1967); PIPKIN & CONNOR (1968); GALUN et al. (1969).

A membrana de silicone mostrou-se eficiente para o completo ingurgitamento de fêmeas de *A. aegypti* (Fig 3-a, 3-b). Assim também foi demonstrado em trabalhos realizados por WETZEL (1979), para alimentação de moscas do gênero *Glossina*, por STONE et al. (1983) que trabalharam com *Ixodes holocyclus*, DAVIS et al. (1983) e BUTLER et al. (1984), que adaptaram a tecnologia da membrana de silicone para alimentação de uma variedade de artrópodes hematófagos, destacando suas qualidades, como aceitação por parte dos carrapatos; facilidade de produzi-la em série; textura superficial adequada para ensaios com artrópodes, o fato de poder ser reutilizada e autoclavada e de ter menor custo do que as de origem natural. DUTRA (1995), MOURA et al. (1997) e ROCHA et al. (1997) utilizaram a mesma metodologia para alimentar *Argas miniatus*, *Amblyomma cajennense* e *Rhodnius pictipes*, respectivamente. Ao contrário do que concluíram RUTLEDGE et al. (1964) ao experimentarem diferentes membranas, naturais e sintéticas, e do que é normalmente citado em literatura sobre a superioridade das membranas naturais sobre as sintéticas, constatou-se que o número de fêmeas ingurgitadas neste experimento com a membrana de silicone foi, em média, semelhante ou superior àqueles obtidos por outros autores que trabalharam também com *A. aegypti* empregando membranas naturais modificadas.

Não foram visualizadas diferenças significativas quanto à quantidade de sangue ingerida, tendo sido consideradas alimentadas aquelas fêmeas que apresentavam o abdome visivelmente dilatado. Nenhuma das fêmeas inspecionadas alimentou-se exclusivamente de plasma, o que por vezes acontece quando não se utiliza um agitador para homogeneizar o sangue oferecido artificialmente. Foram registrados o número de fêmeas ingurgitadas em cada lote, o período de pré-postura e o número médio de ovos por fêmea alimentada. Tabelas 1 e 2.

Não houve diferença significativa quanto a percentagem média de fêmeas alimentadas nos grupos controle (95%) e nos lotes alimentados em sangue citratado humano (89,2%). Esses valores estão bem acima daqueles obtidos por BISHOP & GILCHRIST (1946) que conseguiram, testando vários tratamentos, um percentual máximo de 73% de ingurgitamento de *A. aegypti* alimentados através de membrana de pele de pintos com sangue heparinizado de galinha. GALUN et al. (1963), trabalhando com membrana Silverlight, conseguiram índices de alimentação, em *A. aegypti*, de até $85 \pm 1,6\%$ adicionando tetrafosfato de adenosina à fonte alimentar. RUTLEDGE et al. (1964) ingurgitaram de 6 a 82% de fêmeas de *A. aegypti* em sangue de galinha oferecido através de membrana de Baudruche. GALUN & RICE (1971) alimentaram, em aparato artificial constituído com membrana de Baudruche, proporções de até 83% de *A. aegypti*, quando testavam o papel das plaquetas sobre a fagoestimulação.

No que concerne aos valores obtidos quando da alimentação com sangues citratados de bovino e camundongos, embora não tenham diferido entre si, ficaram bem aquém dos registrados nos outros tratamentos e nos experimentos acima citados, tendo ficado em 25,8% e 22,5%, respectivamente. Estes resultados confirmam a preferência da espécie pelo sangue humano.

Embora o alimento tenha ficado à disposição das fêmeas por um período de aproximadamente 30 minutos, observou-se que a maioria dos espécimes ingurgitava-se nos 15 minutos seguintes ao início do procedimento alimentar.

Os períodos de pré-postura não variaram nos limites de tempo observados, tendo sido sempre de três dias para todos os tratamentos. Os ovos obtidos foram posteriormente imersos em água, tendo sido observada eclosão das larvas de forma homogênea, independente do tipo de sangue ingerido.

O número médio de ovos por fêmeas não variou significativamente entre os lotes. A descalcificação do sangue resultante da adição do citrato de sódio (agente quelador de cálcio) para prevenir a coagulação não diminuiu as qualidades nutritivas do sangue utilizado quando comparados os efeitos sobre a produção de ovos. Esta observação está de acordo com a realizada por WOKE (1937) ao comparar os efeitos de diferentes tratamentos sobre a

oviposição de *A. aegypti*. Contudo, os resultados de WOKE (1937) superaram os obtidos neste experimento pois a média de postura por ele obtida quando da utilização de sangue de coelho adicionado de 0,4% de citrato de sódio foi de 110,7 ovos por fêmea, enquanto que a média obtida no grupo controle do presente ensaio não atingiu 16 ovos por fêmea.

5 CONCLUSÕES

Foi possível o estabelecimento de colônia de *A. aegypti* empregando-se sistema de alimentação artificial constituído por membrana de silicone.

Houve preferência pelo sangue humano, o que confirmou o caráter antropofílico da espécie.

A utilização de citrato de sódio como substância anticoagulante não interferiu no número de fêmeas alimentadas ou mesmo na produção de ovos.

O caráter termofílico foi determinante para a realização do repasto, visto que não se empregou nenhum tipo de substância fagoestimulante sobre a membrana.

A utilização do sistema descrito facilita a investigação sobre o ciclo biológico de *A. aegypti* pois permite escolher e padronizar variáveis que podem influenciar sua performance alimentar, tais como tipo e temperatura do alimento, substâncias atrativas e repelentes, fagoestimulantes, tipos de membrana, entre outros.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAR-ZEEV, M. & SMITH, C.N. 1959. Action of repellents on mosquitoes feeding through treated membranes or on treated blood. Jour. Econ. Ent., 52:263-267.
- BEHIN, R. 1967. Artificial feeding apparatus for mosquitoes. Mosquito News. 27:87-90.
- BISHOP, A. & GILCHRIST, B.M. 1944. Method for collecting sporozoites of *Plasmodium gallinaceum* by feeding infected *Aedes aegypti* through animal membranes. Nature. 3893:713-714.
- BISHOP, A. & GILCHRIST, B.M. 1946. Experiments upon the feeding of *Aedes aegypti* through animal membranes with a view to applying this method to the chemotherapy of malaria. Parasitology, 35:85-100.
- BOORMAN, J.P.T. 1958. Transmission of Uganda S virus by *Aedes (Stegomyia) aegypti* LINN. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 52:383-388.
- BOORMAN, J.P.T. & PORTERFIELD, J.S. 1956. A simple technique for infection of mosquitoes with viruses. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 50:238-242.
- BUTLER, J.F.; HESS, W.R.; ENDRIS, R.G. & HOLCHER, K.H. 1984. *In vitro* feeding of *Ornithodoros* ticks for rearing and assessment of diseases transmission pp. 1075-1081. In D.A. Griffiths and C.E. Bowman (ed.), Acarology VI, Vol 2. Ellis Horwood, West Sussex, England.
- CONSOLI, R.A.G.B. & OLIVEIRA, R.L. 1994. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Rio de Janeiro: Fiocruz. 228p.
- DAVIS, E.L.; BUTLER, J.F.; ROBERTS, R.H.; REINERT, J.F. & KLEINE, D.L. 1983. Laboratory blood feeding of *Culicoides mississippiensis* (Diptera: Ceratopogonidae) through a reinforced membrane. J. Med. Entomol. 20:177-182.
- DUTRA, A.E. 1995. Alimentação artificial de *Argas (persicargas) miniatus* (Koch, 1844) (Acari:Argasidae) através de membrana de silicone. Tese de Mestrado. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. 42 p.
- FRIEND, W.G. & SMITH, J.J.B. 1977. Factors affecting feeding by bloodsucking insects. Ann. Rev. Entomol. 22:309-331.
- GALUN, R. 1967. Feeding stimuli and artificial feeding. Bull. Wld. Hlth. Org. 36:590-593.
- GALUN, R. & RICE, M.J. 1971. Role of blood platelets in haematophagy. Nature New Biology. 233:110-111.
- GALUN, R.; AVI-DOR, Y. & BAAR-ZEEV, M. 1963. Feeding response in *Aedes aegypti*: stimulation by Adenosine Triphosphate. Science. 142:1674-75.
- GALUN, R.; KOSOWER, E.M. & KOSOWER, N.S. 1969. Effect of methyl phenyldiazencarboxylate (Azooter) on the feeding behavior of bloodsucking invertebrates. Nature. 224-182.
- GERBERG, E.J. 1970. Manual for mosquito rearing and experimental techniques. Amer. Mosquito Control Assoc. Bul. 5:1-109.
- GREENBERG, J. 1949. A method for artificially feeding mosquitoes. Mosquito News. 9:48-50.
- KEMP, D.H.; KOUDSTAAL, D.; ROBERTS, J.A. & KERR, J.D. 1975. Feeding of *Boophilus microplus* larvae on a partially defined medium through thin slice of cattle skin. Parasitology. 70:243-254.
- LEHANE, M.J. 1991. Biology of blood-sucking insects. London: Harper Collins Academic. 228p.
- MACDONALD, E. & SCOTT, J.A. 1952. Methods of feeding tropical rat mites on blood and other fluids through a membrane. Exp. Parasitol. 1:283-290.

- McCLELLAND, G.A.H. 1974. A worldwide survey of variation in scale pattern of the abdominal tergum of *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). Trans. R. Entomol. Soc. London, 126:239-259.
- MOURA, S.T.; FONSECA, A.H.; FERNANDES, C.G. & BUTLER, J. 1997. Artificial feeding *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) through silicone membrane. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 92:545-548.
- OGSTON, C.W. & YANOVSKY, A.D. 1982. An improved artificial feeder for bloodsucking insects. J. Med. Entomol. 19:42-44.
- PIERCE, A.E. & PIERCE, M.H. 1956. A note on the cultivation of *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Ixodidae: Acarina) on the embrionated hen egg. Aust. Vet. J. 32:144-146.
- PIPKIN, A.C. & CONNOR, J.C. 1968. A temperature controlled feeding apparatus for hematophagous arthropods. J. Med. Ent. 5:507-509.
- RODHAIN, J.; PONS, C.; VANDENBRANDEN, J. & BEQUAERT, J. 1912. Contribution au mecanisme de la transmission des trypanosomes par les glossines. Arch. Schiffs-u. TROPEN-Hyg. 16:732-739.
- ROCHA, D.S.; FONSECA, A.H.; COSTA, F.A.; JURBERG, J. & GALVÃO, C. 1997. Desenvolvimento de *Rhodnius pictipes* Stal, 1872 (Hemiptera, Reduvidae, Triatominae) alimentado através de membrana de silicone e em camundongos. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 92:553-558.
- ROSS, R.W. 1956. A laboratory technique for studying the insect transmission of animal viruses, employing a bat-wing membrane, demonstrated with two african viruses. J. Hyg. 54:192-200.
- RUTLEDGE, L.C.; WARD, R.A. & GOULD, D.J. 1964. Studies on the feeding response of mosquitoes to nutritive solutions in a new membrane feeder. Mosquito News. 24:407-419.
- RUTLEDGE, L.C.; MOUSSA, M.A. & BELLETTI, C.J. 1976 An *in vitro* blood-feeding system for quantitative testing of mosquito repellents. Mosquito News. 36:283-293.
- ST. JOHN, J.H.S.; SIMMONS, J.S. & REYNOLDS, F.H.K. 1930. Transmission of dengue virus from infected to normal *Aedes aegypti*. Amer. J. Trop. Med. 10:23-24.
- STONE, B.F.; COMMINS, M.A. & KEMP, D.H. 1983. Artificial feeding of the Australian paralysis tick *Ixodes holocyclus* and collection of paralyzing toxin. Int. J. Parasitol. 13:447-454.
- WETZEL, H. 1979. Artificial membrane for *in vitro* feeding of piercing-sucking arthropods. Entomol. Exp. Appl. 25:117-119.
- WOKE, P.A. 1937. Effects of various blood fractions on egg production of *Aedes aegypti* Linn. A. J. Hyg. 25:372-380.