

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

EMILY NENTWIG DE BARROS

ASPECTOS BIOLÓGICOS E EXPRESSÃO DE ENZIMAS VITELOGÊNICAS EM
FÊMEAS DE *Aedes (Stegomyia) aegypti* (LINNAEUS, 1762) APÓS ALIMENTAÇÃO
SANGUÍNEA EM DIFERENTES HOSPEDEIROS VERTEBRADOS

CURITIBA

2022

EMILY NENTWIG DE BARROS

ASPECTOS BIOLÓGICOS E EXPRESSÃO DE ENZIMAS VITELOGÊNICAS EM
FÊMEAS DE *Aedes (Stegomyia) aegypti* (LINNAEUS, 1762) APÓS ALIMENTAÇÃO
SANGUÍNEA EM DIFERENTES HOSPEDEIROS VERTEBRADOS

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Zoologia, Setor
de Ciências Biológicas da Universidade Federal do
Paraná, como requisito parcial à obtenção do título
de mestre em Zoologia.

Orientador: Prof. Dr. Mário Antônio Navarro da Silva

CURITIBA

2022

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Barros, Emily Nentwig de.

Aspectos biológicos e expressão de enzimas vitelogênicas em fêmeas de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (LINNAEUS, 1762) após alimentação sanguínea em diferentes hospedeiros vertebrados. / Emily Nentwig de Barros. – Curitiba, 2022.

1 recurso on-line : PDF.

Orientador: Mário Antônio Navarro da Silva.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Zoologia.

1. Díptero. 2. Culicidae. 3. Vitelogeninas. 4. *Aedes aegypti*. 5. Reprodução. I. Título. II. Silva, Mário Antônio Navarro da. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Zoologia.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ZOOLOGIA -
40001016008P4

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação ZOOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **EMILY NENTWIG DE BARROS** intitulada: **ASPECTOS BIOLÓGICOS E EXPRESSÃO DE ENZIMAS VITELOGÊNICAS EM FÊMEAS DE *Aedes (Stegomyia) aegypti* (LINNAEUS, 1762) APÓS ALIMENTAÇÃO SANGÜÍNEA EM DIFERENTES HOSPEDEIROS VERTEBRADOS**, sob orientação do Prof. Dr. MARIO ANTONIO NAVARRO DA SILVA, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestra está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 24 de Fevereiro de 2022.

Assinatura Eletrônica

08/03/2022 17:12:35.0

MARIO ANTONIO NAVARRO DA SILVA

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

08/03/2022 14:13:47.0

JOÃO ANTÔNIO CYRINO ZEQUI

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA)

Assinatura Eletrônica

08/03/2022 13:07:49.0

ANDREY JOSE DE ANDRADE

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Avenida Cel Francisco H Santos, s/n - CURITIBA - Paraná - Brasil

CEP 81531-980 - Tel: (41) 3361-1641 - E-mail: pgzoo@ufpr.br

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 160048

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp> e insira o código 160048

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador professor Mário Antônio Navarro da Silva, pelo apoio, comprometimento e ensinamentos, durante toda a minha trajetória na graduação e pós-graduação. Encerro esse ciclo com uma gratidão imensa pela oportunidade que tive de trabalhar com um profissional extremamente dedicado e pela experiência e aprendizado que adquiri com o mesmo, tanto em âmbito profissional como pessoal. Não existem palavras que expressem minha gratidão pelo acolhimento que recebi e também pela confiança e investimento nas minhas ideias, opiniões e contribuições como pesquisadora dentro do Laboratório de Morfologia e Fisiologia de Culicidae e Chironomidae.

À Universidade Federal do Paraná, ao Programa de Pós-graduação em Zoologia e aos professores, pela estrutura fornecida e por contribuírem para minha formação.

À CAPES pela bolsa de estudo.

Aos colegas de laboratório durante esses anos, Angela Palacio, Arturo Acero, Valéria Schuartz, Juliane Vink, Gisele de Moraes, Tatiana Rocha, Camila Santos, Vinicius Richardi, Mariana Perez, Thalita Vieira e Ana Marta Schafaschek, pela convivência, ajuda e amizade. Especialmente às minhas amigas Mariana e Ana, que possibilitaram a realização do trabalho e estiveram presentes em todos os momentos. Sem vocês, não conseguiria concluir essa etapa. Também, especialmente aos meus queridos amigos, Vinicius e Thalita, que me ensinaram muito no laboratório.

À toda minha família, principalmente minha mãe Beatriz Nentwig, minha vó Lizette Hirt e meu padrasto Celso Gaffke, que me apoiaram em todos os momentos e tornaram tudo mais leve. Também aos meus primos Fabíola Hirt e Marcos Rauth que sempre incentivaram minha formação e foram essenciais para ocorrência do projeto e para a realização prática dos experimentos, do início ao fim.

À Alaíse Dalmazo, pela disponibilidade e parceria.

Aos amigos do mestrado, Jyulie Singo, Matheus Alves, Érica Padilha e Carolina Simião, que compartilharam experiências, frustrações, risos, perrengues, prazeres e dificuldades da pós-graduação, mesmo à distância.

Às amigas queridas que me acompanham desde a graduação, Carolina Cafisso e Mayara Rodrigues, pelo apoio e amizade.

À Luana Viana e Terezinha Assumpção, por serem pessoas tão especiais que me apoiaram nesse período.

A todos os meus amigos fiéis de Morretes que estiveram do meu lado em mais essa etapa.

Com carinho,

Emily.

RESUMO

Aedes (Stegomyia) aegypti possui relevância mundial em saúde pública como vetor principal de diferentes arbovírus. A dependência da fêmea pela alimentação sanguínea para produção de ovos e um ciclo de vida intimamente associado ao ambiente urbano, são fatores relevantes no entendimento da evolução de uma preferência alimentar pelo hospedeiro humano e na capacidade vetorial da espécie. Nesse sentido, o principal objetivo do trabalho foi analisar como o sangue de diferentes hospedeiros vertebrados podem influenciar nos parâmetros fisiológicos e genéticos relacionados a capacidade reprodutiva da fêmea. Para isso, foi realizado um bioensaio para análises biológicas (I) e outro para análises moleculares (II), onde fêmeas (cepa Rockefeller) previamente acasadas receberam sangue de três vertebrados encontrados em ambiente urbano e semi-urbano: humano, ave e cão. Os experimentos foram realizados sob condições controladas dentro de câmara B.O.D. (temperatura $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade 60 ± 10 e fotoperíodo 12h:12h). O sangue foi obtido diretamente do hospedeiro, com auxílio de profissionais capacitados e fornecido com anticoagulante em um aparato artificial, por vinte minutos (CEUA 719 e CAAE 44032721.1.0000.0102). No Bioensaio I, fêmeas alimentadas artificialmente com sangue de cada hospedeiro vertebrado (e também, diretamente de camundongo) foram individualizadas para análise da postura de ovos e viabilidade da prole. No Bioensaio II, após 24 horas do repasto - período de pico de atividade de enzimas responsáveis pela vitelogênese – as fêmeas foram congeladas e armazenadas em freezer -80°C em *pools* de quatro. Após a extração do RNA das amostras, foi realizada a expressão gênica relativa ($\Delta\Delta\text{CT}$) de duas enzimas de ovogênese (catepsina B vitelogênica e vitelogenina) através da RT-qPCR (“*reverse transcription – quantitative real time PCR*”). Nas análises biológicas, houve uma produção significativamente maior de ovos e viabilidade, para as fêmeas que se alimentaram do sangue de ave (3066 ovos e 59,26% de eclosão larval, para 30 fêmeas analisadas) e camundongo (4747 ovos e 74% de eclosão, para 44 fêmeas analisadas), em relação ao sangue do cão (2306 ovos e 11,68% de eclosão – 30 fêmeas) e humano (1644 ovos e 33,88% de eclosão – 29 fêmeas). Nas análises moleculares, para a Catepsina B, fêmeas alimentadas com sangue de galinha apresentaram uma maior expressão gênica relativa em relação à aquelas alimentadas com sangue de cão. Os resultados obtidos indicam que o sangue de outros animais (entre aves e mamíferos) e suas propriedades, podem ser mais adequados para a produção de ovos de *A. aegypti* do que o sangue humano, não havendo uma aptidão reprodutiva fornecida exclusivamente por essa fonte. Logo, na natureza, o sangue de vertebrados presentes no ambiente urbano, como cão e ave, tem o potencial de manutenção da população na ausência do sangue humano.

Palavras-chave: Diptera; Culicidae; repasto sanguíneo; aparato artificial; aspectos reprodutivos; vitelogênese.

ABSTRACT

Aedes (Stegomyia) aegypti has global public health relevance as the main vector of different arboviruses. The female's dependence on blood feeding for egg production and a life cycle closely associated with the urban environment are relevant factors in understanding the evolution of a preference for the human host and the vectorial capacity of the species. In this sense, the main objective of the work was to analyze how the blood of different vertebrate hosts can influence the physiological and genetic parameters related to the reproductive capacity of the female. For this, a bioassay was carried out for biological analysis (I) and another for molecular analysis (II), where females (Rockefeller strain) previously mated received blood from three vertebrates found in urban and semi-urban environments: human, bird and dog. The experiments were carried out under controlled conditions inside a B.O.D. (temperature $25\pm1^{\circ}\text{C}$, humidity 60 ± 10 and photoperiod 12h:12h). Blood was obtained directly from the host, with the help of trained professionals and supplied with anticoagulant in an artificial apparatus, for twenty minutes (CEUA 719 and CAAE 44032721.1.0000.0102). In Bioassay I, females artificially fed with blood from each vertebrate host (and also directly from mice) were individualized for analysis of egg laying and offspring viability. In Bioassay II, 24 hours after the meal - period of peak activity of enzymes responsible for vitellogenesis - the females were frozen and stored in a freezer at -80°C in pools of four. After extracting the RNA from the samples, the relative gene expression ($\Delta\Delta\text{CT}$) of two oogenesis enzymes (vitellogenic cathepsin B and vitellogenin) was performed using RT-qPCR (Reverse transcription – quantitative real time PCR). In the biological analyses, there was a significantly higher production of eggs and viability for the females that fed on the blood of birds (3066 eggs and 59.26% of larval hatching, for 30 females analyzed) and mice (4747 eggs and 74% of hatching, for 44 females analyzed), in relation to dog blood (2306 eggs and 11.68% hatching – 30 females) and human blood (1644 eggs and 33.88% hatching – 29 females). In the molecular analysis, for Cathepsin B, females fed with chicken blood showed a higher relative gene expression in relation to those fed with dog blood. The results obtained indicate that the blood of other animals (including birds and mammals) and their properties, may be more suitable for the production of *A. aegypti* eggs than human blood, with no reproductive aptitude provided exclusively by this source. Therefore, in nature, the blood of vertebrates present in the urban environment, such as dogs and birds, has the potential to maintain the population in the absence of human blood.

Keywords: Diptera; Culicidae; blood meal; artificial apparatus; reproductive aspects; vitellogenesis.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Distinção de pupas fêmeas e machos de *Aedes aegypti*, através das diferenças morfológicas do lobo genital (indicado por flechas vermelhas, na fêmea e no macho, em vista ventral). As flechas pretas (vista dorsal) indicam o último segmento abdominal (acima) e as “pás” (em número par, abaixo), em ambos os sexos. Fonte: CARVALHO *et al.*, 2014.....40
- Figura 2.** Montagem e funcionamento do aparato artificial de alimentação sanguínea. Em “1” o sangue foi inserido sobre a tampa do pote acrílico (já com água aquecida em seu anterior). Em “2”, o pano TNT foi adicionado e sobre ele foi acrescido um pouco de sangue. Em “3”, fêmeas de *Aedes aegypti* alimentando-se através do aparato artificial, dentro da gaiola de criação. Fonte: a autora.....43
- Figura 3.** Gaiolas dispostas na “B.O.D. 3” para o Bioensaio I. Fonte: a autora.....44
- Figura 4.** Desenho experimental para o repasto sanguíneo do Bioensaio I, ilustrando a disposição das réplicas nas B.O.Ds. Foram adicionadas 100 fêmeas de *Aedes aegypti* previamente acasaladas, com 12-15 dias de vida, por réplica. O repasto foi fornecido por 20 minutos. As siglas RG, RH, RC e RR correspondem, respectivamente, as réplicas do sangue de galinha, humano, cão e camundongo, seguidas pelo número da réplica (1, 2 ou 3). Fonte: a autora.....45
- Figura 5.** Fêmeas de *Aedes aegypti* individualizadas nos recipientes contendo alimentador com solução açucarada e potes de oviposição (dentro de B.O.D.). Fonte: a autora.....47
- Figura 6.** Ovos de *Aedes aegypti* secando em B.O.D. Cada papel equivale aos ovos (pontinhos pretos) de uma única fêmea. Fonte: a autora.....47
- Figura 7.** Ovos de *Aedes aegypti* em lupa para ilustrar a morfologia de um ovo túrgido (em vermelho) e ovos colapsados (em azul). Os ovos da espécie medem cerca de 0,4 mm. Fonte: a autora.....48

Figura 8. Papéis filtro com ovos individuais de fêmeas de *Aedes aegypti* em copos de 300 mL (dentro da B.O.D.), para eclosão das larvas. Fonte: a autora.....48

Figura 9. Níveis de distensão do abdômen, após alimentação sanguínea, estabelecidos pela autora para triagem das fêmeas de *Aedes aegypti*.....49

Figura 10. Fêmeas de *Aedes aegypti*. Em “1”: fêmea totalmente ingurgitada com sangue (nesse caso, os escleritos chegam a separar longitudinalmente). Em “2”: fêmea totalmente ingurgitada apenas com plasma sanguíneo (direita). Ambas as fêmeas realizaram repasto sanguíneo em aparato artificial. Fonte: a autora.....50

Figura 11. Número de fêmeas de *Aedes aegypti* que realizaram alimentação sanguínea (nos três níveis de distensão do abdômen) para cada hospedeiro sanguíneo. Número de fêmeas submetidas ao repasto por réplica = 100 f.; total = 300 f., para cada fonte sanguínea. Nível 1 = pouco; Nível 2 = médio; Nível 3 = totalmente ingurgitadas.....57

Figura 12. Expressão gênica relativa da Vitelogenina para as fêmeas de *Aedes aegypti* que receberam sangue, em aparato artificial, dos hospedeiros galinha, cão e humano, em relação ao controle (fêmeas alimentadas apenas com solução de água e mel). Os dados foram transformados em *log* para plotagem e análise estatística.....63

Figura 13. Expressão gênica relativa da Catepsina B para as fêmeas de *Aedes aegypti* que receberam sangue, em aparato artificial, dos hospedeiros galinha, cão e humano, em relação ao controle (fêmeas alimentadas apenas com solução de água e mel). Os dados foram transformados em *log* para plotagem e análise estatística.....63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Regime geral de alimentação para larvas de <i>Aedes aegypti</i> (mg de comida por larva por dia) utilizando ração triturada para peixe. Para calcular o total é necessário multiplicar pelo nível de larvas por bandeja	39
Tabela 2. Sequência de nucleotídeos dos <i>primers</i> utilizados para cada gene de interesse, sendo Fw = <i>fowad</i> e Rv = <i>reverse</i> . Abaixo, foi adicionado a sigla adotada no trabalho e o número de acesso do <i>Genbank</i> (se disponibilizado)	51
Tabela 3. Valores de eficiência dos primers utilizados.....	53
Tabela 4. Dados biológicos gerais, referentes ao número de ovos e larvas eclodidas para as fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> que receberam cada uma das fontes sanguíneas. Os dados destacados com “*” foram os que apresentaram diferença significativa, nas análises estatísticas.....	58
Tabela 5. Decomposição dos dados individuais referentes ao número de fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> que ovipositaram em relação aos diferentes padrões de quantidade de ovos (túrgidos e colapsados)	59
Tabela 6. Decomposição dos dados individuais referentes ao número de fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> em que os ovos resultaram na eclosão de larvas, para diferentes parâmetros.....	60
Tabela 7. Intervalo máximo de ovos (túrgidos, colapsados e totais) e larvas provenientes das fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> que receberam diferentes fontes sanguíneas.....	61

Tabela 8. Média geral do peso (g), após repasto sanguíneo e após oviposição, de fêmeas de *Aedes aegypti* que receberam diferentes fontes sanguíneas. Os dados destacados com “*” apresentaram diferença significativa nas análises estatísticas.....62

LISTA DE SIGLAS

$\Delta\Delta CT$	Método de expressão relativa
Act	Actina
Cat B	Catepsina B vitelogênica (acesso GenBank)
cDNA	DNA complementar
Cq	Ciclo de quantificação
DNA	<i>“Deoxyribonucleic acid”</i>
EGI	Eficiência do gene de interesse
EGR	Eficiência do gene referência
LAMFIC ²	Laboratório de Morfologia e Fisiologia de Culicidae e Chironomidae
Fw	<i>“Fowad”</i>
Lp	Lipoforina
PCR	<i>“Polymerase Chain Reaction”</i>
RC	Réplica repasto cão
RG	Réplica repasto galinha
RH	Réplica repasto humano
RNA	<i>“Ribonucleic acid”</i>
RR	Réplica repasto camundongo
RT-PCR	<i>“Reverse Transcription - Polimerase Chain Reaction”</i>
RT- qPCR	<i>“Reverse Transcription – quantitative real time PCR”</i>
Rv	<i>“Reverse”</i>
UFPR	Universidade Federal do Paraná
VCB	Carboxipeptidase vitelogênica
VCP	Catepsina B
VHS	Velocidade de hemossedimentação do sangue
Vg	Vitelogenina
VgA1	Vitelogenina (acesso GenBank)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	OBJETIVOS	18
1.1.1	Objetivo geral	18
1.1.2	Objetivos específicos	18
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
1.1	EVOLUÇÃO DA HEMATOFAGIA E ESCOLHA DE HOSPEDEIRO EM INSETOS	20
2.2	HISTÓRIA EVOLUTIVA E PREFERÊNCIA ALIMENTAR EM <i>Aedes aegypti</i>	25
2.3	CARACTERÍSTICAS DE <i>Aedes aegypti</i>	30
2.3.1	Adaptações ao hábito hematófago	30
2.3.2	Ciclo de vida	31
2.3.3	Ciclo gonotrófico e vitelogênese	35
3	MATERIAL E MÉTODOS	39
3.1	MANUTENÇÃO DA CEPA ROCKEFELLER	39
3.2	HOSPEDEIROS VERTEBRADOS	41
3.3	APARATO ARTIFICIAL DE ALIMENTAÇÃO SANGUÍNEA	42
3.4	BIOENSAIO I (ANÁLISES BIOLÓGICAS)	43
3.4.1	Etapa I	46
3.4.2	Etapa II	48
3.5	BIOENSAIO II (ANÁLISES MOLECULARES)	50
3.5.1	<i>Primers</i>	51
3.5.1.1	Gradiente de temperatura de anelamento dos <i>primers</i>	52
3.5.1.2	Teste de eficiência dos <i>primers</i> em PCR tempo real	52
3.5.2	Extração de RNA das amostras e tratamento com DNase	53
3.5.3	RT-PCR (Reação em cadeia da Polimerase com Transcriptase Reversa)	54

4	RESULTADOS	57
4.1	BIOENSAIO I (DADOS BIOLÓGICOS)	57
4.1.1	Repasto sanguíneo e ingurgitamento de fêmeas	57
4.1.2	Produção e viabilidade dos ovos	58
4.1.3	Peso das fêmeas	61
4.2	BIOENSAIO II (ANÁLISES MOLECULARES)	62
5	DISCUSSÃO	64
5.1	EFICIÊNCIA DO APARATO ARTIFICIAL	64
5.2	INFLUÊNCIA DA FONTE SANGUÍNEA SOBRE A APTIDÃO REPRODUTIVA DE <i>Aedes aegypti</i>	66
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	69
	REFERÊNCIAS	70
	APÊNDICE 1 – DADOS INDIVIDUAIS DE OVIPOSIÇÃO E ECLOSÃO DE LARVAS PARA AS FÊMEAS QUE SE ALIMENTARAM DO SANGUE HUMANO	84
	APÊNDICE 2 – DADOS INDIVIDUAIS DE OVIPOSIÇÃO E ECLOSÃO DE LARVAS PARA AS FÊMEAS QUE SE ALIMENTARAM DO SANGUE DE CÃO	85
	APÊNDICE 3 – DADOS INDIVIDUAIS DE OVIPOSIÇÃO E ECLOSÃO DE LARVAS PARA AS FÊMEAS QUE SE ALIMENTARAM DO SANGUE DE GALINHA	86
	APÊNDICE 4 – DADOS INDIVIDUAIS DE OVIPOSIÇÃO E ECLOSÃO DE LARVAS PARA AS FÊMEAS QUE SE ALIMENTARAM DO SANGUE DE CAMUNDONGO	87

1 INTRODUÇÃO

O *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) (Culicidae: Diptera) apresenta importância em saúde pública como vetor de diferentes arbovírus (CONSOLI & LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; FORATTINI, 2002). Características evolutivas da espécie, que incluem adaptações ao ambiente antrópico e a necessidade de sangue para reprodução, são pontos importantes para compreensão dos mecanismos relacionados a preferência alimentar pelo hospedeiro humano e a capacidade vetorial (LYIMO & FERGUSON, 2009; POWELL & TABACHNICK, 2013).

O fóssil mais antigo de Culicidae possui datação entre 100 e 90 milhões de anos, porém, estima-se que o grupo seja ainda mais antigo (BORKENT & GRIMALDI, 2005). A escassez de registros da família corresponde a fragilidade de preservação desses espécimes, o que dificulta estabelecer a origem evolutiva entre os táxons e suas associações iniciais com os hospedeiros vertebrados (BALASHOV, 1984). Para o grupo, sugere-se que a evolução da hematofagia esteja relacionada a presença de pré-adaptações morfofisiológicas e um aparato bucal sugador ancestral, em mosquitos inicialmente fitófagos ou entomófagos, que permitiram ocasionais alimentações em sangue de vertebrados (WAAGE, 1979). Nesse sentido, restritamente na fêmea, benefícios nutricionais proporcionados a capacidade reprodutiva, podem ter favorecido uma hematofagia completa e a seleção de características específicas (LEHANE, 2005).

Dentro dessa perspectiva, existem espécies que adotam hábitos generalistas, alimentando-se oportunamente de diferentes grupos de vertebrados e, especialistas, apresentando preferência por determinados hospedeiros. Um conjunto de fatores extrínsecos (relacionados ao hospedeiro e ao ambiente) e intrínsecos (genéticos e fisiológicos do inseto) podem modular essa relação. A evolução de uma preferência alimentar em mosquitos parece estar associada a um contato prolongado e facilitado com determinado vertebrado no ambiente (maior disponibilidade e fácil acesso) e a uma possível vantagem seletiva (relação de custo-benefício positiva) proporcionada ao se alimentar desse organismo, especificamente (EGAS *et al.*, 2004; TAKKEN & VERHULST, 2013).

O *A. aegypti* se encaixa nesse cenário, tendo sua história evolutiva intimamente moldada pelos seres humanos (TABACHNICK, 1991). Populações da espécie apresentam preferência pelo sangue desse hospedeiro ao longo de diferentes

distribuições geográficas e ambientes urbanos, semiurbanos e rurais, mas, podem alimentar-se oportunamente e em menor escala de outros vertebrados disponíveis, como cães, galinhas e gado (SCOTT, *et al.*, 1993; SCOTT *et al.*, 2000; PONLAWAT & HARRINGTON, 2005; SIVAN *et al.*, 2015). Acredita-se que a forma “domesticada” e antropofílica da espécie tenha evoluído de populações ancestrais zoofílicas generalistas, que viviam em florestas no leste da África e sofreram pressões seletivas que favoreceram a aproximação ao habitat e criadouros artificiais. Com a chegada nas Américas, a partir das navegações intercontinentais dos séculos XV-XIX, foram sendo selecionadas características adaptativas que permitiram essa espécie viver no ambiente antrópico e nos grandes centros urbanos, realizando todo o ciclo de vida nesses locais e especializando-se na dieta humana (PETERSEN, 1977; TABACHNICK, 1991; POWEEL & TABACHNICK, 2013; BROWN *et al.*, 2014).

A fêmea de *A. aegypti* é essencialmente anautógena, ou seja, depende das proteínas e aminoácidos do sangue para ativação da maturação dos ovários e produção dos ovos. A busca ativa pelo hospedeiro e a ingestão do sangue induzem uma sucessão de eventos fisiológicos imprescindíveis para o ciclo gonadotrófico (VALLE *et al.*, 2015). Em conjunto com a digestão do sangue, dá-se início ao período vitelogênico da ovogênese. Nesse estágio, basicamente, ocorre a secreção de hormônios que estimulam a produção, no corpo gorduroso do inseto, de proteínas precursoras do vitelo (principalmente vitelogenina, carboxipeptidase vitelogênica e catepsina B), que são levadas pela hemolinfa até os ovários e propiciam a formação dos ovócitos maduros. São necessários de dois a três dias para ocorrer a digestão completa do sangue, o armazenamento de reservas nutricionais (vitelo) nos ovócitos e consequentemente, a oviposição da fêmea em local próximo a água (RAIKHEL *et al.*, 2002).

Apesar da preferência alimentar ser um comportamento inerente e de origem genética, diferentes estudos buscam compreender os elementos que impulsionaram a seleção e manutenção dessa característica em *A. aegypti* (GREENBERG, 1951; BENNET, 1970; NAYAR & SAUERMAN, 1977; CHANG & JUDSON, 1979; EDMAN & SCOTT, 1987; HARRINGTON *et al.*, 2001; SCOTT & TAKKEN, 2012; HARRISON *et al.*, 2021). Como os grupos de vertebrados apresentam características bioquímicas específicas na composição do sangue, sugere-se que esse parâmetro seja importante na evolução de uma escolha por hospedeiro. Logo, possíveis vantagens seletivas na escolha de hospedeiro podem estar relacionadas, entre outros fatores, a

especificidades nutritivas da composição do sangue do hospedeiro preferencial, que poderiam favorecer a capacidade reprodutiva (produção de ovos e viabilidade), de sobrevivência e tempo de vida da fêmea do mosquito (HARRINGTON *et al.*, 2001).

Nesse sentido, a investigação de fatores genéticos e fisiológicos relacionados ao repasto sanguíneo e capacidade reprodutiva da fêmea, podem auxiliar na compreensão da evolução da preferência pelo sangue humano, mesmo com disponibilidade de outros vertebrados em ambiente urbano, possibilitando também novas abordagens para modulação dessas características no controle de vetores (LYIMO & FERGUNSON, 2009). Além disso, a análise da eficiência de metodologias artificiais de alimentação sanguínea são importantes para manutenção de insetários e realização de experimentos em laboratório, sem a necessidade de submissão direta de vertebrados aos insetos (COSTA-DA-SILVA *et al.*, 2013; ANJOLETTE & MACORIS, 2016; HARRISON *et al.*, 2021).

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Avaliar como o sangue de diferentes hospedeiros vertebrados de comum disponibilidade em ambiente urbano (incluindo o ser humano), podem influenciar parâmetros fisiológicos e genéticos reprodutivos de fêmeas de *Aedes aegypti* e sua viabilidade na manutenção dos mosquitos em insetário.

1.1.2 Objetivos específicos

- Analisar a eficácia da utilização de aparato sanguíneo e a possibilidade de substituição do método de alimentação para manutenção do insetário em laboratório;
- Avaliar os níveis de distensão do abdômen e o total de fêmeas alimentadas em cada repasto fornecido;
- Contabilizar os ovos e a viabilidade da prole de fêmeas alimentadas com as diferentes fontes sanguíneas;
- Comparar o peso das fêmeas durante os diferentes processos fisiológicos (após repasto sanguíneo, após digestão do sangue e após oviposição);

- Analisar a dinâmica de produção de proteínas precursoras do vitelo, a partir do método de expressão gênica relativa, para as fêmeas alimentadas de diferentes hospedeiros vertebrados;
- Relacionar a dinâmica de expressão gênica de vitelogeninas aos dados biológicos de oviposição.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 EVOLUÇÃO DA HEMATOFAGIA E ESCOLHA DE HOSPEDEIRO EM INSETOS

O hábito hematófago evoluiu de forma independente em diferentes linhagens de insetos – por vezes, dentro da mesma ordem –, com surgimento estimado entre o Jurássico e Cretáceo (BALASHOV, 1984; RIBEIRO, 1995; WHEELER *et al.*, 2001). Essa evolução múltipla fica evidente quando se observa, por exemplo, as diferenças em relação aos processos e estratégias de interação específicas com o hospedeiro; níveis de dependência do sangue; a presença do hábito em diferentes fases do ciclo de vida, em ambos os sexos ou somente na fêmea; as particularidades das peças bucais; entre outros. Por outro lado, houve convergência evolutiva de características relacionadas à hematofagia, sendo a principal delas, o surgimento de um aparato bucal essencialmente picador-sugador, adaptado para perfurar a pele e sugar o sangue do hospedeiro (FRIEND & SMITH, 1977; LEHANE, 2005; ARAÚJO *et al.*, 2012).

Os grupos de insetos hematófagos conhecidos atualmente são: os percevejos e triatomíneos (Ordem Hemiptera); os piolhos (Ordem Phthiraptera); as pulgas (Ordem Siphonaptera); ocasionalmente, alguns grupos de mariposas (Ordem Lepidoptera); e moscas, mosquitos e outros representantes desse grupo (Ordem Diptera) (LEHANE, 2005; BRUSCA *et al.*, 2018).

De acordo com dados de registros fósseis e análises morfofisiológicas e moleculares de grupos recentes, são propostas duas hipóteses macroevolutivas para o surgimento da hematofagia nos insetos, que podem se sobrepor (WAAGE, 1979; LEHANE, 2005). A primeira, inclui uma associação íntima e prolongada com os vertebrados (répteis e mamíferos primitivos) no ninho, para onde os insetos seriam atraídos pelas condições propícias e disponibilidade de alimento. Inicialmente, acredita-se que esses invertebrados eram mastigadores e alimentavam-se de detritos orgânicos, passando ocasionalmente a aproveitar produtos e secreções tegumentares e sangue em injúrias da pele do hospedeiro. Como o sangue apresenta um alto valor nutricional, a evolução da hematofagia e de um aparato bucal especializado podem ter sido favorecidas. Esse hábito também poderia ter evoluído longe do ninho, relacionado principalmente às vantagens de obter o alimento próximo ao local

necessário para deposição dos ovos e desenvolvimento das formas imaturas, o que geraria um menor custo energético para a fêmea (LEHANE, 2005).

Apesar dos mecanismos que envolvem o surgimento da hematofagia nos machos serem difíceis de explicar, uma associação íntima com vertebrado pode ter sido favorecida pela maior probabilidade de encontro com a fêmea e cópula bem sucedida (LEHANE, 2005). Um exemplo interessante de interação semelhante, é observado em *A. aegypti*, onde apesar do macho não ser hematófago, este vive essencialmente no mesmo ambiente da fêmea e é encontrado sobrevoando o hospedeiro humano na intenção de realizar a cópula (TEESDALE, 1955).

A segunda rota evolutiva envolve insetos com pré-adaptações morfofisiológicas, que em associação prolongada com vertebrados em locais de habitat compartilhado, e ocasional alimentação sanguínea, evoluíram para uma hematofagia completa. Acredita-se que esses organismos eram inicialmente fitófagos (alimentação de néctar) ou entomófagos (alimentação de produtos internos de outros invertebrados), que possuíam um aparato bucal perfurador ancestral (BEKLEMISHEV, 1957; DOWNES, 1970; WAAGE, 1979; LEHANE, 2005). Exemplos que ilustram essa teoria incluem mosquitos hematófagos que em condições de laboratório foram capazes de produzir ovos viáveis alimentando-se de líquidos corporais de larvas (HARRIS *et al.*, 1969) e grupos de borboletas em que o aparato bucal essencialmente adaptado para sugar néctar, pode ser utilizado para alimentação sanguínea ocasional (ZASPEL *et al.*, 2007).

Independente do caminho, a evolução da hematofagia favoreceu diversas adaptações relacionadas ao hábito, podendo também estar associada aos processos de coespeciação e coevolução entre vertebrados e invertebrados e, entre esses e organismos patogênicos (KIM *et al.*, 2011; DA SILVA NETO, 2013; CRUZ, 2017; FERREIRA *et al.*, 2018).

Dentro do grupo mais diversos de representantes hematófagos, os dípteros, a família Culicidae apresenta o maior grau de adaptações específicas relacionadas a alimentação sanguínea. Inferências ecológicas e de relacionamentos taxonômicos, sugerem que essa característica evoluiu no grupo de acordo com segunda rota anteriormente descrita. Nesta, as fêmeas se beneficiaram com o caráter nutritivo no quesito reprodutivo, enquanto os machos mantiveram o hábito fitófago. Logo, nos mosquitos, a relação parasito/hospedeiro estaria associada à via trófica apenas da fêmea e existiria certa independência do hospedeiro, pois a associação ocorre

somente no momento da alimentação (BALASHOV, 1984; WAAGE, 1979; HARBACH, 2007).

Uma característica de extrema relevância é a evolução de uma relação íntima de alguns mosquitos com o ser humano e o ambiente urbano, como é o caso de *Aedes aegypti*, *Culex quinquefasciatus* e *Anopheles gambiae* sensu stricto (s.s.), por exemplo. Apesar das fêmeas da maioria das espécies de mosquitos apresentarem hábito hematofágico, poucas apresentam preferência por hospedeiros específicos como o ser humano (TAKKEN & VERHULST *et al.*, 2013). De acordo com Powell & Tabachnick (2013), o hábito que alguns insetos vetores possuem de viver em ambiente urbano, o que os autores denominam como processo de “domesticação”, é um dos fenômenos mais importantes da entomologia médica. Logo, ainda há muitos questionamentos do porque essas características evoluíram em alguns grupos e qual a relação com a competência vetorial do inseto (EGAS *et al.*, 2004; LYIMO & FERGUSON, 2009; TAKKEN & VERHULST *et al.*, 2013).

Sabe-se que os primeiros hominídeos surgiram milhões de anos após os insetos hematófagos, sendo a história da espécie humana relativamente recente (cerca de 10 milhões de anos atrás) (POWELL & TABACHNICK, 2013). Por consequência, nesse período, os insetos já ocupavam uma grande variedade de habitats e possuíam adaptações específicas para hematofagia em diferentes vertebrados (LEHANE, 2005). Nesse sentido, pode-se considerar que os patógenos transmitidos por esses vetores tem uma longa história prévia de associação com outros animais vertebrados e as infecções ao ser humano foram subproduto derivado (POWELL & TABACHNICK, 2013).

Os seres humanos ocuparam e modificaram em larga escala o ambiente silvestre, impactando profundamente algumas espécies de insetos e favorecendo outras com adaptações ao ambiente modificado, criando-se nichos onde esses organismos vivem em ampla associação com os humanos (LEHANE, 2005; POWELL & TABACHNICK, 2013). Espécies generalistas resistentes podem evoluir ao longo do tempo para viver nesses ambientes e podem tornar-se especialistas na dieta humana (LYIMO & FERGUSON, 2009). As relações ecológicas mais próximas de mosquitos com os seres humanos geralmente são apresentadas por espécies vetorais com preferência alimentar pelo sangue humano e que dependem diretamente do ambiente artificial para realizar seus ciclos de vida (HARRINGTON *et al.* 2001; TAKKEN & VERHULST *et al.*, 2013; BROWN *et al.*, 2014).

Em Culicidae, a escolha por hospedeiro, em diferentes níveis, está relacionada aos padrões históricos de disponibilidade de hospedeiros e as variações genéticas das populações desses insetos. Logo, pode variar espacial e temporalmente, e entre populações e espécies. Sugere-se, empiricamente, que uma especialização alimentar surge em ambientes com disponibilidade de hospedeiros favoráveis e quando exista um custo-benefício positivo relacionado ao ganho energético e de aptidão, em restringir/limitar as possibilidades. Por outro lado, o generalismo estaria relacionado aos ambientes onde os encontros com hospedeiros ideais são baixos e o custo da espera seria alto, podendo refletir na morte do inseto antes da alimentação (KELLY & THOMPSON, 2000; PAGE, 2003; EGAS *et al.*, 2004; LYIMO & FERGUSON, 2009).

A distribuição do hospedeiro na natureza pode influenciar diretamente no gasto energético, sobrevivência e risco de predação durante a procura da fêmea por alimentação sanguínea. Porém, uma verdadeira preferência alimentar está associada a múltiplos fatores fisiológicos, comportamentais e ecológicos tanto dos insetos quanto dos potenciais hospedeiros vertebrados, que não se resumem apenas a disponibilidade do hospedeiro. Em culicídeos que apresentam alta especificidade com o ser humano, mesmo sob escassez do hospedeiro preferencial e disponibilidade de outras espécies no local, altas taxas de alimentação específica podem ocorrer, onde a fêmea procura ativamente seu hospedeiro preferencial (TAKKEN & KNOLS, 1999; LYIMO & FERGUSON, 2009; TAKKEN & VERHULST, 2013).

Algumas hipóteses levantadas, sugerem a relevância de características como a base nutricional e propriedades físicas e químicas do sangue; o custo e tempo de digestão no inseto; as características defensivas do hospedeiro e nível de suscetibilidade às picadas, na evolução de uma escolha de hospedeiro preferencial relacionada a possíveis aptidões reprodutivas e de sobrevivência da fêmea de mosquitos (LYIMO & FERGUSON, 2009; SCOTT & TAKKEN, 2012; TAKKEN & VERHULST, 2013).

O padrão de alimentação em humanos (e outros animais) pode variar de acordo com fatores como idade, tamanho, sexo, gravidez, saúde e até mesmo tipo sanguíneo (LINDSAY *et al.*, 1972; PORT *et al.*, 1980; EDMAN & SPIELMAN, 1988; KELLY, 2001; KWEKA *et al.*, 2010; MACIEL-DE-FREITAS *et al.*, 2013; PRASADINI *et al.*, 2019). O sangue dos vertebrados é composto principalmente por glóbulos vermelhos suspensos em plasma, com a solução geral contendo grandes quantidades de proteínas e, em menor quantidade, lipídios, carboidratos e moléculas inorgânicas, que

variam entre espécies e organismos (WINTROBE, 1933; DE SMET, 1978). De maneira geral, nos mamíferos, as hemácias são menores, anucleadas e cilíndricas, enquanto que nas demais classes são maiores e apresentam núcleo em formato achatado-oval (LEWIS, 1996). Nesse sentido, as variações na composição do sangue e tamanho dos eritrócitos podem ter consequências nutricionais para os mosquitos e na produção de ovos, desempenhando um papel importante na escolha de hospedeiro (HARRINGTON *et al.*, 2001; LYIMO & FERGUNSON, 2012; HARRISON *et al.*, 2021).

Características biomecânicas relacionadas a facilitação da ingestão de sangue e o custo energético da digestão também podem ser relevantes, apesar da necessidade de maiores estudos com Culicidae nessa área. Os parâmetros que atuam sobre a viscosidade do sangue durante o bombeamento do inseto pelo canal alimentar para o intestino podem influenciar na ingestão de sangue pelo inseto, dentre eles: temperatura corporal, hematócrito (fração do volume de sangue ocupada pelas hemácias), agregação eritrocitária, coagulação, agregação plaquetária, diâmetro do tubo pelo qual ele flui (ARAÚJO *et al.*, 2012). Também, como o acesso inicial aos aminoácidos depende da quebra mecânica das hemácias pela armadura cibarial, e como a morfologia dessa estrutura é distinta entre as espécies de mosquitos, a evolução pode ter favorecido relações preferencias com hospedeiros em que as células sanguíneas sejam hemolizadas de forma mais eficiente (LYIMO E FERGUSON, 2009).

Além disso, como a quantidade de sangue ingerido e a probabilidade de alimentação bem sucedida e sobrevivência durante o repasto também pode influenciar na aptidão da fêmea, fatores relacionados ao hospedeiro vertebrado, como o tamanho, capacidade defensiva e as barreiras físicas da pele, também podem ser relevantes na seleção e evolução de hospedeiros preferenciais (EDMAN *et al.*, 1972; KELLY, 2001; LEHANNE, 2005). Nesse sentido, um tamanho corporal maior poderia influenciar a escolha de hospedeiro pela emissão de maiores pistas olfatórias e fornecimento de maior superfície corporal para realização da picada (SMITH, 1956; PORT *et al.*, 1980; TORR, 2006; KWEKA *et al.*, 2010). Já a espessura da pele e a presença de pelos e penas poderiam influenciar na sondagem do inseto e bloquear o acesso a alimentação, enquanto que movimentos físicos, poderiam espantá-lo e até mata-lo (WAAGE & NONDO, 1982; WALKER & EDMAN *et al.*, 1985; EDMAN & SCOTT, 1987; KELLY *et al.*, 1996; LEHANNE, 2005).

2.2 HISTÓRIA EVOLUTIVA E PREFERÊNCIA ALIMENTAR EM *Aedes aegypti*

O *A. aegypti* pertence à ordem Diptera, subordem Nematocera, família Culicidae, subfamília Culicinae, tribo Aedini, gênero *Aedes* e subgênero *Stegomyia*. É considerado o vetor de maior importância epidemiológica da família Culicidae (HARBACH, 2007). A espécie é praticamente ubíqua, com ampla distribuição nas regiões tropicais e subtropicais de todo o mundo. Acredita-se que o inseto alcançou a região neotropical através das expedições colonizadoras e tráfico comercial com o Velho Mundo, sendo originário da África, onde estão a maioria dos outros membros do gênero (FORATTINI, 2002; GUBLER, 2002; VALLE *et al.*, 2015).

A espécie apresenta um alto grau de capacidade adaptativa e plasticidade genética, característica que evoluiu principalmente relacionada às diferentes condições aplicadas sobre o ambiente pelas atividades antrópicas, além das consecutivas introduções da espécie na região neotropical. Isso fica claro nas diferenças morfológicas, fisiológicas, genéticas e comportamentais, das populações provenientes de locais distintos na natureza e também daquelas estabelecidas em laboratório. No cenário atual, sem entrar na questão de possíveis divisões em subespécies, sabe-se que ainda existem populações com hábitos selvagens, vivendo em florestas e alimentando-se do sangue de mamíferos e répteis, que estão restritas ao local de origem da espécie na região subsaariana da África, e populações tipicamente conhecidas como domesticadas, com preferência pela dieta humana, que estão distribuídas amplamente e principalmente nas Américas (MCCLELLAND & WEITZ, 1963; LOPES, 1997; FORATTINI, 2002; BRAGA & VALLE, 2007; MCBRIDE, 2016).

Existem duas hipóteses para o surgimento de populações de *A. aegypti* adaptadas ao ambiente antrópico e especialistas no sangue humano (POWEEL & TABACHNICK, 2013). Em ambos os casos, sugere-se que esse modelo tenha evoluído de uma população ancestral generalista e zoofílica, que vivia em buracos de árvores no leste africano. No primeiro caso, acredita-se que populações ancestrais passaram por um isolamento geográfico em período de seca severa no Saara, cerca de 4000 anos atrás. Essa paisagem poderia ter favorecido a seleção de comportamentos domésticos e características relacionadas. Então, essas populações teriam sido disseminadas globalmente através de viagens intercontinentais de

explorações humanas iniciadas no século XV, especializando-se amplamente aos ambientes modificados (TABACHNICK, 1991; POWEEL & TABACHNICK, 2013).

No segundo caso, sugere-se que essa diferenciação ocorreu apenas durante o processo de transporte humano e colonização do Novo Mundo e não antes. Ou seja, a seleção da forma adaptada ocorreu em resposta às condições de transporte nos navios e aos novos locais (POWEEL & TABACHNICK, 2013). Ainda não está claro se todas as populações “domésticas” atuais resultaram de um único evento evolutivo inicial ou se ocorreram múltiplos eventos independentes de associação com os humanos que resultaram em populações distintas de acordo com as regiões de ocupação e processos de reintrodução (MATTINGLY, 1957; PETERSEN, 1977; BROWN *et al.*, 2011; BROWN *et al.*, 2014; WILKE *et al.*, 2019).

O processo de aproximação do ambiente antrópico na espécie pode ter sido acompanhado por uma maior competência em transmitir determinados patógenos aos humanos. Sugere-se que arboviroses humanas podem ter sofrido pressão de seleção favorecendo adaptações aos genótipos de mosquitos que se alimentam preferencialmente desses hospedeiros. Quanto maior a história evolutiva entre essas associações, mais eficientemente o vírus se replica no corpo do inseto - driblando seu sistema de defesa - e é transmitido para o hospedeiro vertebrado em outros repastos sanguíneos (MONCAYO *et al.*, 2004; LOBO *et al.*, 2009; POWELL & TABACHNICK, 2013).

Uma acentuada atração e elevados níveis de alimentação na natureza indicam a preferência alimentar de *A. aegypti* pelo sangue humano (MCCLELLAND & WEITZ, 1963; GOUCK, 1972; MCBRIDE *et al.*, 2014). Estudos mostram que mais de 80% da alimentação sanguínea na natureza, da forma domesticada da espécie, são provenientes de humanos. Sivan e colaboradores (2015) identificaram que 87,8% de fêmeas ingurgitadas de diferentes paisagens da Índia, alimentam-se preferencialmente de humanos, seguido de uma pequena proporção de mamíferos (vacas = 4,8% e cabras = 2,7%), aves (galinhas = 0,7%) e amostras de origem desconhecida (4,01%).

Em *A. aegypti* coletados em diferentes distritos da Tailândia, o registro de uma única refeição sanguínea em sangue humano ultrapassou 80% em todos os locais, sendo o segundo registro mais comum a combinação de sangue humano e de cachorro (entre 4,6% e 16%) (PONLAWAT & HARRINGTON, 2005). Em uma vila rural também da Tailândia, 88% das refeições sanguíneas avaliadas para fêmeas da

espécie, foram provenientes de um único repasto em humano e mais 7% de refeições múltiplas incluíram esse hospedeiro. A segunda refeição única mais comum foi realizada em cães (2%) e a terceira, em aves (1%), enquanto as refeições múltiplas mais comuns foram nas combinações humano e galinha, humano e cão e humano e boi, com cerca de 2% do total (SCOTT *et al.*, 1993). Já em área residencial de Porto Rico, 95% de fêmeas coletadas foram positivas para sangue humano e 2% para sangue humano em refeições mistas com outros hospedeiros (SCOTT *et al.*, 2000). Os mesmos autores, realizando comparações de coletas entre área residencial de Porto Rico e vila rural na Tailândia, encontraram que em geral, os mosquitos coletados em ambiente domiciliar de vila rural possuíam mais refeições múltiplas (42% duplas e 5% triplas) do que em ambiente domiciliar urbanizado (32% e 2%, respectivamente) (SCOTT *et al.*, 2000).

Sabe-se que o hábito hematófago evoluiu exclusivamente na fêmea de *A. aegypti*, associado à obtenção de nutrientes e aminoácidos, indispensáveis para o desenvolvimento do ovário e produção de ovos, característica chamada de anautogenia (GREENBERG, 1951; CLEMENTS, 1992). Por outro lado, em populações restritas ao leste africano, foram registrados diferentes graus de autogenia (produção de ovos sem alimentação sanguínea). Essa característica pode ser influenciada por questões ambientais e disponibilidade de hospedeiro, além de uma base genética (retida provavelmente dos ancestrais) que permite que populações onde o encontro com hospedeiro seja raro, sobrevivam ao longo do tempo. Nessas populações, uma alta taxa de alimentação na fase larval e refeições ótimas de açúcar parecem propiciar a produção de ovos de forma autógena (TRPIS, 1977; ARIANI *et al.*, 2015).

Desde que os mecanismos relacionados com a produção de ovos de *A. aegypti* passaram a ser melhor compreendidos, estudos começaram a buscar como o sangue e componentes do sangue de diferentes hospedeiros podem influenciar na preferência alimentar do inseto pelo sangue humano (MATHIS, 1934; DIMOND *et al.*, 1956; LEA *et al.*, 1958; DE SMET, 1978). Em conjunto com a evolução desses estudos, foram sendo propostas diferentes metodologias de aparatos e membranas artificiais como alternativas viáveis, eficazes e seguras, na substituição de repastos sanguíneos diretamente dos vertebrados em laboratório (GREENBERG, 1949; GREENBERG, 1951; LEA *et al.*, 1956; SPIELMAN & WONG, 1974; HAGEN *et al.*, 1990).

Experimentos iniciais, comparando o fornecimento de alimentação açucarada com sangue total de vertebrados (tratado com anticoagulante ou desfibrinado) ou com frações e componentes do sangue e outras fontes de proteína, evidenciaram que a alimentação primária e mais completa de sangue ocasionou a produção de um número significativamente maior de ovos pelas fêmeas de *A. aegypti*. Porém, outras alternativas como somente o plasma sanguíneo, sêrum, eritrócitos lavados, leite desnatado fresco, albumina diluída, entre outras dietas artificiais, também levaram a produção de ovos viáveis. O volume de sangue ingerido pela fêmea da espécie e a quantidade e suplementação de proteínas, aminoácidos e produtos proteicos nessa alimentação parecem ser os principais fatores relevantes nesse sentido, estando relacionados positivamente com o aumento da produção de ovos (WOKE 1937b; GREENBERG, 1951; LEA et al, 1956; SPIELMAN & WONG, 1974).

Ainda não está claro se as particularidades físicas e químicas específicas do sangue humano estão associadas a benefícios reprodutivos para *A. aegypti* e existem resultados divergentes nessa questão (HARRINGTON et al., 2001; LYIMO & FERGUSON, 2009; HARRISON et al., 2021). Trabalhos pioneiros primeiramente constataram diferenças nas produções de ovos de fêmeas a partir de comparações qualitativas de sangue e propuseram que o sangue humano poderia ser utilizado de forma mais eficiente pela espécie (GEOLDI, 1905 *apud* HARRINGTON et al., 2001; MATHIS, 1934 *apud* HARRINGTON et al., 2001). Comparações de diferentes fontes sanguíneas em condições experimentais (macaco, humano, coelho e porquinho-da-india) corroboraram essa visão, onde fêmeas de *A. aegypti* alimentadas com sangue humano produziram mais ovos (MATHIS, 1934 *apud* HARRINGTON et al, 2001).

Por outro lado, estudos subsequentes não conseguiram estabelecer a mesma lógica, mostrando que o sangue de outros vertebrados (dentre répteis, aves e mamíferos) foram mais relevantes nesse sentido (WOKE, 1937; LEA et al., 1958; BENNET, 1970; NAYAR & SAUERMAN, 1977). Sugeriu-se, então, que ao contrário do que se esperava, o sangue de répteis e aves poderiam levar a uma maior produção de ovos que de mamíferos, pois possuem um balanço de aminoácidos (principalmente altos níveis de isoleucina) e eritrócitos nucleados que são mais adequados para formação de ovo do que os aminoácidos e células sanguíneas anucleadas dos mamíferos. Nos mamíferos, os menores títulos de isoleucina nos humanos em relação aos outros animais do grupo, foram relacionados também com a menor produção de ovos de fêmeas alimentadas desse hospedeiro (GREENBERG, 1951; CLEMENTS,

1963; BENNET, 1970; SPIELMAN & WONG, 1974; CHANG, 1976; CHANG & JUDSON, 1977; NAYAR & SAUERMAN, 1977; BRIEGEL, 1985). Diferentes experimentos conduzidos em laboratório concluíram consistentemente que a isoleucina influencia positivamente na produção de ovos e início da oôgenese de *A. aegypti*, onde a suplementação e/ou títulos superiores presentes no sangue de determinados vertebrados, levou a uma maior capacidade reprodutiva da fêmea do mosquito (GREENBERG, 1951; DIMOND *et al.*, 1956; BELLAMY & BRACKEN, 1971; SPIELMAN & WONG, 1974; CHANG & JUDSON, 1977).

Chang & Judson (1977) relataram que o papel da isoleucina no desenvolvimento ovariano de *A. aegypti* não está associado diretamente com o desencadeamento da liberação endócrina de ecdisteroidogênio ovariano, pois o sangue relativamente pobre de isoleucina humano fornecido para a fêmea não apresentou diferença na liberação desse hormônio, se comparado com o sangue de porquinho-da-índia rico de aminoácido. Porém, os níveis de isoleucina apresentaram uma correlação positiva com o grau de maturação folicular e a presença dessas moléculas gerou uma maior incorporação da quantidade de aminoácidos marcados nas proteínas solúveis (vitelogeninas) nas culturas de órgãos do corpo gorduroso do inseto.

Harrington *et al.* (2001) encontraram uma relação positiva entre a isoleucina e o aumento da produção de ovos de *A. aegypti* somente quando as fêmeas foram alimentadas em conjunto com açúcar. Por outro lado, fêmeas alimentadas apenas com sangue humano apresentaram uma maior sobrevivência específica (em relação a idade) e maior produção reprodutiva total do que aquelas alimentadas em conjunto com açúcar ou em relação aquelas alimentadas com sangue de camundongo rico em isoleucina (com ou sem açúcar). Ou seja, apesar de um aumento da produção de ovos para fêmeas alimentadas com sangue de camundongo combinado com alimentação açucarada, essas não viveram tanto e produziram menos ovos totais ao longo da vida do que as alimentadas somente com sangue humano. Nesse sentido, foi proposto que um alto teor de isoleucina sem uma fonte de carboidrato, realoca a maioria ou todos os nutrientes do repasto para a vitelogênese, resultando nos esgotamentos de reservas para manutenção de outras funções e morte do inseto por fome. Logo, segundo os autores, os níveis específicos de isoleucina no sangue humano podem fornecer uma vantagem adaptativa para as fêmeas na natureza, que raramente se alimentam de açúcar.

2.3 CARACTERÍSTICAS DE *Aedes aegypti*

2.3.1 Adaptações ao hábito hematófago

Diferentes características morfológicas, fisiológicas e comportamentais explicam a eficiência de *A. aegypti* na ingestão, armazenamento e digestão do sangue. Nesse sentido, destaca-se o aparato bucal (ou probóscide) do tipo picador-sugador labial da fêmea, formado por seis estiletes, um par de maxilas e um de mandíbulas e a hipofaringe e o labro, que se encontram alojados no lábio (CONSOLI & LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994). A probóscide da fêmea é adaptada para solenofagia, ou seja, para perfurar a pele do hospedeiro e alcançar diretamente os vasos sanguíneos (ARAÚJO et al. 2012).

Durante o repasto, a fêmea inocula saliva – com propriedades anticoagulantes, antiplaquetárias e anestésicas – pelo canal salivar (hipofaringe), e suga o sangue pelo canal alimentar, formado pelo labro em aspecto de calha. A presença de duas bombas de sucção (faringeana e cibarial) também auxiliam na ingestão eficiente do sangue. A solenofagia e as propriedades anestésicas da saliva geram menores respostas fisiológicas e dano tecidual no hospedeiro, o que evita comportamentos agonistas imediatos (CLEMENTS, 1992; ARAÚJO et al. 2012; DA SILVA NETO, 2013; CRUZ, 2017).

Além disso, a presença de armadura cibarial e a produção de uma cascata complexa de serino-proteases do tipo tripsinas digestivas, permitem a quebra mecânica das hemácias e digestão química do sangue (CLEMENTS, 1992; ISOE et al., 2009; BRACKNEY et al., 2010). Existem também, diversos receptores gustativos e olfatórios presentes nas sensilas desses insetos, principalmente nos palpos labiais e antenas, que auxiliam na localização do hospedeiro (SENGUL & TU, 2010; MANOHARAN et al., 2013; EYUN et al., 2017). Foi demonstrado que, para a espécie, os perfis de respostas olfatórias podem ser assimilados em conjunto com as respostas defensivas dos hospedeiros (VINAUGER et al., 2018).

Durante a alimentação sanguínea, a fêmea pode ingerir até quatro vezes o seu peso, possuindo receptores do sistema nervoso que controlam a hiperfagia e evitam o estresse mecânico no intestino médio (GWADZ, 1969; NAYAR & SAUERMAN, 1977). As adaptações anatômicas do intestino médio - incluindo dois divertículos para armazenamento adicional e uma membrana acelular (matriz peritrófica) que isola o

conteúdo alimentar e protege o intestino – e as barreiras físicas de infecções do corpo do inseto, os hemócitos e proteínas defensivas da hemolinfa, e a microbiota intestinal própria, que atuam no impedimento de infecções e são fatores que influenciam na competência vetorial (JOBILING, 1987; SHAO *et al.*, 2001; CASTILLO *et al.*, 2011).

Além de adaptações ao hábito hematófago, esses insetos desenvolveram particularidades relacionadas a localização e distinção de seu hospedeiro preferencial. A fêmea possui uma maior atração pelos compostos voláteis emitidos pelo corpo humano, em relação a outros animais, e através de receptores odoríferos mediados por respostas neuronais, parece conseguir diferenciar e assimilar os níveis particulares de ácido láctico emitido pela pele através do suor em combinação com o CO₂ liberado pela respiração, o que desencadeia comportamentos predatórios e de escolha de hospedeiro (ACREE *et al.*, 1968; GEIER & BOECKH, 1996; DEKKER *et al.*, 2005; MCBRIDE *et al.*, 2014; MCBRIDE, 2016; VINAUGER *et al.*, 2018). Curiosamente, o macho também pode ser particularmente atraído por condições químicas do hospedeiro humano, característica que parece estar relacionada com o aumento das chances de encontro com a fêmea e cópula (DA SILVA PAIXÃO *et al.*, 2015).

2.3.2 Ciclo de vida

O *A. aegypti* é um organismo de fácil criação e manutenção em laboratório, sendo a maioria do conhecimento sobre o grupo obtido sobre essas condições. É um inseto holometábolo (metamorfose completa), com as fases de: ovo, quatro ínstaras larvais, pupa e adulto. A forma adulta, em geral, possui coloração escura, com escamas brancas que formam linhas pelo corpo. Além disso, tem um desenho característico de uma lira no dorso do tórax, que facilita a identificação da espécie (CONSOLI & LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; FORATTINI, 2002).

O ciclo de vida do ovo até emergência do inseto alado dura, em média, de sete a dez dias e depende, principalmente, das condições de temperatura e umidade do ambiente, disponibilidade de alimento e número de larvas no criadouro. Após a oviposição, a incubação do ovo dura cerca de 48 horas e o contato com a água parece ser o principal fator desencadeador da eclosão da larva. Em condições desfavoráveis, o ovo pode permanecer viável por um longo período de latência (diapausa embrionária) (FORATTINI, 2002; VALLE *et al.*, 2015)

As fases imaturas (larvas e pupa) ocorrem em ambiente aquático e são caracterizadas por organismos livres natantes, responsáveis por grande parte do crescimento e desenvolvimento do inseto. As larvas alimentam-se de matéria orgânica, tem grande mobilidade e acumulam nutrientes realizando alimentação intensa. Passam por quatro fases de desenvolvimento – que duram, no total, aproximadamente cinco dias - em que aumentam consideravelmente de tamanho. Já na fase de pupa, o inseto não se alimenta e permanece na superfície da água em grande parte do tempo, onde utiliza as reservas nutricionais para completar a metamorfose em dois/três dias (BESERRA *et al.*, 2009; MOHAMMED & CHADEE, 2011).

Os adultos alados, responsáveis pela reprodução, manutenção e dispersão da espécie, vivem em média 30 dias, sendo que as fêmeas geralmente apresentam maior longevidade – há registros de fêmeas vivendo em laboratório por mais de 90 dias (MACIEL-DE-FREITAS *et al.*, 2011) -, porém, esse parâmetro varia de acordo com as condições ambientais e características próprias do inseto e populações (BESERRA *et al.*, 2006; BESERRA *et al.*, 2009).

Os mosquitos da espécie estão aptos para copular após a emergência e endurecimento do exoesqueleto. No macho, esse período é um pouco mais lento, podendo durar até 24 horas, relacionado ao processo de rotação de 180° da genitália externa. Por outro lado, foi observado em condições laboratoriais, que mesmo a fêmea podendo começar a copular logo após a emergência, essa parece refratária a inseminação nas primeiras 48-72 horas (GWADZ, 1967; LEA, 1967 *apud* HARTBERG, 1971; GWADZ & CRAIG, 1968; GWADZ & CRAIG, 1971).

A cópula pode ocorrer em espaços pequenos, durante o voo ou em repouso, geralmente próxima ao hospedeiro humano no domicílio (CONSOLI & LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994). Apesar dos mecanismos envolvidos não estarem completamente elucidados, os machos também podem participar da formação de pequenos agregados (“enxames”) na natureza, próximos aos hospedeiros vertebrados (TEESDALE, 1955; HARTBERG, 1971; CATOR *et al.*, 2011; OLIVA *et al.*, 2014; ALDERSLEY & CATOR, 2019). Independente do caso, quando as fêmeas se aproximam, provavelmente atraídas pelos hospedeiros sanguíneos, são detectadas e interceptadas pelos machos, que as reconhecem através de frequências específicas emitidas pelos batimentos das asas. O acasalamento não parece ocorrer forçadamente e de forma aleatória, sendo que a escolha da fêmea vem sendo

relacionada com características como o tamanho do macho e a convergência harmônica da batida das asas entre os sexos (HELINSKI & HARRINGTON, 2011; CATOR & ZANTI, 2016; ALDERSLEY & CANTOR, 2019;).

As fêmeas são essencialmente monogâmicas, no sentido em que o processo de inseminação ocorre predominantemente uma única vez. Nesse caso, fêmeas virgens, após a primeira inseminação, tornam-se refratárias a um novo acasalamento. Como possuem espermatecas que permitem armazenar os espermatozoides, podem produzir ovos viáveis por toda a vida (GWADZ & CRAIG, 1971; FORATTINI, 2002). Por outro lado, mesmo em baixa frequência, fêmeas que receberam sêmen de mais de um macho foram observadas em experimentos em laboratório e semi-campo utilizando populações naturais (HELINSKI *et al.*, 2012; RICHARDSON *et al.*, 2015; DEGNER & HARRINGTON, 2016). Esses registros podem estar relacionados e depender de diferentes fatores, como: tempo pós-acasalamento, depreciação do sêmen de machos, cópulas e inseminações interrompidas e múltiplos ciclos de oviposição da fêmea (GWADZ *et al.*, 1970; WILLIAMS, 1980; HELINSKI *et al.*, 2012).

Já nos machos, o acasalamento pode ocorrer com múltiplas fêmeas ao longo da vida, potencializando as chances de reprodução bem sucedida, mas são limitados pela capacidade de inseminação consecutiva em um único dia ou período, o que pode afetar a fecundidade da fêmea (WEDELL, 2007; HELINSKI & HARRINGTON, 2011). Estudos apontam que são necessárias três a seis inseminações consecutivas para a diminuição significativa do sêmen do macho (GWADZ & CRAIG, 1970; JONES, 1973; FOSTER & LEA 1975 *apud* HELINSKI & HARRINGTON, 2011). É importante ressaltar que a cópula/acasalamento indica o posicionamento e encontro dos órgãos sexuais femininos e masculinos, enquanto a inseminação propriamente refere-se ao despejo e retenção dos espermatozoides e líquido seminal na fêmea. Logo, pode ocorrer cópula sem inseminação bem sucedida (AKEY & JONES, 1968; HARTBERG, 1971).

Após o acasalamento, a voracidade da fêmea pelo sangue é intensificada e através de diversas estratégias especializadas, ocorre a busca ativa pelo hospedeiro vertebrado, para completar o ciclo gonotrófico. Em *A. aegypti*, a cópula geralmente precede a procura por sangue, mas o contrário já foi observado em população de campo do leste da África (TEESDALE, 1955; FORATTINI, 2002; VALLE *et al.*, 2015). Geralmente, um repasto completo e o início da digestão do sangue é suficiente para ativar a maturação dos ovários e concluir a produção dos ovos. Porém, sabe-se que a fêmea pode apresentar discordância gonotrófica, ou seja, realizar mais de um

repasto em diferentes hospedeiros durante o mesmo ciclo gonotrófico. Isso é um fator preocupante, pois aumenta a competência vetorial e transmissão de arboviroses entre hospedeiros. Essa característica pode estar relacionada a deficiências nutricionais do sangue, interrupção do repasto ou não ingurgitamento completo do abdômen e pode depender do período de ovogênese da fêmea grávida, no qual estágios avançados de desenvolvimento ovariano poderiam inibir a procura por outros hospedeiros (KLOWDEN & LEA 1979; TRPIS & HAUSERMANN, 1986; SCOTT *et al.*, 1993; KLOWDEN, 1995; BARATA *et al.*, 2001; LIMA-CAMARA *et al.*, 2007; VALLE *et al.*, 2015).

Por outro lado, estudos sugerem que múltiplos repastos são comuns na natureza e podem estar associados a um aumento de fecundidade da fêmea, sendo o nível de distensão do abdômen e de desenvolvimento ovariano não suficientes para inibir a procura por nova alimentação. Ovócitos de fêmeas coletadas em campo, com múltiplas refeições, geralmente se encontram em estágios avançados de desenvolvimento e os registros de espécimes com abdômen parcialmente preenchidos são baixos, sendo a maioria encontrada com abdômen totalmente preenchido (SCOTT *et al.*, 2000; HARRINGTON *et al.*, 2005; FARJANA & TUNO, 2012; FARJANA & TUNO, 2013).

As fêmeas de *A. aegypti* realizam atividade diurna, picando geralmente no início da manhã e fim da tarde (FORATTINI, 2002; VALLE *et al.*, 2015). A alimentação de solução açucarada, representada principalmente pelo néctar de plantas na natureza, é realizada por ambos os sexos e está relacionada a obtenção de energia para diversas funções vitais (CLEMENTS, 1992). Mesmo sendo apta a essa alimentação, os fatores relacionados a escolha da fêmea em quando utilizar açúcar e/ou sangue e a relação com a presença de cobertura vegetal e densidade de hospedeiros, ainda são incertos. Experimentos realizados em uma vila rural da Tailândia indicam que fêmeas de populações naturais apresentam uma taxa muito baixa de alimentação de açúcar, mesmo com a disponibilidade vegetal do local (EDMAN *et al.*, 1992).

Day *et al.* (1994), realizando experimentos de laboratório e observações de campo, apontaram que as fêmeas tem uma maior longevidade em laboratório se receberem uma fonte de carboidrato, porém isso não aumenta o sucesso reprodutivo. Em seus ensaios controlados, fêmeas que se alimentaram apenas de açúcar ou de açúcar e sangue, tiveram a sobrevivência aumentada, porém uma menor fecundidade em relação à aquelas alimentadas apenas com sangue de galinha.

Normalmente, após a digestão completa de uma refeição sanguínea e ocorrência do período vitelogênico (cerca de 72 horas depois do repasto), as fêmeas grávidas estão prontas para ovipor e buscam – através de respostas visuais, olfatórias e quimiotáticas -, preferencialmente, locais sombreados, com água razoavelmente limpa e concentrações moderadas de matéria orgânica e sais, para realizar a postura (BENTLEY & DAY, 1989; MERRIT *et al.*, 1992; CONSOLI & LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; SOUZA-SANTOS, 1999; VAREJÃO, 2005). Por outro lado, como esses insetos possuem grande capacidade de se adaptar às adversidades, podem sobreviver, mesmo com menor viabilidade, em esgotos e água salobra (BESERRA *et al.*, 2010; BRITO-ARDUINO *et al.*, 2010; BRITO-ARDUINO *et al.*, 2015; SURENDRAN *et al.*, 2018). Navarro *et al.* (2003) mostraram, em laboratório, que a oviposição de *A. aegypti* diminui de acordo com a salinidade, porém, a presença de bactérias em água residual e de lagoa coletadas em campo, favorecem positivamente a oviposição, se comparadas com água destilada.

Existe, nas populações neotropicais, uma preferência por criadouros artificiais (grande variedade) em relação aos naturais (como bromélias, bambu e buracos em rochas), o que pode ser explicado pelas vantagens de um ambiente mais seguro, com ampla disponibilidade de criadouros com condições ideais para oviposição e desenvolvimento larval. Logo, os adultos dessas regiões tendem a não se afastar do ambiente domiciliar. Em geral, a fêmea grávida realiza, no mesmo ciclo gonotrófico, a postura em diferentes ocasiões e localidades, ou seja, utiliza diferentes criadouros. Esse comportamento é relacionado a uma estratégia de dispersão e sobrevivência da espécie, além de evitar competição intraespecífica (CONSOLI & LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; FORATINNI, 2002).

2.3.3 Ciclo gonotrófico e vitelogênese

O ciclo gonotrófico dura em média 3-4 dias e compreende o período sucedido entre a realização do repasto sanguíneo e a oviposição. Na fêmea, o primeiro ciclo depende do tempo para realização dos processos relacionados à cópula, busca por hospedeiro, alimentação sanguínea, digestão do sangue, maturação dos ovos, busca por criadouros e postura. Necessariamente, os ciclos seguintes não dependem mais do acasalamento, pois os óvulos podem ser fertilizados pelo sêmen do primeiro macho que foi armazenado nas espermatecas. Além disso, condições ambientais como

temperatura, umidade relativa do ar, fotoperíodo e disponibilidade de hospedeiro, e fatores intrínsecos, como abundância populacional e tamanho do mosquito, influenciam diretamente nas atividades da fêmea e na duração do ciclo gonotrófico (FORATTINI, 2002; VALLE *et al.*, 2015).

As fêmeas possuem um par de ovários com diversos ovários compostos por câmaras que irão conter um oócito (ovo primário que por divisões meióticas forma o óvulo ou ovócito), células nutridoras e foliculares. Essas câmaras e o oócito primário permanecem com o desenvolvimento interrompido até a realização do repasto sanguíneo. Após isso, inicia-se o processo de maturação (oogênese) e acúmulo de vitelo que irá nutrir o embrião (vitelogênese) (CLEMENTS, 1992; CONSOLI & LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994).

Durante a oogênese, ocorrem cinco estágios (I-V) em que os ovócitos assumem formas e tamanhos distintos com a deposição de vitelo. Nos estágios III ou IV, geralmente no segundo dia após alimentação, as fêmeas são consideradas pré-grávidas. Nesse período, se a fêmea voltar a se alimentar de sangue, identifica-se a discordância gonotrófica, o que pode atrasar o desenvolvimento do estágio V em até dois dias. No estágio V, a fêmea está grávida e pronta para ovulação e oviposição. A fertilização ocorre durante a oviposição e passagem do ovo pelo oviduto, quando os espermatozoides são liberados pelas espermatecas e podem penetrar pela micrópila e fecundar o ovo. Uma única fêmea de *A. aegypti* pode depositar mais de 100 ovos em cada ciclo (CLEMENTS, 1992; CONSOLI & LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; ROY *et al.*, 2016; VALLE *et al.*, 2015; VALZANIA *et al.*, 2019).

A proporção de ovos eclodidos em uma mesma desova varia principalmente em relação a fatores ambientais (VALLE *et al.*, 2005). A viabilidade dos ovos depositados geralmente é alta, porém, mesmo sob condições adequadas para oviposição, ocasionalmente, ovos totalmente formados podem ser retidos na fêmea. Ovos defeituosos (encolhidos, divididos, fora do tamanho adequado ou sem coloração normal) também podem ser depositados, em baixa frequência (WOKE, 1995). Esses ovos são considerados na literatura como colapsados ou não viáveis (embrião não viável), podendo ser considerado “morto” (BYTTEBIER *et al.*, 2014; FISCHER *et al.*, 2011; BIBBS *et al.*, 2018).

Os processos fisiológicos, hormonais e moleculares envolvidos no ciclo gonotrófico e principalmente na produção de ovos, foram e continuam sendo alvo de extensos estudos na espécie (RAIKHEL *et al.*, 2002; CHEN *et al.*, 2004). A

vitelogenese foi amplamente descrita, sendo o processo definido pela cascata de sinalização hormonal e proteica, que culmina na síntese de proteínas precursoras do vitelo e incorporação dessas moléculas pelos ovócitos em desenvolvimento. O corpo gorduroso possui extrema importância nessa etapa, sendo o tecido metabólico responsável pela produção e liberação dessas proteínas na hemolinfa. Na grande maioria dos casos, a ativação da via, em *A. aegypti*, depende diretamente do volume de sangue ingerido, do nível de distensão abdominal, tempo de digestão e da disponibilidade nutricional (KLOWDEN, 1997; RAIKHEL *et al.*, 2002; CHEN *et al.*, 2004; ATTARDO *et al.*, 2005). Spielman & Wong (1974) mostraram que quantidades inferiores a 0,5 mg de sangue não são suficientes para estimular a maturação dos ovários.

A vitelogenina é uma das principais proteínas precursoras do vitelo em animais ovíparos e o gene codificante (Vg) foi caracterizado para *A. aegypti* por Chen *et al.* (1994). Esse gene é ativado especificamente pela alimentação sanguínea (em populações anautógenas), transcrito em níveis altos no corpo do inseto – há diferença de expressão considerando o tempo decorrido e tipo de tecido analisado - e principal alvo de regulação da via, sendo essencial para a produção dos ovos. Logo, torna-se de grande interesse para estudos genéticos e fisiológicos relacionados especificamente ao repasto sanguíneo e a oviposição (RAIKHEL *et al.*, 2002). Hays e Raikhel (1990), Cho *et al.* (1991) e Cho *et al.* (1999) mostraram também, que outras duas pró-enzimas – carboxipeptidase vitelogênica (VCP) e catepsina B (VCB) - são secretadas de forma semelhante pelo corpo gorduroso e participam da formação do vitelo durante a embriogênese. A VCP atua como segunda proteína precursora mais abundante, sendo que seu gene precursor é expresso de forma harmônica e possui sítios conservados em relação a Vg. Nos anos 2000, Sun *et al.*, descobriram que a lipoforina (Lp), uma proteína transportadora de lipídios, também atua como precursora na formação do vitelo.

Basicamente, no mosquito, a vitelogenese ocorre em dois períodos: pré-vitelogênico e vitelogênico. A pré-vitelogenese é a fase preparatória, que ocorre antes do repasto sanguíneo. O hormônio juvenil III (JH III) é essencial nesse período e durante os três dias iniciais de emergência da fêmea, atua na maturação do corpo gorduroso e ovários, para que respondam competentemente aos hormônios que promovem a vitelogenese. Esse período também é indicado como necessário para a fêmea se tornar receptiva à inseminação e alimentação sanguínea. Após essa fase, o

inseto pode permanecer em estado de espera até a oportunidade de alimentação sanguínea (RAIKHEL *et al.*, 2002; ATTARDO *et al.*, 2005).

O período vitelogênico inicia-se com a fase de síntese, que ocorre durante as primeiras 30 horas após o repasto e acompanha o processo digestivo do sangue que ocorre no intestino médio do inseto. Inicialmente, fatores relacionados a distensão abdominal e sinais nutricionais, ativam a liberação de peptídeos semelhantes a insulina (ILPs – “*insulin-like peptides*”), relacionados a expressão de serino-proteases do tipo tripsinas digestivas, e do hormônio ecdisteroidogênico ovariano (OHE – do inglês “*ovary ecdysteroidogenic hormone*”), o principal fator desencadeador da vitelogênese (RAIKHEL, 1992; RAIKHEL *et al.*, 1999; RAIKHEL *et al.*, 2002; ISOE *et al.*, 2009; GULIA-NUSS *et al.*, 2011).

O OHE é secretado por células neuroendócrinas do cérebro e nos ovários, e estimula a produção e secreção de ecdisona na hemolinfa. No corpo gorduroso, a ecdisona transforma-se em 20-hidroxiecdisona, sua forma ativa. Essas moléculas, após serem reconhecidas pelos receptores nucleares das células do tecido, regulam uma cascata de fatores de transcrição e genes responsáveis pela produção de proteínas precursoras do vitelo. Este é o evento principal que leva a uma maturação bem sucedida dos ovos. Por outro lado, o corpo gorduroso também depende da sinalização nutricional de aminoácidos liberados na digestão sanguínea para iniciar a síntese. Também é nesse período que os ovários são ativados para captar, armazenar e transformar as proteínas precursoras em grânulos de vitelo (HAGEDORN, 1985; HAGEDORN, 1989; RAIKHEL, 1992; RAIKHEL *et al.*, 2002; ATTARDO *et al.*, 2005).

A 20-hidroxiecdisona tem seu pico de atividade cerca de 18 horas após o repasto sanguíneo, enquanto as proteínas precursoras tem os maiores níveis próximo a 24 horas. A depleção da 20-hidroxiecdisona na hemolinfa leva ao fim do período de síntese. A fase de término vai de 30 horas até 72 horas, quando as fêmeas estão aptas para ovipositar. Durante esse período, ocorre o fim da síntese de proteínas precursoras (próxima as 48 horas), término de digestão do sangue e finalização da biossíntese de tripsinas (aproximadamente 54 h), formação do córion e regressão do corpo gorduroso ao estado inicial (RAIKHEL & DHADIALLA, 1994; RAIKHEL *et al.*, 1999; RAIKHEL *et al.*, 2002; BRIEGEL, 2003; ATTARDO *et al.*, 2005; BRACKNEY *et al.*, 2010; GULIA-NUSS *et al.*, 2011; ROY *et al.*, 2016).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MANUTENÇÃO DA CEPA ROCKEFELLER

A cepa Rockefeller de *Aedes aegypti* é uma população estabelecida em laboratório e tida como referência em suscetibilidade aos inseticidas. Um insetário dessa espécie é mantida no Laboratório de Morfologia e Fisiologia de Culicidae e Chironomidae (LAMFIC²), sendo a criação realizada em sala individualizada com ambiente controlado (temperatura $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $60\pm 10\%$ e fotoperíodo 12h: 12h).

A manutenção da população de mosquitos no laboratório ocorre por meio do repasto sanguíneo utilizando camundongos “Swiss” fêmeas (espécie *Mus musculus*) anestesiados, provenientes do biotério da UFPR (CEUA 719). Os mosquitos adultos são mantidos em gaiolas de criação, em proporção de duas fêmeas para um macho, com alimentação açucarada (mel e água, em mamadeiras adaptadas) “*ad libitum*”. A alimentação sanguínea é fornecida de duas a três vezes por semana, para uma boa reposição de ovos.

O recipiente para oviposição consiste em copo contendo água desclorada e acima é adicionado papel filtro dobrado (como um filtro coador de café), onde as fêmeas realizam a postura atraídas pela proximidade à água. A cada dois dias, os papéis filtro são trocados (para evitar a eclosão das larvas) e após secagem, são armazenados em saco de papel (com data e identificação), em potes plásticos fechados. Quando existe necessidade de reposição dos insetos ou para realização de experimentos, os ovos previamente armazenados (de acordo com a quantidade necessária) são colocados em copos de 500/300 mL contendo água reconstituída ou desclorada e ração em flocos para peixe triturada em pó (TetraMin®).

Após a eclosão, as larvas são transferidas para bandejas de criação de 5 L (complementando com água), com reposição de ração diária, na proporção adequada para cada estágio larval e densidade populacional (Tabela 1, baseada em Carvalho *et al.*, 2014). Geralmente, são adicionadas 800 larvas por bandeja, separadas e contabilizadas no primeiro instar, com pipeta Pasteur de vidro. Seguindo-se esses padrões, os insetos atingem estágio de pupa, em média, no sétimo dia após o contato inicial dos ovos com a água.

Tabela 1. Regime geral de alimentação para larvas de *Aedes aegypti* (mg de comida por larva por

dia) utilizando ração triturada para peixe. Para calcular o total é necessário multiplicar pelo nível de larvas por bandeja (CARVALHO *et al.*, 2014).

Dia	Quantidade de alimento por larva (mg)
1	0,06
2	0,08
3	0,16
4	0,31
5	0,64
6	0,32
7	0,32
8	0,32
9	0,16
10	0,08
11	0,06

As pupas são separadas, em lupa, através da observação do tamanho (as fêmeas são, em geral, consideravelmente maiores que os machos, conforme observado na Figura 1, em vista lateral) e também da análise do último segmento abdominal. Existem diferenças morfológicas na forma do lobo genital, no último segmento ventral, abaixo das “pás”. Na Figura 1, destacado em vermelho, pode-se observar que as fêmeas apresentam esse lobo fino e curto, enquanto nos machos, são alongados e largos (CARVALHO *et al.*, 2014).

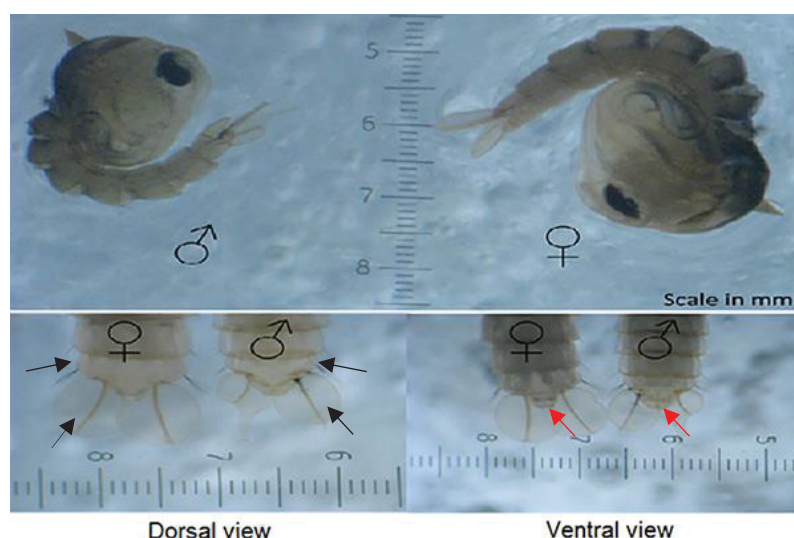


Figura 1. Distinção de pupas fêmeas e machos de *Aedes aegypti*, através das diferenças morfológicas do lobo genital (indicado por flechas vermelhas, na fêmea e no macho, em vista ventral). As flechas pretas (vista dorsal) indicam o último segmento abdominal (acima) e as “pás” (em número par, abaixo), em ambos os sexos. Fonte: CARVALHO *et al.*, 2014.

Por fim, as pupas são contabilizadas e adicionadas nas gaiolas em copos de 50 mL, para emergência dos adultos e continuação do ciclo.

3.2 HOSPEDEIROS VERTEBRADOS

Os hospedeiros vertebrados utilizados para desenvolver esse trabalho correspondem aos animais encontrados com frequência em ambiente urbano e semiurbano. Foram utilizados dois mamíferos, um da espécie humana (*Homo sapiens*) e um canídeo (*Canis lupus familiares*, da raça Pastor Belga) e uma ave (*Gallus gallus domesticus*, galinha doméstica). O sexo feminino foi padronizado pela disponibilidade de representantes desse sexo para o experimento.

O sangue humano foi fornecido por uma pesquisadora da Universidade Federal do Paraná, saudável, com exames gerais (sangue e urina) e de COVID-19 realizados previamente. O sangue foi retirado por uma profissional de enfermagem habilitada para essa função (Alaise Dalmazo, Coren/PR 855.024).

O cão e a ave foram disponibilizados pelo médico veterinário parceiro deste trabalho e são provenientes de criação própria. A coleta de sangue também foi realizada pelo profissional (Marcos Felipe Wagner Rauth, Crmv/PR 9689). Esses animais, através de testes hematológicos (esfregaço sanguíneo e teste parasitológico de ponta de orelha), foram atestados pelo veterinário como livres de hemoparasitos que poderiam influenciar no experimento.

Todos os hospedeiros envolvidos estavam previamente alimentados de forma pertinente a cada espécie, considerando o interesse de fornecer sangue nutritivo aos insetos. O sangue foi retirado em dois momentos distintos (em locais adequados e higienizados), para o Bioensaio I e II, observando o peso de cada animal e quantia máxima que pode ser retirada sem prejudicar o hospedeiro. A coleta foi realizada no mesmo dia de cada experimento e o sangue foi armazenado na geladeira até o momento de utilização. Dos mamíferos, foram coletado 5 mL de sangue e da ave, 3mL, considerando a quantidade necessária para cada aparato artificial de alimentação. Foram utilizadas seringas e agulhas estéreis e descartáveis e tubos de coleta para armazenamento.

O anticoagulante utilizado foi o CPDA-1 (citrato fosfato dextrose adenina) na proporção de 0,14 mL para 1 mL de sangue. As condições para coleta e biossegurança seguiram as normas do Ministério da Saúde, de acordo com as

aprovações da Comissão de Ética em Uso de Animais da UFPR (CEUA - BIO UFPR número 719) e do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFPR - CEP/SD (Certificado de Apresentação de Apreciação Ética – CAAE número 44032721.1.0000.0102).

3.3 APARATO ARTIFICIAL DE ALIMENTAÇÃO SANGUÍNEA

O repasto em aparato artificial foi escolhido para evitar o incomodo causado pela picada de diversos mosquitos diretamente na pele do hospedeiro e para excluir o viés da questão de atratividade e de diferentes barreiras físicas (p. ex.: pelos e penas) de cada animal. Além disso, houve interesse em analisar a eficiência dessa metodologia alternativa para otimizar a manutenção do insetário sob condições de laboratório.

Em tentativas prévias de utilização de membrana artificial de parafilme através de adaptações do método de Costa-da-Silva *et al.* (2013), não foi observado atratividade de fêmeas ao alimentador e nenhuma tentativa de alimentação de sucesso. Como alternativa, o tecido TNT foi empregado para substituir uma membrana artificial de plástico, considerando-se resultados positivos encontrados por Anjolette & Macoris (2016).

O protótipo final do aparato utilizado (Figura 2) foi composto por recipiente acrílico contendo tampa com uma superfície central côncava, água aquecida, tecido TNT e elástico. A montagem consistiu em: I) preencher o recipiente até sua capacidade máxima - para que houvesse contato com a superfície inferior da tampa – e fechá-lo; II) adicionar o sangue sobre a parte central da tampa; III) em contato direto com o sangue, adicionar o tecido TNT e prendê-lo firmemente com elástico, simulando uma película perfurante. Por fim, o aparato foi adicionado na superfície inferior da gaiola contendo as fêmeas de mosquitos.

A água utilizada no interior do aparato foi mantida em equipamento de banho maria digital na temperatura de 45°C, para que após a montagem e finalização do aparato, a mesma estivesse próxima aos 42-40°C. Isso foi necessário para conservar a temperatura do sangue na tampa entre 36-38°C, padronização média de temperatura inicial de interesse para adição do aparato na gaiola. O sangue pré-aquecido em banho maria (40°C) foi adicionado com auxílio de uma pipeta Pasteur descartável, sendo utilizado 1 mL por aparato.

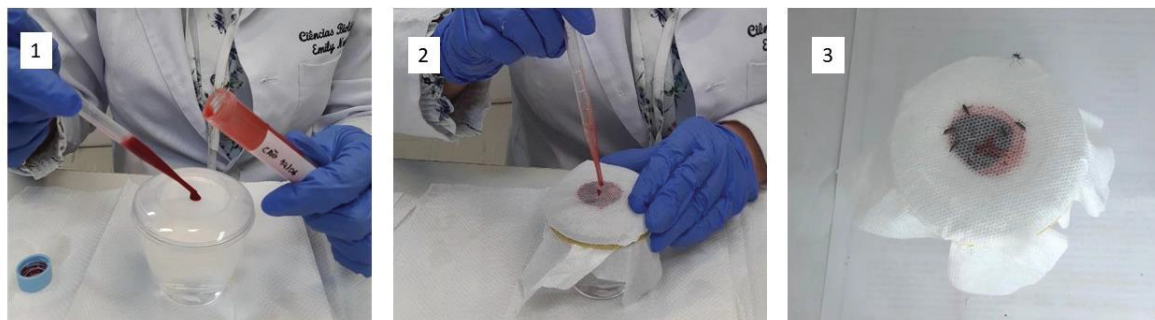


Figura 2. Montagem e funcionamento do aparato artificial de alimentação sanguínea. Em “1” o sangue foi inserido sobre a tampa do pote acrílico (já com água aquecida em seu anterior). Em “2”, o pano TNT foi adicionado e sobre ele foi acrescido um pouco de sangue. Em “3”, fêmeas de *Aedes aegypti* alimentando-se através do aparato artificial, dentro da gaiola de criação. Fonte: a autora.

3.4 BIOENSAIO I (ANÁLISES BIOLÓGICAS)

No Bioensaio I, além do fornecimento de três tipos de repastos sanguíneos (cão, ave e humano) através do aparato artificial, foi incluído como análise o repasto fornecido diretamente de camundongo anestesiado de acordo com protocolo aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA 719). Nesse sentido, as fêmeas de *A. aegypti* foram avaliadas sobre duas situações em relação à alimentação de sangue sob condições de laboratório: (1) alimentação diretamente sobre hospedeiro (camundongo) e (2) alimentação através de aparato artificial, utilizando sangue de três hospedeiros (humano, cão e galinha). Os resultados obtidos após alimentação sobre camundongo representam os níveis que almejam ser alcançados sobre alimentador artificial.

Para os experimentos, foram utilizados ovos da criação Rockefeller, com no máximo três meses de armazenamento e provenientes de uma mesma geração. A obtenção e manutenção dos espécimes foi realizada de forma padronizada e de acordo com o que foi descrito no tópico “3.1”. Para o bioensaio, foi realizada uma produção em massa, onde todo o ciclo de vida dos insetos ocorreu dentro de câmara B.O.D., em condições ambientais adequadas para a espécie (temperatura $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade 60 ± 10 e fotoperíodo 12h: 12h).

Inicialmente, foram montadas quatro “gaiolas mães” e adicionadas 350 pupas fêmeas e 175 pupas machos em cada, mantendo a proporção 2:1 e totalizando 1400 fêmeas e 700 machos iniciais. Os adultos necessários foram superestimados,

considerando a mortalidade existente até o dia da realização do repasto sanguíneo. Além disso, as pupas triadas estavam dentro de três dias de diferença de idade.

Após a emergência dos adultos, esses foram mantidos com solução açucarada até o dia anterior ao repasto sanguíneo, que ocorreu entre 12-15 dias de idade das fêmeas. Tal período foi utilizado para aumentar a probabilidade de que todas as fêmeas estivessem acasaladas e consequentemente, apresentassem maior voracidade pelo sangue. O mel foi retirado no dia anterior para evitar que a fêmea estivesse alimentada e com o abdômen preenchido por essa fonte. No dia do experimento, as fêmeas foram distribuídas (utilizando Capturador Manual de Castro) nas gaiolas específicas de cada réplica, de forma aleatória, contabilizando 100 fêmeas por gaiola (totalizando 1200 fêmeas para o experimento). Os bioensaios foram realizados em câmaras contendo cada uma das réplicas de diferentes hospedeiros (Figura 3), de acordo com esquema da Figura 4. O padrão de distribuição das réplicas foi seguido até o término de todas as análises biológicas pertinentes e finalização dessa etapa.



Figura 3. Gaiolas dispostas na “B.O.D. 3” para o Bioensaio I. Fonte: a autora.

Desenho experimental do Bioensaio I

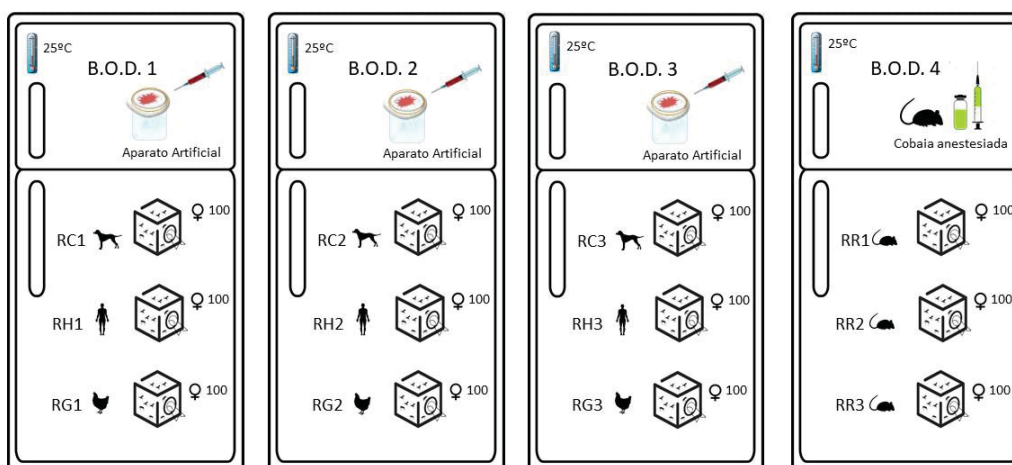


Figura 4. Desenho experimental para o repasto sanguíneo do Bioensaio I, ilustrando a disposição das réplicas nas B.O.Ds. Foram adicionadas 100 fêmeas de *Aedes aegypti* previamente acasaladas, com 12-15 dias de vida, por réplica. O repasto foi fornecido por 20 minutos. As siglas RG, RH, RC e RR correspondem, respectivamente, as réplicas do sangue de galinha, humano, cão e camundongo, seguidas pelo número da réplica (1, 2 ou 3). Fonte: a autora.

O repasto sanguíneo foi realizado próximo das 16:00 horas, considerando o período de maior atividade da espécie na natureza (FORATTINI, 2002; VALLE *et al.*, 2015). No repasto diretamente do hospedeiro (camundongo), o mesmo animal foi utilizado para as três réplicas e mantido por 20 minutos em cada réplica. A adição do aparato foi cronometrada para cada gaiola para garantir a retirada em exatos 20 minutos e as B.O.Ds foram mantidas fechadas durante o período de alimentação.

Após o término do período de alimentação sanguínea, as fêmeas com abdômen visivelmente preenchido em algum nível, foram retiradas com sugador (Capturador Manual de Castro) e mantidas em recipientes menores. Nesse momento, as análises se dividiram em duas etapas: **Etapa I** – Individualização de 15 fêmeas totalmente ingurgitadas (analisadas em lupa de mão) de cada uma das réplicas, para oviposição e análises de fecundidade e fertilidade; **Etapa II** – Congelamento do restante das fêmeas e análise de nível de distensão do abdômen de cada uma, em microscópio estereoscópio (lupa).

Os dados biológicos foram avaliados pelos testes de Shapiro Wilk ($p < 0,05$) e Levene's ($P < 0,05$), para verificação de normalidade e homogeneidade de distribuição, respectivamente. Os dados paramétricos foram analisados pelo teste ANOVA ($p \leq 0,05$) unifatorial com a posteriori de Tukey e os dados não paramétricos foram comparados pelo teste de Kruskal- Wallis ($p < 0,0001$) com a posteriori de *Dunn's post hoc*, através do programa "Past 4.02".

3.4.1 Etapa I

Considerando que as fêmeas necessitam da distensão completa do abdômen para induzir a produção ótima de ovos (SPIELMAN & WONG, 1974), foram selecionadas fêmeas completamente ingurgitadas para análises de número e viabilidade dos ovos. O número total de ovos postos pelas fêmeas indicou a fecundidade, enquanto a fertilidade foi medida pela quantidade de larvas emergidas após eclosão dos ovos, em porcentagem (CLEMENTS, 1992). Além disso, como o intuito foi testar a influência do sangue completo de vertebrados sobre a produtividade de ovos das fêmeas, de maneira semelhante como ocorreria na natureza, as fêmeas selecionadas estavam apenas com sangue vermelho no abdômen.

Nessa etapa, 15 fêmeas totalmente ingurgitadas (abdômen com sangue escuro) foram individualizadas aleatoriamente para cada réplica. Os mosquitos foram inicialmente pesados em balança de precisão (a leitura foi feita quando o mosquito se encontrava pousado em recipiente previamente tarado) e transferidos para recipientes próprios de criação individual, devidamente identificados e contendo alimentador com água e mel (Figura 5). No total, foram individualizadas 180 fêmeas totalmente ingurgitadas com sangue (15 fêmeas para cada uma das três réplicas, para os quatro tipos de hospedeiros).

Após 72 horas (três dias), período em que a fêmea está pronta para ovipor (após a digestão do sangue e vitelogênese), foi adicionado o recipiente para oviposição, consistindo em copo de 50 mL com água reconstituída e papel filtro acima, com identificação individual (Figura 5).



Figura 5. Fêmeas de *Aedes aegypti* individualizadas nos recipientes contendo alimentador com solução açucarada e potes de oviposição (dentro de B.O.D.). Fonte: a autora.

Dois dias depois da adição do recipiente de oviposição, os papéis filtro com ovos foram retirados e as fêmeas foram novamente pesadas. Após a secagem de todos os papéis, os ovos de cada papel filtro foram contados em microscópio estereoscópio (lupa) (Figura 6). A contagem foi realizada de forma separada para os ovos túrgidos (normais e dilatados) e ovos colapsados (amassados ou ressecados em algum nível), sendo a morfologia de cada um exemplificada na Figura 7.

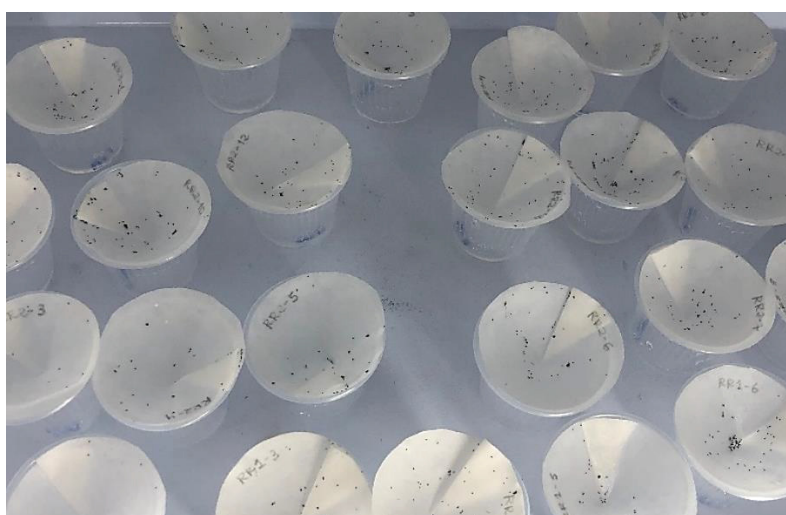


Figura 6. Ovos de *Aedes. aegypti* secando em B.O.D. Cada papel equivale aos ovos (pontinhos pretos) de uma única fêmea. Fonte: a autora.

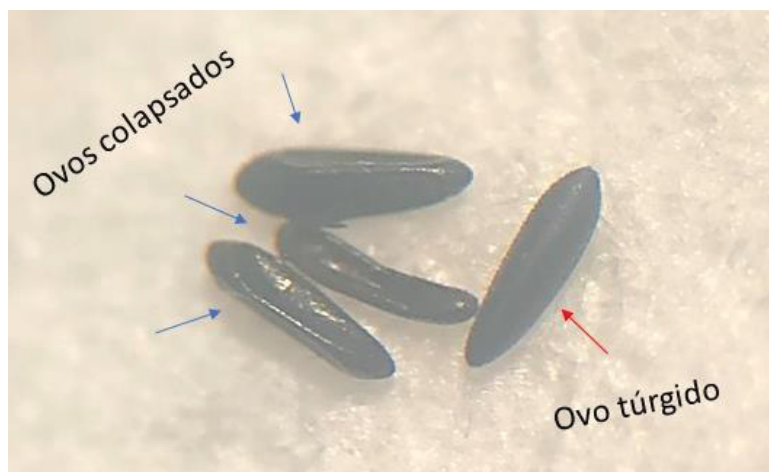


Figura 7. Ovos de *Aedes aegypti* em lupa para ilustrar a morfologia de um ovo túrgido (em vermelho) e ovos colapsados (em azul). Os ovos da espécie medem cerca de 0,4 mm. Fonte: a autora.

Após contagem dos ovos nos papéis filtro, os mesmos foram colocados individualmente em copos de 300 mL com água reconstituída, para eclosão das larvas (Figura 8). As larvas de primeiro instar começaram a ser contabilizadas cerca de um dia após o contato inicial dos ovos com a água (considerando a sequência em que foi adicionada nos copos). Inicialmente, a água e as larvas de cada copo foram despejadas em recipientes de vidro, com plástico preto abaixo (para facilitar visualização). Então, foi feita a contagem utilizando pipeta Pasteur de vidro e contador de mão. Por último, as larvas foram descartadas em água sanitária.



Figura 8. Papéis filtro com ovos individuais de fêmeas de *Aedes aegypti* em copos de 300 mL (dentro da B.O.D.), para eclosão das larvas. Fonte: a autora.

3.4.2 Etapa II

Nessa etapa, as fêmeas ingurgitadas restantes, para cada uma das réplicas, foram congeladas e triadas em lupa de acordo com os níveis de distensão do abdômen pré-estabelecidos (Figura 9). Características do sangue no abdômen também foram anotadas, visto que foi observado alimentação somente com o plasma sanguíneo (Figura 10).

Níveis de distensão do abdômen de fêmeas de *Aedes Aegypti*



Figura 9. Níveis de distensão do abdômen, após alimentação sanguínea, estabelecidos pela autora para triagem das fêmeas de *Aedes aegypti*. **Nível 1:** Abdômen pouco distendido. Nível de distensão vertical do abdômen: menos de um esclerito de distância (indicado na figura em tracejado amarelo) entre os escleritos ventrais (esternitos) e dorsais (tergitos) – considerando 3° e 4° escleritos abdominais (indicados com flechas amarelas). Penúltimos escleritos do abdômen pouco ou não separados entre si (circulado em amarelo). **Nível 2:** Abdômen parcialmente distendido. Nível de distensão vertical do abdômen: um/ mais de um/ menos de dois escleritos de distância (indicado na figura em tracejado laranja) entre os escleritos ventrais (esternitos) e dorsais (tergitos) – considerando 3° e 4° escleritos abdominais (indicados com flechas laranjas). Penúltimos escleritos do abdômen começam a separar, com um ângulo médio de abertura (circulado em laranja). **Nível 3:** Abdômen quase ou totalmente distendido. pouco ou não separados entre si (circulado em amarelo). Nível 2: Abdômen parcialmente distendido. Nível de distensão vertical do abdômen: dois/ mais de dois escleritos de distância (indicado na figura em tracejado vermelho) entre os escleritos ventrais (esternitos) e dorsais (tergitos) – considerando 3° e 4° escleritos abdominais (indicados com flechas vermelhas). Penúltimos escleritos do abdômen separados entre si, com um ângulo amplo de abertura (circulado em vermelho). Fonte: a autora.



1. Fêmea totalmente ingurgitada com sangue;



2. Fêmea totalmente ingurgitada apenas com plasma sanguíneo.

Figura 10. Fêmeas de *Aedes aegypti*. Em “1”: fêmea totalmente ingurgitada com sangue (nesse caso, os escleritos chegam a separar longitudinalmente). Em “2”: fêmea totalmente ingurgitada apenas com plasma sanguíneo (direita). Ambas as fêmeas realizaram repasto sanguíneo em aparato artificial. Fonte: a autora.

3.5 BIOENSAIO II (ANÁLISES MOLECULARES)

O Bioensaio II ocorreu, inicialmente, de forma semelhante ao bioensaio anterior. Porém, para esse experimento, foram utilizados apenas os três hospedeiros vertebrados de interesse (com utilização de aparato artificial). Novamente, uma criação em massa foi iniciada no laboratório e foram utilizadas quatro “gaiolas mães”, onde as pupas fêmeas e machos foram adicionadas em proporção 2:1 (275 fêmeas para 138 machos, totalizando 1100 fêmeas e 552 machos disponíveis inicialmente).

As fêmeas foram mantidas nas “gaiolas mães” para acasalamento por 12-15 dias (diferença máxima de idade de três dias), com alimentação açucarada. No dia anterior ao experimento, as mamadeiras foram retiradas e fêmeas que se alimentaram somente dessa fonte durante esse período foram aleatorizadas, separadas e congeladas em freezer -80°C. Foram armazenados 20 *pools* de quatro fêmeas (totalizando 100), para serem utilizadas como amostras controles (não submetidas a qualquer tipo de alimentação sanguínea) nas análises moleculares. No dia do bioensaio, as fêmeas foram adicionadas de forma aleatória nas gaiolas/réplicas e a organização nas B.O.Ds seguiu o mesmo padrão anterior, com intuito de manter cada experimento de forma inicialmente separada (“B.O.D. 1” com “réplicas 1”, “B.O.D. 2” com “réplicas 2” e “B.O.D. 3” com “réplicas 3”). Logo, foram utilizadas nove réplicas, sendo três para cada hospedeiro sanguíneo (cão, galinha e humano) e foram adicionadas 100 fêmeas por réplica, totalizando 900 fêmeas. O repasto também foi padronizado da mesma forma e ocorreu próximo das 16:00 horas da tarde, por um período de 20 minutos cronometrado em cada gaiola.

Em seguida, todas as fêmeas totalmente ingurgitadas (com sangue escuro no abdômen) de cada gaiola foram separadas, utilizando lupa de mão e sugador. As fêmeas provenientes das réplicas dos mesmos hospedeiros sanguíneos foram adicionadas em um único recipiente (totalizando três recipientes finais), onde foram mantidas por 24 horas após o repasto sanguíneo (em B.O.D.), considerando o período de pico de atividade das enzimas vitelogênicas. Após, os recipientes foram colocados em freezer -20°C (para sacrificar os mosquitos) e os espécimes foram separados

sobre o gelo, em *pools* de quatro (de forma aleatória, dentro de cada tipo de repasto), com auxílio de pinça autoclavada.

Para conservação do material genético, as fêmeas foram armazenadas em *eppendorfs* em freezer -80°C. Todo o material utilizado para análises moleculares foi previamente autoclavado. Os tubos foram identificados de acordo com o tipo de repasto sanguíneo proveniente e número do *pool* adquirido.

3.5.1 Primers

As sequências dos *primers* dos genes de interesse foram selecionadas em bibliografia pertinente utilizando RT- qPCR (“*reverse transcription – quantitative real time PCR*”). Além dos genes de interesse relacionados a ovogênese (catepsina B vitelogênica e vitelogenina), a actina - comumente utilizada em estudos de expressão gênica com insetos - foi escolhida para normalização da expressão basal, funcionando como controle interno/endógeno (genes de referência) (ARAUJO *et al.*, 2011; ISOE *et al.*, 2009).

Tabela 2. Sequência de nucleotídeos dos *primers* utilizados para cada gene de interesse, sendo Fw =*forward* e Rv =*reverse*. Abaixo, foi adicionado a sigla adotada no trabalho e o número de acesso do *Genbank* (se disponibilizado).

Primer	Sequência
Actina (Act) (PARK <i>et al.</i> , 2006)	Fw 5' GAC TAC CTG ATG AAG ATC CTG AC 3' Rv 5' GGC ACA GCT TCT CCT TAA TGT CAC 3'
Vitelogenina (VgA1) (L41842) (ISOE & HAGEDORN, 2007)	Fw 5' CCA CAG TAT CCT TCA TGC TCT TT 3' Rv 5' GTT CGT ACT CTT CAA ATC CAT TCT 3'
Catepsina B vitelogênica (CatB) (AF127592) (ARAUJO <i>et al.</i> , 2011)	Fw 5' AGT CTA AGG GAA ATC CGC GAT C 3' Rv 5' ACG AGT GAC AGC AAG ACA GCA 3'

O gene referência é aquele que possui um nível de expressão contínuo em todas as células do organismo, mesmo após tratamentos experimentais. Apesar disso, diversos estudos demonstram que mesmo esses genes possuem certa modulação em condições experimentais e nem sempre estão expressos igualmente em todos os tecidos. Por isso, geralmente é utilizado mais de um normalizador (BUSTIN *et al.*, 2009; PFAFFL, 2001).

Os primers são sequências iniciadoras que irão alinhar e propiciar a amplificação das fitas de cDNA pela enzima DNA polimerase (BUSTIN *et al.*, 2009). Foram obtidos liofilizados e preparados para uso final em laboratório, de acordo com informações do fabricante (Síntese Biotecnologia – IDT®).

3.5.1.1 Gradiente de temperatura de anelamento dos *primers*

O teste de temperatura ideal de anelamento foi realizado em PCR convencional com gradiente de temperaturas (seis temperaturas entre 45°C e 65°C). Para isso, foram utilizadas seis cópias de uma amostra de RNA do organismo de interesse (já transformada em cDNA), os reagentes comuns de um protocolo de PCR convencional e uma programação adequada de ciclos no termociclador. Foi utilizado, para um volume final de 10 µl por reação: 1,2 µl de 10x PCR *Buffer* (contendo MgCl₂) (disponível no *kit*); 0,1 µl Taq DNA polimerase (Sigma-Aldrich®, “from *Thermus aquaticus*”, ref.:D1806); 1 µl de *primer forward*; 1 µl de *primer reverse*; 0,8 µl de MgCl₂ (25mM) (Applied Biosystems®, ref.: N8080241); 0,4 µl dNTP mix (10mM) (Promega®, dNTPs *Sets* conc. 100mM, ref. U1330); 4 µl de água Milli-Q® autoclavada e 1,5 µl de amostra. Os parâmetros utilizados no termociclador foram: 94°C por 3 min; 32 ciclos de: 94°C por 30 seg., 52°C por 30 seg. e 72°C por 60 seg. ; 72°C por 5 min.; “hold ∞” de 4°C.

Em seguida, foi realizada uma eletroforese em gel de agarose (0,600 g de agarose para 60mL de tampão TAE diluído em 1X (Tris-Acetato EDTA *buffer* 10x, Sigma-Aldrich®, ref.:T9650), com pipetagem de 4 µl de amostra mais 1,5 µl de *safer dye* (Kasvi®, ref. K9-16C) e 1 µl de *ladder* (marcador molecular de 50 p.b.) mais 1,5 µl de *safer* e 3 µl de água Milli-Q® autoclavada, com os parâmetros de 80 V por 160 M.A por meia hora. No gel, foi possível visualizar a temperatura ideal (de preferência comum) de anelamento (formação de bandas nítidas e no peso molecular esperado) para utilização dos *primers* na PCR em tempo real (qPCR – PCR quantitativo). A temperatura escolhida para utilização foi de 58,9°C para os quatro *primers* de interesse.

3.5.1.2 Teste de eficiência dos *primers* em PCR tempo real

O teste de eficiência dos *primers* foi realizado em qPCR (fabricante Rotor-Gene®), através da diluição seriada (fator de diluição de 4x) de uma amostra de cDNA com concentração conhecida, totalizando cinco diluições (três réplicas para cada diluição e três controles negativos para cada *primer*). Para cada reação com um volume final de 10 µl, utilizou-se: 5 µl de *PowerUp SYBR Green Master Mix* (Applied Biosystems®, ref.:A25742); 0,3 µl de *primer forward* (10mM), 0,3 µl de *primer reverse* (10mM) e 3,4 µl de água Milli-Q® autoclavada. Foi utilizado o “*standart cycling mode*” de indicação do SYBR, que leva em consideração a temperatura adequada de anelamento dos primers. O cálculo de eficiência dos *primers* foi baseado no método de Pfaffl (2001), onde os valores de concentrações das amostras são transformados em *log* e plotados em um gráfico de regressão linear contra os valores de “Cq” (Ciclos de quantificação). O “Cq” equivalente ao valor de expressão a partir da emissão de fluorescência e indica em qual ciclo a fluorêscia começou a ser detectada pelo equipamento. É importante ressaltar que os valores finais de “Cq” são obtidos da média entre as três réplicas realizadas para cada amostra, onde o desvio padrão deve ser inferior ao valor “1”. Ou seja, é possível excluir uma das réplicas para ajustar os valores. Por fim, o valor de *slope* (coeficiente angular, medida de inclinação da reta), obtido no gráfico de regressão linear, foi utilizado para aplicação da fórmula abaixo, onde os valores aceitáveis para utilização dos *primers* devem estar entre 90 e 110%.

$$\text{Eficiência (\%)} = \left(10^{\frac{-1}{\text{Slope}-1}} \right) \times 100$$

Tabela 3. Valores de eficiência dos primers utilizados.

Primer	Eficiência (em %)
Actina	105,82
Vitelogenina	92,58
Catepsina B vitelogênica	103,93

3.5.2 Extração de RNA das amostras e tratamento com DNase

A extração de RNA foi realizada em *pools* de quatro fêmeas, com o “*RNeasy Mini Kit*” (Qiagen®, ref:74106), seguindo todas as instruções do fabricante e com

um volume final de reação de 50 µl. Após a extração de todas as amostras, foi avaliada a concentração de RNA e o grau de pureza das amostras (considerando as absorbâncias 260 nm e 280 nm) em “*NanoDrop 2000/2000c*” (Espectrofotômetro da Thermo Scientific®).

Em seguida, foi realizado o tratamento com o kit de “*DNase I Amplification Grade*” (Sigma®, ref: AMPD1), utilizando o protocolo da marca e normalizando as amostras para a menor concentração de RNA obtida no espectrofotômetro. No caso, foi utilizado um volume final de solução de 33 µl (para tratar até 24 µl de RNA). Como a amostra de menor concentração bruta de RNA (após extração) foi de 70,8 ng por µl, em uma “regra de x” considerando o volume final de tratamento (24 µl), foi calculado uma concentração final de aproximadamente 1700 ng. Todas as amostras foram padronizadas de acordo com essa concentração de interesse.

Novamente, após o tratamento com DNase, o RNA foi quantificado e avaliado em *NanoDrop*® e as amostras foram normalizadas (para garantir maior precisão) para a menor concentração, durante a RT-PCR.

3.5.3 RT-PCR (Reação em cadeia da Polimerase com Transcriptase Reversa)

Utilizando a fita de RNA de cadeia simples, em uma reação em cadeia da polimerase (PCR - *polymerase chain reaction*), a enzima transcriptase reversa sintetiza uma cadeia de DNA complementar (cDNA) que é mais estável para ser utilizada nos experimentos. Para essa etapa, foi utilizado o kit “*High Capacity cDNA Reverse Transcription*” (Applied Biosystem®), seguindo o protocolo da marca para um volume final de reação de 20 µl (para até 14,2 µl de RNA). Considerando que a menor amostra após tratamento com DNase foi de 40 ng/µl e a quantidade máxima de RNA para ser utilizada na reação foi de 14,2 µl, obteve-se uma concentração final de interesse de 568 ng, para qual todas as outras amostras foram padronizadas. Ao fim da RT-PCR, as amostras foram diluídas em 10 µl de água Milli-Q® autoclavada, o que permitiu um volume final maior para utilização em PCR tempo real.

3.5.4 PCR em tempo real (qPCR – quantitativa)

O equipamento de qPCR permite acoplar os processos de amplificação, detecção e quantificação do DNA, através da fluorescência emitida pelos ciclos de amplificações da amostra (BUSTIN *et al.*, 2009). Os parâmetros comuns, utilizados para cada amostra, foram de: 5 µl de *PowerUp SYBR Green Master Mix* (Applied Biosystems®, ref.:A25742); 0,3 µl de *primer forward* (10mM), 0,3 µl de *primer reverse* (10mM) e 3,4 µl de água Milli-Q® autoclavada. Foi utilizado o equipamento RotorGene® e o “*standart cycling mode*” de indicação do SYBR, sendo a temperatura de anelamento previamente estabelecida, de 58,9°C.

Para a expressão gênica, foi possível utilizar oito *pools* de fêmeas que se alimentaram de sangue de galinha, 12 *pools* do sangue de cão, 13 *pools* do sangue humano e 13 *pools* do controle (fêmeas alimentadas apenas com água e mel), sendo essa quantidade referente as extrações íntegras de RNA obtidas.

Todas as amostras foram rodadas em triplicatas e para cada *primer* (em cada rodada de q-PCR), foram realizados controles negativos (sem amostra), também em triplicatas. Se detectado contaminação no controle negativo, as análises deveriam ser repetidas. Os valores de desvio padrão para os ciclos de quantificação (Cq) considerados estavam abaixo de um (para no mínimo duas das réplicas).

3.5.5 Análise de Expressão Relativa

O método utilizado para análise dos dados foi o de Expressão Relativa – método $\Delta\Delta CT$, que considera a diferença nas eficiências dos primers (PFAFFL, 2001). Primeiramente, para cada gene, foi feita uma média dos valores de expressão (valores de Cq) das amostras de fêmeas que não realizaram repasto sanguíneo (“controle mel”). Essa média foi então subtraída dos valores de cada uma das amostras de interesse (dos três tipos de hospedeiros). O primeiro delta é o resultado dessa subtração para o gene de interesse e o segundo delta, para o gene referência. Para obtenção do dado bruto da expressão relativa de cada amostra, para cada gene de interesse, foi aplicada a fórmula a seguir:

$$\text{Relação da Expressão Gênica: } \frac{(EGI)^{\Delta Cq_{GI}}}{(EGR)^{\Delta Cq_{GR}}}$$

Na fórmula, “EGR” corresponde ao valor de eficiência do gene de referência, “EGI” ao valor de eficiência do gene de interesse, “ ΔCq GI” ao valor de delta para o gene de interesse e “ ΔCq GR” ao valor de delta calculado para o gene referência.

Os resultados foram analisados para relevância estatística através do programa Past 4.02. Foram utilizados os testes Shapiro Wilk ($p < 0,05$) e Levene`s ($p < 0,05$) para avaliar a normalidade e homogeneidade na distribuição dos dados de expressão gênica relativa. Os dados paramétricos foram avaliados pelo teste ANOVA ($p \leq 0,05$) unifatorial com a posteriori de Tukey e os dados não paramétricos foram comparados pelo teste de Kruskal- Wallis ($p < 0,0001$) com a posteriori de *Dunn’s post hoc*. Os gráficos foram confeccionados pelo programa R Studio.

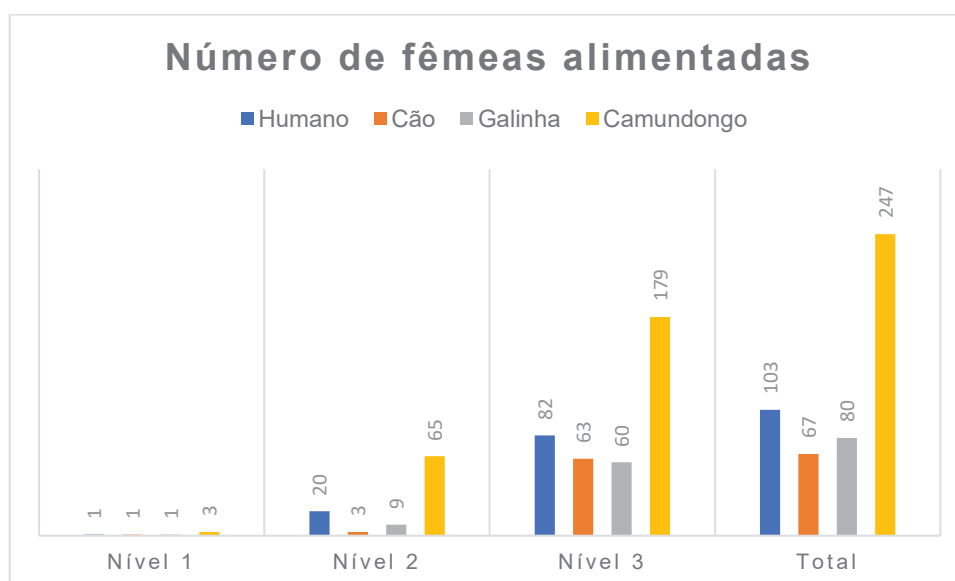
4 RESULTADOS

4.1 BIOENSAIO I (DADOS BIOLÓGICOS)

4.1.1 Repasto sanguíneo e ingurgitamento de fêmeas

O maior número de fêmeas que realizaram alimentação sanguínea (independentemente de nível) foi encontrado para o repasto diretamente sobre o hospedeiro camundongo (média de 82,34%), seguido, consecutivamente, pelo repasto utilizando sangue humano (34,33%), de galinha (26,66%) e de cão (23,33%), através de aparato artificial (Figura 11). Além disso, a maioria das fêmeas que realizaram alimentação sanguínea encontraram-se em “Nível 3” de preenchimento do abdômen, para todas as fontes sanguíneas (Humano: 79,61%; Cão: 94,03%; Galinha: 87,5% e Camundongo - 72,47%).

Figura 11. Número de fêmeas de *Aedes aegypti* que realizaram alimentação sanguínea (nos três níveis de distensão do abdômen) para cada hospedeiro sanguíneo. Número de fêmeas submetidas ao repasto por réplica = 100 f.; total = 300 f., para cada fonte sanguínea. Nível 1 = pouco; Nível 2 = médio; Nível 3 = totalmente ingurgitadas.



Considerando os dados de cada uma das réplicas, a análise de *Kruskal-Wallis* apontou diferença significativa entre o número de fêmeas que realizaram alimentação em “Nível 2” e “Nível 3” e entre o total de fêmeas alimentadas (independentemente de nível) para os diferentes hospedeiros. O teste de *Dunn’s post hoc*, a partir da análise entre os pares, indicou que o número de fêmeas em “Nível 2”, “Nível 3” e o total de fêmeas alimentadas diretamente em camundongo foi discrepante em relação a

alimentação artificial com sangue de cão ($p= 0,005092$, $p= 0,0233$ e $p= 0,008965$, respectivamente) e galinha ($p= 0,0446$, $p=0,0233$ e $p= 0,0306$).

Uma particularidade observada em fêmeas alimentadas através do aparato artificial, foi a alimentação apenas com plasma sanguíneo, constatada através da coloração clara do abdômen. Um total de 16,5% de fêmeas alimentadas com sangue humano estavam apenas com plasma no abdômen (independentemente do nível), enquanto 2,5% do total de fêmeas alimentadas com sangue de galinha foram encontradas no mesmo estado.

4.1.2 Produção e viabilidade dos ovos

O teste de *Kruskal-Wallis*, utilizando os dados individuais de oviposição [Apêndice 1, 2, 3 e 4], indicou que o número de ovos produzidos pelas fêmeas divergiu significativamente entre as fontes sanguíneas recebidas (dados resumidos na Tabela 4). A análise de *Dunn's post hoc* mostrou que as fêmeas que receberam o sangue de galinha e camundongo, apresentaram significativamente uma maior fecundidade do que aquelas que se alimentaram de sangue humano ($p= 0,000338$ e $p=3,57E-06$, respectivamente) e de cão ($p= 0,03044$ e $p= 0,001935$).

Tabela 4. Dados biológicos gerais, referentes ao número de ovos e larvas eclodidas para as fêmeas de *Aedes aegypti* que receberam cada uma das fontes sanguíneas. Os dados destacados com “*” foram os que apresentaram diferença significativa, nas análises estatísticas.

Fonte sanguínea	N° fêmeas analisadas	Total de ovos (fecundidade)	Ovos colapsados	%	Ovos túrgidos	%	Total de larvas	% de eclosão larval (fertilidade)
Humano	29	1644	622	37,83	1022	62,17	557	33,88
Cão	30	2306	1617*	70,12	689	28,89	358	11,68
Galinha	30	3066*	381	12,43	2685*	87,57	1817*	59,26*
Camundongo (alimentação direta)	44	4747*	581	12,24	4166*	87,76	3513*	74,00*

Observação: foi detectado um defeito no fotoperíodo da B.O.D. que continha as réplicas de número três dos hospedeiros cão, humano e galinha, que permaneceu com a luzes ligadas intermitentemente. Como o fotoperíodo pode afetar diretamente na postura dos ovos (GOMES *et al.*, 2006), essa réplica foi excluída para esses hospedeiros. No caso do hospedeiro humano e camundongo, houve a morte de uma das fêmeas antes das análises.

Na mesma premissa, houve uma produção significativamente maior de ovos túrgidos para as fêmeas que receberam o sangue de galinha e camundongo, em relação àquelas que receberam sangue humano ($p=5,36E-05$ e $p=1,29 E-06$,

respectivamente) e de cão ($p=6,65E-07$ e $p=4,37E-09$). Por outro lado, apenas as fêmeas alimentadas com sangue de cão apresentaram diferença significativa na produção de ovos colapsados ($p=0,01586$, em comparação com repasto humano; $p=0,004718$, em comparação com repasto de galinha; $p=0,0005076$, em comparação com repasto diretamente de camundongo).

A análise de *Kruskal-Wallis* também mostrou que houve diferença significativa no número de larvas eclodidas dos ovos das fêmeas que receberam diferentes fontes sanguíneas [Apêndice 1, 2, 3 e 4] (Tabela 4). O teste de *Dunn's post hoc* indicou que o número de larvas provenientes de fêmeas que receberam sangue de galinha e camundongo, foram significativamente maiores do que para aquelas que receberam sangue de cão e humano, onde para os pares, encontrou-se: Galinha-Humano: $p=0,001027$; Galinha- Cão: $p=2,65E-0,5$; Camundongo-Humano: $p=8,46E-0,7$; Camundongo-Cão: $p=1,97E-0,9$.

A observação individual dos parâmetros biológicos (resumidos na Tabela 5) evidenciou que a maioria das fêmeas analisadas realizaram oviposição após alimentação sanguínea (86,21% - repasto humano; 93,33% - repasto cão; 96,66% - repasto galinha; 100% - repasto camundongo). Considerando as fêmeas que realizaram postura, 100% apresentaram ovos túrgidos (mínimo de um) após alimentação com sangue de galinha e camundongo, enquanto que para o sangue humano e de cão as taxas foram de 76,00% e 67,86%, respectivamente. Em relação ao número de fêmeas com ovos colapsados (mínimo de um), houve uma variação de 88,64% para aquelas com sangue de camundongo, 92,00% para sangue humano, 96,43% para sangue de cão e 96,55% para sangue de galinha.

Tabela 5. Decomposição dos dados individuais referentes ao número de fêmeas de *Aedes aegypti* que ovipositaram em relação aos diferentes padrões de quantidade de ovos (túrgidos e colapsados).

Fonte Sanguê	Número de fêmeas									
	Analis.	Ovipositaram (mín. um ovo)	Ovos túrgidos				Ovos colapsados			
			Mín. de um	Menos de 25	Mais de 50	Mais de 100	Mín. de um	Menos de 25	Mais de 50	Mais de 100
Humano	29	25	19	14	9	3	23	17	5	0
Cão	30	28	19	19	6	0	27	12	14	9
Galinha	30	29	29	4	23	17	28	24	2	0

Camundongo (alimentação direta)	44	44	44	5	35	20	39	34	3	0
---------------------------------------	----	----	----	---	----	----	----	----	---	---

Proporcionalmente, o maior número de fêmeas com mais de 100 ovos túrgidos (Tabela 5) foi encontrado para a fonte sanguínea galinha (58,62%), seguido pelo camundongo (45,45%). Apenas 12% de fêmeas que receberam sangue humano apresentaram mais de 100 ovos túrgidos e nenhuma fêmea ovipositou mais que essa quantia após receber sangue de cão. Por outro lado, o maior número de fêmeas com uma postura inferior a 25 ovos túrgidos, foi apresentado para o sangue do hospedeiro cão (67,86%), seguido pelo humano (56,00%), galinha (13,79%) e camundongo (11,36%).

A maioria das fêmeas que se alimentaram do sangue de galinha, camundongo e humano (Tabela 5) apresentaram menos de 25 ovos colapsados (82,76%, 77,27% e 68%, respectivamente), enquanto que menos da metade (42,86%) apresentaram essa quantia em relação ao sangue do cão. O único repasto sanguíneo que resultou em fêmeas com mais de 100 ovos colapsados foi o do cão (32,14%).

A taxa de fêmeas em que os ovos resultaram na eclosão de larvas (Tabela 6) foi de 52% para as alimentadas com sangue humano, 42,86% para o sangue de cão, 86,21% para sangue de galinha e 97,73% para as alimentadas diretamente em camundongo.

Tabela 6. Decomposição dos dados individuais referentes ao número de fêmeas de *Aedes aegypti* em que os ovos resultaram na eclosão de larvas, para diferentes parâmetros.

Fonte sanguínea	Número de fêmeas					
	Ovipositaram (mín. um ovo)	Eclosão de Larvas				
		Não eclosão	Eclosão (mín. uma)	Menos de 25	Mais de 50	Mais de 100
Humano	25	12	13	6	5	2
Cão	28	16	12	6	3	0
Galinha	29	4	25	5	15	9
Camundongo (alimentação direta)	44	1	43	7	31	15

O número máximo de ovos totais e ovos túrgidos produzidos por uma fêmea (Tabela 7) foi encontrado após alimentação com sangue de galinha (176 ovos e 175 ovos, respectivamente), seguido por camundongo (172 ovos e 171 ovos), humano (142 ovos e 140 ovos) e cão (131 ovos e 94 ovos).

Tabela 7. Intervalo máximo de ovos (túrgidos, colapsados e totais) e larvas provenientes das fêmeas de *Aedes aegypti* que receberam diferentes fontes sanguíneas.

Fonte sanguínea	Intervalos máximos obtidos			
	Ovos Túrgidos	Ovos Colapsados	Ovos Totais	Larvas
Humano	2-140	1-96	3-142	1-123
Cão	1-94	1-133	1-133	1-88
Galinha	4-175	1-89	16-176	8-136
Camundongo (alimentação direta)	1-171	1-89	1-172	1-161

Em relação ao valor máximo de ovos colapsados colocado por uma fêmea (Tabela 7), o maior número foi encontrado para fêmea que recebeu sangue de cão (133 ovos), seguido por humano (96 ovos) e galinha/camundongo (89 ambos). O valor mínimo de ovos colocados por uma fêmea foi superior para sangue de galinha (16 ovos), seguido pelo sangue humano (três ovos), e cão/camundongo (um ovo).

O número máximo de larvas provenientes de uma fêmea foi de 161 larvas para fêmea que recebeu sangue de camundongo, seguido pelo valor de 136 larvas encontrado para fêmea que recebeu sangue galinha, 123 larvas provenientes de fêmea que recebeu sangue humano e 88 larvas para humano. Já o número mínimo de larvas encontrado foi maior para sangue de galinha (oito larvas), enquanto para os outros hospedeiros o valor foi de uma larva.

4.1.3 Peso das fêmeas

A análise estatística utilizando *Kruskal-Wallis* indicou que não houve diferença significativa entre o peso das fêmeas após repasto, entre as fontes sanguíneas fornecidas (Tabela 8). Porém, através de ANOVA, houve diferença entre o peso das fêmeas após oviposição. O teste de *Tukey* mostrou que o peso das fêmeas, após oviposição, alimentadas com sangue de galinha, foi significativamente menor que aquelas alimentadas com sangue humano ($p=0,01485$).

Tabela 8. Média geral do peso (g), após repasto sanguíneo e após oviposição, de fêmeas de *Aedes aegypti* que receberam diferentes fontes sanguíneas. Os dados destacados com “*” apresentaram diferença significativa nas análises estatísticas.

Fonte sanguínea	N° fêmeas analisadas	Média de peso após repasto (g)	N° fêmeas analisadas	Média de peso após oviposição (g)
Humano	45	0,0046	27	0,0029
Cão	45	0,0044	26	0,0025
Galinha	45	0,0046	28	0,0023*
Camundongo (alimentação direta)	45	0,0045	43	0,0027

4.2 BIOENSAIO II (ANÁLISES MOLECULARES)

O teste *ANOVA* com *aposteriori* de *Tukey's* indicou uma diferença significativa na expressão relativa da Vitelogenina (Figura 12) apenas para fêmeas alimentadas exclusivamente com solução açucarada (controle) em relação as fêmeas que receberam também alimentação sanguínea dos diferentes hospedeiros ($p=1,06E-12$, para todos os pares). Para a Catepsina B (Figura 13), a análise de *Kruskal-Wallis* com *aposteriori* de *Dunn's post hoc* evidenciou, além de uma diferença significativa na expressão gênica do controle para as diferentes fontes sanguíneas (Controle-Repasto Galinha: $p=7,98E-08$; Controle-Repasto Cão, $p=0,00373$; Controle-Repasto Humano, $4,80E-06$), uma diferença significativa entre as fontes sanguíneas cão e galinha ($p=0,006129$).

Também para a Catepsina B, quando a análise estatística foi realizada comparando apenas os resultados entre as fontes sanguíneas, o teste de *Dunn's post hoc* indicou uma diferença significativa entre as fontes sanguíneas cão e galinha ($p=0,000142$) e humano e cão ($p=0,02822$).

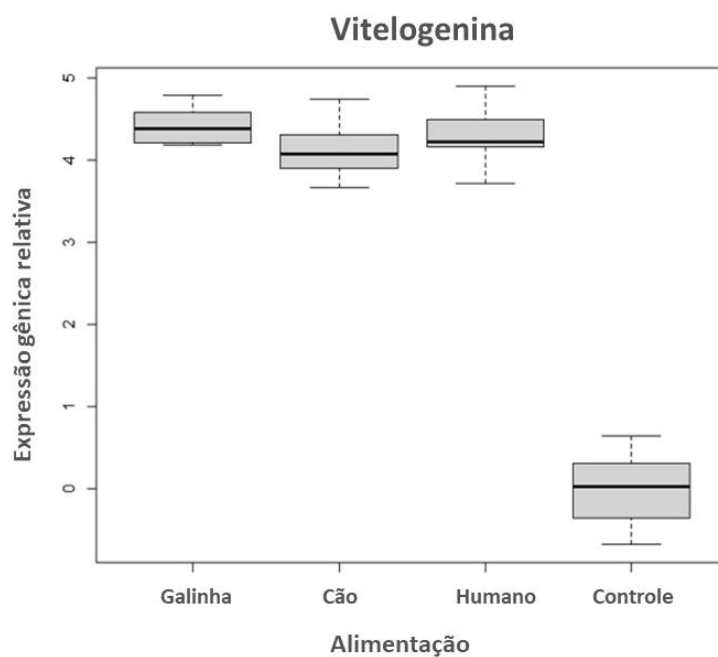


Figura 12. Expressão gênica relativa da Vitelenina para as fêmeas de *Aedes aegypti* que receberam sangue, em aparato artificial, dos hospedeiros galinha, cão e humano, em relação ao controle (fêmeas alimentadas apenas com solução de água e mel). Os dados foram transformados em *log* para plotagem e análise estatística.

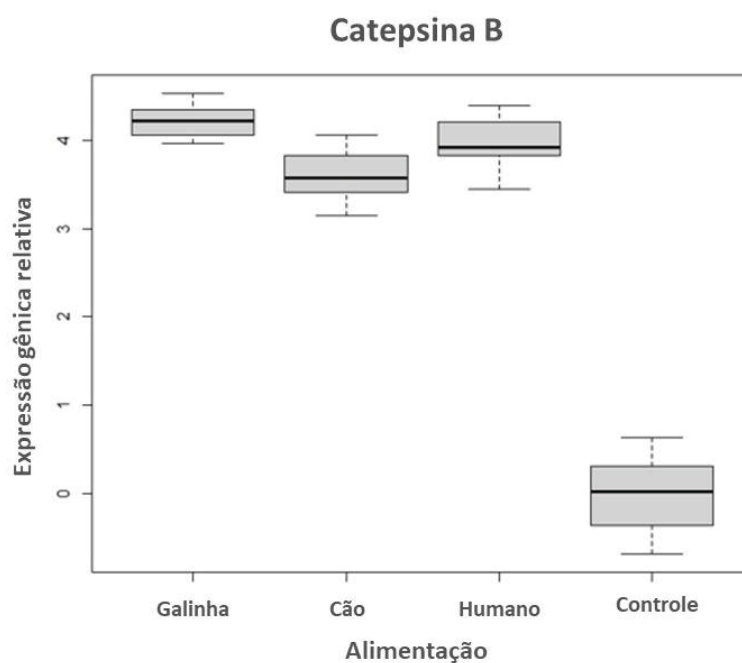


Figura 13. Expressão gênica relativa da Catepsina B para as fêmeas de *Aedes aegypti* que receberam sangue, em aparato artificial, dos hospedeiros galinha, cão e humano, em relação ao controle (fêmeas alimentadas apenas com solução de água e mel). Os dados foram transformados em *log* para plotagem e análise estatística.

5 DISCUSSÃO

5.1 EFICIÊNCIA DO APARATO ARTIFICIAL

Os dados obtidos para o repasto sanguíneo diretamente da cobaia em relação a metodologia artificial, indicam que, ao menos em partes, características atrativas da pele e respiração do hospedeiro vivo, bem como uma maior área de superfície, podem influenciar na procura e realização da alimentação sanguínea de *A. aegypti*. Por outro lado, o aparato artificial mostrou ser funcional, independentemente da fonte sanguínea fornecida, com chances e registros semelhantes de alimentação dos mosquitos. Inclusive, o repasto artificial de sangue humano foi equiparado ao repasto diretamente em camundongo na obtenção de fêmeas ingurgitadas totais.

Além disso, sob aparato artificial, a maioria das fêmeas que realizaram alimentação estavam com distensão completa do abdômen (Nível 3), o que é o ideal para potencializar a postura de ovos e manutenção adequada do insetário em laboratório (SPIELMAN & WONG, 1974). Essa metodologia também forneceu para as fêmeas o volume (em g) de sangue equivalente a uma alimentação feita diretamente sobre o hospedeiro.

Apesar de o sangue humano ter registrado uma quantidade superior de mosquitos alimentados artificialmente, essa fonte levou a uma maior ocorrência de fêmeas apenas com plasma sanguíneo no abdômen. Diferentes estudos suportam que fêmeas podem se alimentar até a plenitude de fontes alternativas e que somente o plasma sanguíneo e as células do sangue, separadamente, suportam a produção de ovos, porém, geralmente em menor quantidade do que o sangue completo (WOKE, 1937b; GREENBERG, 1951; SPIELMAN & WONG, 1974; HARRINGTON *et al.*, 2001; HARRISON *et al.*, 2021).

Considerando que o plasma dos animais é uma solução proteica onde estão diluídas as hemácias, logo, constituída também de aminoácidos livres, como isoleucina e outros aminoácidos essenciais, essa fonte pode fornecer nutrientes necessários para produção de ovos. Porém, dependendo do animal de qual foi proveniente, o plasma pode iniciar o desenvolvimento dos oócitos, mas não sustentar a total maturação dos ovos (HARRISON *et al.*, 2021; SPIELMAN & WONG, 1974).

O fato de o aparato artificial utilizado não possuir um mecanismo de circulação sanguínea pode ter refletido na hemossedimentação ao decorrer do tempo e na

separação do plasma sanguíneo. A velocidade de hemossedimentação sanguínea (VHS) é uma medida (em mm) da distância em que os eritrócitos sedimentam em uma suspensão vertical de anticoagulante em determinado tempo (em temperatura ambiente constante). Ou seja, é um índice que mede a separação dos glóbulos vermelhos e o plasma, que é a parte líquida do sangue, através da gravidade. A taxa de sedimentação é influenciada pelo tamanho, morfologia e concentração eritrocitária, composição das proteínas plasmáticas e viscosidade do plasma e também depende do sexo, idade e condição de saúde. O índice VHS é um teste utilizado para avaliação de inflamações e infecções em humanos e outros animais (como cães e gatos), mas é importante na ecologia fisiológica de vertebrados (JOHNSTONE & REINA, 2017; DACIE, 2006).

Em mulheres adultas em condições normais, o VHS costuma ser de até 20 mm em 1 hora, enquanto que em galinhas domésticas adultas (sexo feminino) esse índice é de em média 12 mm por hora (STURKIE *et al.*, 1960; SOUSA *et al.*, 2021). Em cães saudáveis adultos, o índice é geralmente menor que 10 mm por hora, sendo em média de 2-4 mm em 1 hora (independente do sexo) (ARLIAN *et al.*, 1995; TRIMMER & OLWIN., 1956; ASAWAPATTANAKUL *et al.*, 2021).

Tais dados corroboram com os registros superiores de alimentação com plasma encontrados para fêmeas que receberam o sangue humano, em relação ao sangue de galinha e sangue de cão (não ocorrência), em 20 minutos de alimentação sanguínea artificial. Essas observações são relevantes na escolha do sangue utilizado e no tempo de repasto fornecido, para manutenção dos mosquitos através do aparato artificial proposto, visto que um número significativo de fêmeas ingurgitadas somente com plasma pode ser registrado quando existe um alto VHS, influenciando na produtividade final de ovos.

Em sistemas de criação em massa de mosquitos, eficiência e economia são importantes (BAILEY *et al.*, 1980). A alimentação direta tem desvantagens relacionadas ao custo, manutenção e manipulação dos animais vertebrados em laboratório. Membranas artificiais são eficientes nesse sentido, pois limitam o contato diretamente com o animal. Existem diversos trabalhos que propõe e testam diferentes metodologias com essa finalidade em mosquitos (THOMAS *et al.*, 1985; BENZON & APPERSON, 1987; O'MEARA *et al.*, 1993; SAMISH *et al.*, 1995; COSGROVE & WOOD, 1996; ROBERT, 1998; PHASOMKUSOLSIL *et al.*, 2003; HARRISON *et al.*, 2021).

A utilização de um aparato artificial de confecção simples, composto basicamente por recipiente de acrílico e membrana de TNT, mostrou uma boa relação custo-benefício, sendo econômico, prático e eficiente. A possibilidade de utilização de mais de um aparato por gaiola de mosquitos, em estudos futuros, pode aumentar a área de superfície e potencializar a realização de alimentação sanguínea, sendo uma alternativa viável para substituição de cobaias em laboratório. Além disso, como foi possível utilizar um volume baixo de sangue, pode-se armazenar o sangue (com anticoagulante) de uma única coleta para utilizá-lo mais de uma vez na manutenção do insetário de *A. aegypti*.

5.2 INFLUÊNCIA DA FONTE SANGUÍNEA SOBRE A APTIDÃO REPRODUTIVA DE *Aedes aegypti*

Fêmeas de *A. aegypti* alimentadas com sangue de galinha (em aparato artificial) e camundongo (diretamente do hospedeiro) apresentaram uma produção significativamente maior de ovos (fecundidade) e eclosão de larvas (fertilidade), em relação às alimentadas com outros hospedeiros vertebrados. Além disso, para essas fontes sanguíneas, registraram-se mais de 80% de ovos túrgidos, corroborando com a maior viabilidade encontrada para os seus ovos.

Fêmeas que se alimentaram artificialmente do sangue de cão produziram uma maior quantidade de ovos em relação ao sangue humano. Porém, mais de 70% desses ovos estavam colapsados. Logo, a menor taxa de eclosão de larvas registrada para essa fonte sanguínea, nesse sentido, pode ser explicada pela presença de uma grande quantidade de ovos nesse estado, que efetivamente não foram viáveis.

Enquanto a literatura indica que mosquitos anautógenos produzem mais ovos após alimentarem-se de sangue de animais com eritrócitos nucleados (aves e répteis) (NAYAR & SAUERMAN, 1977; CLEMENTS, 1963), o fornecimento do repasto sanguíneo diretamente do camundongo apresentou resultados superiores e equivalentes estatisticamente ao sangue de ave fornecido em aparato artificial.

Harrison *et al.* (2021) não encontraram diferenças na quantidade de sangue ingerido e na produção de ovos de fêmeas de *A. aegypti* alimentadas diretamente do hospedeiro vivo e através do sangue do mesmo hospedeiro em membrana artificial, com utilização de diferentes anticoagulantes (Heparina e Citrato de Sódio). Logo, a

explicação para os resultados obtidos para camundongo, no trabalho, pode não se resumir apenas a metodologia de fornecimento do repasto e sim, também, as propriedades do sangue desse hospedeiro apresentarem benefícios reprodutivos para os mosquitos. Por outro lado, tal observação também pode estar relacionado com possíveis adaptações e seleção de gerações de cepas de laboratório alimentadas com essa fonte (HARRISON *et al.*, 2021).

Em relação às respostas moleculares, considerando que o repasto sanguíneo é o principal fator desencadeador da transcrição e ativação das proteínas precursoras (RAIKHEL *et al.*, 2002), foram observados níveis muito baixos de expressão basal de Vitelogenina e Catepsina B, para fêmeas que receberam apenas solução de água e mel (controle). O repasto utilizando aparato artificial e diferentes fontes sanguíneas foi capaz de maximizar significativamente a expressão gênica relativa das proteínas de interesse. Logo, evidenciou-se também, que todas as fontes de sangue foram capazes de ativar eficientemente a via vitelogênica.

Como as proteínas precursoras do vitelo são secretadas de forma semelhante pelo corpo gorduroso do inseto (HAYS & RAIKHEL, 1990; CHO *et al.*, 1991; CHO *et al.*, 1999), houve um padrão de expressão comum entre os genes para as diferentes fontes sanguíneas. Fêmeas que receberam o sangue de galinha apresentaram um nível superior de expressão gênica para a Vitelogenina e Catepsina B, seguido por aquelas que receberam sangue de humano e por último, de cão. Porém, uma diferença estatisticamente relevante ocorreu apenas para a Catepsina B, onde as fêmeas alimentadas com sangue de galinha divergiram em relação ao repasto em cão.

Os dados moleculares apresentaram uma base lógica de análise que permitiu inferir a viabilidade da prole de *A. aegypti*, onde os níveis de expressão de proteínas precursoras do vitelo corroboraram a produção de ovos viáveis (túrgidos) e eclosão de larvas encontrados nas análises biológicas. Para o repasto com sangue de cão, foi observado número elevado de ovos colapsados e uma menor expressão gênica relativa de proteínas do vitelo, apontado para algum componente ou fator no sangue desse animal que inviabiliza a completa formação do vitelo ou mesmo o processo embrionário. Não foi encontrado na literatura registros do estudo do sangue do cão sobre a formação de ovos em *A. aegypti*.

Os resultados obtidos corroboram com os trabalhos que indicam que o sangue de outros animais (entre aves e mamíferos) e suas propriedades, podem ser mais

adequados para a produção de ovos de *A. aegypti*, do que o sangue humano, não havendo uma aptidão reprodutiva fornecida exclusivamente por essa fonte (GREENBERG, 1951; DIMOND *et al.*, 1956; BENNET, 1970; BELLAMY & BRACKEN, 1971; SPIELMAN & WONG, 1974; SPIELMAN & WONG, 1974; CHANG, 1976; CHANG & JUDSON, 1977; BRIEGEL, 1985). Porém, essa comparação não pode ser vista como regra, visto que o sangue do cão se mostrou menos eficiente que de humano na produção de ovos viáveis. Por isso, é importante uma análise completa, incluindo o estado dos ovos, a eclosão de larvas e a ativação das vias genéticas da vitelogênese, visto que somente a quantidade de ovos não indica uma aptidão reprodutiva maximizada.

Os resultados encontrados para a primeira postura de ovos da espécie, não indicam necessariamente que em toda a vida da fêmea, não hajam vantagens seletivas em se alimentar do hospedeiro preferencial indicado na natureza, ao invés de outros hospedeiros disponíveis. Segundo Harrington *et al.* (2001), existem duas contradições e problemas importantes para *A. aegypti*: (1) a discrepância entre uma preferência alimentar pelo sangue humano verificada em populações naturais e os dados encontrados em laboratório, que sugerem um melhor aproveitamento do sangue e títulos de isoleucina de outros vertebrados; (2) a quebra do modelo fisiológico da espécie que propõe que as fêmeas usam a alimentação açucarada (carboidratos) para síntese e reservas de energia e alimentação sanguínea (proteínas) para atividades reprodutivas, o que na natureza parece ocorrer raramente (SCOTT *et al.*, 1993; VAN HANDEL *et al.*, 1994; COSTERO *et al.*, 1998).

A premissa que a preferência alimentar estaria relacionada com vantagens adaptativas fornecidas para a fêmea, pode não ser simplificada apenas a fatores específicos como a composição do sangue do hospedeiro e/ou características do mesmo. É possível que outros parâmetros, além dos níveis de isoleucina e morfologia do eritrócito, sejam igualmente relevantes na evolução de uma escolha de hospedeiro, visto que não foi encontrada uma relação direta entre a produção e viabilidade dos ovos quando comparado o sangue de mamíferos com o da ave. As vantagens do inseto em completar o ciclo de vida em ambiente domiciliar, incluindo a qualidade e disponibilidade de sítios para oviposição e desenvolvimento larval, e disponibilidade e proximidade do hospedeiro, também devem ser consideradas em um cenário complexo de evolução da espécie (LEHANNE, 2005; SCOTT & TAKKEN, 2012).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- O alimentador artificial produziu resultados positivos para utilização na manutenção do insetário de *A. aegypti* e viabilização de estudos de aspectos da digestão e aproveitamento do sangue de diferentes hospedeiros. Nessa metodologia, o sangue de galinha mostrou-se mais eficaz para maximizar a produção reprodutiva da espécie.
- Os resultados suportam que, na ausência do hospedeiro preferencial, a fêmea de *A. aegypti* tem condições de utilizar sangue de outros vertebrados disponíveis em ambiente urbano (como cães e aves), viabilizando a manutenção da população do vetor em ambiente antrópico. Esse fator também é preocupante em novos cenários epidemiológicos no ecossistema urbano.
- Para estudos futuros, mostra-se relevante a avaliação da causa da produção de número expressivo de ovos colapsados em fêmeas de *A. aegypti* após alimentação em cão e investigação dos componentes do metabolismo da fêmea que podem levar a essa situação.
- Para um panorama amplo sobre as características da espécie e dos fatores envolvidos na preferência de alimentar pelo hospedeiro humano, também se mostra necessário acompanhar aspectos conjuntos do ciclo de vida da fêmea (diferentes posturas de ovos, morfologia dos ovos, mortalidade e sobrevivência da fêmea), após o fornecimento de diferentes fontes sanguíneas. Além disso, agregar estudos genéticos aos fisiológicos, investigando os aspectos da vitelogênese que podem ser influenciados por características específicas do sangue de diferentes vertebrados - principalmente os de comum disponibilidade em ambiente urbano -, são necessários para compreender a evolução da preferência alimentar indicada para a espécie.

REFERÊNCIAS

- ACREE JR, F.; TURNER, R. B.; GOUCK, H. K.; BEROZA, M.; SMITH, N. L-Lactic acid: a mosquito attractant isolated from humans. **Science**, v. 161, n. 3848, p. 1346-1347, 1968.
- AKEY, D. H.; JONES, J. C. Sexual responses of adult male *Aedes aegypti* using the forced-copulation technique. **The Biological Bulletin**, v. 135, n. 3, p. 445-453, 1968.
- ALDERSLEY, A.; CATOR, L. J. Female resistance and harmonic convergence influence male mating success in *Aedes aegypti*. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-12, 2019.
- ANJOLETTE, A. F. F.; MACORIS, M. D. L. D. G. Técnicas para manutenção de *Aedes aegypti* em laboratório. **Bepa-Boletim Epidemiológico Paulista**, p. 19-29, 2016.
- ARAÚJO, R. N.; GONTIJO, N. F.; LAZZARI, C. R.; PEREIRA, M. H. Interação entre os insetos hematófagos e seus hospedeiros vertebrados. **Tópicos Avançados em Entomologia Molecular**, p. 1-15, 2012.
- ARAUJO, R. V.; MACIEL, C.; HARTFELDER, K.; CAPURRO, M. L. Effects of *Plasmodium gallinaceum* on hemolymph physiology of *Aedes aegypti* during parasite development. **Journal of insect physiology**, v. 57, n. 2, p. 265-273, 2011.
- ARDUINO, M. D. B.; MARQUES, G. R. D. A. M.; SERPA, L. L. N. Registro de larvas e pupas de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* em recipientes com água salina em condições naturais. **BEPA-Boletim Epidemiológico Paulista**, p. 22-28, 2010.
- ARLIAN, L. G.; MORGAN, M. S.; RAPP, C. M.; VYSZENSKI-MOHER, D. L. Some effects of sarcoptic mange on dogs. **The Journal of parasitology**, p. 698-702, 1995.
- ARIANI, C. V.; SMITH, S. C.; OSEI-POKU, J.; SHORT, K.; JUNEJA, P.; JIGGINS, F. M. Environmental and genetic factors determine whether the mosquito *Aedes aegypti* lays eggs without a blood meal. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 92, n. 4, p. 715, 2015.
- ASAWAPATTANAKUL, T.; PINTAPAGUNG, T.; PIRATAE, S.; JUNTAUTSA, S.; CHANCHAROEN, P. Erythrocyte sedimentation rate, C-reactive protein, and interleukin-6 as inflammatory biomarkers in dogs naturally infected with *Ehrlichia canis*. **Veterinary World**, v. 14, n. 9, p. 2325, 2021.
- ATTARDO, G. M.; HANSEN, I. A.; RAIKHEL, A. S. Nutritional regulation of vitellogenesis in mosquitoes: implications for anautogeny. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 35, n. 7, p. 661-675, 2005.
- BAILEY, D. L.; LOWE, R. E.; FOWLER, J. E.; FOCKS, D. A. Effects of adult sex ratio and stocking rate on viable egg production of *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 17, n. 6, p. 563-566, 1980.

BALASHOV, Y. S. Interaction between blood-sucking arthropods and their hosts, and its influence on vector potential. **Annual review of entomology**, v. 29, n. 1, p. 137-156, 1984.

BEKLEMISHEV, V. N. Some general problems of the biology of blood-sucking lower Diptera. **Meditssinskaia parazitologiya i parazitarnye bolezni**, v. 26, n. 5, p. 562-566, 1957.

BELLAMY, R. E.; BRACKEN, G. K. Quantitative aspects of ovarian development in mosquitoes. **The Canadian Entomologist**, v. 103, n. 5, p. 763-773, 1971.

BENNETT, G. F. The influence of the blood meal type on the fecundity of *Aedes (Stegomyia) aegypti* L. (Diptera: Culicidae). **Canadian journal of zoology**, v. 48, n. 3, p. 539-543, 1970.

BENTLEY, M. D.; DAY, J. F. Chemical ecology and behavioral aspects of mosquito oviposition. **Annual review of entomology**, v. 34, n. 1, p. 401-421, 1989.

BENZON, G. L. An electrically heated membrane blood-feeding device for mosquito colony maintenance. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 3, p. 322-324, 1987.

BESERRA, E. B.; CASTRO JR, F. P. D.; SANTOS, J. W. D.; SANTOS, T. D. S.; FERNANDES, C. R. Biologia e exigências térmicas de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) provenientes de quatro regiões bioclimáticas da Paraíba. **Neotropical Entomology**, v. 35, p. 853-860, 2006.

BESERRA, E. B.; FERNANDES, C. R.; DE SOUSA, J. T.; DE FREITAS, E. M.; SANTOS, K. D. Efeito da qualidade da água no ciclo de vida e na atração para oviposição de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). **Neotropical Entomology**, v. 39, p. 1016-1023, 2010.

BESERRA, E. B.; FERNANDES, C. R.; RIBEIRO, P. S. Relação entre densidade larval e ciclo de vida, tamanho e fecundidade de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) em laboratório. **Neotropical Entomology**, v. 38, n. 6, p. 847-852, 2009.

BIBBS, C. S.; HAHN, D. A.; KAUFMAN, P. E.; XUE, R. D. Sublethal effects of a vapour-active pyrethroid, transfluthrin, on *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* (Diptera: Culicidae) fecundity and oviposition behaviour. **Parasites & vectors**, v. 11, n. 1, p. 1-9, 2018.

BORKENT, A.; GRIMALDI, D. A. The earliest fossil mosquito (Diptera: Culicidae), in mid-Cretaceous Burmese amber. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 97, n. 5, p. 882-888, 2004.

BRACKNEY, D. E.; ISOE, J.; BLACK IV, W. C.; ZAMORA, J.; FOY, B. D.; MIESFELD, R. L.; OLSON, K. E. Expression profiling and comparative analyses of seven midgut serine proteases from the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. **Journal of insect physiology**, v. 56, n. 7, p. 736-744, 2010.

BRAGA, I. A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. 2007.

BRIEGEL, H. Physiological bases of mosquito ecology. **Journal of vector ecology: journal of the Society for Vector Ecology**, v. 28, n. 1, p. 1-11, 2003.

BROWN, J. E.; EVANS, B. R.; ZHENG, W.; OBAS, V.; BARRERA-MARTINEZ, L.; EGIZI, A.; ... & POWELL, J. R. Human impacts have shaped historical and recent evolution in *Aedes aegypti*, the dengue and yellow fever mosquito. **Evolution**, v. 68, n. 2, p. 514-525, 2014.

BROWN, J. E.; MCBRIDE, C. S.; JOHNSON, P.; RITCHIE, S.; PAUPY, C.; BOSSIN, H.; ... & POWELL, J. R. Worldwide patterns of genetic differentiation imply multiple 'domestications' of *Aedes aegypti*, a major vector of human diseases. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 278, n. 1717, p. 2446-2454, 2011.

BRUSCA, R.C.; MOORE, W.; SHUSTER, S. M. Invertebrados. 3a edição. Editora Guanabara-Koogan, 2018.

BUSTIN, S. A.; BENES, V.; GARSON, J. A.; HELLEMANS, J.; HUGGETT, J.; KUBISTA, M.; ... & WITWER, C. T. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. 200

BYTTEBIER, B.; DE MAJO, M. S.; FISCHER, S. Hatching response of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) eggs at low temperatures: effects of hatching media and storage conditions. **Journal of medical entomology**, v. 51, n. 1, p. 97-103, 2014.

CARVALHO, D. O.; NIMMO, D.; NAISH, N.; MCKEMEY, A. R.; GRAY, P.; WILKE, A. B.; ... & CAPURRO, M. L. Mass production of genetically modified *Aedes aegypti* for field releases in Brazil. **JoVE (Journal of Visualized Experiments)**, n. 83, p. e3579, 2014.

CASTILLO, J.; BROWN, M. R.; STRAND, M. R. Blood feeding and insulin-like peptide 3 stimulate proliferation of hemocytes in the mosquito *Aedes aegypti*. **PLoS pathogens**, v. 7, n. 10, p. e1002274, 2011.

CATOR, L. J., ARTHUR, B. J., PONLAWAT, A.; HARRINGTON, L. C. Behavioral observations and sound recordings of free-flight mating swarms of *Ae. aegypti* (Diptera: Culicidae) in Thailand. **Journal of medical entomology**, v. 48, n. 4, p. 941-946, 2011.

CATOR, L. J.; ZANTI, Z. Size, sounds and sex: interactions between body size and harmonic convergence signals determine mating success in *Aedes aegypti*. **Parasites & vectors**, v. 9, n. 1, p. 1-11, 2016.

CHANG, Y. Y. H.; JUDSON, C. L. Amino acid composition of human and guinea pig blood proteins, and ovarian proteins of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*; and their effects on the mosquito egg production. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, v. 62, n. 3, p. 753-755, 1979.

CHANG, Y. Y. H.; JUDSON, C. L. The role of isoleucine in differential egg production by the mosquito *Aedes aegypti* Linnaeus (Diptera: Culicidae) following feeding on human or guinea pig blood. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, v. 57, n. 1, p. 23-28, 1977.

CHEN, L.; ZHU, J.; SUN, G.; RAIKHEL, A. S. The early gene Broad is involved in the ecdysteroid hierarchy governing vitellogenesis of the mosquito *Aedes aegypti*. **Journal of molecular endocrinology**, v. 33, n. 3, p. 743-761, 2004.

CLEMENTS, A. N.; KERKUT, G. A. The physiology of mosquitoes: international series of monographs on pure and applied biology. **Oxford: Pergamon Press**, v. 17, p. 410, 1963.

CLEMENTS, A. N. Vol. 1: Development, nutrition and reproduction. **London [etc]: Chapman & Hall**, 1992.

CONSOLI, R. A.; & OLIVEIRA, R. L. D. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. Editora Fiocruz, 1994.

COSGROVE, J. B.; WOOD, R. J. Effects of variations in a formulated protein meal on the fecundity and fertility of female mosquitoes. **Medical and veterinary entomology**, v. 10, n. 3, p. 260-264, 1996.

COSTA-DA-SILVA, A. L.; NAVARRETE, F. R.; SALVADOR, F. S.; KARINA-COSTA, M.; IOSHINO, R. S.; AZEVEDO, D. S.; ... & CAPURRO, M. L. Glytube: a conical tube and parafilm M-based method as a simplified device to artificially blood-feed the dengue vector mosquito, *Aedes aegypti*. **PloS one**, v. 8, n. 1, p. e53816, 2013.

CRUZ, L. Comportamento hematófago em dípteros (Insecta: Diptera): caracterização, evolução, bases morfo-anatômicas e mecanismos fisio-moleculares. **Boletim PETBio UFMA** / nº 41, 2017.

DACIE, J. V. **Dacie and Lewis practical haematology**. Elsevier Health Sciences, 2006.

DA SILVA NETO, M. A. C.; WINTER, C.; TERMIGNONI, C. (Ed.). Tópicos Avançados em Entomologia Molecular: Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular. **Itabajara da Silva Vaz Junior**, 2013.

DA SILVA PAIXÃO, K.; DE CASTRO PEREIRA, I.; LOPES ALVES BOTTINI, L.; EDUARDO EIRAS, Á. Volatile semiochemical-conditioned attraction of the male yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*, to human hosts. **Journal of Vector Ecology**, v. 40, n. 1, p. 1-6, 2015.

DEGNER, E. C.; HARRINGTON, L. C. Polyandry depends on postmating time interval in the dengue vector *Aedes aegypti*. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 94, n. 4, p. 780, 2016.

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

DE SMET, W. H. The total protein content in the blood serum of 416 species and subspecies of. **Acta Zoo Pathol Antverpiensia**, v. 70, p. 35-56, 1978.

DHADIALLA, T. S.; RAIKHEL, A. S. Endocrinology of mosquito vitellogenesis. **Perspectives in comparative endocrinology**, p. 275-281, 1994.

DIMOND, J. B.; LEA, A. O.; HAHNERT, W. F.; DELONG, D. M. The Amino Acids Required for Egg Production in *Aedes aegypti*. **The Canadian Entomologist**, v. 88, n. 2, p. 57-62, 1956.

DOWNES, John A. The ecology of blood-sucking Diptera: an evolutionary perspective. **Ecology and physiology of parasites**, p. 232-258, 1971.

EDMAN, J. D.; SCOTT, T. W. Host defensive behaviour and the feeding success of mosquitoes. **International Journal of Tropical Insect Science**, v. 8, n. 4-5-6, p. 617-622, 1987.

EDMAN, J. D.; SPIELMAN, A. Blood-Feeding by Vectors: Physiology, Ecology, Behavior, and Vertebrate Defense. In: **The Arboviruses: Epidemiology and Ecology**. CRC Press, 2020. p. 153-190.

EDMAN, J. D.; WEBBER, L. A.; KALE II, H. W. Effect of mosquito density on the interrelationship of host behavior and mosquito feeding success. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 21, n. 4, p. 487-491, 1972.

EGAS, M.; DIECKMANN, U.; SABELIS, M. W. Evolution restricts the coexistence of specialists and generalists: the role of trade-off structure. **The american naturalist**, v. 163, n. 4, p. 518-531, 2004.

EYUN, S. I.; SOH, H. Y.; POSAVI, M.; MUNRO, J. B.; HUGHES, D. S.; MURALI, S. C.; ... & LEE, C. E. Evolutionary history of chemosensory-related gene families across the Arthropoda. **Molecular biology and evolution**, v. 34, n. 8, p. 1838-1862, 2017.

FARJANA, T.; TUNO, N. Effect of body size on multiple blood feeding and egg retention of *Aedes aegypti* (L.) and *Aedes albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae). **Medical Entomology and Zoology**, v. 63, n. 2, p. 123-131, 2012.

FARJANA, T.; TUNO, N. Multiple blood feeding and host-seeking behavior in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). **Journal of medical entomology**, v. 50, n. 4, p. 838-846, 2013.

FERREIRA, C. M.; STIEBLER, R.; SARAIVA, F. M.; LECHUGA, G. C.; WALTER-NUNO, A. B.; BOURGUIGNON, S. C.; ... & OLIVEIRA, M. F. Heme crystallization in a Chagas disease vector acts as a redox-protective mechanism to allow insect

reproduction and parasite infection. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 7, p. e0006661, 2018.

FISCHER, S.; ALEM, I. S.; DE MAJO, M. S.; CAMPOS, R. E.; SCHWEIGMANN, N. Cold season mortality and hatching behavior of *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) eggs in Buenos Aires City, Argentina. **Journal of Vector Ecology**, v. 36, n. 1, p. 94-99, 2011.

FORATTINI, O. P. Culicidologia médica: identificação, biologia, epidemiologia, vol. 2. **EDUSP**, 2002.

FOSTER, W. A.; LEA, A. O. Renewable fecundity of male *Aedes aegypti* following replenishment of seminal vesicles and accessory glands. **Journal of insect physiology**, v. 21, n. 5, p. 1085-1090, 1975.

FRIEND, W. G.; SMITH, J. J. B. Factors affecting feeding by bloodsucking insects. **Annual review of entomology**, v. 22, n. 1, p. 309-331, 1977.

GULIA-NUSS, M.; ROBERTSON, A. E.; BROWN, M. R.; STRAND, M. R. Insulin-like peptides and the target of rapamycin pathway coordinately regulate blood digestion and egg maturation in the mosquito *Aedes aegypti*. **PloS one**, v. 6, n. 5, p. e20401, 2011.

GEIER, M.; SASS, H.; BOECKH, J. A search for components in human body odour that attract females of *Aedes aegypti*. In: **Ciba Foundation Symposium**, p. 132-144, 1996.

GEOLDI, E. A. Os Mosquitos no Pará. **Mem. Mus. Goeldi (Mus. Pars.) Hist. Nat. Ethnogr. IV**, 1905.

GOUCK, H. K. Host preferences of various strains of *Aedes aegypti* and *A. simpsoni* as determined by an olfactometer. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 47, n. 5, p. 680, 1972.

GREENBERG, J. Some nutritional requirements of adult mosquitoes (*Aedes aegypti*) for oviposition: Two figures. **The Journal of nutrition**, v. 43, n. 1, p. 27-35, 1951.

GREENBERG, J. A method for artificially feeding mosquitoes. **Mosquito News**, v. 9, n. 2, p. 48-50, 1949.

GUBLER, D. J. Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. **Trends in microbiology**, v. 10, n. 2, p. 100-103, 2002.

GWADZ, R. W. The age of sexual receptivity in female *Aedes aegypti*. **BUZZ. Entomol. Sot. Amer**, v. 13, p. 201, 1967.

GWADZ, R. W.; CRAIG JR, GEORGE B. Sexual receptivity in female *Aedes aegypti*, 1968.

GWADZ, R. W. Regulation of blood meal size in the mosquito. **Journal of Insect**

Physiology, v. 15, n. 11, p. 2039–2044, 1969.

GWADZ, R. W.; CRAIG JR., G. B.; HICKEY, W. A. Female sexual behavior as the mechanism rendering *Aedes aegypti* refractory to insemination. **The Biological Bulletin**, v. 140, n. 2, p. 201-214, 1971.

HAGEDORN, H. H. The Role of Ecdysteroids in Reproduction. *Endocrinology* II. 1985.

HAGEDORN, H. H. Physiological roles of hemolymph Ecdysteroid in the adult insect. **Koolman J, editor**. 1989.

HAGEN, H. E. et al. Routine blood-feeding of *Aedes aegypti* via a new membrane. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 6, n. 3, p. 535-536, 1990.

HARBACH, R. E. The Culicidae (Diptera): A review of taxonomy, classification and phylogeny. **Zootaxa**, v. 1668, p. 591–638, 2007.

HARRINGTON, L. C.; EDMAN, J. D.; SCOTT, T. W. Why do female *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) feed preferentially and frequently on human blood. **Journal of medical entomology**, v. 38, n. 3, p. 411-422, 2001.

HARRINGTON, L. C.; SCOTT, T. W.; LERDTHUSNEE, K.; COLEMAN, R. C.; COSTERO, A., CLARK, G. G.; ... & EDMAN, J. D. Dispersal of the dengue vector *Aedes aegypti* within and between rural communities. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 72, n. 2, p. 209-220, 2005.

HARRISON, R. E.; BROWN, M. R.; STRAND, M. R. Whole blood and blood components from vertebrates differentially affect egg formation in three species of anautogenous mosquitoes. **Parasites & vectors**, v. 14, n. 1, p. 1-19, 2021.

HELINSKI, M. E.; HARRINGTON, L. C. Male mating history and body size influence female fecundity and longevity of the dengue vector *Aedes aegypti*. **Journal of medical entomology**, v. 48, n. 2, p. 202-211, 2011.

HELINSKI, M. E.; VALERIO, L.; FACCHINELLI, L.; SCOTT, T. W.; RAMSEY, J.; HARRINGTON, L. C. Evidence of polyandry for *Aedes aegypti* in semifield enclosures. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 86, n. 4, p. 635, 2012.

ISOE, J.; HAGEDORN, H. H. Mosquito vitellogenin genes: Comparative sequence analysis, gene duplication, and the role of rare synonymous codon usage in regulating expression. **Journal of Insect Science**, v. 7, n. 1, p. 1, 2007.

ISOE, J.; RASCÓN JR, A. A.; KUNZ, S.; MIESFELD, R. L. Molecular genetic analysis of midgut serine proteases in *Aedes aegypti* mosquitoes. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 39, n. 12, p. 903-912, 2009.

JOBLING, B. The mosquito *Aedes aegypti*. In: **Anatomical drawings of biting flies**. London, British Museum (Natural History), Wellcome Trust, 1987. p. 47-80.

JOHNSTONE, C. P.; LILL, A.; REINA, R. D. Use of erythrocyte indicators of health and condition in vertebrate ecophysiology: a review and appraisal. **Biological Reviews**, v. 92, n. 1, p. 150-168, 2017.

JONES, J. C. A study on the fecundity of male *Aedes aegypti*. **Journal of Insect Physiology**, v. 19, n. 2, p. 435-439, 1973.

KELLY, D. W.; MUSTAFA, Z.; DYE, C. Density-dependent feeding success in a field population of the sandfly, *Lutzomyia longipalpis*. **Journal of Animal Ecology**, p. 517-527, 1996.

KELLY, D. W.; THOMPSON, C. E. Epidemiology and optimal foraging: modelling the ideal free distribution of insect vectors. **Parasitology**, v. 120, n. 3, p. 319-327, 2000.
KLOWDEN, M. J. Blood, sex, and the mosquito. **Bioscience**, v. 45, n. 5, p. 326-331, 1995.

KELLY, D. W. Why are some people bitten more than others? **Trends in parasitology**, v. 17, n. 12, p. 578-581, 2001.

KIM, B. H.; KIM, H. K.; LEE, S. J. Experimental analysis of the blood-sucking mechanism of female mosquitoes. **Journal of Experimental Biology**, v. 214, n. 7, p. 1163-1169, 2011.

KLOWDEN, M. J. Endocrine aspects of mosquito reproduction. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology: Published in Collaboration with the Entomological Society of America**, v. 35, n. 4, p. 491-512, 1997.

KLOWDEN, M. J.; LEA, A. O. Abdominal distention terminates subsequent host-seeking behaviour of *Aedes aegypti* following a blood meal. **Journal of insect physiology**, v. 25, n. 7, p. 583-585, 1979.

KWEKA, E. J.; MWANG'ONDE, B. J.; LYARUU, L.; TENU, F.; MAHANDE, A. M. Effect of different hosts on feeding patterns and mortality of mosquitoes (Diptera: Culicidae) and their implications on parasite transmission. **Journal of Global Infectious Diseases**, v. 2, n. 2, p. 121-123, 2010.

LEA, A. O.; DIMOND, J. B.; DELONG, D. M. Role of diet in egg development by mosquitoes (*Aedes aegypti*). **Science**, v. 123, n. 3203, p. 890-891, 1956.

LEA, A. O.; DIMOND, J. B.; DELONG, D. M. Some nutritional factors in egg production by *Aedes aegypti*. In: **Proc 10th Int Congr Entomol**, p. 793-796, 1958.

LEHANE, M. J. **The biology of blood-sucking in insects**. Cambridge University Press, 2005.

LEWIS, J. H. Comparative hemostasis. In: **Comparative hemostasis in vertebrates**, p. 325-359, 1996.

LINDSAY, S.; ANSELL, J.; SELMAN, C.; COX, V.; HAMILTON, K.; WALRAVEN, G. Effect of pregnancy on exposure to malaria mosquitoes. **The Lancet**, v. 355, n. 9219, p. 1972, 2000.

LOBO, F. P.; MOTA, B. E.; PENA, S. D.; AZEVEDO, V.; MACEDO, A. M.; TAUCH, A.; ... & FRANCO, G. R. Virus-host coevolution: common patterns of nucleotide motif usage in Flaviviridae and their hosts. **PloS one**, v. 4, n. 7, p. e6282, 2009.

LOPES, J. Ecologia de mosquitos (Diptera: Culicidae) em criadouros naturais e artificiais de área rural do Norte do Estado do Paraná, Brasil. V. Coleta de larvas em recipientes artificiais instalados em mata ciliar. **Revista de Saúde Pública**, v. 31, n. 4, p. 370-377, 1997.

LYIMO, I. N.; FERGUSON, H. M. Ecological and evolutionary determinants of host species choice in mosquito vectors. **Trends in parasitology**, v. 25, n. 4, p. 189-196, 2009.

MACIEL-DE-FREITAS, R.; SYLVESTRE, G.; GANDINI, M.; KOELLA, J. C. The influence of dengue virus serotype-2 infection on *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) motivation and avidity to blood feed. **PLoS One**, v. 8, n. 6, p. e65252, 2013.

MANOHARAN, M.; NG FUK CHONG, M.; VAÏTINADAPOULÉ, A.; FRUMENCE, E.; SOWDHAMINI, R.; OFFMANN, B. Comparative genomics of odorant binding proteins in *Anopheles gambiae*, *Aedes aegypti*, and *Culex quinquefasciatus*. **Genome biology and evolution**, v. 5, n. 1, p. 163-180, 2013.

MATHIS, M. Agressivite et Pontes comparees du Moustique de la fievre jaune en conditions experimentales. **Compt. Rend. Seances Soc. Biol.**, v. 115, p. 1624-1626, 1934.

MATTINGLY, P. F. Genetical Aspects of the Aedes Aegypti Problem: I.—Taxonomy and Bionomics. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 51, n. 4, p. 392-408, 1957.

MCBRIDE, C. S.; BAIER, F.; OMONDI, A. B.; SPITZER, S. A.; LUTOMIAH, J.; SANG, R.; ... VOSSHALL, L. B. Evolution of mosquito preference for humans linked to an odorant receptor. **Nature**, v. 515, n. 7526, p. 222-227, 2014.

MCBRIDE, C. S. Genes and odors underlying the recent evolution of mosquito preference for humans. **Current Biology**, v. 26, n. 1, p. R41-R46, 2016.

MCCLELLAND, G. A. H.; WEITZ, B. Serological identification of the natural hosts of *Aedes aegypti* (L.) and some other mosquitoes (Diptera, Culicidae) caught resting in vegetation in Kenya and Uganda. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 57, n. 2, p. 214-224, 1963.

MERRITT, R. W.; DADD, R. H.; WALKER, E. D. Feeding behavior, natural food, and nutritional relationships of larval mosquitoes. **Annual review of entomology**, v. 37, n. 1, p. 349-374, 1992.

MOHAMMED, A.; CHADEE, D. D. Effects of different temperature regimens on the development of *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) mosquitoes. **Acta tropica**, v. 119, n. 1, p. 38-43, 2011.

MONCAYO, A. C.; FERNANDEZ, Z.; ORTIZ, D.; DIALLO, M.; SALL, A.; HARTMAN, S.; ... & WEAVER, S. C. Dengue emergence and adaptation to peridomestic mosquitoes. **Emerging infectious diseases**, v. 10, n. 10, p. 1790, 2004.

NAVARRO, D. M. A. F.; DE OLIVEIRA, P. E. S.; POTTING, R. P. J.; BRITO, A. C.; FITAL, S. J. F.; SANT'ANA, A. G. The potential attractant or repellent effects of different water types on oviposition in *Aedes aegypti* L. (Dipt., Culicidae). **Journal of Applied Entomology**, v. 127, n. 1, p. 46-50, 2003.

NAYAR, J. K.; SAUENNAN JR, D. M. The effects of nutrition on survival and fecundity in Florida mosquitoes. Part 4. Effects of blood source on oocyte development. **Journal of Medical Entomology**, v. 14, n. 2, p. 167-174, 1977.

OLIVA, C. F.; DAMIENS, D.; BENEDICT, M. Q. Male reproductive biology of *Aedes* mosquitoes. **Acta tropica**, v. 132, p. S12-S19, 2014.

O'MEARA, G. F.; LARSON, V. L.; MOOK, D. H. Blood feeding and autogeny in the peridomestic mosquito *Aedes bahamensis* (Diptera: Culicidae). **Journal of medical entomology**, v. 30, n. 2, p. 378-383, 1993.

PAGE, R. D. M. Tangled trees: phylogeny, cospeciation, and coevolution. University of Chicago Press, 2003.

PARK, J. H.; ATTARDO, G. M.; HANSEN, I. A.; RAIKHEL, A. S. GATA factor translation is the final downstream step in the amino acid/target-of-rapamycin-mediated vitellogenin gene expression in the anautogenous mosquito *Aedes aegypti*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 16, p. 11167-11176, 2006.

PETERSEN, J. L. Behavioral differences in two subspecies of *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) in East Africa. Ph.D. thesis, University of Notre Dame, 1977.

PFAFFL M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic acids research**, v. 29, n. 9, p. e45-e45, 2001.

PHASOMKUSOLSIL, S.; TAWONG, J.; MONKANNA, N.; PANTUWATANA, K.; DAMDANGDEE, N.; KHONGTAK, W.; ... & SCHUSTER, A. L. Maintenance of mosquito vectors: effects of blood source on feeding, survival, fecundity, and egg hatching rates. **Journal of vector Ecology**, v. 38, n. 1, p. 38-45, 2013.

PONLAWAT, A.; HARRINGTON, L. C. Blood feeding patterns of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Thailand. **Journal of medical entomology**, v. 42, n. 5, p. 844-849, 2005.

PORT, G. R.; BOREHAM, P. F. L.; BRYAN, J. H. The relationship of host size to feeding by mosquitoes of the *Anopheles gambiae* Giles complex (Diptera: Culicidae). **Bulletin of Entomological Research**, v. 70, n. 1, p. 133-144, 1980

POWELL, J. R.; TABACHNICK, W. J. History of domestication and spread of *Aedes aegypti* - a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, p. 11-17, 2013.

PRASADINI, M.; DAYANANDA, D.; FERNANDO, S.; HARISCHANDRA, I.; DE SILVA, N. Blood feeding preference of female *Aedes aegypti* mosquitoes for human blood group types and its impact on their fecundity: implications for vector control. **Am J Entomol**, v. 3, n. 2, p. 43-48, 2019.

PRICE, D. P.; NAGARAJAN, V.; CHURBANOV, A.; HOUDE, P.; MILLIGAN, B., DRAKE, L. L.; ... & HANSEN, I. A. The fat body transcriptomes of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*, pre-and post-blood meal. **PLoS One**, v. 6, n. 7, p. e22573, 2011.

RAIKHEL, A. S.; DHADIALLA, T. S. Accumulation of yolk proteins in insect oocytes. **Annual review of entomology**, v. 37, n. 1, p. 217-251, 1992.

RAIKHEL, A. S.; KOKOZA, V. A.; ZHU, J.; MARTIN, D.; WANG, S. F.; LI, C.; ... & ATTARDO, G. Molecular biology of mosquito vitellogenesis: from basic studies to genetic engineering of antipathogen immunity. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 32, n. 10, p. 1275-1286, 2002.

RAIKHEL, A. S.; MIURA, K.; SEGRAVES, W. A. Nuclear receptors in mosquito vitellogenesis. **American zoologist**, v. 39, n. 4, p. 722-735, 1999.

RIBEIRO, J. M. C. Insect saliva: function, biochemistry, and physiology. In: **Regulatory mechanisms in insect feeding**. Springer, Boston, MA, 1995. p. 74-97.

RICHARDSON, J. B.; JAMESON, S. B.; GLORIA-SORIA, A.; WESSON, D. M.; POWELL, J. Evidence of limited polyandry in a natural population of *Aedes aegypti*. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 93, n. 1, p. 189, 2015.

ROBERT, Vincent. Age grading *Anopheles arabiensis*: their gorging and surviving responses using a membrane feeding system. **Parasite**, v. 5, n. 1, p. 87-90, 1998.

ROY, S.; SMYKAL, V.; JOHNSON, L.; SAHA, T. T.; ZOU, Z.; RAIKHEL, A. S. Regulation of reproductive processes in female mosquitoes. In: **Advances in Insect Physiology**. Academic Press, 2016. p. 115-144.

SAMISH, M.; KOZLOWSKA, A.; MARAMOROSCH, K. Factors affecting membrane feeding of *Anopheles stephensi*. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 11, n. 4, p. 408-415, 1995.

SENGUL, M. S.; TU, Z. Expression analysis and knockdown of two antennal odorant-binding protein genes in *Aedes aegypti*. **Journal of Insect Science**, v. 10, n. 1, 2010.

SCOTT, T. W.; AMERASINGHE, P. H.; MORRISON, A. C.; LORENZ, L. H.; CLARK, G. G.; STRICKMAN, D.; ... & EDMAN, J. D. Longitudinal studies of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Thailand and Puerto Rico: blood feeding frequency. **Journal of medical entomology**, v. 37, n. 1, p. 89-101, 2000.

SCOTT, T. W.; CLARK, G. G.; LORENZ, L. H.; AMERASINGHE, P. H.; REITER, P.; EDMAN, J. D. Detection of multiple blood feeding in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) during a single gonotrophic cycle using a histologic technique. **Journal of medical entomology**, v. 30, n. 1, p. 94-99, 1993.

SCOTT, T. W.; CHOW, E.; STRICKMAN, D.; KITTAYAPONG, P.; WIRTZ, R. A.; LORENZ, L. H.; EDMAN, J. D. Blood-feeding patterns of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) collected in a rural Thai village. **Journal of medical entomology**, v. 30, n. 5, p. 922-927, 1993.

SCOTT, T. W.; TAKKEN, W. Feeding strategies of anthropophilic mosquitoes result in increased risk of pathogen transmission. **Trends in parasitology**, v. 28, n. 3, p. 114-121, 2012.

SHAO, L.; DEVENPORT, M.; JACOBS-LORENA, M. The peritrophic matrix of hematophagous insects. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 47, n. 2, p. 119-125, 2001.

SIVAN, A.; SHRIRAM, A. N.; SUNISH, I. P.; VIDHYA, P. T. Host-feeding pattern of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in heterogeneous landscapes of South Andaman, Andaman and Nicobar Islands, India. **Parasitology research**, v. 114, n. 9, p. 3539-3546, 2015.

SMITH, A. The attractiveness of an adult and child to *A. gambiae*. **East African medical journal**, v. 33, n. 10, 1956.

SOUSA, J. V. D. C.; DOS SANTOS, M. N.; MAGNA, L. A.; DE OLIVEIRA, E. C. Validation of a fractional model for erythrocyte sedimentation rate. **Computational and Applied Mathematics**, v. 37, n. 5, p. 6903-6919, 2018.

SOUZA-SANTOS, R. Fatores associados à ocorrência de formas imaturas de *Aedes aegypti* na Ilha do Governador, Rio de Janeiro, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32, n. 4, p. 373-382, 1999.

SPIELMAN, A.; WONG, J. Dietary factors stimulating oogenesis in *Aedes aegypti*. **The Biological bulletin**, v. 147, n. 2, p. 433-442, 1974.

STURKIE, P. D.; TEXTOR, K. Further studies on sedimentation rate of erythrocytes in chickens. **Poultry Science**, v. 39, n. 2, p. 444-447, 1960.

TABACHNICK, W. J. Evolutionary genetics and arthropod-borne disease: the yellow fever mosquito. **American Entomologist**, v. 37, n. 1, p. 14-26, 1991.

TAKKEN, W.; KNOLS, B. G. Odor-mediated behavior of Afrotropical malaria mosquitoes. **Annual review of entomology**, v. 44, n. 1, p. 131-157, 1999.

TAKKEN, W.; VERHULST, N. O. Host preferences of blood-feeding mosquitoes. **Annual review of entomology**, v. 58, p. 433-453, 2013.

TEESDALE, C. Studies on the bionomics of *Aedes aegypti* (L.) in its natural habitats in a coastal region of Kenya. **Bulletin of Entomological Research**, v. 46, n. 3, p. 711-742, 1955.

THOMAS, J. A.; BAILEY, D. L.; DAME, D. A. Maintenance of *Anopheles albimanus* on frozen blood. **Journal of the american mosquito control association (USA)**, 1985.

TORR, S. J.; MANGWIRO, T. N. C.; HALL, D. R. The effects of host physiology on the attraction of tsetse (Diptera: Glossinidae) and Stomoxys (Diptera: Muscidae) to cattle. **Bulletin of entomological research**, v. 96, n. 1, p. 71-84, 2006.

TRIMMER, R. W.; OLWIN, J. H. The Effect of Dicumarolization On the Erythrocyte Sedimentation Rate in Dogs. **Angiology**, v. 7, n. 6, p. 537-540, 1956.

TRPIS, M. Autogeny in diverse populations of *Aedes aegypti* from East Africa. **Tropenmedizin und Parasitologie**, v. 28, n. 1, p. 77-82, 1977.

TRPIS, M.; HAUSERMANN, W. Dispersal and other population parameters of *Aedes aegypti* in an African village and their possible significance in epidemiology of vector-borne diseases. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 35, n. 6, p. 1263-1279, 1986.

VALLE, D.; PIMENTA, D.N.; DA CUNHA, R. V. Dengue: teorias e práticas. **SciELO-Editora FIOCRUZ**, 2015.

VALZANIA, L.; MATTEE, M. T.; STRAND, M. R.; BROWN, M. R. Blood feeding activates the vitellogenic stage of oogenesis in the mosquito *Aedes aegypti* through inhibition of glycogen synthase kinase 3 by the insulin and TOR pathways. **Developmental biology**, v. 454, n. 1, p. 85-95, 2019.

VAREJÃO, J. B. M.; SANTOS, C. B. D.; REZENDE, H. R.; BEVILACQUA, L. C.; FALQUETO, A. A Criadouros de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) em bromélias nativas na Cidade de Vitória, ES. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, p. 238-240, 2005.

VINAUGER, C.; LAHONDÈRE, C.; WOLFF, G. H.; LOCKE, L. T.; LIAW, J. E.; PARRISH, J. Z.; ... & RIFFELL, J. A. Modulation of host learning in *Aedes aegypti* mosquitoes. **Current Biology**, v. 28, n. 3, p. 333-344. e8, 2018.

WAAGE, J. K.; NONDO, J. Host behaviour and mosquito feeding success: an experimental study. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 76, n. 1, p. 119-122, 1982.

WAAGE, J. K. The evolution of insect/vertebrate associations. **Biological journal of the Linnean Society**, v. 12, n. 3, p. 187-224, 1979.

WALKER, E. D.; EDMAN, J. D. The influence of host defensive behavior on mosquito (Diptera: Culicidae) biting persistence. **Journal of Medical Entomology**, v. 22, n. 4, p. 370-372, 1985.

WEDELL, N. Sperm competition and ejaculate evolution. **Society of Reproduction and Fertility Supplement**, v. 65, p. 115-135, 2007.

WHEELER, W. C.; WHITING, M.; WHEELER, Q. D.; CARPENTER, J. M. The phylogeny of the extant hexapod orders. **Cladistics**, v. 17, n. 2, p. 113-169, 2001.

WHO. Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control. 2nd edition; **World Health Organization**, Geneva, 1997.

WILKE, A. B.; CABAN-MARTINEZ, A. J.; AJELLI, M.; VASQUEZ, C.; PETRIE, W.; BEIER, J. C. Mosquito adaptation to the extreme habitats of urban construction sites. **Trends in parasitology**, v. 35, n. 8, p. 607-614, 2019.

WILLIAMS, R. W.; BERGER, A. The relation of female polygamy to gonotrophic activity in the ROCK strain of *Aedes aegypti*. **Mosquito News (USA)**, 1980.

WINTROBE, M. M. Variations in the size and hemoglobin content of erythrocytes in the blood of various vertebrates. **Folia haematologica**, v. 51, n. 32, p. 32-49, 1934.

WOKE, P. A. Comparative effects of the blood of different species of vertebrates on egg-production of *Aedes aegypti* Linn. **American Journal of Tropical Medicine**, v. 17, n. 5, 1937.

WOKE, P. A. Effects of various blood fractions on egg production of *Aedes aegypti* Linn. **American Journal of Hygiene**, v. 25, n. 2, 1937.

ZASPEL, J. M.; KONONENKO, V. S.; GOLDSTEIN, P. Z. Another blood feeder? Experimental feeding of a fruit-piercing moth species on human blood in the Primorye territory of far eastern Russia (Lepidoptera: Noctuidae: Calpinae). **Journal of Insect Behavior**, v. 20, n. 5, p. 437-451, 2007.

**APÊNDICE 1 – DADOS INDIVIDUAIS DE OVIPOSIÇÃO E ECLOSÃO DE LARVAS
PARA AS FÊMEAS QUE SE ALIMENTARAM DO SANGUE HUMANO**

ID	Ovos túrgidos	Ovos colapsados	Total ovos	Total larvas	ID	Ovos túrgidos	Ovos colapsados	Total ovos	Total larvas
RH1. 1	2	30	32	0	RH2. 1	0	43	43	0
RH1. 2	0	0	0	—	RH2. 2	0	3	3	0
RH1. 3	0	16	16	0	RH2. 3	53	29	82	6
RH1. 4	4	96	100	1	RH2. 4	2	6	8	0
RH1. 5	114	1	115	91	RH2. 5	116	3	119	109
RH1. 6	0	94	94	0	RH2. 6	140	2	142	123
RH1. 7	98	0	98	90	RH2. 7	48	24	72	16
RH1. 8	2	7	9	0	RH2. 8	96	9	105	3
RH1. 9	0	0	0	—	RH2. 9	97	5	102	3
RH1. 10	18	11	29	13	RH2. 10	72	1	73	11
RH1. 11	31	68	99	25	RH2. 11	X	x	x	x
RH1. 12	0	0	0	—	RH2. 12	14	57	71	0
RH1. 13	0	93	93	0	RH2. 13	9	3	12	0
RH1. 14	87	0	87	66	RH2. 14	19	11	30	0
RH1. 15	0	0	0	—	RH2. 15	0	10	10	0
Média	23,73	27,73	51,47	26,00	Média	10,50	20,25	62,29	19,36
Total	356	416	772	286	Total	666	206	872	271

APÊNDICE 2 – DADOS INDIVIDUAIS DE OVIPOSIÇÃO E ECLOSÃO DE LARVAS PARA AS FÊMEAS QUE SE ALIMENTARAM DO SANGUE DE CÃO

ID	Ovos túrgidos	Ovos colapsados	Total ovos	Total larvas	ID	Ovos túrgidos	Ovos colapsados	Total ovos	Total larvas
RC1. 1	89	18	107	55	RC2. 1	43	14	57	0
RC1. 2	0	119	119	1	RC2. 2	2	123	125	0
RC1. 3	74	10	84	50	RC2. 3	51	69	120	15
RC1. 4	0	133	133	0	RC2. 4	22	119	131	3
RC1. 5	0	59	59	0	RC2. 5	30	22	52	0
RC1. 6	0	28	28	0	RC2. 6	1	4	5	0
RC1. 7	0	19	19	0	RC2. 7	0	0	0	—
RC1. 8	1	125	126	0	RC2. 8	0	118	118	0
RC1. 9	49	5	54	15	RC2. 9	0	98	98	0
RC1. 10	0	75	75	0	RC2. 10	11	93	104	0
RC1. 11	90	0	90	9	RC2. 11	2	103	105	86
RC1. 12	0	1	1	0	RC2. 12	2	106	108	0
RC1. 13	6	1	7	3	RC2. 13	94	1	95	88
RC1. 14	0	0	0	—	RC2. 14	92	4	96	30
RC1. 15	17	49	66	3	RC2. 15	13	101	114	0
Média	21,73	42,80	64,53	9,71	Média	24,20	65,00	88,53	15,86
Total	326	642	968	136	Total	363	975	1328	222

**APÊNDICE 3 – DADOS INDIVIDUAIS DE OVIPOSIÇÃO E ECLOSÃO DE LARVAS
PARA AS FÊMEAS QUE SE ALIMENTARAM DO SANGUE DE GALINHA**

ID	Ovos túrgidos	Ovos colapsados	Total ovos	Total larvas	ID	Ovos túrgidos	Ovos colapsados	Total ovos	Total larvas
RG1. 1	175	1	176	124	RG2. 1	21	1	22	0
RG1. 2	89	14	103	40	RG2. 2	96	12	108	12
RG1. 3	14	2	16	8	RG2. 3	120	4	124	50
RG1. 4	133	19	152	125	RG2. 4	65	30	95	11
RG1. 5	120	6	126	116	RG2. 5	107	8	115	88
RG1. 6	0	0	0	—	RG2. 6	20	0	20	0
RG1. 7	113	1	114	96	RG2. 7	102	2	104	47
RG1. 8	26	63	89	22	RG2. 8	108	9	117	96
RG1. 9	53	89	142	9	RG2. 9	110	34	144	87
RG1. 10	148	12	160	136	RG2. 10	4	33	37	0
RG1. 11	140	1	141	126	RG2. 11	132	5	137	105
RG1. 12	78	5	83	16	RG2. 12	120	3	123	77
RG1. 13	123	4	127	123	RG2. 13	116	1	117	113
RG1. 14	137	2	139	55	RG2. 14	102	1	103	102
RG1. 15	50	13	63	0	RG2. 15	63	6	69	33
Média	93,27	15,47	108,73	71,14	Média	85,73	9,93	95,00	54,73
Total	1399	232	1631	996	Total	1286	149	1435	821

APÊNDICE 4 –DADOS INDIVIDUAIS DE OVIPOSIÇÃO E ECLOSÃO DE LARVAS PARA AS FÊMEAS QUE SE ALIMENTARAM DO SANGUE DE CAMUNDONGO

ID	Ovos túrg.	Ovos colap.	Total ovos	Total larvas	ID	Ovos túrg.	Ovos colap.	Total ovos	Total larvas	ID	Ovos túrg.	Ovos colap.	Total ovos	Total larvas
RR1. 1	82	8	90	72	RR2. 1	47	1	48	37	RR3. 1	142	2	144	55
RR1. 2	141	3	144	115	RR2. 2	135	3	138	131	RR3. 2	79	54	133	63
RR1. 3	13	5	18	12	RR2. 3	1	0	1	0	RR3. 3	96	33	129	161
RR1. 4	99	1	100	97	RR2. 4	56	46	102	36	RR3. 4	87	44	131	67
RR1. 5	67	0	67	42	RR2. 5	141	6	147	136	RR3. 5	132	3	135	100
RR1. 6	98	1	99	84	RR2. 6	143	1	144	138	RR3. 6	139	3	142	121
RR1. 7	111	3	114	94	RR2. 7	5	4	9	1	RR3. 7	145	1	146	71
RR1. 8	76	2	78	68	RR2. 8	100	11	111	100	RR3. 8	134	5	139	89
RR1. 9	111	8	119	112	RR2. 9	130	1	131	129	RR3. 9	88	0	88	69
RR1. 10	171	1	172	143	RR2. 10	134	2	136	146	RR3. 10	x	x	x	x
RR1. 11	30	0	30	22	RR2. 11	34	38	72	5	RR3. 11	123	22	145	77
RR1. 12	12	5	17	15	RR2. 12	125	31	156	62	RR3. 12	62	89	151	39
RR1. 13	32	9	41	32	RR2. 13	138	2	140	138	RR3. 13	67	54	121	17
RR1. 14	20	0	20	10	RR2. 14	154	1	155	147	RR3. 14	129	40	169	114
RR1. 15	100	30	130	124	RR2. 15	98	1	99	99	RR3. 15	139	7	146	123
Média	77,53	5,07	82,60	69,47	Média	96,07	9,87	105,93	87,00	Média	104,00	42,40	146,40	83,29
Total	1163	76	1239	1042	Total	1441	148	1589	1305	Total	1562	357	1919	1166