



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS - UEA
ESCOLA NORMAL SUPERIOR
CURSO DE LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

JÚLIA MELISSA DA ROCHA ALBUQUERQUE

PRÁTICAS METODOLÓGICAS PARA COLONIZAÇÃO DE *Haemagogus janthinomys*
Dyar, 1921 (Diptera: Culicidae)

Manaus –AM

2023

JÚLIA MELISSA DA ROCHA ALBUQUERQUE

PRÁTICAS METODOLÓGICAS PARA COLONIZAÇÃO DE *Haemagogus janthinomys*
Dyar, 1921 (Diptera: Culicidae)

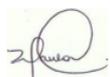
Trabalho de Conclusão de Curso de graduação em Ciências Biológicas da Universidade do Estado do Amazonas – UEA, como requisito para a obtenção do Grau de Licenciada em Ciências Biológicas.

Orientador(a): Dra. Maria Paula Gomes Mourão

Coorientador(a): Dra. Bárbara Aparecida Chaves

Aprovado em: 01/03/2023

ASSINATURA DOS MEMBROS DA BANCA AVALIADORA



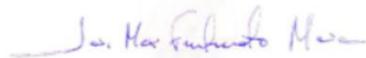
Prof(a). Orientador(a)



1º Avaliador(a)



2º Avaliador(a)



3º Avaliador(a)

Manaus –AM

2023

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Sistema Integrado de Bibliotecas da Universidade do Estado do Amazonas.

J94pp Albuquerque, Júlia Melissa da Rocha
Práticas metodológicas para colonização de *Haemagogus janthinomys* Dyar, 1921 (Diptera: Culicidae) / Júlia Melissa da Rocha Albuquerque. Manaus : [s.n.], 2023.
29 f. : il. ; 29 cm.

TCC - Graduação em Ciências Biológicas - Licenciatura
- Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2023.

Inclui bibliografia

Orientador: Mourão, Maria Paula Gomes

Coorientador: Chaves, Bárbara Aparecida

1. *Haemagogus*. 2. mosquitos. 3. colonização. 4. Febre Amarela Silvestre. I. Mourão, Maria Paula Gomes (Orient.). II. Chaves, Bárbara Aparecida (Coorient.). III. Universidade do Estado do Amazonas. IV. Práticas metodológicas para colonização de *Haemagogus janthinomys* Dyar, 1921 (Diptera: Culicidae)

Elaborado por Jeane Macelino Galves - CRB-11/463

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha irmã e meus pais e meu namorado pelo incentivo nas coisas que faço, suporte, amor, carinho e por aturarem eu ser tão rabugenta. Principalmente papai que quase nunca me julga e quando não quero saber de nada sobre ciência fica tagarelado sobre os impactos antrópicos ao meio ambiente.

Agradeço aos meus amados cachorrinhos e gatinhos que me trouxeram muito amor em anos que foram tão sombrios para muitas pessoas. Especialmente à Coquinha, Grace, Bolinha, Coquinho e Chihiro; sinto falta de vocês todos os dias.

Agradeço à Universidade do Estado do Amazonas, aos meus professores e orientadores, à FAPEAM pelas bolsas de meus projetos e a todos que contribuíram de forma indireta para esse trabalho.

Muito obrigada.

RESUMO

Mosquitos (Diptera: Culicidae) são insetos de notável importância para a saúde pública, em parte devido à transmissão de arbovírus de importância médica, como dengue, chikungunya e zika. Alguns culicídeos do gênero *Haemagogus* são vetores da febre amarela silvestre no Brasil. Por esta razão, estudos para melhorar as técnicas de criação e acasalamento em laboratório são de grande importância para algumas espécies como *Haemagogus janthinomys* e *Haemagogus leucocelaenus* devido ao desconhecimento sobre a competência vetorial. O presente trabalho teve como objetivo desenvolver e testar diversas técnicas que aprimorem os métodos existentes de criação de *Haemagogus janthinomys*. Mosquitos fêmeas adultas foram coletadas em uma árvore caída na Reserva Florestal Adolpho Ducke, no norte de Manaus, Amazonas, Brasil (2,9633° S, 59,9228° W), entre agosto de 2021 e março de 2022, com auxílio de rede e aspirador entomológico. Os mosquitos foram colocados em uma gaiola de papelão e adicionados de algodão com água até serem transferidos para um insetário no Centro de Entomologia da Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado, para início das atividades de criação. Estes incluíram alimentação de sangue, oviposição em diferentes tubos e eclosão em diferentes meios. Os resultados indicam que 42%, 51% e 7% das fêmeas se alimentaram, não alimentaram e morreram, respectivamente, durante o processo de alimentação; a viabilidade e eclosão foi de 82,8%, mas apenas 17,5% dos ovos depositados se desenvolveram até a fase adulta; os resultados de análise de oviposição e influência dos meios de submersão não apresentaram diferenças estatísticas significativas, enquanto a análise de sobrevivência indicou que as fêmeas sobrevivem mais em tubos controle.

Palavras-chave: mosquitos; *Haemagogus*; colonização; febre amarela silvestre.

ABSTRACT

Mosquitoes (Diptera: Culicidae) are notable insects of public health importance in the Americas, partly due to their transmission of medically important arboviruses such as dengue, chikungunya and Zika. Some Culicidae of the genus *Haemagogus* are vectors of sylvatic yellow fever in Brazil. For this reason, studies to improve laboratory rearing and mating techniques are of great importance for certain species as *Haemagogus janthinomys* and *Haemagogus leucocelaenus* due the lack of knowledge about vector competence. The present work aims to develop and test several techniques that improve upon existing methods for rearing *Haemagogus janthinomys*. Adult female mosquitoes were collected at a treefall at the Adolpho Ducke Forest Reserve in north of Manaus, Amazonas, Brazil (2.9633° S, 59.9228° W), between august 2021 and march 2022 using an entomological net and mouth aspirator. Mosquitoes were placed in a cage and provided with water until transferred to an insectary at the Entomology Center of Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado to begin rearing activities. These included, blood feeding, oviposition and hatching. The results indicate that 42%, 51% and 7% of females fed, did not feed and died during the feeding process, respectively; the viability and eclosion of 82.8% and 17.5 % of the deposited eggs and development until the adult stage, respectively. The results of oviposition analysis and influence of submersion media did not influence significant statistics, while the survival analysis indicated that females survived longer in control tubes.

Key words: mosquitos; *Haemagogus*; colonização; febre amarela silvestre.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
1.1 MOSQUITOS (DIPTERA: CULICIDAE).....	9
1.2 O GÊNERO <i>HAEMAGOGUS</i>	10
1.3 REVISÃO DA LITERATURA	11
2. JUSTIFICATIVA	13
3. OBJETIVO GERAL	14
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
4. MATERIAL E MÉTODOS	14
4.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	14
4.2 COLETA EM CAMPO.....	15
4.3 CONDICIONAMENTO DE FÊMEAS SILVESTRES.....	15
4.4 ALIMENTAÇÃO SANGUÍNEA.....	16
4.5 OVIPOSIÇÃO DE FÊMEAS SILVESTRES.....	17
4.6 INCUBAÇÃO DOS OVOS.....	17
4.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	17
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
5.1 TAXA DE SUCESSO EM ALIMENTAÇÃO.....	18
5.2 VIABILIDADE DE OVOS.....	19
5.3 TAXA DE ECLOSÃO E PRIMEIRA GERAÇÃO.....	20
5.4 ANÁLISE DE OVIPOSIÇÃO EM TUBO CONTROLE E ‘T’.....	20
5.5 ANÁLISE DE SOBREVIVÊNCIA EM TUBO CONTROLE E ‘T’.....	21
5.6 ANÁLISE DA ECLOSÃO LARVAL EM RELAÇÃO À ÁGUA DESTILADA E INFUSÃO DE BAMBU.....	22
6. CONCLUSÃO	23

7. REFERÊNCIAS..... 24

1.INTRODUÇÃO

1.1 Mosquitos (Diptera: Culicidae)

A ordem Diptera engloba moscas e mosquitos, ambos possuindo apenas um par de asas funcionais membranosas e um par de asas atrofiadas, os balancins. Possui ampla distribuição biogeográfica, se estendendo até a Antártica. É capaz de colonizar vários habitats, da fase larval aquática até a terrestre nos mais variados estratos ambientais (Courtney e Merrit, 2009). Atualmente, com a revisão e validação na literatura, estima-se que haja aproximadamente 3550 espécies de culicídeos no mundo, com ocorrência de 535 espécies para o Brasil, distribuídas em 23 gêneros (WRBU). Os mosquitos possuem ciclo biológico holometábolo, ou completo, dividido em quatro estágios: ovo, larva, pupa e adulto, com cabeça incluindo um par de antenas, olhos compostos, palpos maxilares e uma probóscide picadora-sugadora. O tórax possui três seguimentos, sendo que cada um abriga um par de pernas; tendo, no segundo seguimento há o par de asas funcionais e no terceiro seguimento os balancins (Consoli e Lourenço-de-Oliveira, 1994). A preferência alimentar é a sanguínea, porém algumas espécies são zoofílicas, picando somente animais, outras são antropofílicas e as generalistas podem picar tanto animais como seres humanos. Sua alimentação é baseada no repasto de açúcar tanto para macho como para fêmea, porém essa última possui ainda hábito hematófago para estímulo à oviposição e desenvolvimento dos ovos (Forattini, 2002). Os mosquitos se tornaram amplamente estudados devido ao hábito alimentar hematófago. Gêneros como *Aedes* Meigen, 1818, *Haemagogus* Dyar, 1921, *Culex* Linnaeus, 1758, e *Anopheles* Meigen, 1818 são os vetores de arboviroses como a dengue, febre amarela, chikungunya e protozoários como do gênero *Plasmodium* autor, sendo importantes transmissores no ambiente urbano (WRUB, 2017).

McMichael e Woodruff (2008) apontam que a investigação de doenças infecciosas é imprescindível e a interferência das ações antrópicas, a exemplo o crescimento demográfico e mudanças no clima oferecem margem de movimentação populacional e, conseqüentemente, brechas para a atuação desses mosquitos vetores, acarretando o risco de transmissão de arboviroses, seja causando um surto inicial ou a reintrodução dessas e outras doenças.

A escolha do local para oviposição, dispersão pluvial ou a falta dela, com estações

mais secas e alterações nas mudanças climáticas são condições que afetam a sobrevivência dos ovos, estes são sensíveis ao ambiente, podendo prolongar sua viabilidade por um ano e emergindo assim que as condições externas propiciem o contato hídrico para a eclosão e continuação das demais ecdises até a fase de adulto (Consoli e Lourenço-de-Oliveira 1994; Balthazar, 2018).

1.2 O gênero *Haemagogus*

Os mosquitos do gênero *Haemagogus* são amplamente distribuídos, ocorrendo desde o sul da América Central até a Argentina, possuindo 28 espécies conhecidas, algumas espécies possuem capacidade de transmissão de arboviroses como a febre Mayaro, febre amarela entre outras (MARCONDES e ALENCAR, 2010; TRAPIDO e GALINDO, 1951). Dégallier *et al.* (2006) descreveu que na Amazônia, os surtos epizooticos e epidemias de Febre Amarela foram associados a estações chuvosas, onde há maior densidade de indivíduos. Esses vetores possuem hábito diurno, e a alimentação se dá entre 9:00 e 16:00 horas, principalmente na copa das árvores (MARCONDES, ALENCAR e GUIMARÃES, 2010).

Os ambientes de repouso e alimentação são dentro de floresta primária ou secundária e as fêmeas depositam seus ovos em lâminas aquáticas em ocos de árvores, cascas de coco, entrenós de bambus e bromélias, (ARNELL, 1973; CHAVERRI, 2009). Os ovos de *Haemagogus* possuem característica de resistirem por longo tempo, eclodindo apenas na estação mais chuvosa do ano, diferentemente dos ovos de outros Aedini, que se comportam de forma diferente a diversos estímulos externos, o que se caracteriza a estratégia para sobrevivência dos mosquitos em criadouros passíveis de várias inundações (ANDREADIS, 1990). Os machos dificilmente são coletados em campo por não serem atraídos com iscas ou armadilhas, já os “criadouros” também são de difícil acesso por estarem em estratos diferentes (HOVANITZ, 1946). Fatores biológico como a luz, umidade, temperatura e distribuição de chuvas afetam a população de culicídeos, para os *Haemagogus*, a oxigenação pode interferir na eclosão de ovos e ciclo de vida desses insetos (De Kruijf, 1973; Silva-Inácio, 2020)

A manutenção de *Haemagogus janthinomys* em laboratório apresenta uma problemática realidade, uma vez que o vetor possui traços fisiológicos e comportamentais que dificultam sua criação, a exemplo está a dificuldade de reprodução em gaiolas (Hovanitz, 1946). A oviposição ocorre em corpos de água de buracos de árvore e bambu (Arnell, 1973; Marcondes, Alencar e Guimarães, 2010; Yanovik *et al.*, 2006) e a consequência desse hábito é observável na tolerância ao ressecamento e ao mecanismo de eclosão larval em “períodos”

(Alencar *et al.*, 2008, 2014). A eclosão requer ciclos de imersão e ressecamento, que por sua vez implicam na difícil obtenção de um grande número de larvas, embora esse dinamismo possa ser parcialmente contornado. (Alencar *et al.*, 2008; Silva-Inacio *et al.*, 2020). Outrossim, estudos de infecção vetorial e transferência de patógenos, além de sobrevivência já foram executados com F₁ de fêmeas coletadas em campo (Bates, 1945). No entanto, após estudos de Hovanitz (1946), pouco progresso com a colonização da espécie para além da primeira geração foram desenvolvidos em razão da relutância dos mosquitos em copular dentro de gaiolas, as tentativas de cópula serem mal sucedidas (Galindo, Rodaniche e Trapido, 1956; Bates, 1945; Hovanitz, 1946) ou muito difíceis de se operar (Degallier *et al.*, 2006; Waddell e Kumm, 1948; Vasconcelos *et al.*, 1997).

Figura 1: Fêmea do gênero *Haemagogus*.



Fonte: David Reynoso – Nayarit, México.

1.3 Revisão da literatura

Apesar de ser um gênero de importância médica, pouco se sabe sobre a ecologia de *Haemagogus*, devido à dificuldade de se encontrar os locais de alimentação e repouso, além disso, estudos relacionados com a reprodução da espécie *Haemagogus janthinomys* se mostram carentes, devido ao fato de ser eurigâmica, não copulando em espaços fechados (Hovanitz, 1946), reforçando necessidade de um método alternativo para copulação e comparação à sua taxa de inseminação no tocante aos espécimes silvestres.

Oliva *et al* (2012) realizaram experimentos com mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*, investigando os mecanismos de transferência de esperma em várias situações.

Apontaram uma indicação à estratégia sexual do macho das espécies no período de acasalamento. Cinco etapas foram desenvolvidas, a saber: cópula de machos virgens e sucesso de inseminação; dinâmica da transferência de espermatozoides no trato reprodutivo feminino; transferência de sêmen em fêmeas copuladas uma ou duas vezes; fertilidade de fêmeas copuladas duas vezes e habilidade na inseminação após várias cópulas sequenciais. Os resultados determinaram que o sucesso de acasalamento seguiu o mesmo padrão para machos estéreis e não estéreis, embora os primeiros inseminassem significativamente menos as fêmeas. O sangue é um componente fundamental para a estimulação à maturação de ovos. As fêmeas hematófagas são especialistas com dois específicos apetites: proteína e carboidratos com a utilização de distintos processos fisiológicos. *Aedes aegypti*, por exemplo, possuem demandas alimentares relacionadas à valor nutricional. Embora carboidratos obtidos do néctar vegetal sejam suficientes para a energia metabólica, a proteína obtida do sangue do hospedeiro é requerida (Duvall *et al.*, 2019). Culicídeos como o *Aedes aegypti* obtêm do repasto sanguíneo em hospedeiros vertebrados e integram pistas sensoriais como dióxido de carbono (CO₂), calor e odor na localização das vítimas (Dekker *et al.*, 2005; Liu & Vosshall, 2019; McMeniman *et al.*, 2014; Takken e Kline, 1989). Para a obtenção de nutrientes na alimentação, fêmeas de *Aedes aegypti* se inserem em um âmbito anatômico e comportamental.

Há uma relação na alimentação de néctar e sangue, entre eles: ligação com o trato digestivo, o tamanho da “refeição”, etc (Gordon e Lumsden, 1939; Trembley, 1952). Duty (1981) já enfatizava a dificuldade na colonização de *H. janthinomys* devido à falta de um método simples de alimentação. Algodão e alimentadores de membrana eram utilizados para a transferência de sangue infectado a *Haemagogus equinus* Theobald, 1903 e *Haemagogus leucocelaenus* Dyar e Shannon, 1924, enquanto para *H. janthinomys* Dyar, 1921 não está claro se a alimentação será imediata em camundongos, esses que já foram utilizados em estudos de competência vetorial (Bates, 1946; Bates e Roca-Garcia, 1945). Várias espécies de macacos neotropicais haviam sido utilizadas na alimentação de *H. janthinomys* (Bates e Roca-Garcia, 1945a, 1945b, 1946a, 1946b), além de voluntários humanos vacinados contra febre amarela, todavia não foram métodos adequados para manutenção a longo prazo (Mondet, 1997).

Pesquisas laboratoriais em *Haemagogus leucocelaenus* demonstraram resistência dos ovos em condições desfavoráveis, como o período de seca, assim como os gêneros *Aedes* Meigen, 1818, *Psorophora* Rubineau-Desvoidy, 1827, que completam todo seu estágio larval em inundação, são suscetíveis a ambientes com picos e quedas de umidade e dessecação,

aprimorando o sucesso reprodutivo e ampla distribuição biogeográfica. Denlinger e Armbruster (2014), apontam que a quiescência é a dormência induzida que ocorre devido ao ambiente desfavorável, terminando imediatamente uma vez que essas condições se tornem favoráveis. Diferente de Campos e Sy (2006), onde a diapausa é definida como uma dormência hormonalmente programada, a qual não finaliza imediatamente após as condições favoráveis. (Vinogradova, 2007).

Tátilla-Ferreira (2017) avaliou o ciclo de vida de *Haemagogus leucocelaenus* com ênfase em observar o efeito cumulativo de imersões em 875 ovos coletados, em dois experimentos. Os testes mostraram um declínio de eclosões ao longo de 11 imersões, com sucesso na primeira (15%), sexta (10%), segunda e sétima (ambas 4%). De 875 ovos, 323 (36.9%) eclodiram. No segundo experimento, o pico de eclosão ocorreu na primeira imersão, com taxa de 15% de ovos eclodidos, seguido pela segunda (2%), e quinta (1%). Foi observado que após a quinta e sétima imersões, a proporção de ovos eclodidos caiu abruptamente. Ao longo de 20 larvas monitoradas até o estágio adulto, uma morreu no terceiro e outra no quarto instar. As 18 larvas restantes completaram seu ciclo de vida em um período entre 9 e 11 dias.

Os experimentos realizados por Alencar *et al.*, (2014) mostram taxa de viabilidade da eclosão de ovos sendo de 36.9%. Embora a primeira imersão tenha demonstrado resultados impressionantes, eclosões também ocorreram para as demais imersões em *Haemagogus leucocelaenus* (Alencar *et al.*, 2014) *Haemagogus janthinomys* (Alencar *et al.*, 2008). Galindo *et al* (1951) demonstra que ovos de *Haemagogus* são capazes de resistir a longos períodos de seca por até 7 meses, o que permite a ocorrência de eclosão durante períodos de chuvas irregulares.

A eclosão de ovos de *Haemagogus* é determinada por inúmeros fatores, como a variação sazonal e o oxigênio nos ambientes aquáticos (Forattini, 2002). Segundo Galindo *et al* (1951), no Panamá, duas semanas em condições de umidade foram necessárias para o desenvolvimento de *Haemagogus janthinomys*, porém Alencar *et al* (2008) testou que o desenvolvimento de mosquitos da mesma espécie durou em média apenas $10,4 \pm 0,70$ dias. Nota-se que o desenvolvimento rápido do ciclo de vida poderia implementar a transmissão de febre amarela, uma vez que um ciclo mais curto tende a aumentar a densidade do vetor.

2. JUSTIFICATIVA

Algumas espécies do gênero *Haemagogus* são considerados vetores de arbovirose.

Esses mosquitos podem ser encontrados em ambientes peri-urbanos e silvestres. O monitoramento da circulação de espécies desses gêneros é importante para o entendimento epidemiológico de arboviroses como a febre amarela. Ainda não há conhecimento suficiente disponível sobre a susceptibilidade desse gênero de mosquito, por exemplo, ao recém-chegado zika vírus, somado a outras arboviroses emergentes, tão necessárias para estudo de controle dessas doenças.

A colonização desses mosquitos em condições de laboratório é de grande interesse científico, uma vez que pode vir a dispor de parâmetros e padrões relativos ao ciclo de vida e demais aspectos intrínsecos da espécie, viabilizando outros estudos investigativos, como o próprio caráter infeccioso de vírus patogênicos, além de dados a respeito da taxonomia e ecologia.

3. OBJETIVO GERAL

Testar técnicas para a colonização ou criação de *Haemagogus janthinomys* em ambiente controlado.

3.1 Objetivos específicos

- Registrar a alimentação de *H. janthinomys* a partir de um método alternativo;
- Indicar a viabilidade de ovos depositados;
- Comparar métodos de oviposição em tubo controle e tubo ‘T’;
- Descrever a taxa de eclosão larval em água destilada e infusão de bambu.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Considerações éticas

Considerações éticas: este projeto cumpriu alguns do intitulado “Transmissão de Zika vírus e outros arbovírus entre hospedeiros silvestres e urbanos” submetido e aprovado no SISBIO sob processo N° 57003-2 e no CEUA da FMT-HVD sob numeração 003188/2017.

4.2 Coleta em campo

A pesquisa compõe caráter descritivo, investigando variáveis ao longo de toda a sua realização. As coletas de mosquitos foram realizadas ao norte de Manaus, Amazonas, dentro da Reserva Florestal Adolpho Ducke, coordenadas 2.9633° S, 59.9228° W, utilizando de rede e sugador entomológico no período de agosto de 2021 a março de 2022, sendo estabelecida uma vez por semana no período de 10:00 da manhã até 15:00 da tarde. Ao término, os

mosquitos capturados foram condicionados em gaiolas de papelão 16 x 19,5 cm com algodão embebido em água e direcionados ao insetário do Centro de Entomologia da Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado.

Figura 2: Local de coleta e acondicionamento de *Haemagogus janthinomys*.



Fonte: Albuquerque, 2022.

4.3 Condicionamento de fêmeas silvestres

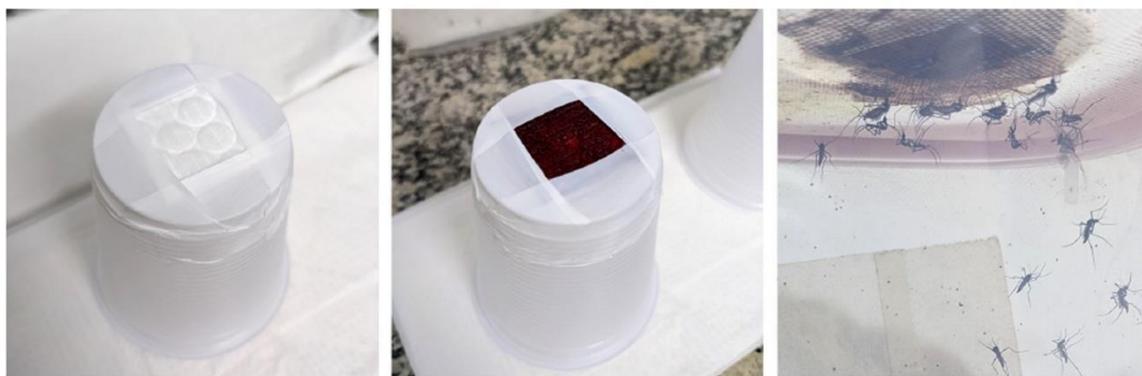
Após a coleta, os mosquitos obtidos foram depositados em gaiolas de plástico, 15 x 15 cm, com redes de tecido tipo tule, tamanho 19 x 40 cm, modificando quando necessário, acrescidas de algodões com solução açucarada a 10% e água mineral que foram trocados diariamente. Os experimentos se deram em laboratório climatizado, com ciclos de 12 horas de claro-escuro, havendo mudanças às 6:00 e 18:00 horas diariamente; temperatura de 26 °C (\pm 1°C) e umidade relativa entre 70-80% por meio de ar condicionado.

4.4 Alimentação sanguínea

A alimentação das fêmeas parentais foi realizada uma vez que a alimentação sanguínea é de suma importância para o desenvolvimento dos ovos no trato reprodutivo (Hurd, Hogg e Renshaw, 1995). A alimentação foi realizada dois dias após as coletas. A metodologia seguida foi a de Hendy *et al* (2022), onde foi coletado sangue de voluntários em tubos de heparina (9 mL) por um técnico capacitado, seguindo a norma e aprovação do conselho de ética para o desenvolvimento desse trabalho, nº 003188/2017 da Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado. O sangue coletado foi usado imediatamente ou refrigerado com 4 dias

de antecedência para seu posterior uso. Inicialmente, foram preparados dois copos plásticos de 180 mL com discos de algodão cortados (2 x 2 cm) grudados com fita Teflon em seu fundo. Em seguida, pipetou-se 2 mL do sangue coletado já aquecido a 37°C em banho maria no algodão até saturá-lo por completo. Os copos alimentadores foram então invertidos em cima da gaiola com fêmeas, essas que tiveram sua alimentação açucarada interrompida previamente no anoitecer anterior. Os copos foram preenchidos com 100 mL de água a aproximadamente 45°C. A água no copo foi trocada uma vez tendo atingido temperatura abaixo de 36°C, sendo então aquecida novamente caso fosse necessário. A alimentação teve duração de aproximadamente uma hora e as fêmeas parcial ou completamente engorgitadas foram separadas e transferidas para outra gaiola identificada de 5 a 6 dias, dessa vez já com algodão embebido em solução para manutenção durante esse período.

Figura 3: Repasto sanguíneo pelo método de copos.



Fonte: Hendy, 2022.

4.5 Oviposição de fêmeas silvestres

Em sequência, as fêmeas alimentadas foram separadas individualmente em tubos falcon para postura de ovos até sua morte, sendo feita troca diária de solução açucarada. Dois tipos de tubo foram utilizados, o vertical e uma adaptação do tubo de Mondet, chamado de tubo 'T' (Mondet, 1997). Os dois tubos são de material plástico poliestireno; o vertical mede cerca de 5,5 cm de diâmetro e 8 cm de altura e o horizontal, 3x6 cm, com uma projeção lateral de aproximadamente 4 cm. O tubo vertical é fechado na porção superior com tule e internamente é revestido por papel de filtro medindo 8 cm de altura, assim como um disco de papel filtro de 27 mm de diâmetro posto sobre chumaço de algodão embebido em água destilada para a manutenção da umidade. A constituição do tubo com projeção horizontal é

similar, contendo revestimento de papel filtro na porção horizontal. Dentro desse tubo é acrescentada a água destilada até cerca de 1,5 cm de altura. A atividade de oviposição foi acompanhada diariamente até a morte da fêmea, sendo as datas de individualização em tubo, quantidade de ovos e morte de fêmeas, registradas em planilha no programa Microsoft Excel. Somado a isso, a identificação taxonômica foi realizada por especialista usando as chaves de Arnell (1973), Consoli (1994) e Forattini (2002).

Figura 4. Tubos de oviposição vertical e horizontal 'T'.



Fonte: Albuquerque, 2022.

4.6 Incubação dos ovos

Os ovos removidos foram analisados em microscópio estereoscópico modelo Stemi SV 6 Zeiss para contagem total e descarte de ovos inviáveis, que se apresentavam morfológicamente colapsados. Após a verificação, foi feita separação randômica de ovos para submersão em infusão de bambu e água destilada. Foram transferidos para potes de vidro (altura 5,5 cm, diâmetro 7 cm, capacidade de 150 ml) com 100 ml de infusão de folhas de bambu (folhas de bambu e água destilada, proporção 1:1 em uma garrafa pet com capacidade de 2 L); para a submersão em água destilada, foram utilizados 100 ml e uma quantidade ínfima de fermento biológico instantâneo marca Fleischmann (AB Brasil Indústria e Comércio de Alimentos Ltda, São Paulo, Brasil) para a alimentação das larvas durante seu desenvolvimento. Houve monitoramento diário do ciclo de desenvolvimento, com todos os ínstares registrados em planilha do Excel. Ao passarem para estágio de pupa, essas foram transferidas para potes de vidro (tamanho 5,5 cm de altura e 7 cm de diâmetro) dentro de

gaiolas de plástico identificadas, vedadas com tecido tule e algodão embebido em solução açucarada a 10% até a fase adulta, onde os mosquitos da primeira geração foram mantidos para tabulação.

Figura 5. Imersão de ovos e gaiolas com adultos de *H. janthinomys*.



Fonte: Albuquerque, 2022.

4.7 Análises estatísticas

Todos os dados foram tabulados em planilhas pelo programa Microsoft Excel e análises foram feitas utilizando o software GraphPad Prism 8.0.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Taxa de sucesso em alimentação

A alimentação das fêmeas de *Haemagogus janthinomys* se deu em duas etapas, com um total de 118 espécimes coletados, sendo as fêmeas alimentadas utilizadas na etapa de oviposição e eclosão. No primeiro repasto sanguíneo, de um total de 54 fêmeas, 24 (44,4%) realizaram o repasto sanguíneo, 22 (40,7%) não realizaram e 8 (14,8%) morreram durante a alimentação; para a segunda coleta de um total de 64 fêmeas, 26 (40,6%) se alimentaram e 38 (59,3%) não realizaram o repasto. O estudo realizado por Hendy *et al*, (2022) apontou uma taxa de 54,1% de sucesso na alimentação pelo método de copos, com 226 fêmeas alimentadas para o total de 418 fêmeas coletadas em campo. Foi obtida a segunda geração de mosquitos, para um total de 92 fêmeas, 79 engorgitaram, representando 85,9% de sucesso alimentar. Por conseguinte, os resultados do presente trabalho se mostram similares ao citado, uma vez observadas as taxas de alimentação pós-coleta, considerando-se ainda que novas análises contendo um número amostral

superior ou similar ao de Hendy *et al*, (2022) podem identificar padrões no padrão alimentar de *Haemagogus janthinomys*.

Tabela 1. Taxa de sucesso em alimentação

Primeira alimentação

Fêmeas alimentadas	Fêmeas não alimentadas	Morreram
24 (44,4%)	22 (40,7%)	8 (14,8%)

Segunda alimentação

Fêmeas alimentadas	Fêmeas não alimentadas	Morreram
26 (40,6%)	38 (59,3%)	0

5.2 Viabilidade de ovos

A obtenção total das fêmeas de *Haemagogus janthinomys* foi de 756 ovos distribuídos entre 50 fêmeas que concluíram o ciclo de oviposição. Observou-se a inviabilidade de 130 (17,2%) ovos e 626 (82,8%) se apresentaram com aspecto viável após observação no microscópio estereoscópico.

Tabela 2. Taxa de viabilidade dos ovos

Total de ovos	Ovos viáveis	Ovos inviáveis
756	626 (82,8%)	130 (17,2%)

5.3 Taxa de eclosão e primeira geração

O percentual total de mosquitos da primeira geração a passarem por todos os estágios larvais, pupa e atingirem a fase adulta foi de 17,5%, representando apenas 133 dos 756 ovos submergidos. Foram identificados 65 (48%) machos de F₁ e 68 (51%) fêmeas de F₁. No estudo de Tátilla-Ferreira *et al*, (2017), 875 ovos da espécie *Haemagogus leucocelaenus* foram coletados e após 15 procedimentos de secagem e imersão dos ovos em água MiliQ®, apenas 323 (36,9%) eclodiram. Já Hendy *et al* (2022) obteve 1.562 (62,8%) de eclosão em um total de 10 ciclos de secagem e imersão em infusão de bambu.

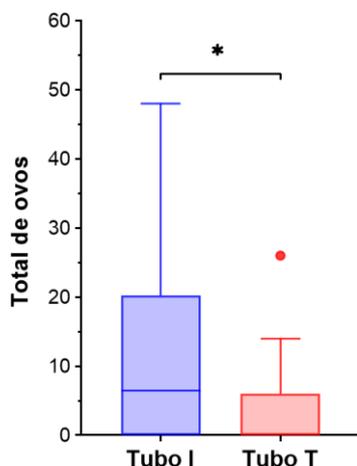
Tabela 3. Taxa de desenvolvimento completo e primeira geração de adultos

Total de ovos emergidos	Ciclo de desenvolvimento completo	Machos	Fêmeas
623 (100%)	17,5% (133)	65 (48%)	68 (51%)

5.4 Análise de oviposição em tubo controle e ‘T’

Os resultados a respeito da influência dos tipos de tubo na taxa de deposição de ovos das fêmeas de *Haemagogus janthinomys* mostra uma maior variabilidade de dados para o tubo controle (Mediana 6,5 e P value = 0,0355), sendo mais distantes entre si e em maior número que os dados do tubo T, sendo esses mais concentrados e com menos números. Somado a isso, percebe-se a ausência do whisker (bigode) inferior, indicando a ausência de oviposição. O boxplot do tubo controle infere que a maior oviposição se deu no mesmo, enquanto o tubo T não mostrou apresentar diferenças na oviposição, no entanto, com a presença de muitos valores 0 no tubo controle, pode-se afirmar que muitas fêmeas morreram antes de poderem ovipor. O estudo de Mondet (1997) utilizou 22 fêmeas silvestres para a oviposição em tubos T, cada fêmea foi acompanhada por ciclo de oviposição e alimentada novamente com sangue a cada término de ciclo, com a remoção dos ovos e troca da água. Ao final dos experimentos, o número total de ovos obtidos foi de 1.724 ovos com a média de 36,7 ovos por ciclo, mostrando um aumento de mais de 2 vezes em relação a esse trabalho, implicando na possibilidade de serem realizadas tentativas de realimentação das fêmeas no período em que estiverem dispostas nos tubos. De forma geral, a quantidade de dados para ambos os tubos não se iguala para uma concreta distinção, demonstrando que o aumento nos números de exemplares de ambos necessita ser maior e similar, assim como adaptações nos experimentos como o citado no artigo, a fim de se excluir fatores que possam interferir nas análises.

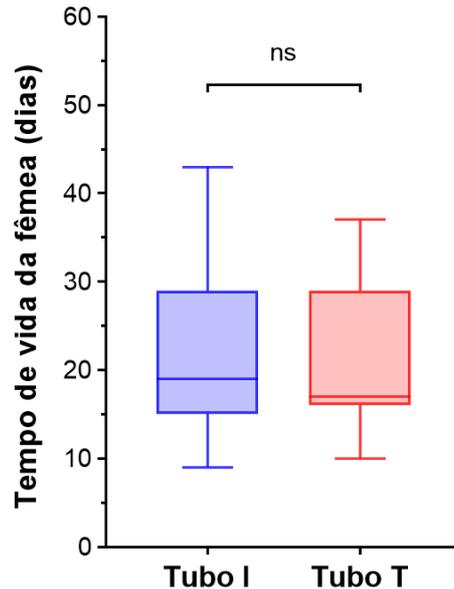
Figura 6. Diagrama de comparação de oviposição entre tubos controle e ‘T’.



Fonte: Albuquerque, 2022.

5.5 Análise de sobrevivência em tubo controle e 'T'

Figura 7. Diagrama de sobrevivência das fêmeas em relação aos tubos.

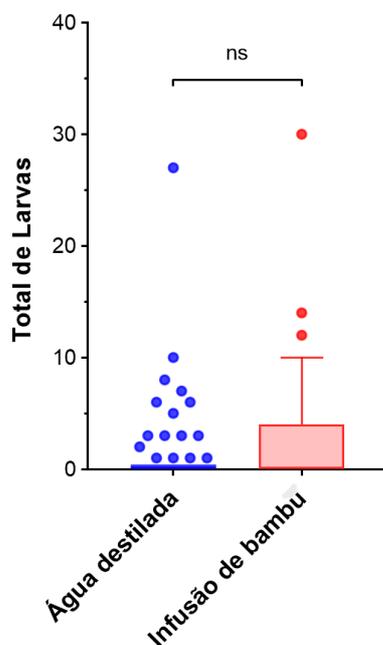


Fonte: Albuquerque, 2022.

Os resultados de sobrevivência das fêmeas em relação aos diferentes tubos mostram que não há diferenças estatísticas significativas entre ambos, como mostram os boxplot da figura 7. Observa-se que a variabilidade de dados é próxima, diferindo apenas na mediana do tubo T, que está mais concentrada. No caso do tubo controle, a mediana se encontra próxima ao valor 20, enquanto para o tubo T, a mesma é bem mais baixa. Ainda assim, a quantidade de resultados para o tubo controle é maior, reforçando a demanda de novas análises com mais dados e esses em números similares, possibilitando comparações e inferências mais assertivas. Mondet (1997) ao utilizar os tubos modificados, constatou a sobrevivência de fêmeas em 72 dias, obtendo mais ciclos de oviposição por fêmea. Em relação a esse estudo, pode-se constatar que a utilização dos tubos originais de Mondet, associados com a alimentação sanguínea a cada ciclo de oviposição, pode vir a prolongar a vida das fêmeas de *H. janthinomys* em condições laboratoriais.

5.6 Análise da eclosão larval em relação à água destilada e infusão de bambu

Figura 8. Diagrama da influência das diferentes imersões na eclosão larval.



Fonte: Albuquerque, 2022.

Os resultados a respeito dos dois diferentes tipos de água usados na imersão dos ovos, como mostrado na figura 8, indicam que não houve diferença estatística significativa a respeito da influência da infusão de bambu na eclosão larval. O boxplot apresenta a pouca variabilidade nas amostras analisadas, sendo a caixa da infusão de bambu apresentando variabilidade de dados um pouco acima em relação a água destilada, uma que vez que o primeiro quartil apresenta muitos valores 0 do banco de dados, além de pontos muito distante do conjunto de dados, os outliers. O trabalho de Hendy *et al* (2022) apresentou a quase não ocorrência de eclosão nos primeiros três ciclos de imersões com infusão de bambu, com o aumento começando durante o quarto e quinto ciclos e atingindo pico durante o sexto e sétimo ciclos da geração F1.

Reforça-se a necessidade de novas comparações com um maior conjunto de dados a fim de que se estabeleça uma análise mais robusta e concreta do real efeito das diferentes imersões em ovos de *H. janthinomys* além da possibilidade de tentativas que possam ser realizadas com tratamento nos ovos, a exemplo dos ciclos de umedecimento e ressecamento parcial realizados no trabalho mencionado.

6. CONCLUSÃO

Apesar de *Haemagogus janthinomys* ser o mais importante vetor de Febre Amarela e da febre Mayaro no neotrópico, o conhecimento acerca de sua biologia, ecologia e a respeito de sua competência vetorial ainda é escasso. O presente trabalho se constituiu de experimentos em pequena escala, no entanto, apesar disso, os resultados de alimentação se mostram relevantes, com uma taxa de sucesso de 44,4% e viabilidade de ovos de 82,2%. Já os resultados a respeito da comparação de atividades de oviposição para os diferentes tubos mostram que os tubos convencionais oferecem condições propícias para uma maior quantidade de ovos do que os tubos adaptados, sendo necessárias investigações ou novas adaptações para tentativas de otimizar ainda mais a deposição de ovos. Os resultados de análise de sobrevivência de fêmeas em diferentes tubos mostraram que não há diferenças estatísticas significativas no período em que condicionadas a eles, podendo apontar que um fator intrínseco à biologia das mesmas possa estar relacionado ao tempo de vida entre o campo e o laboratório. Por conseguinte, a análise da eclosão larval em relação à água destilada e infusão de bambu também não se mostrou estatisticamente significativa, o que pode ser avaliado com um maior n amostral e recorrentes imersões para novos parâmetros e discussões. Destarte, conclui-se que os experimentos em pequena escala podem dar margem para novos estudos de colonização com a espécie *Haemagogus janthinomys* em ambiente controlado.

7. REFERÊNCIAS

ALENCAR, Jeronimo. MARCONDES C.B. GUIMARÃES A.E. Efeito de múltiplas imersões em ovos e desenvolvimento de formas imaturas de *Haemagogus janthinomys* do Sudeste do Brasil (Diptera: Culicidae). **Entomological News** , v. 119, n. 3, pág. 239-244, 2008.

ALENCAR, Jeronimo *et al.* Criadouros naturais de mosquitos *Haemagogus* (Diptera, Culicidae) no Brasil. **Entomological News** , v. 121, n. 4, pág. 393-396, 2010.

ALENCAR, Jeronimo *et al.* Estudo comparativo do efeito de múltiplas imersões em ovos de mosquitos Aedini (Diptera: Culicidae) com ênfase em vetores silvestres do vírus da febre amarela. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** , v. 109, p. 114-117, 2014.

ANDREADIS, THEODORE G. Epizootiologia de *Amblyospora connecticus* (Microsporida) em populações de campo do mosquito da marisma, *Aedes cantator*, e do copépodo ciclopóide, *Acanthocyclops vernalis*. **The Journal of protozoology** , v. 37, n. 3, pág. 174-182, 1990.

BROWN, Brian Victor. **Manual of central american diptera**. NRC Research Press, 2009.

Disponível em: < https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=IYgflipaDXQC&oi=fnd&pg=PR7&dq=Manual+of+Central+American+Diptera&ots=LHNXLZOQ61&sig=XXEhaIkx167lfxIK1wi_zNG3p0U#v=onepage&q=Manual%20of%20Central%20American%20Diptera&f=false>. Acesso em: Julho, 2021.

Arnell, J.H. Mosquito studies (Diptera, Culicidae) XXXII: A revision of the genus *Haemagogus*. **Contrib. Am. Entomol. Inst.** 1973, 10, pág. 1–174.

BALTHAZAR, Thamisris d'Almeida *et al.* **Ecologia e vigilância entomológica de mosquitos (Diptera: Culicidae), vetores de arboviroses, no Parque Estadual dos Três Picos, Estado do Rio de Janeiro.** 2018. Tese de Doutorado. Disponível em < <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/27468>> Acesso em: Set. 2021

BATES, Marston *et al.* Experiments with various Colombian Marsupials and Primates in

Laboratory Cycles of Yellow Fever. **American Journal of Tropical Medicine**, v. 26, n. 4, 1946.

BATES, Marston et al. Laboratory Studies of the Saimiri-Haemagogus Cycle of Jungle Yellow Fever. **American Journal of Tropical Medicine**, v. 25, n. 3, 1945.

BATES, Marston *et al.* Laboratory Studies of the Saimiri-Haemagogus Cycle of Jungle Yellow Fever. **American Journal of Tropical Medicine**, v. 25, n. 3, 1945.

BATES, Marston et al. The development of the virus of yellow fever in haemagogus mosquitoes. **American Journal of Tropical Medicine**, v. 26, n. 5, p. 585-605, 1946.

BATES, Marston et al. The Douroucouli (Aotus) in Laboratory Cycles of Yellow Fever. **American Journal of Tropical Medicine**, v. 25, n. 5, p. 385-9, 1945a.

BATES, Marston *et al.* Estudos laboratoriais do ciclo Saimiri-Haemagogus da febre amarela silvestre. **American Journal of Tropical Medicine**, v. 25, n. 3, 1945b.

CAMARGO, Amanda Alves. **Estudo da resposta de mosquitos (Diptera: Culicidae) a diferentes tipos de criadouros e condições de fatores físico-químicos da água**. 2018. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. Disponível em: <<https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/6/6143/tde-15062018-130327/en.php>> Acesso em: 01 Out. 2021.

CAMPOS, Raúl Ernesto; SY, Victoria Elena. Variation in the hatching response of *Ochlerotatus albifasciatus* egg batches (Diptera: Culicidae) in temperate Argentina. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, p. 47-53, 2006.

CONSOLI, Rotraut AGB; OLIVEIRA, Ricardo Lourenço de. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. Editora Fiocruz, 1994.

DE KRUIJF, H. A. M.; WOODALL, J. P.; TANG, A. T. The influence of accumulated rainfall and its pattern on mosquito (Diptera) populations in Brazil. **Bulletin of Entomological**

Research, v. 63, n. 2, p. 327-333, 1973.

DEKKER, Teun; GEIER, Martin; CARDÉ, Ring T. Carbon dioxide instantly sensitizes female yellow fever mosquitoes to human skin odours. **Journal of Experimental Biology**, v. 208, n. 15, pág. 2963-2972, 2005.

DENLINGER, David L.; ARMBRUSTER, Peter A. Mosquito diapause. **Annual review of entomology**, v. 59, p. 73-93, 2014.

DUVALL, Laura B. *et al.* Agonistas de moléculas pequenas de *Ae. aegypti*, neuropeptídeo Y, bloqueiam a picada do mosquito. **Cel**, v. 176, n. 4, pág. 687-701. e5, 2019.

FORATTINI, Oswaldo Paulo. **Culicidologia médica: identificação, biologia, epidemiologia Vol. 2**. Edusp, pág. 864, 2002.

GALINDO P, Carpenter SJ e Trapido H. A contribution to the ecology and biology of tree hole breeding mosquitoes of Panama. *Annals of the Entomological Society of America* 1951; 48:158-164.

GALINDO, Pedro *et al.* Ecological observations on forest mosquitoes of an endemic yellow fever area in Panama. **American Journal of Tropical Medicine**, v. 31, n. 1, 1951.

GALINDO, Pedro *et al.* Experimental transmission of yellow fever by Central American species of *Haemagogus* and *Sabethes chloropterus*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 5, n. 1956) 6, 1957.

GORDON, R. M.; LUMSDEN, W. H. R. A study of the behaviour of the mouth-parts of mosquitoes when taking up blood from living tissue; together with some observations on the ingestion of microfilariae. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 33, n. 3-4, p. 259- 278, 1939.

HARBACH, Ralph E. Mosquito taxonomic inventory. 2017. [internet]. Disponível em: <<https://mosquito-taxonomic-inventory.myspecies.info/>>. Acesso em: 01 Out. 2021.

HENDY, Adam *et al.* Towards the Laboratory Maintenance of *Haemagogus janthinomys* (Dyar, 1921), the Major Neotropical Vector of Sylvatic Yellow Fever. **Viruses**, v. 15, n. 1, p. 45, 2022.

HOVANITZ, William. Comparisons of mating behavior, growth rate, and factors influencing egg-hatching in South American *Haemagogus* mosquitoes. **Physiological zoology**, v. 19, n. 1, p. 35-53, 1946.

HURD, H.; HOGG, J. C.; RENSHAW, M. Interactions between bloodfeeding, fecundity and infection in mosquitoes. **Parasitology Today**, v. 11, n. 11, p. 411-416, 1995.

RW,HUTCHINGS RSG, SALLUM MAM. Culicidae in **Catálogo Taxonômico da Fauna do Brasil**. PNUD. Disponível em: <<http://fauna.jbrj.gov.br/fauna/faunadobrasil/798>>. Acesso em: 15 Fev. 2023

LIU, Molly Z.; VOSSHALL, Leslie B. General visual and contingent thermal cues interact to elicit attraction in female *Aedes aegypti* mosquitoes. **Current Biology**, v. 29, n. 13, p. 2250-2257. e4, 2019.

MARCONDES, Carlos Brisola; ALENCAR, Jerônimo. Revisão dos mosquitos do gênero *Haemagogus* Williston (Diptera: Culicidae) do Brasil. **Revista Biomédica** , v. 21, não. 3, pág. 221-238, 2010.

MCMENIMAN, Conor J. et al. Multimodal integration of carbon dioxide and other sensory cues drives mosquito attraction to humans. **Cell**, v. 156, n. 5, p. 1060-1071, 2014.

MCMICHAEL, Anthony J.; WOODRUFF, Rosalie E. Climate change and infectious diseases. In: **The social ecology of infectious diseases**. Academic Press, 2008. p. 378-407.

MONDET, Bernard. Condições de sobrevivência em laboratório de *Haemagogus janthinomys*

Dyar, 1921 (Diptera: Culicidae). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 30, p. 11-14, 1997.

OLIVA, Clelia F. *et al.* The sterile insect technique for controlling populations of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) on Reunion Island: mating vigour of sterilized males. **PloS one**, v. 7, n. 11, p. e49414, 2012.

SILVA-INACIO, Cássio Lázaro *et al.* Ecological relationships of *Haemagogus spegazzinii* (Diptera: Culicidae) in a semiarid area of Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 53, 2020.

TAKKEN, W.; KLINE, D. L. Carbon dioxide and 1-octen-3-ol as mosquito attractants. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 5, n. 3, p. 311-316, 1989.

TÁTILA-FERREIRA, Aline *et al.* Oviposition behavior of *Haemagogus leucocelaenus* (Diptera: culicidae), a vector of wild yellow fever in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 59, 2017.

TREMBLEY, Helen L. *et al.* The Distribution of certain Liquids in the Esophageal Diverticula and Stomach of Mosquitoes. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 1, n. 4, p. 693-710, 1952.

VASCONCELOS, Pedro Fernando da Costa *et al.* Epidemia de febre amarela silvestre na região sudeste do Estado do Maranhão, Brasil, 1993-1994: achados epidemiológicos e entomológicos. 1997.

VINOGRADOVA, Elena B. Diapause in aquatic insects, with emphasis on mosquitoes. **Diapause in Aquatic Invertebrates Theory and Human Use**, p. 83-113, 2007.

WADDELL, Mary B. *et al.* *Haemagogus capricornii* Lutz como vetor laboratorial da febre amarela. **American Journal of Tropical Medicine**, v. 28, n. 2, 1948.

WRBU. Systematic catalog of Culicidae. Whashington, USA: Disponível em:

<<http://www.mosquitocatalog.org/>.> Acesso em: 01 Out. 2021.

YANOVIK, SP; LOUNIBOS, LP; WEAVER, SC. O uso da terra afeta a composição da comunidade de macroinvertebrados em fitotelmata na Amazônia peruana. **Anais da Sociedade Entomológica da América** , v. 99, n. 6, pág. 1172-1181, 2006.