



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

RAFAELA DE OLIVEIRA BENTO COSTA

**INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA E CICLO CIRCADIANO NA
ECLODIBILIDADE, DESENVOLVIMENTO, CARACTERÍSTICAS
CELULARES E SEXO DO MOSQUITO *Aedes Aegypti***

João Pessoa

2019

RAFAELA DE OLIVEIRA BENTO COSTA

**INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA E CICLO CIRCADIANO NA
ECLODIBILIDADE, DESENVOLVIMENTO, CARACTERÍSTICAS
CELULARES E SEXO DO MOSQUITO *Aedes Aegypti***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado á disciplina de conclusão de curso do Centro de Biotecnologia na Universidade Federal da Paraíba, como requisito para obtenção do Título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientadora: Prof. Dra. Fabíola da Cruz Nunes

João Pessoa

2019

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

C838i Costa, Rafaela de Oliveira Bento.

Influência da temperatura e ciclo circadiano na eclodibilidade, desenvolvimento, características celulares e sexo do mosquito *Aedes aegypti* / Rafaela de Oliveira Bento Costa. - João Pessoa, 2019.

39f. : il.

Monografia (Graduação) - UFPB/CBiotec.

1. Mosquito. 2. Adaptação. 3. Ambiente. 4. Eclosão. 5. Desenvolvimento. I. Título

UFPB/BC



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA (UFPB)
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA (CBiotec)
CAMPUS I – JOÃO PESSOA/PB
Coordenação do Curso de Bacharelado em
Biotecnologia



ATA DE DEFESA PÚBLICA DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Aos vinte e três dias do mês de abril de 2019, às 10:00h, em sessão pública no auditório do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPEFarM) deste Campus Universitário, na presença da Banca Examinadora presidida pela Professora Dra. Fabíola da Cruz Nunes e composta pelas avaliadoras: 1. M.^a Maria Denise Leite Ferreira (PPgPNSB); 2. Bela. Louise Helena Guimarães (PPgBiotec), a discente Rafaela de Oliveira Bento Costa, matrícula 11504058, apresentou o Trabalho de Conclusão de Curso intitulado: **“Influência da temperatura e ciclo circadiano na eclodibilidade, desenvolvimento, características celulares e sexo do mosquito *Aedes aegypti*”**, como requisito curricular indispensável para a integralização do Curso de Graduação em Biotecnologia. Após reunião em sessão reservada, a Banca Examinadora deliberou e decidiu pela Aprovação do referido trabalho, divulgando o resultado formalmente a discente e demais presentes e eu, Fabíola da Cruz Nunes, na qualidade de Presidente da Banca, lavrei a presente ata que será assinada por mim, pelos demais avaliadores e pelo discente.

Presidente da Banca Examinadora

Avaliador 1

Discente

Avaliador 2

João Pessoa/PB, 23 de abril de 2019.

Aos meus pais,

Sem eles eu nada seria.

AGRADECIMENTOS

Primordialmente agradeço ao Deus, por ser a razão da minha existência e me conceder a vida, que sempre esteve ao meu lado e me fez traçar todo caminho até hoje e sempre me acompanhará. Obrigada por ter me concedido saúde e perseverança para passar no curso que escolhi, cursá-lo e realizar este trabalho de conclusão.

Aos meus pais, Edicleide e Roberto, que desde antes do meu nascimento já me amavam e sempre me apoiaram com conversas e conselhos. Ensinarão-me a honestidade, humildade, respeito, amor e temor à Deus. São as pessoas mais importantes da minha vida, amo vocês.

Ao meu irmão, Roberto Júnior, que me acompanhou durante toda minha vida escolar, um apoiando ao outro e repreendendo quando necessário. Obrigada por fazer parte da desta caminhada, você é um presente de Deus na minha vida e dos nossos pais.

À todos que fizeram e fazem parte da minha vida, especialmente, a meu namorado, Sérgio Ricardo, pelo carinho, paciência e palavras de apoio, meus colegas da graduação que se tornaram amigos que amo e compartilhei muitos momentos durante esses quatro anos que estudamos juntos, Andressa Coimbra, Karla Karoline, Cibele Queiroz, César Henrique e John Kennedy, todo esse percurso não seria tão gratificante sem vocês comigo.

Aos colegas do LAPAVET (Laboratório de Biotecnologia Aplicada a Parasitas e Vetores), que junto a mim mantiveram o laboratório em pleno funcionamento, pois sem a colaboração de todos, nada funcionaria. Em especial a Louise Guimarães, Patrícia Alexandria e o Hyago Rique, que foram minhas companhias mais presentes no laboratório e que compartilhamos muitos conhecimentos práticos e experiências.

À minha admirada orientadora, Fabíola da Cruz Nunes, por toda a oportunidade que me deu no laboratório, pela confiança em mim depositada, os conhecimentos compartilhados, a paciência, o apoio e dedicação. Nunca esquecerei da sua contribuição em minha vida acadêmica e tudo que fez por mim, muito obrigado!

Aos membros da banca examinadora, Denise e Louise, agradeço de todo coração por aceitarem o convite e por me presentear com seus ensinamentos e contribuições.

Agradeço a UFPB e a todos os professores do Centro de Biotecnologia por doarem um pouco de si pela construção do conhecimento e por se dedicarem a ciência. Obrigada por todas as trocas de experiências.

Por fim, agradeço a todos que me ajudaram a concretizar essa etapa tão importante em minha vida e a realização desse trabalho.

*“Prefiram a minha instrução à prata,
e o conhecimento ao ouro puro,
pois a sabedoria é mais preciosa do que rubis;
nada do que vocês possam desejar compara-se a ela.”*

Provérbios 8:10-11

RESUMO

O mosquito *Aedes aegypti* é considerado o principal vetor de diversas arboviroses que acometem a população brasileira, como dengue, febre amarela, chikungunya e zika. Ele pertence ao filo Arthropoda, classe Hexapoda, ordem Diptera, família Culicidae e ao gênero *Aedes*. Os vírus são transmitidos pela picada da fêmea do mosquito *Ae. aegypti*, que necessita de sangue para ovopositar. Esse mosquito apresenta tanto hábitos silvestres como domésticos, sendo considerado tropical, porém ele tem se adaptado e disseminado em quase todo território nacional provocando o aumento da transmissão das doenças, e epidemias, se tornando um problema de saúde pública. Seu ciclo de vida é compreendido em ovo, larva, pupa (fases aquáticas) e adulto (fase alada). Em laboratório, é possível reproduzir este ciclo afim de conhecer mais sobre ele, sua adaptação e tornar viável medidas futuras de controle. Diante da problemática de adaptação e dispersão do *Ae. aegypti* surgiu o objetivo desse estudo de avaliar a eclosão, desenvolvimento, características celulares e aspectos sexuais de ovos provenientes de mosquitos submetidos a diferentes condições, na estufa incubadora com controle de temperatura e luminosidade (26 °C e fotoperíodo de 12h claro-escuro) e na bancada sem o controle dessas variáveis (23±2 °C e fotoperíodo de cerca de 4h claro e 20h escuro), eclodindo e se desenvolvendo nessas condições até a emergência na fase alada. Os grupos foram separados em ovos gerados na estufa eclodindo e se desenvolvendo na estufa (EE), ovos gerados na bancada eclodindo e se desenvolvendo na bancada (BB), ovos gerados na estufa eclodindo e se desenvolvendo na bancada (EB) e ovos gerados na bancada eclodindo e se desenvolvendo na estufa (BE). Para avaliar a eclosão dos ovos acondicionados em ambientes diferentes, foi realizada uma análise de comparação da curva de sobrevivência utilizando o teste de Log Rank (Mantel-cox) e teste de Chi square (qui-quadrado), com resultados mostrando que o grupo EB foi o único que se diferenciou dos demais, demorando mais para a eclosão, já para a avaliação do desenvolvimento adicionando aos testes anteriores, realizamos o teste de Gehan-Breslow-Wilcoxon para as análises de comparação entre as curvas de sobrevivência, com um desenvolvimento mais rápido para EE, intermediário para EB e BE, e mais longo para BB. Já para a caracterização e quantificação celular e sexagem, foram realizadas análises através da ANOVA com pós-teste de Tukey ($P < 0.05$), que demonstrou balanço entre o número de fêmeas e machos, e abundância de células do tipo celular prohemócitos, principalmente do grupo EE. Todos os testes foram realizados no programa GraphPad Prism versão 5.0. Foi possível observar adaptação real do *Aedes aegypti* em eclodir e se desenvolver em ambientes com pouca luminosidade e temperatura de 23±2 °C, porém também observado, que apesar da adaptação, seu desenvolvimento é retardado, sendo o grupo com maior tempo para chegar em seu último estágio larval o que teve menos contato com a luz (BB), já o grupo que foi exposto a um ambiente controlado ideal, no que se refere a temperatura e luminosidade (EE) teve o desenvolvimento mais rápido entre os observados.

Palavras Chave: Mosquito, Adaptação, Ambiente, Eclosão, Desenvolvimento.

ABSTRACT

The *Aedes aegypti* mosquito is considered the main vector of several arboviruses that affect the Brazilian population, such as dengue fever, yellow fever, chikungunya and zika. It belongs to the phylum Arthropoda, class Hexapoda, order Diptera, family Culicidae and the genus *Aedes*. The viruses are transmitted by the mosquito bite *Ae. aegypti*, which requires blood to ovulate. This mosquito has both wild and domestic habits, being considered tropical, but it has adapted and disseminated in almost all national territory provoking the increase of the transmission of the diseases, and epidemics, becoming a public health problem. Its life cycle is comprised of egg, larva, pupa (aquatic phases) and adult (winged phase). In the laboratory, it is possible to reproduce this cycle in order to know more about it, its adaptation and to make possible future measures of control. Facing the problem of adaptation and dispersion of *Ae. aegypti* the objective of this study was to evaluate the hatching, development, cellular characteristics and sexual aspects of eggs from mosquitoes submitted to different conditions, in the incubator with temperature and luminosity control (26 ° C and 12h light-dark photoperiod) and (23 ± 2 ° C and photoperiod of about 4h light and 20h dark), hatching and developing under these conditions until emersion in the winged phase. The groups were separated in incubator eggs hatching and developing in the incubator (EE), eggs generated in the bench hatching and developing in the bench (BB), eggs generated in the incubator hatching and developing in the bench (EB) and eggs generated in the bench hatching and developing in the incubator (BE). To evaluate the hatching of conditioned eggs in different environments, a comparison analysis of the survival curve was performed using the Log Rank test (Mantel-cox) and Chi square test (chi-square test), with results showing that the EB group was the only one that differed from the others, taking longer to hatch, for the evaluation of the development adding to the previous tests, we performed the Gehan-Breslow-Wilcoxon test for the comparative analyzes between the survival curves, with a more developed fast for EE, intermediate for EB and BE, and longer for BB. For the cell characterization and quantification and sexing, ANOVA with Tukey's post-test (P <0.05) was performed, which showed a balance between the number of females and males, and abundance of prohemocyte cell type cells, mainly group EE. All tests were performed in the GraphPad Prism program version 5.0. It was possible to observe a real adaptation of *Aedes aegypti* to hatch and develop in environments with low light and temperature of 23 ± 2 ° C, but also observed that despite the adaptation, its development is delayed, being the group with the most time to arrive in its last larval stage had the least contact with light (BB), while the group that was exposed to an ideal controlled environment in terms of temperature and luminosity (EE) had the fastest development among those observed.

Keywords: Mosquito, Adaptation, Environment, Hatchery, Development.

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1: Mosquito <i>Aedes aegypti</i> adulto.....	13
Figura 2: Ciclo de vida do mosquito <i>Aedes aegypti</i> . Mosquito adulto (A), ovos (B), larva de 1º estágio (C), larva de 2º estágio (D), larva de 3º estágio (E), larva de 4º estágio (F) e pupa (G).....	14
Figura 3: Representação morfológica das larvas do <i>Ae. Aegypti</i> . Características morfológicas externas das estruturas das larvas (a) e demonstração do posicionamento do cílio respiratório para respiração da larva (b).....	15
Figura 4: <i>Aedes aegypti</i> no estágio de pupa, com representação dos seus segmentos. ..	17
Figura 5: Morfologia externa da forma alada do <i>Aedes aegypti</i>	18
Figura 6: Sistema circulatório do <i>Aedes aegypti</i>	20
Figura 7: Papéis filtro com ovos da bancada e as placas de petri separadas para a eclosão em duplicata do grupo (esquerda), e as placas de petri para a eclosão de ovos da estufa que estão aderidos nos papéis filtros (direita).	25
Figura 8: As duplicatas dos grupos acondicionadas nos ambientes da bancada (não controlado/esquerda) e na estufa (controlado/direita).....	25
Figura 9: Estágios larvais do <i>Aedes aegypti</i> . Primeiro estágio larval, L1 (A); segundo estágio larval, L2 (B); terceiro estágio larval, L3 (C) e quarto estágio larval, L4 (D). ..	26
Figura 10: Pupa do mosquito <i>Aedes aegypti</i>	26
Figura 11: Placa de petri com a lâmina de bisturi e os microcapilares de vidro utilizados para a extração de hemolinfa, tubos de plástico de 1,5 mL com tampão PBS.....	27
Figura 12: Hemócitos de larvas de <i>Aedes aegypti</i> observados por microscopia de luz em câmara de Neubauer. A seta amarela indica um plasmatócito, a seta vermelha, um prohemócito e a seta azul indica um oenocitóide.	27
Figura 13: Avaliação da eclosão de ovos de <i>Aedes aegypti</i> acondicionados em diferentes condições.	29
Figura 14: Avaliação do desenvolvimento das fases larvais do <i>Aedes aegypti</i> , desde a eclosão dos ovos até o estágio de pupa.	30
Figura 15: Quantificação celular da hemolinfa de larvas <i>Aedes aegypti</i>	30
Figura 16: Quantificação de hemócitos de larvas <i>Aedes aegypti</i>	31
Figura 17: Avaliação da quantidade de fêmeas e machos do mosquito <i>Aedes aegypti</i> que se desenvolveu acondicionado em diferentes ambientes.	31

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
2.1 <i>Aedes aegypti</i>	13
2.2 Ovos.....	14
2.3 Larvas.....	15
2.4 Pupas.....	16
2.5 Adultos.....	17
2.6 Sistema circulatório.....	20
3. OBJETIVO.....	23
3.1 Objetivo geral.....	23
3.2 Objetivos específicos.....	23
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
4.1 Obtenção dos ovos.....	24
4.2 Ensaio para observação da eclosão.....	24
4.3 Análise do desenvolvimento.....	25
4.4 Caracterização e contagem de células.....	26
4.5 Análise das características sexuais.....	28
4.6 Análise estatística.....	28
5. RESULTADOS.....	29
6. DISCUSSÃO.....	32
7. CONCLUSÃO.....	34
REFERÊNCIAS.....	35

1. INTRODUÇÃO

O *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) é um mosquito de coloração enegrecida com listras brancas pelo corpo, que apresenta grande importância na saúde da população por ser responsável pela transmissão de diversas doenças, das quais se destacam a dengue, a febre amarela urbana, a febre chikungunya e a zika. Segundo Brasil (2001), esse mosquito pertence ao Filo Arthropoda, classe Hexapoda, ordem Diptera, família Culicidae, ao gênero *Aedes* e a espécie *Aedes aegypti*.

O *Aedes aegypti* distribui-se nas áreas tropical e subtropical do globo, sendo descrito primeiramente no Egito por Linnaeus, em 1762. Está presente em praticamente todo o continente americano, no sudeste da Ásia, e em toda a Índia. Evidências faunística, primitiva e silvestre do mosquito na África indicam que ele surgiu naquele continente. É provável que esse mosquito tenha sido introduzido nas Américas pelas expedições colonizadoras, posteriormente se dispersando com a movimentação humana (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994).

Ao longo de sua evolução, o *Aedes aegypti* desenvolveu um comportamento sinantrópico e antropogênico, estando intimamente ligado às condições domiciliares ou peridomiciliares ofertadas pelo modo de vida das populações humanas, sendo considerado a espécie de mosquito mais dependente do ambiente urbano (BESERRA, FREITAS, SOUZA, FERNANDES, & SANTOS, 2009).

O ciclo de vida do *Aedes Aegypti* compreende quatro fases: ovo, larva, pupa e adulto. A fase larval apresenta ainda 4 estágios (L1 a L4). Apenas a fase adulta acontece no ambiente terrestre, todas as outras ocorrem em ambiente aquático (NUNES, 2016). Na natureza, os machos e as fêmeas se alimentam de néctar açucarado e somente as fêmeas são hematófagas, alimentam-se de sangue (ANJOLETTE, 2016). A fêmea do *Ae. aegypti* necessita do repasto sanguíneo para a maturação dos ovos, alimentando-se sucessivas vezes até estar totalmente ingurgitada. Essa característica aumenta as chances de o mosquito entrar em contato com os vírus e transmiti-los.

As arboviroses, dengue, zika, chikungunya e febre amarela, são doenças virais, causadas por RNAvírus, o qual ao infectar um susceptível pode desencadear sinais clínicos semelhantes entre si. É sabido que a dengue se caracteriza por dores no corpo e possíveis complicações neurológicas, cardiorrespiratórias e hepáticas, com risco de haver óbito se não for identificada em tempo hábil. A chikungunya é caracterizada por dor

intensa e edema nas articulações, dificultando a retomada das atividades profissionais. Já a zika, apresenta-se clinicamente por febre baixa, erupção cutânea vermelha na pele, prurido, além de poder está associada com microcefalia em recém-nascidos, e de apresentar complicações de ordem neurológica também em adultos (POMBO, 2016).

Por ter essa grande dispersão, por estar ligado ao homem e “seguir-lo”, e por ser vetor de várias doenças, o *Ae. Aegypti* causa preocupação e é o único elemento vulnerável da cadeia de transmissão desses vírus, sendo então o foco para o controle dessa disseminação e de estudos relativos a diversos aspectos da sua ecologia. Nestes estudos tem-se buscado desvendar os comportamentos e hábitos preferenciais desses mosquitos na natureza e no espaço habitado pelo ser humano, devido à grande capacidade de adaptação que apresentam diante as diversas características sociais, urbanas e ambientais (PEDROSA, 2015).

Existem aspectos importantes da fisiologia do mosquito que necessitam ser melhor compreendidos, no sentido de se estabelecer novas perspectivas de controle. Nesse sentido, se justifica o presente estudo, que pretende avaliar o desenvolvimento desse culicídeo quanto exposto a diferentes condições de temperatura, umidade e ciclo circadiano (claro-escuro), em ambiente laboratorial, visando analisar o desempenho adaptativo dessa espécie de grande importância.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Aedes aegypti*

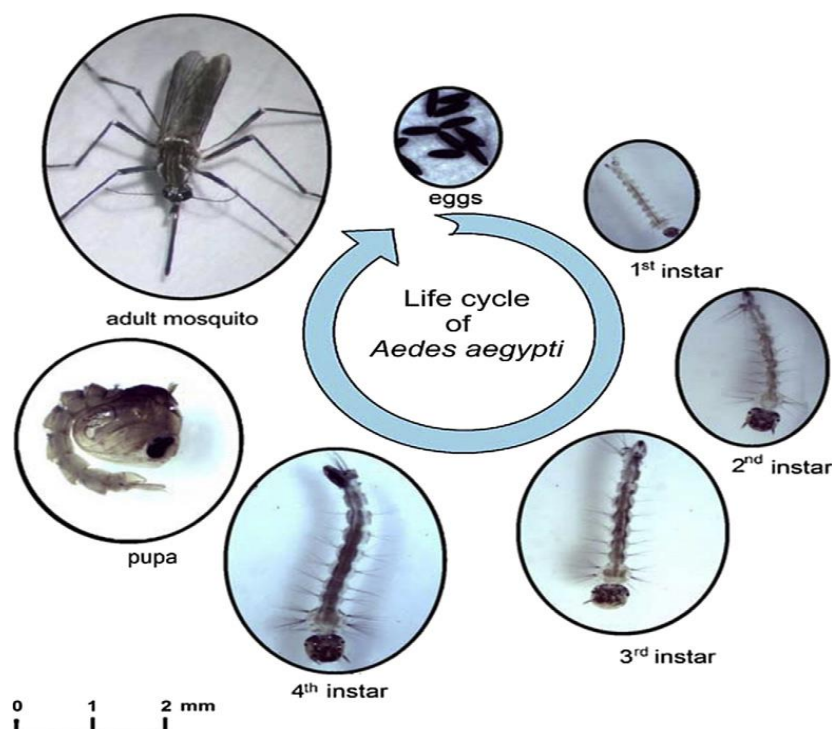
A ordem Diptera compreende 85.000 espécies de insetos das quais aproximadamente 200 podem atuar como vetores de agentes (vírus, bactérias, protozoários e helmintos) causadores de doenças ao homem. A família Culicidae está composta por mais de 3.300 espécies de mosquitos distribuídas em 41 gêneros e pelo menos seis deles são de grande importância médica, *Anopheles*, *Culex*, *Aedes*, *Ochlerotatus*, *Psorophora*, *Haemagogus* e *Sabethes* (ELDRIDGE; EDMAN, 2000). No gênero *Aedes*, estão representadas aproximadamente 900 espécies distribuídas em 44 subgêneros, sendo uma dessas espécies a *Aedes aegypti* (figura 1) (SANTOS, 2008).



Fonte: LAPAVET, UFPB.

Figura 1: Mosquito *Aedes aegypti* adulto.

O *Aedes aegypti* é originário provavelmente da região etiópica, tendo sido descrito no Egito, dispersou-se para áreas onde a atividade antrópica e o clima favoreceram a sua proliferação, sendo reconhecida entre os culicídeos como a espécie mais associada ao homem (NATAL, 2002), e atualmente pode ser encontrado em regiões tropicais e subtropicais do globo. Sendo no Brasil a única espécie de mosquito que transmite arboviroses, dentre elas a dengue, a febre amarela, zika e chikungunya. Essa espécie possui um curto ciclo biológico com duração de 15 a 30 dias, em regiões tropicais (BESERRA *et al.*, 2006) que compreende as fases de ovo, quatro estágios larvais (L1, L2, L3 e L4), pupa e adulto (figura 2).



Fonte: GERIS et al, 2012.

Figura 2: Ciclo de vida do mosquito *Aedes aegypti*. Mosquito adulto (A), ovos (B), larva de 1^o estágio (C), larva de 2^o estágio (D), larva de 3^o estágio (E), larva de 4^o estágio (F) e pupa (G).

2.2 Ovos

Os ovos do *Ae. aegypti* são imóveis, possuem contorno alongado, fusiforme, elípticos ou ovais, muitas vezes com um lado achatado, plano ou mesmo um tanto côncavo, oposto ao lado convexo e medem, aproximadamente, um milímetro de comprimento. Têm cor pálida no momento da oviposição, tornando-se escuros após alguns minutos. Os ovos podem ser colocados isoladamente ou em conjuntos, diretamente sobre a superfície da água, na face inferior de substratos flutuantes na água ou mesmo em local úmido bem próximo da água. A "casca" dos ovos dos mosquitos, caracteristicamente impermeável, é conhecida como cório. Na extremidade anterior dos ovos há um orifício no cório, a micrópila, pelo qual o espermatozóide penetra para fecundar o óvulo (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994).

Os embriões, no interior dos ovos, necessitam de dois a três dias de alta umidade próximo à linha d'água para atingirem o seu desenvolvimento. A eclosão só se verifica após esse período. Se durante este período os ovos secarem, ocorre enfraquecimento e morte dos embriões. Porém, se durante este tempo foi assegurado um perfeito

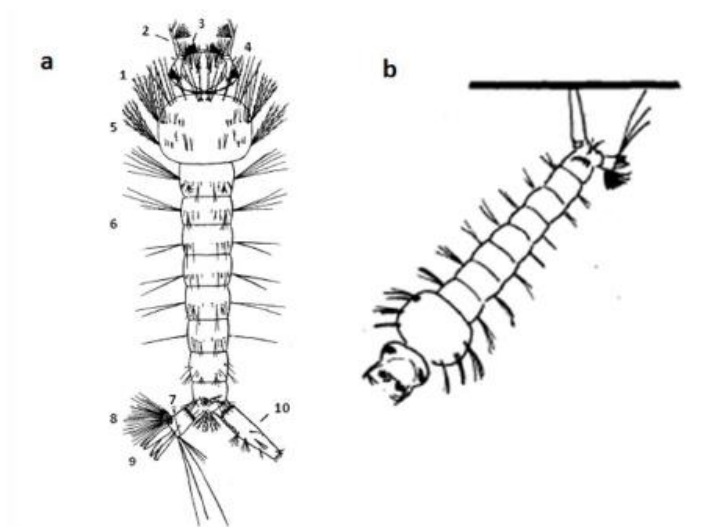
desenvolvimento completo, os ovos se tornam resistentes à dessecação e podem sobreviver por períodos que vão de vários meses até mais de um ano (COSTA, 2001).

A eclosão larvária é auxiliada pelo atrito de um "dente" quitinoso situado dorsalmente na cabeça da larva de 1º estágio contra a casca do ovo, e ainda o engurgitamento da larva juntamente com os seus movimentos pulsáteis (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994).

2.3 Larvas

As larvas de *Ae. aegypti* apresentam um aspecto alongado e vermiforme, sua coloração pode variar entre o esbranquiçado, esverdeado, avermelhado ou mesmo enegrecido (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994).

Seu corpo dividido em cabeça, tórax e abdômen. De aspecto globoso e mais robusto, a cabeça e o tórax têm uma maior quantidade de quitina, já o abdômen fino, liso, flexível e dividido por nove segmentos garante grande mobilidade (ABED *et al.* 2007) (figura 3), o décimo segmento é diferenciado em lobo anal (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994).



Fonte: NUNES, 2013.

Figura 3: Representação morfológica das larvas do *Ae. Aegypti*. Características morfológicas externas das estruturas das larvas (a) e demonstração do posicionamento do sifão respiratório para respiração da larva (b).

Embora aquáticas, as larvas de mosquitos respiram sempre o oxigênio do ar, necessitando para isso chegar à superfície da água, e fazê-lo através de um sifão respiratório, ligado ao segmento VIII, tubo na extremidade do qual se abrem os

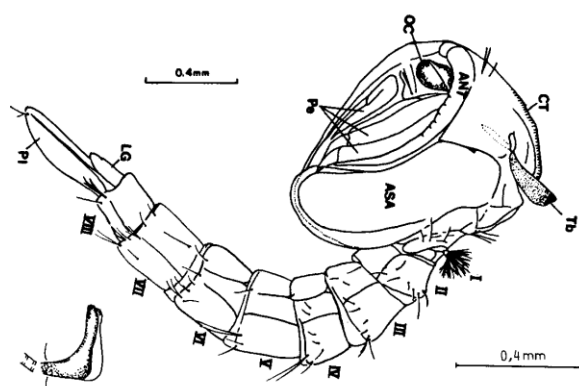
espiráculos para a entrada de ar. O sistema traqueal larvário consiste de dois grandes troncos longitudinais, conectados entre si e ramificados por todo o corpo. Quando a larva mergulha, os espiráculos se fecham para impedir a entrada de água no sistema. O tempo que as larvas suportam longe da superfície varia com a espécie, idade e estado fisiológico. A capacidade de respiração cutânea parece variar muito nas diversas espécies. Já com relação a alimentação, a maioria delas alimenta-se indistintamente do microplâncton presente em seus habitats, constituído de algas, rotíferos, bactérias, esporos de fungos, ou quaisquer partículas de matéria orgânica (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994). Embora possam raspar superfícies com as suas peças bucais, a filtração constitui a forma mais comum de alimentação. Uma larva pode filtrar até 2 litros de água por dia, por essa grande capacidade e ingestão não seletiva de partículas por parte das larvas facilita a utilização de larvicidas por ação digestiva (FORATTINI, 1962).

Alguns fatores podem influenciar no desenvolvimento larval como a temperatura, a luminosidade, a salinidade, poluentes orgânicos e inorgânicos, relações com outros animais, vegetações aquáticas e não aquáticas, entre outro. Entende-se por temperatura ótima aquela na qual o desenvolvimento ocorre com o mínimo de mortalidade e perda de fertilidade nos adultos resultantes. Essa não será necessariamente a temperatura de desenvolvimento mais rápido. Porém, constantes flutuações de temperatura são prejudiciais ao desenvolvimento larvário. A temperatura ótima para o desenvolvimento varia para cada espécie, encontrando-se entre 24 e 28°C (temperatura ambiente do ar) para a maioria dos mosquitos tropicais. Já a luminosidade, para algumas espécies de mosquitos não alcançam a maturidade em ausência de luz (TRENZ, 1934; FROST *et al.*, 1936), entretanto a maioria das espécies estudadas pode desenvolver-se em completa escuridão. Esse fato pode ter relevância no caso de vetores urbanos como *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus*, que desta forma podem desenvolver-se em galerias de água ou esgoto, onde haja pouca ou nenhuma luz (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994).

2.4 Pupas

Depois de passada todas as fases larvais, o último estágio aquático é a pupa. Nesta fase ocorre a metamorfose no mosquito: a larva de quarto estágio (que tem aparelho bucal mastigador, é desprovida de apêndices locomotores e de que não se pode definir facilmente o sexo), passa à fase pupal, durante a qual não se alimenta, e se transforma no adulto, o qual por sua vez se alimenta por punção, tem asas, patas e genitálias interna e externa completamente formadas. As pupas têm aspecto de vírgula (figura 4). São

bastante móveis quando perturbadas, mas estão quase sempre paradas em contato com a superfície da água. Seu corpo, que tem inicialmente a mesma cor da larva recém-transformada, escurece na medida que se aproxima o momento da emergência do adulto. Divide-se em duas porções: cefalotórax (CT) (cabeça + tórax) e abdome (dividido em 8 segmentos). No cefalotórax existem duas estruturas tubulares chamadas trombetas ou trompas respiratórias, onde se abrem os únicos espiráculos da pupa. Ainda nesta porção do corpo vêm-se manchas escuras bilaterais que correspondem, respectivamente, aos olhos compostos e aos estemas. No final do abdome, isto é, no ápice do último segmento, há um par de pás ou paletas que auxiliam a pupa na locomoção (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994).



Fonte: Adaptado do CONSOLI; OLIVEIRA, 1994.

Figura 4: *Aedes aegypti* no estágio de pupa, com representação dos seus segmentos.

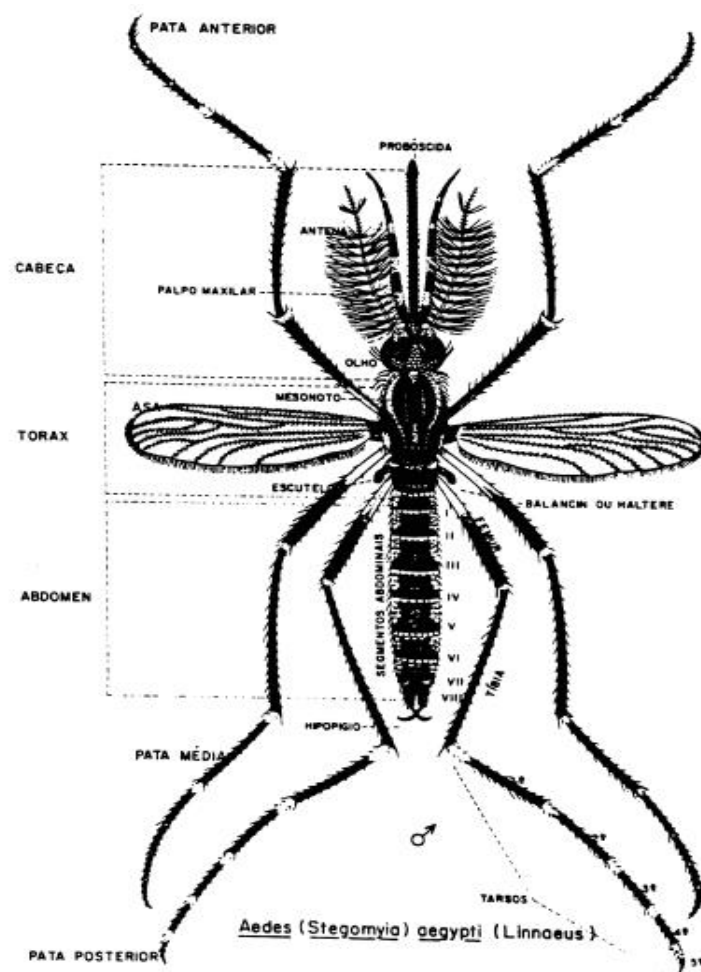
2.5 Adultos

Os adultos do *Aedes aegypti* representam a fase reprodutora do inseto. Logo após emergir do estágio pupal, o inseto procura pousar sobre as paredes do recipiente, assim permanecendo durante várias horas, o que permite o endurecimento do exoesqueleto, das asas e, no caso dos machos, a rotação da genitália em 180°. Vivem em média de 30 a 35 dias (BRASIL, 2001).

Assim como os demais insetos, os mosquitos têm seu corpo segmentado e revestido por um exoesqueleto ou cutícula, composto principalmente por quitina. Tais segmentos endurecidos e as membranas que os unem englobam uma cavidade chamada hemocele, repleta de hemolinfa, líquido que banha os órgãos em geral. As partes endurecidas de cada segmento são chamadas de escleritos, já as membranosas, de pleura. Os escleritos dorsais são os tergitos, os ventrais os esternitos e os laterais os pleuritos. Dessa forma, o corpo dos mosquitos é formado por espécies de anéis compostos de tergito

unido ao pleurito e esse ao esternito e vice-versa, sendo a ligação desempenhada pelas pleuras ou membranas pleurais (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994).

Nos adultos, o corpo é nitidamente dividido em cabeça, tórax e abdome (figura 5). Na cabeça encontram-se os principais órgãos dos sentidos, como os olhos, as antenas e os palpos. Os olhos ocupam a maior parte ântero-lateral da cabeça, são convexos, reniformes e compostos, constituem um agregado de elementos ópticos: os omatídeos. As antenas dos mosquitos são longas e compostas de 15 ou 16 segmentos, o primeiro deles é estreito e em forma de anel, o segundo é globoso (o toro ou pedicelo), e os demais 13-14, geralmente alongados, são chamados segmentos flagelares. O aspecto da porção flagelar da antena varia de acordo com o sexo do mosquito: nos machos, os pelos implantados nesse segmento são mais numerosos e longos do que nas fêmeas, dessa maneira as antenas dos machos são denominadas plumosas e as das fêmeas pilosas, podendo ser diferenciados por essas características macroscópicas (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994).



Fonte: Brasil, 2001.

Figura 5: Morfologia externa da forma alada do *Aedes aegypti*.

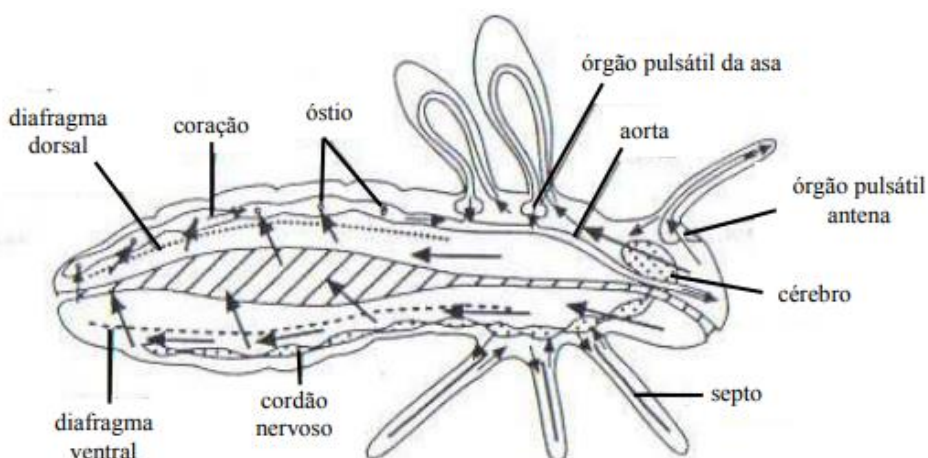
Entre os olhos e abaixo das antenas se encontra uma estrutura denominada clipeo e logo abaixo situa-se o conjunto de órgãos que formam o aparelho bucal do tipo picador ou pungitivo. Todo o conjunto de peças bucais é denominado probóscide ou tromba, constituído por lábio (formado por um par de maxilas e um par de mandíbulas, o hipofaringe e o labro) e labelas. Nos dípteros em geral, o protórax e o metatórax são pouco desenvolvidos. Mas o mesotórax ocupa a maior porção, pois nele estão as asas que são realmente funcionais. As asas metatorácicas estão modificadas em halteres, que parecem auxiliar na orientação e no equilíbrio durante o vôo; elas apresentam escamas, em diferentes quantidades e aspectos, nas suas veias e em seu contorno, neste último caso formando a franja da asa. As pernas dos mosquitos são longas e, como nos insetos em geral, compostas de coxa, trocanter, fêmur, tibia e cinco tarsômeros ou artículos tarsais, numerados em ordem crescente de proximal para distal. O quinto artículo tarsal é geralmente provido de um par de unhas semelhantes ou desiguais, denteadas ou não. O abdome dos mosquitos é formado de oito segmentos aparentes e mais dois reduzidos e modificados em ânus e genitália externa (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994).

Segundo Silva et al (2008), eles acasalam no primeiro ou no segundo dia após se tornarem adultos. A cópula entre o macho e a fêmea se dá durante o voo, sendo o macho atraído pela fêmea devido às batidas das asas e em média uma fêmea produz 120 ovos por postura (ANJOLETTE, 2016).

Os culicídeos na natureza se alimentam de néctar de flores e suco de frutos ricos em carboidratos que são essenciais para a sua sobrevivência (LEANDRO, 2012). A fêmea do *Ae. aegypti* necessita de alimentação sanguínea para completar o processo de amadurecimento do folículo ovariano, e após alguns dias a fêmea já está apta a ovipositar fechando o ciclo do mosquito (figura 2)(ANNIES, 2017). Podendo depositar seus ovos nos mais diferentes locais, desde paredes ásperas, umedecidas e escurecidas de recipientes, mas também pode ser diretamente na água, ou ainda também sob condições laboratoriais podem ovipositar em papel sulfite, papel filtro, papel manteiga e papel toalha. Os ovos podem permanecer sem eclodir por um grande período de tempo, característica denominada quiescência, esta permite a manutenção da viabilidade dos mesmo durante as variações climáticas sazonais, chegando até 492 dias na seca, eclodindo após contato com a água (SILVA & SILVA, 1999).

2.6 Sistema circulatório

Os insetos em geral possuem o sistema circulatório aberto e a hemolinfa, que é o líquido circulante, ocupa a cavidade geral. Toda a circulação desse líquido se dá por meio da contração de um único vaso presente no corpo do inseto, localizado dorsalmente ao trato alimentar que percorre seu corpo longitudinalmente, sendo chamado de vaso dorsal. Esse vaso é pulsátil, constituído de um tubo simples dividido em duas regiões diferenciadas anatomicamente: região anterior ou aorta (inicia no tórax e termina na cabeça), e região posterior, também denominada de coração (situa-se no abdômen) (figura 6) (GALLO et al., 1978; CHAPMAN, 1983).



Fonte: Adaptado (CHAPMAN, 1998)

Figura 6: Sistema circulatório do *Aedes aegypti*.

A hemolinfa é o único tecido fluido extracelular no corpo dos insetos. É composto pelo componente líquido, o plasma linfático; e por células incolores suspensas, os hemócitos. Percorre quase todo o corpo do inseto banhando os tecidos diretamente. A hemolinfa corresponde de 15 a 75% do volume total do corpo do inseto. Sua quantidade e composição variam conforme a espécie, momento fisiológico e a idade. Esse líquido é claro, às vezes incolor, podendo apresentar coloração verde, amarela ou raramente vermelha, devido à presença de pigmentos solúveis provenientes da alimentação. Apresenta grande tendência a se tornar escura, quando em contato com o ar, sob a influência de uma enzima, a tirosinase (BARTH, 1972; BARRACCO, 1982).

É atuando através da hemolinfa que são efetuadas as trocas químicas entre os diversos órgãos, funcionando no transporte de hormônios e enzimas; dos resíduos oriundos do metabolismo aos órgãos de excreção; e ainda no transporte das substâncias nutritivas do

aparelho digestivo para os tecidos, asas e demais apêndices, os quais são banhados livremente por ela (GALLO et al., 1978).

As células livres circulantes na hemolinfa dos insetos são denominadas de hemócitos e apresentam formas e funções diversificadas (BARTH, 1972). Os principais mecanismos de defesa são desenvolvidos pelos hemócitos, que fornecem uma resposta ágil e eficiente contra patógenos que atingem a hemocele (RATICLIFFE et al., 1985). São comparados, devido as suas funções, aos leucócitos dos vertebrados, visto que estão relacionados direta ou indiretamente com sua capacidade de reagir contra a presença de patógenos (BOMBONATO; GREGÓRIO, 1995).

Observações da hemolinfa através da microscopia de luz resultaram em numerosas e conflitantes publicações quanto à classificação dos hemócitos, bem como na dificuldade em relacioná-los aos diferentes mecanismos de defesa, que envolvem a ação de vários tipos celulares (WILLOT et al., 1994). Há uma grande variabilidade morfológica dos hemócitos em função dos estágios de desenvolvimento e das condições ambientais, além da grande diversidade de insetos (ARAÚJO, 2011).

Para a classificação morfológica dos hemócitos são considerados vários aspectos como: o tamanho, a forma, o número e afinidade tintorial de suas inclusões e coloração do citoplasma, dentre outros presentes na literatura. Gupta (1985) em ampla revisão da literatura, uniformizou a nomenclatura dessas células e classificou os principais tipos de hemócitos presentes em várias ordens de insetos: prohemócito (PR), plasmatócito (PL), granulócito (GR) e oenocitóide (OE).

Os prohemócitos presentes na hemolinfa de *Ae. aegypti*, foram as menores células encontradas. Estas apresentam-se com perfil esférico medindo de 5-10 μ m de diâmetro, seu núcleo grande localizado no centro da célula ocupa quase todo espaço celular, restando ao citoplasma apenas uma pequena área ao seu redor (ARAÚJO, 2009). Gupta (1979) comenta sobre o alto índice mitótico do PR, sendo considerado por Lavine & Strand (2002) um tipo celular que dá origem aos demais hemócitos. Já os plasmatócitos apresentam funções imunológicas participando na fagocitose, no encapsulamento ou na coagulação; estas células são bastante polimórficas variando de arredondadas a alongadas com 6-25 μ m de diâmetro; sua membrana plasmática possui superfície irregular, filopódios e pseudópodes. Os oenocitóides medem aproximadamente 7-12 μ m de diâmetro, possuem formato redondo com núcleo pequeno e excêntrico (ARAÚJO, 2009), Iwama & Ashida (1986) e Ashida *et al.* (1988) relatam a presença da enzima fenoloxidase nestas células. Na literatura encontram-se poucos trabalhos com abordagem sobre

hemócitos de insetos, quando se considera o elevado número de espécies existentes, ou mesmo quando se considera apenas as espécies economicamente importantes na agricultura ou na saúde. Os trabalhos a esse respeito enfocam as ordens mais estudadas que são: Lepidoptera, Himenoptera, Coleoptera e Diptera (CHAPMAN, 1998).

3. OBJETIVO

3.1 Objetivo geral

Analisar a diferença de eclosão de ovos, desenvolvimento das fases aquáticas até a fase alada, características celulares e sexualidade do mosquito *Aedes aegypti* expostos a temperatura, umidade e ciclo claro-escuro controlados e não controlados.

3.2 Objetivos específicos

- Analisar diferença da eclosão dos ovos oriundos de mosquitos expostos a temperatura, umidade e ciclo claro-escuro controlados (estufa) comparando aos não controlados (bancada);
- Analisar a diferença da evolução do desenvolvimento das fases larvais até o estágio de pupa no ambiente controlado e não controlado;
- Analisar quantitativamente as células caracterizadas da hemolinfa das larvas que são provenientes e estão se desenvolvendo em ambientes controlados e não controlados;
- Analisar a diferença de sexualidade entre os mosquitos provenientes de desenvolvimento em ambiente controlado e não controlado.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Obtenção dos ovos

Os ovos dos mosquitos da espécie *Aedes aegypti* foram obtidos a partir dos insetários do Laboratório de Biotecnologia Aplicada a Parasitas e Vetores, do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba (Lapavet/CBiotec/UFPB). Ovos são postos pelas fêmeas após o repasto sanguíneo em um papel filtro que fica envolvendo um depósito com água dentro de cada insetário.

Um insetário está dentro da estufa incubadora BOD (Biochemical Oxygen Demand) mantendo os mosquitos em temperatura média de 26 °C e fotoperíodo de 12 horas de claro-escuro e o outro insetário está em cima da bancada do laboratório, em que durante o período dos experimentos analisados foram mantidos os mosquitos em temperatura média de 23±2 °C e fotoperíodo de cerca de 4 horas de claro e 20 horas de escuro (sendo esses números estimados pela medição do termômetro e realização do monitoramento, pois essas duas variáveis dependiam da utilização do laboratório (ligar/desligar ar-condicionado, dias quentes, chuvosos, noites mais frias, ligar/ desligar lâmpada).

4.2 Ensaio para observação da eclosão

Ovos provenientes dos ambientes, controlado (estufa) e não controlado (bancada), foram separados em grupos com 30 ovos cada. Duplicatas de cada ambiente (estufa e bancada) foram separados em placas de petri (figura 7), em que o papel filtro com os ovos aderidos foram embebidos em água e monitorados a cada 24 horas, sendo expostas duplicatas dos grupos em ambiente com controle das variáveis (na estufa), e duplicatas dos grupos em ambiente não controlado (na bancada) (figura 8). Então os grupos foram: ovos gerados na estufa eclodindo e se desenvolvendo na estufa (EE), ovos gerados na bancada eclodindo e se desenvolvendo na bancada (BB), ovos gerados na estufa eclodindo e se desenvolvendo na bancada (EB) e ovos gerados na bancada eclodindo e se desenvolvendo na estufa (BE). Foram separadas em cada monitoramento as larvas que haviam eclodido durante o período em que os ovos estavam em contato com a água até a eclosão de todos os ovos.



Figura 7: Papéis filtro com ovos da bancada e as placas de petri separadas para a eclosão em duplicata do grupo (esquerda), e as placas de petri para a eclosão de ovos da estufa que estão aderidos nos papéis filtros (direita).

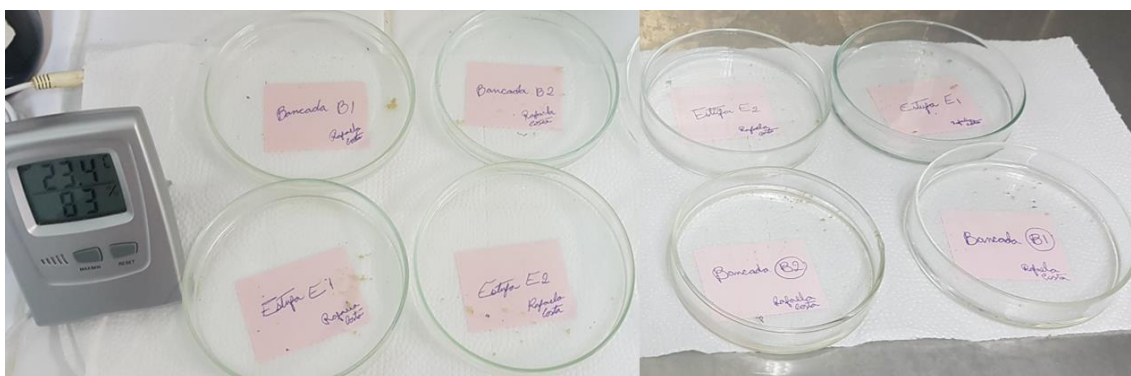
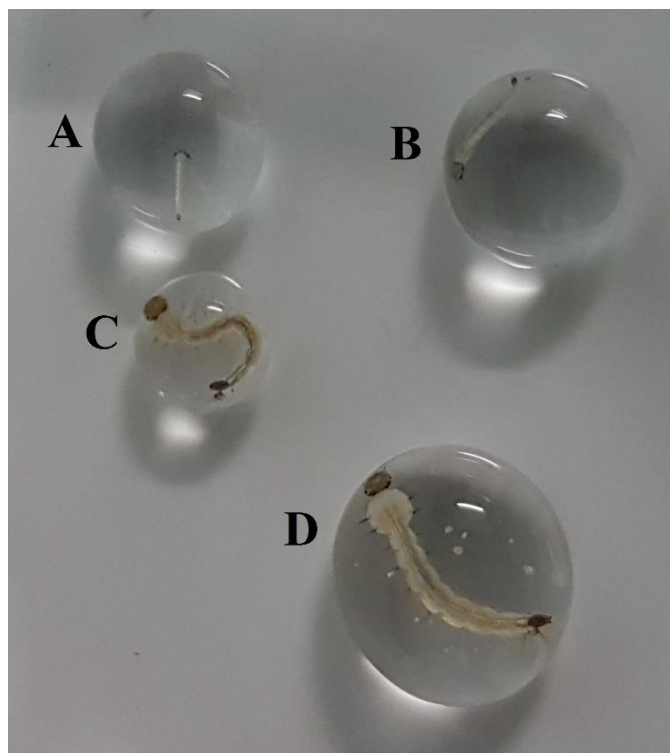


Figura 8: As duplicatas dos grupos acondicionadas nos ambientes da bancada (não controlado/esquerda) e na estufa (controlado/direita).

4.3 Análise do desenvolvimento

Após a eclosão, as larvas (figura 9) que foram separadas durante o monitoramento e ficaram acondicionadas no mesmo ambiente até o estágio de pupa (figura 10), sendo fornecida ração canina como alimentação, foi contabilizado quantos dias desde a eclosão de cada larva até o seu último estágio larval.



Fonte: acervo LAPAVET.

Figura 9: Estágios larvais do *Aedes aegypti*. Primeiro estágio larval, L1 (A); segundo estágio larval, L2 (B); terceiro estágio larval, L3 (C) e quarto estágio larval, L4 (D).



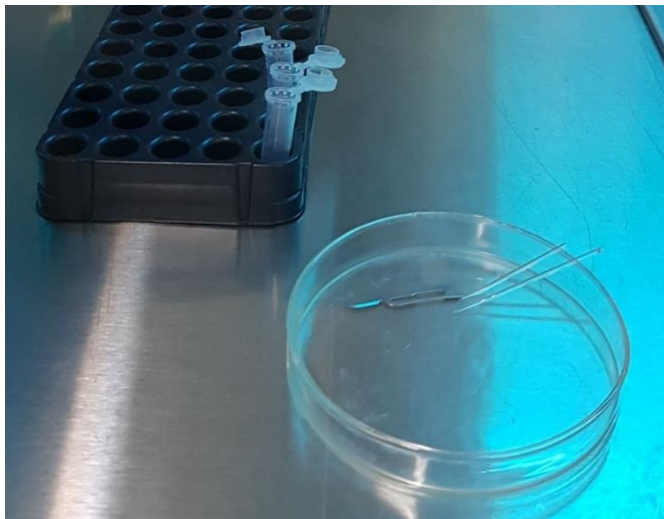
Fonte: acervo LAPAVET.

Figura 10: Pupa do mosquito *Aedes aegypti*.

4.4 Caracterização e contagem de células

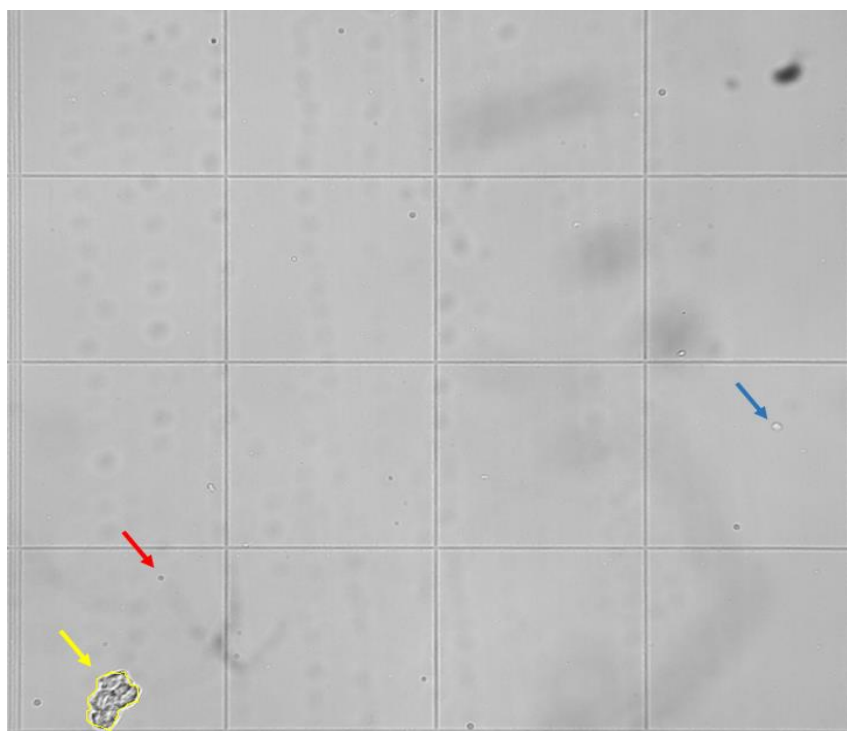
Foram colocados, separadamente, ovos de *Aedes aegypti* para eclodir, para fazer a extração da hemolinfa das larvas em 4º estágio. As larvas foram separadas em placas de petri, para cada grupo (EE, EB, BB e BE) para coleta do pool de hemolinfa de 5 larvas, que com o auxílio de uma lâmina de bisturi tiveram a cabeça decepada e a hemolinfa foi

coletada com o auxílio de um microcapilar de vidro (figura 11), acondicionadas em um tubo de plástico de 1,5 mL contendo 1000 μL de tampão PBS. Foi retirada uma alíquota de 10 μL de cada grupo e colocada na câmara de Neubauer, observada as características celulares que diferenciam os hemócitos, cada grupo celular foi contabilizado.



Fonte: LAPAVET/UFPB.

Figura 11: Placa de petri com a lâmina de bisturi e os microcapilares de vidro utilizados para a extração de hemolinfa, tubos de plástico de 1,5 mL com tampão PBS.



Fonte: LAPAVET/UFPB.

Figura 12: Hemócitos de larvas de *Aedes aegypti* observados por microscopia de luz em câmara de Neubauer. A seta amarela indica um plasmatócito, a seta vermelha, um prohemócito e a seta azul indica um oenocitóide.

4.5 Análise das características sexuais

Após todo o monitoramento até o estágio de pupa, foi separado cada mosquito adulto emergido para a contabilidade de machos e fêmeas por meio das características morfológicas externas, em que os pelos implantados nas antenas dos machos são denominadas plumosas e as das fêmeas pilosas (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994).

4.6 Análise estatística

Para avaliar a eclosão dos ovos acondicionados em ambientes diferentes, foi realizada uma análise de comparação da curva de sobrevivência utilizando o teste de Log Rank (Mantel-cox) e teste de Chi square (qui-quadrado). Para a avaliação do desenvolvimento também foram utilizados os testes de Log Rank (Mantel-cox) e Chi square, e o teste de Gehan-Breslow-Wilcoxon para as análises de comparação da curva de sobrevivência. Já para a quantificação celular e dos sexos, foram realizadas as análises através da ANOVA com pós-teste de Tukey ($P < 0.05$). Todos os testes foram realizados no programa GraphPad Prism versão 5.0.

5. RESULTADOS

A análise da eclosão mostrou que o grupo de ovos da estufa que eclodiram na estufa (EE) e o grupo de ovos da bancada que eclodiram na bancada (BB) tiveram 100% de eclosão em cerca de 5 dias. O grupo de ovos da bancada eclodindo na estufa (BE) chegaram a 100% de eclosão em cerca de 7 dias, já os ovos do grupo da estufa que eclodiram na bancada (EB) demoraram mais para eclodir que os demais grupos (figura 13), os últimos ovos eclodiram no oitavo dia. Não houve diferença estatística entre o grupo EE e o grupo BB, nem entre o grupo EE e o grupo BE, assim como não houve entre BB e BE; já o grupo EB se diferenciou estatisticamente de todos os demais grupos.

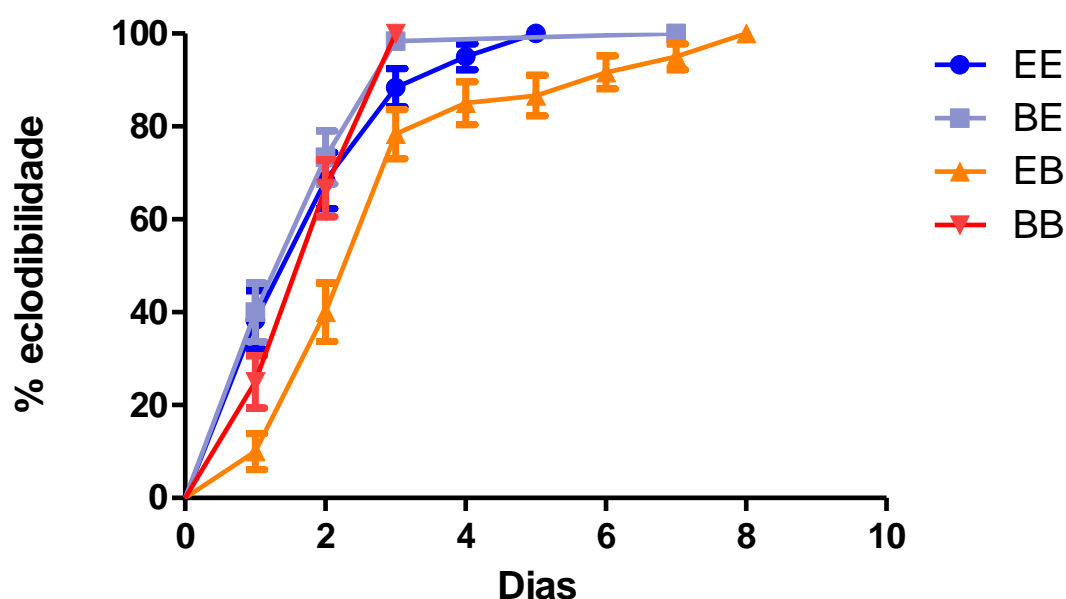


Figura 13: Avaliação da eclosão de ovos de *Aedes aegypti* acondicionados em diferentes condições.

Na análise do desenvolvimento das fases larvais até o estágio de pupa, o grupo EE foi o grupo que se desenvolveu mais rápido, tendo a última larva se transformado em pupa 13 dias após a sua eclosão. Os grupos EB e BE tiveram o desenvolvimento muito próximo, cerca de 15 dias, estatisticamente não houve diferença entre esses dois grupos. Já o grupo BB foi o que mais demorou a se desenvolver, alcançando cerca de 22 dias para completar o seu desenvolvimento na água (figura 14).

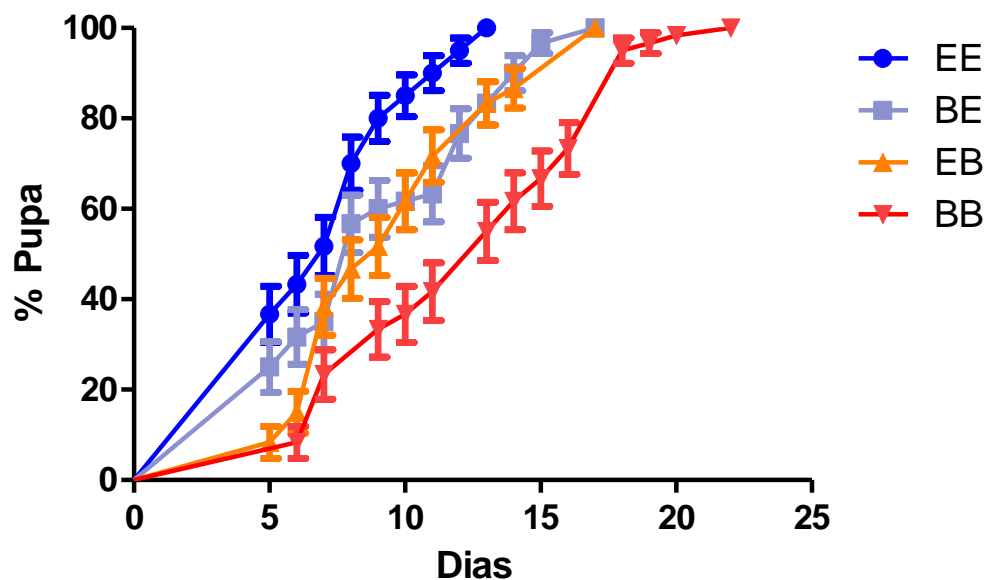


Figura 14: Avaliação do desenvolvimento das fases larvais do *Aedes aegypti*, desde a eclosão dos ovos até o estágio de pupa.

Calculando o total de células analisadas e comparando entre os grupos, observa-se que não há diferença estatística entre os grupos da bancada (BB e BE), e o grupo EE foi o que apresentou a maior quantidade celular (figura 15), já o EB foi o grupo que apresentou o menor número de células.

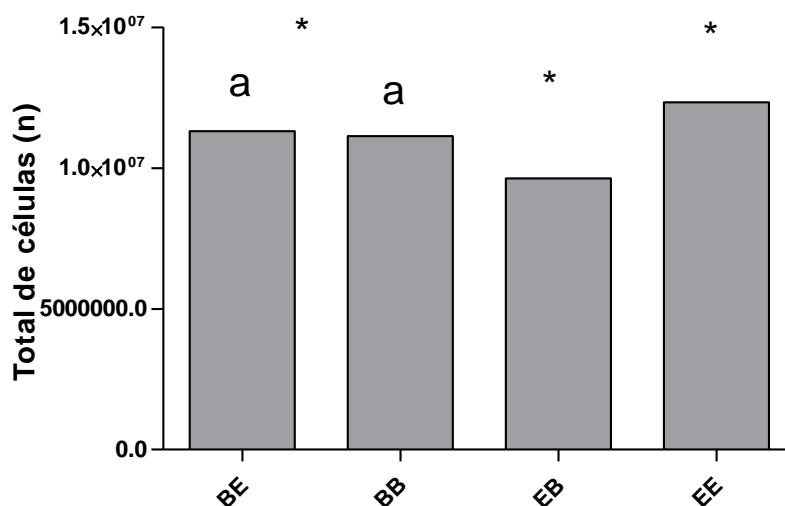


Figura 15: Quantificação celular da hemolinfa de larvas *Aedes aegypti*.

Após a contagem dos tipos celulares na câmara de Neubauer, os diferenciando por tamanho e morfologia, foi possível observar que nos 4 grupos, a população de células predominantes foi a de prohemócitos, seguido pela de oenocitoides e plasmatócitos.

O grupo EE foi o que apresentou mais prohemócitos, Não houve diferença estatística na variação da população de plasmatócitos entre os grupos (figura 16).

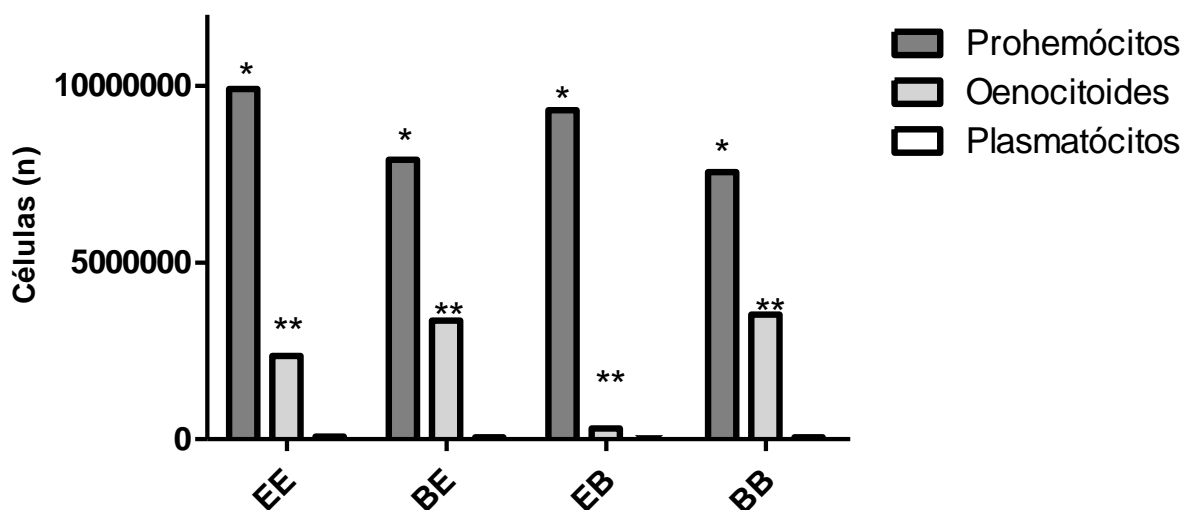


Figura 16: Quantificação de hemócitos de larvas *Aedes aegypti*.

A quantidade de mosquitos *Aedes aegypti* fêmeas e machos variou muito pouco entre os grupos observados, apresentando um balanço de cerca de 50% para cada sexo (figura 17). Apenas o grupo BE obteve uma porcentagem um pouco maior de fêmeas que os demais, porém não houve diferença estatística entre os grupos.

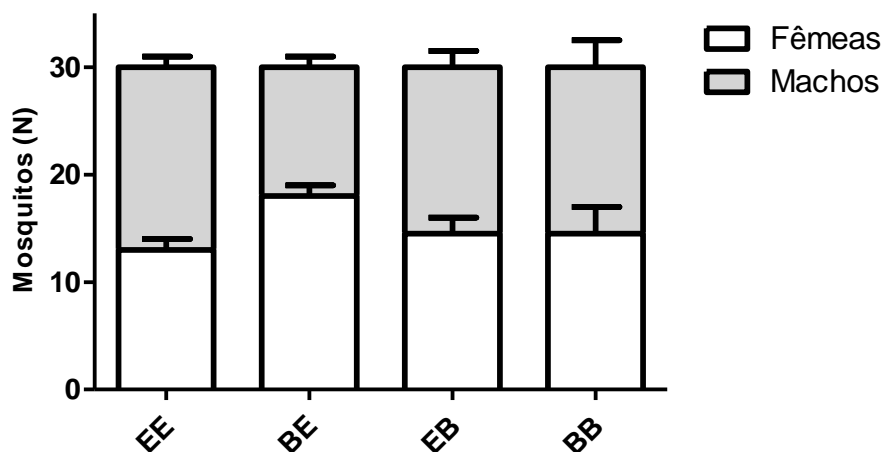


Figura 17: Avaliação da quantidade de fêmeas e machos do mosquito *Aedes aegypti* que se desenvolveu acondicionado em diferentes ambientes.

6. DISCUSSÃO

A eclosão dos ovos, mesmo variando em tempo, foi de 100% em todos os grupos. Ressalta-se que eram ovos recentes (coletados 2 dias antes do início do experimento), em que o período de quiescência era muito curto, corroborando com o que foi observado por Silva (1999), que quanto menor o tempo de quiescência maior a taxa de eclosão/viabilidade dos ovos.

Nosso estudo analisou a eclodibilidade de ovos de *Aedes aegypti* em diferentes condições e verificou que mesmo em temperatura de 23 ± 2 °C e luminosidade baixa, houve eclosão e desenvolvimento, entretanto os ovos provenientes de fêmeas expostas a temperatura e luminosidade controladas (estufa) tiveram mais dificuldade para eclosão em um ambiente não controlado (temperatura variando entre 21 e 25 °C, e ciclo de claro e escuro que não obedeceu um padrão)(bancada). Uma hipótese que poderia explicar esse fenômeno pode ser a falta de um ambiente nas condições ideais como foi o da oviposição desses ovos, pois comparado aos mesmos ovos postos em ambiente controlado, o grupo EE, que obtiveram tempo de eclosão aproximado aos grupos de ovos postos em ambiente com variáveis não controladas (BB e BE).

Na análise do desenvolvimento do mosquito, foi observada que os grupos EE e BB mostraram um retardo no desenvolvimento larval. Ambos os grupos foram expostos ambiente sem controle de luz e temperatura. Já os grupos que foram expostos ambiente diferente do da sua oviposição, eclodiu e se desenvolveu em tempo semelhante. O tempo de desenvolvimento observado entre os grupos EE (entre 5 a 13 dias), EB e BE (entre 7 a 15 dias) foi intermediário aos dados encontrados por Shannon & Putnam (1934) e Forattini (1965) que constataram um desenvolvimento entre 6 e 8 dias; e em Silva *et al.* (1994) e Silva *et al.* (1998), esse desenvolvimento variou entre 10 e 11 dias; apenas o grupo BB que teve um tempo mais longo até o estágio de pupa (até 22 dias) e foge aos parâmetros para o *Aedes aegypti* já observados em literatura. Dive (2007) demonstrou que abaixo de 20°C este período de desenvolvimento pode ser mais longo; a temperatura da bancada era acima dessa, mas era abaixo da temperatura da estufa, essa variável e a pouca incidência de luz pode ter contribuído para o resultado do desenvolvimento observado no grupo BB.

Araújo (2009) observou e caracterizou morfológicamente hemócitos da hemolinfa extraída de mosquitos *Aedes aegypti* adultos, porém encontram-se na literatura poucos

trabalhos com abordagem sobre hemócitos. Além disso, ainda não há uma quantificação bem definida dos hemócitos presentes na hemolinfa de larvas de *Aedes aegypti*. As células observadas e contabilizadas no nosso estudo foram os prohemócitos, os oenocitóides e os plasmatócitos, sendo o primeiro o mais abundante em todos os grupos, principalmente no grupo EE, já o segundo tipo celular foi menos contabilizado que o primeiro, e o terceiro foi o menos encontrado em todos os grupos.

Segundo a literatura, os prohemócitos estão envolvidos no processo de hematopoiese, pois se dividem ativamente originando os demais tipos de hemócitos como os plasmatócitos e os granulócitos. Alguns autores sugerem que, todos os hemócitos representam fases de desenvolvimento de um único tipo celular (Lavine; Strand, 2002; Silva, 2002). Essa pode ser uma explicação para que este tipo celular seja mais abundante nas larvas, já que estas são as fases iniciais do ciclo de vida do mosquito. Segundo Araújo (2011) prohemócitos, oenocitóides e plasmatócitos somam cerca de 97% da população total de células circulantes na hemolinfa de mosquitos *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* adultos. Entretanto, mais estudos são necessários para contribuir para esta discussão.

A quantidade total de células pode variar até mesmo pelo método utilizado em sua identificação e quantificação. Essa quantidade também varia entre espécies e na mesma espécie ao longo do desenvolvimento do inseto (Arnold & Hinks, 1976, Araújo, 2009). Porém não há uma quantificação exata para a quantidade média de células de hemolinfa das larvas (L4) de *Ae. aegypti*. Nos estudos feitos com hemolinfas de adultos, em geral, as fêmeas possuem mais hemócitos que os machos (Chapman, 1998).

Ao analisar a diferenciação sexual dos mosquitos adultos, observou-se que a relação entre fêmeas e machos foi bastante equilibrada, cerca de 50% machos e 50% de fêmeas, mas houve um pequeno aumento na quantidade de fêmeas no grupo BE em relação aos demais grupos. Talvez a incidência de luz e temperatura controlada tenha sido um estímulo para a eclosão de fêmeas nesse grupo, mas Lopes *et al.* (2004), Lima-Camara (2006), Serpa *et al.* (2006) e Fantinatti *et al.* (2007) mostram que na captura dessa espécie na natureza, a relação entre machos e fêmeas é de 1:1.

7. CONCLUSÃO

Todo organismo na Terra é submetido a oscilações diárias de luz, temperatura e umidade. Esses ciclos tem uma influência contínua sobre as funções de um organismo durante a sua vida. De fato, os organismos se adaptaram aos ciclos ambientais ao longo de sua evolução histórica e exibem variação rítmica em condições fisiológicas e traços comportamentais de acordo com esses ciclos. Os resultados desse estudo demonstram a adaptação do *Aedes aegypti* em eclodir e se desenvolver em ambientes com luminosidade e temperatura variáveis. Mesmo sendo um mosquito tropical, parece se adaptar facilmente a condições um pouco diferentes das ideais, o que pode possibilitar sua futura dispersão no mundo. Ainda assim, ressalta-se que apesar de se desenvolverem nessas condições não ideais, seu desenvolvimento é retardado e ainda não foi constatado que o adulto sobreviva a essas e outras variações ambientais. Sendo o *Ae. aegypti* um vetor de diversas doenças emergentes no Brasil e no mundo, é necessário o conhecimento desse vetor e de sua capacidade adaptativa, assim faz-se imprescindível estudos posteriores para contribuir com a prevenção da disseminação desse vetor e das doenças que ele é capaz de transmitir.

REFERÊNCIAS

- ABED R. A., CAVASIN GM, SILVA HHG, GERIS R, SILVA IG. Alterações morfohistológicas em larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae) causadas pela atividade larvicida do óleo-resina da planta medicinal *Copaifera reticulada* Ducke (Leguminosae). **Rev Patol Trop** v. 36, p. 75-86, 2007.
- ANJOLETTE, A. F.F; MACORIS, M. L. G. **Técnicas para manutenção de Aedes aegypti em laboratório.** v. 13, p. 19-29, 2016.
- ANNIES, V. **Desenvolvimento de metodologias de controle do Aedes aegypti baseadas em compostos de baixa toxicidade ao ser humano e ao meio ambiente.** Tese de doutorado. Universidade Federal do Paraná, 2017.
- ARAÚJO, Helena Rocha Côrrea de. **Ultra-estrutura dos hemócitos de Aedes aegypti (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae).** Dissertação (Mestrado em Saúde pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Recife, 2009.
- ARAÚJO, Helena Rocha Corrêa. **Caracterização morfológica dos hemócitos do Aedes aegypti e do Aedes albopictus e a resposta imune dos hemócitos do Aedes aegypti após a infecção pelo Dengue virus.** Tese (Doutorado com Concentração em Biologia Celular e Molecular) - Centro de Pesquisas René Rachou, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, 2011.
- ASHIDA M., OCHIAI M., NIKI T. Immunolocalization of prophenoloxidase among hemocytes of the silkworm, *Bombyx mori*. **Tissue Cell**; v. 20: 599–610; 1988.
- BARRACCO, M. A. **Estudo dos hemócitos e hemolinfa de Trichosia pubescens (Diptera: Sciaridae).** 1982. Tese (Doutorado em Biologia) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 1982.
- BARTH, R. **Entomologia Geral.** Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 1972.
- BESERRA, E. B. *et al.* Biologia e exigências térmicas de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) provenientes de quatro regiões bioclimáticas da Paraíba. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 35, n. 6, p. 853-860, 2006.
- BESERRA, E. B., FREITAS, E. M., SOUZA, J. T., FERNANDES, C. R. M. & SANTOS, K. D. Ciclo de vida de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera, Culicidae) em águas com diferentes características. **Iheringia, Sér. Zool.**, Porto Alegre, v. 99(3), p. 281-285, 2009.
- BOMBONATO, M. T.; GREGÓRIO, E. A. Estudo morfológico e quantitativo dos hemócitos em larvas de *Diatraea sacharalis* (Fabricius) (Lepidoptera, Pyralidae). **Rev. bras. zool.**, São Paulo, v.12, n. 4, p. 867-879, 1995.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Dengue. Instruções para pessoal de combate ao vetor: manual de normas técnicas.** 3. ed. Brasília: Ministério da Saúde/Fundação Nacional de Saúde, 2001.

CHAPMAN, R. F. Circulatory system blood and immune systems. In: _____. The insects: structure and function. 4. ed. **Cambridge: Cambridge University**, cap. 5, p. 94-131, 1998.

CHAPMAN, R. F. The circulatory system. In: _____. The insects: structure and function. **London: Hodber and stonghton**, cap. 32, p. 781-795, 1983.

CONSOLI, RAGB.; OLIVEIRA, RL. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil [online]. Rio de Janeiro: **Editora FIOCRUZ**, 1994. 228 p. ISBN 85-85676-03-5. Disponível em: <http://books.scielo.org/>.

COSTA, Maria Antonia Ramos. **A ocorrência do Aedes Aegypti na região Noroeste do Paraná: um estudo sobre a epidemia da dengue em Paranaíba-1999, na perspectiva da geografia médica**. Dissertação de pós-graduação. Universidade Estadual Paulista. Presidente Prudente, 2001.

ELDRIDGE, B. F., EDMAN, J. D. **Medical Entomology**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2000.

FANTINATTI, ELAINE C.S. *et al* . Abundância e agregação de ovos de *Aedes aegypti* L. e *Aedes albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae) no norte e noroeste do Paraná. **Neotrop. entomol.**, Londrina , v. 36, n. 6, p. 960-965, Dec. 2007.

FORATTINI, O.P. **Entomologia Médica**. Vol. 1., Faculdade de Higiene e Saúde Pública, São Paulo, 662 p, 1962.

FORATTINI, O.P. **Entomologia Médica**. Vol. 2. São Paulo, EDUSP., 506 p, 1965.

FROST, F.M.; HERMS, W.B. & HOSKIN, W.M. (1936). The nutritional requirements of the larvae of the mosquito *Theobaldia incidens* (Thom.). **J. Exp. Zool.**, 73: 461-479.

GALLO, D. et al. Aparelho Circulatório. **Manual de Entomologia Agrícola**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1978. p. 94-96.

GERIS R., RIBEIRO P.R., BRANDÃO M.S., SILVA H. H. G., SILVA I. G. Bioactive natural products as potential candidates to control *Aedes aegypti*, the vector dengue. In: Atta-ur-Rahman, FRS. Studies in natural products chemistry. **Elsevier**. Amsterdã, 2012.

GUPTA, A. P. Structure and taxonomic significance. Insects Hemocytes. **Cambridge: Cambridge University Press**; p. 85-128, 1979.

GUPTA, A. P. Cellular elements in hemolymph. In: KERKUT, G. A.; GILBERT, L. I. (Ed.). **Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology**. Oxford: Pergamon, v. 3, p. 401-451, 1985.

IWAMA R, ASHIDA M. Biosynthesis of prophenoloxidase in hemocytes of larval hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. **Insect Biochem**. Bristol, v. 16: 547-555; 1986.

LAVINE M. D., STRAND M. R. Insect hemocytes and their role in immunity. **Insect Biochem. Mol. Biol.** Orford, v 32: 1295-1309, 2002.

LEANDRO, R. S. **Competição e dispersão de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) e *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse, 1894) (Diptera: culicidae) em áreas de ocorrência no município de João Pessoa – PB.** Dissertação de mestrado. Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciência e Tecnologia. Campina Grande, 2012.

LIMA-CAMARA, T.M., N.A. HONÓRIO & R. LOURENÇO-DE-OLIVEIRA. Frequência e distribuição espacial de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* (Diptera, Culicidae) no Rio de Janeiro, Brasil. **Cad. Saúde Pública** v. 22, p. 2079-2084, 2006.

LOPES, J., E.A.C. MARTINS, O. OLIVEIRA, V. OLIVEIRA, B.P. OLIVEIRA NETO & J.E. OLIVEIRA. Dispersion of *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) and *Aedes albopictus* (Skuse, 1894) in the rural zone of north Paraná State. **Braz. Arch. Biol. Technol.** v. 47, p. 739-746, 2004.

NATAL, D. Bioecologia do *Aedes aegypti*. **O Biológico**, São Paulo, vol 64, nº2, p. 205-207, 2002.

NUNES, F. C. **Estudo da atividade larvicida da *Agave sisalana* contra *Aedes aegypti*.** Tese de doutorado. Universidade Federal da Paraíba, 2013.

PEDROSA, M. C. **Aspectos ecológicos da ocorrência de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) e *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse, 1984) (DIPTERA: CULICIDAE) em áreas verdes urbanas e residenciais.** Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Ouro Preto, 2013.

POMBO, Ana Paula Miranda Mundim. ***Aedes aegypti*: Morfologia, morfometria do ovo, desenvolvimento embrionário e aspectos relacionados à vigilância entomológica no Município de São Paulo.** Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, 2016.

RATCLIFFE, N.A. *et al.* Invertebrate immunity: basic concepts and recent advances. **Int. rev. cytol.**, New York, v. 97, p. 183-279, 1985.

SANTOS, M. A. V. M. ***Aedes aegypti*: estudos populacionais e estratégias integradas para controle vetorial em municípios da região metropolitana do Recife, no período de 2001 a 2007.** Tese de doutorado. Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 2008.

SERPA, L.L.N., K.V.R. COSTA, J.C. VOLTOLINI & I. KAKITANI. Variação sazonal de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* no município de Potin, São Paulo. **Rev. Saúde Pública** v. 40, p. 1101- 1105, 2006.

SHANNON, R.C. & PUTNAM, P, The biology of *Stegomyia* under laboratory conditions. The analysis of factors which influences larval development, **Proc. Ent. Soe. Wash.** v. 36, p. 185- 216, 1934.

SILVA, H. H. G.; SILVA, I. G. Influência do período de quiescência dos ovos sobre o ciclo de vida de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae) em condições de laboratório. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 32, n. 4, p. 349-355, jul./ago. 1999.

SILVA, H.; SILVA, LONIZETE; LIRA, K. Metodologia de criação, manutenção de adultos e estocagem de ovos de *Aedes* (Linnaeus, 1762) em laboratório. **Revista de Patologia Tropical / Journal of Tropical Pathology**, v. 27, n. 1, p. 53-63, jan./ jun. 1998.

SILVA, I.G.; CAMARGO, M.F.; ELIAS, C.N.; ISAC, E.; SANTOS, A.H. Metodologia de criação de *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae) em condições de laboratório. **Rev. Goiana Med.**, 39: 23-26, 1994.

SILVA, C. C. Aspectos do sistema imunológico dos insetos. **Biotecnologia Cienc. Desenvolv.** Brasília, v. 24, p. 68-72, 2002.

TRENZ, F. (1934). De l'influence des rayons solaires sur le cycle évolutif de *Aedes mariae*. **C. R. Soe. Biol.**, Paris, 115:1108-11

WILLOTT, E. et al. Immunochemical identification of insect populations monoclonal antibodies distinguish four major hemocyte types in *Manduca sexta*. **Eur. j. cell biol.**, Stuttgart, v. 65, p. 417-423, 1994.

GLOSSARIO

Eclodibilidade – Ato de desenvolvimento do ovo para a fase de larva.

Fase alada – Fase adulta do mosquito.

Insetário – Local de criação dos mosquitos.

Oviposição – Ato de expelir os ovos realizado por fêmeas de animais invertebrados.

Repasto sanguíneo – Atividade alimentar realizada por insetos hematófagos.