

**COMPORTAMENTO DE *Aedes aegypti* L., 1762**  
**(DIPTERA: CULICIDAE) ALIMENTADOS**  
**ARTIFICIALMENTE COM SANGUE DE DIFERENTES**  
**ESPÉCIES DE DOADORES**

Isabelle Garcia Pina<sup>1</sup> e Aivaldo Henrique da Fonseca<sup>2</sup>

**RESUMO**

Foi comparado o efeito da alimentação artificial, utilizando sangue humano, bovino e de camundongo, sobre o ingurgitamento e a oviposição do mosquito *Aedes aegypti* L. Dezesesseis grupos constituídos de 30 fêmeas e de 10 machos desta espécie de mosquito, com idade entre 4 a 7 dias, foram pré-alimentados com solução de sacarose e mantidos em ambiente climatizado, com temperatura de  $28 \pm 0,5$  °C, com umidade relativa de  $80 \pm 5\%$  e em fotoperiodismo de 12 horas diárias. Os mosquitos foram expostos ao aparato alimentar contendo sangue citratado das diferentes espécies animais testadas pelo período de 20 a 30 minutos. Como superfície alimentar, foi utilizada membrana de silicone com 0,056 mm de espessura e a temperatura do sangue oferecido variou entre 37 e 39 °C. O grupo controle foi alimentado diretamente em um hospedeiro humano voluntário. Após a alimentação, as fêmeas ingurgitadas foram contadas e colocadas no interior de gaiolas contendo frasco com água limpa para oviposição. Registraram-se o número de fêmeas alimentadas em cada tratamento, o número de ovos por grupo de fêmeas ingurgitadas e o período de pré-postura. Das fêmeas alimentadas diretamente no voluntário humano, 95% ingurgitaram e produziram em média 435 ovos, por lote. Das fêmeas alimentadas com sangue humano, bovino e de camundongos através da membrana de silicone, 89%, 25,8% e 22,5% ingurgitaram e ovipositaram em média, por lote, 357,2, 80,2 e 62 ovos, respectivamente. Não houve variação no período de pré-postura que foi de três dias, entre os tratamentos realizados.

**UNITERMOS:** *Aedes aegypti*. Alimentação artificial. Membrana de silicone.

**INTRODUÇÃO**

O mosquito *Aedes aegypti* L. é o mais importante vetor dos agentes etiológicos da dengue e da febre amarela urbana, uma vez que seu

desenvolvimento se processa em ambientes domiciliares e peridomiciliares e as fêmeas apresentam um caráter alimentar preferencialmente antropofílico (4). Devido a estas características específicas, esses mosquitos são amplamente estudados, principalmente com o objetivo de desenvolver métodos eficazes para o controle de populações.

O estudo do desenvolvimento e do comportamento de mosquitos em condições naturais é tarefa difícil. Um dos requisitos básicos para o sucesso é a criação e a manutenção de colônias sob condições controladas, em laboratório, o que implica a necessidade de manutenção paralela de biotério para o fornecimento de animais a serem empregados como fonte alimentar. Os inconvenientes gerados por esta necessidade vêm estimulando o uso de métodos alternativos de alimentação. Vários fatores de influência na atração e na indução da alimentação de artrópodes hematófagos foram descritos por Friend & Smith (6) e Galun (7), destacando-se como importantes aqueles relacionados à temperatura da superfície corporal, à liberação de dióxido de carbono, aos estímulos táteis, visuais e olfatórios, além da composição da dieta e da temperatura do fluido alimentar.

O emprego de técnicas de alimentação artificial apresenta vantagens sobre as técnicas tradicionais que empregam hospedeiros naturais (3), porque permite o estudo da concentração na qual um microrganismo deve ser encontrado no sangue para ser infectante para o artrópode hematófago, a determinação da eficiência na transmissão de patógenos por diferentes espécies de parasitos, o estudo do desenvolvimento do parasito sem a influência do sistema imune do hospedeiro e o aumento na segurança e manuseio de patógenos e substâncias tóxicas, facilitando a determinação de doses mínimas efetivas para infecção e controle desses parasitos.

St. John et al. (16) demonstraram a possibilidade de infectar *A. aegypti* com o vírus da dengue alimentando-os através de membrana de pele de cobaia com uma mistura de sangue e macerado de mosquitos naturalmente infectados. Bishop & Gilchrist (1,2) conseguiram alimentar *A. aegypti* com sangue heparinizado de galinha através de membranas naturais, constituídas de pele de aves, e Greenberg (11) relatou a alimentação de *A. aegypti* em vários fluidos artificiais, através de membrana de Baudruche, utilizando principalmente o caráter termofílico da espécie empregada como estímulo ao ingurgitamento.

O objetivo do trabalho foi conhecer o efeito do sangue citratado proveniente de diferentes espécies de animais, oferecido artificialmente através de membrana de silicone, sobre a *performance* alimentar e reprodutiva do *A. aegypti*.

1 Prof. responsável pelas disciplinas de Zoologia I e II no Centro Universitário de Barra Mansa, RJ.

2 Prof. Titular de Doenças Parasitárias - Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública, Instituto de Veterinária - UFRRJ e bolsista do CNPq.

Endereço para correspondência: Cx. Postal 74548 CEP 23851-970 Seropédica RJ.

E-mail aivaldo@ufrj.br

## MATERIAIS E MÉTODOS

### 1. Espécimes utilizados

Utilizaram-se mosquitos obtidos a partir de ovos procedentes do insetário da Fundação Instituto Oswaldo Cruz (RJ). Os procedimentos realizados no presente trabalho para o estabelecimento de colônia estão de acordo com os descritos por Gerberg (10). Mosquitos adultos, com idades entre 4 a 7 dias, tiveram sua alimentação com solução de sacarose previamente suspensa entre 22 a 24 horas antes do oferecimento do repasto sanguíneo. Foram utilizados 480 mosquitos distribuídos em 16 grupos constituídos por 30 fêmeas e 10 machos cada, sendo realizadas 4 repetições para cada tipo de alimentação testada.

### 2. Procedimento para alimentação

Como fonte alimentar foram empregados sangue citratado humano, bovino e de camundongo, sendo utilizado um humano como voluntário para tratamento do grupo controle. As coletas de sangue foram feitas imediatamente antes da alimentação ou no máximo com 6 horas de antecedência. Neste último caso realizava-se o resfriamento da alíquota a 10-14 °C até o momento de sua utilização, quando, então, era novamente aquecida à temperatura de  $38 \pm 1$  °C. Como anticoagulante em todos os casos foi utilizada a solução estéril de citrato de sódio a 3,9%, na proporção de 1ml de solução anticoagulante para 9ml de sangue.

Para aquecimento do sangue durante a alimentação dos mosquitos, foram empregadas garrafas plásticas do tipo usado para cultura de tecidos, preenchidas com água aquecida a aproximadamente 45 °C e colocadas sobre as câmaras de alimentação, e a temperatura na superfície de alimentação variou entre 36 e 38 °C. A câmara de alimentação (Figura 1a) foi elaborada de acordo com as descrições de Davis et al. (5); as membranas de silicone utilizadas tinham a espessura de 0,056 mm. O frasco de contenção dos espécimens para alimentação era cilíndrico, de plástico semitransparente, com dimensões de 9 cm de altura e 8 cm de diâmetro, no qual existiam duas janelas laterais recobertas por tela de tule, para ventilação. O tampo móvel apresentava um orifício retangular de aproximadamente 2 x 6 cm, no qual foi encaixada a fonte alimentar (Figura 1b).

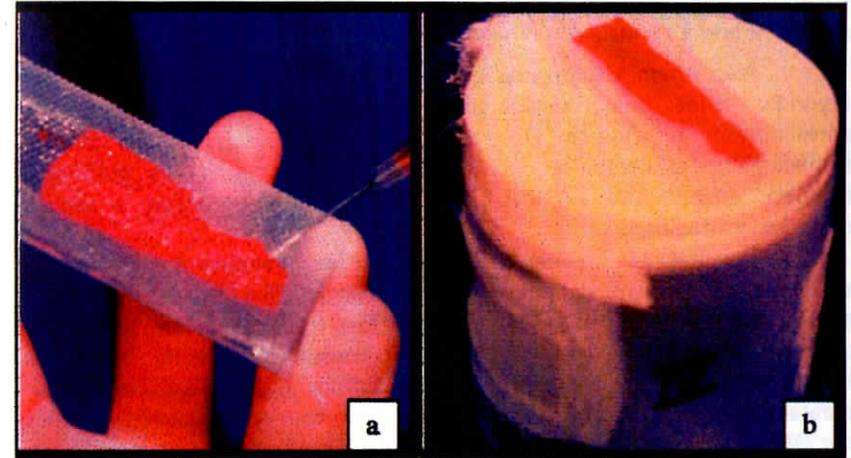


Figura 1. a) Preenchimento da câmara de alimentação, composta de lâmina de vidro (base), borracha de silicone (laterais) e membrana de silicone (superfície de alimentação); b) fêmea de *Aedes aegypti* em processo de ingurgitamento através de membrana de silicone.

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

O experimento foi realizado no interior de câmara climatizada, com a temperatura de  $28 \pm 0,5$  °C e com umidade relativa de  $80 \pm 5\%$ . O período de exposição ao alimento foi de 20-30 minutos, findos os quais realizou-se a contagem das fêmeas ingurgitadas e seu remanejamento para novas gaiolas contendo em seu interior frascos plásticos revestidos com papel de filtro e fina camada de água, para realização da postura. Os frascos foram avaliados a cada 12 horas, sendo que, quando se observou a presença de ovos, o papel de filtro foi substituído por um novo. Procedeu-se à secagem do papel contendo a postura e à contagem dos ovos, obtendo-se, então, a relação de número de ovos por grupo de fêmeas ingurgitadas. Quando transcorreram 24 horas sem a realização de novas posturas, as fêmeas foram descartadas. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância e ao teste "T".

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não foram visualizadas diferenças quanto à quantidade de sangue ingerida, tendo sido consideradas ingurgitadas aquelas fêmeas que apresentavam o abdome visivelmente dilatado. Nenhuma das fêmeas inspecionadas alimentou-se exclusivamente de plasma, o que por vezes acontece quando não se utiliza agitador para homogeneizar o sangue oferecido artificialmente.

Das fêmeas alimentadas diretamente no voluntário humano e com sangue humano através da membrana de silicone, 95% e 89% ingurgitaram e produziram em média 435 e 357,2 ovos por lote, respectivamente. Não houve diferença significativa ( $p=0,15$ ) quanto à percentagem média de fêmeas ingurgitadas nos grupos controle e nos grupos alimentados em sangue citratado humano (Tabela 1). Estes valores estão bem acima daqueles obtidos por Bishop & Gilchrist (2) que conseguiram, testando vários tratamentos, um percentual máximo de 73% de ingurgitamento de *A. aegypti* alimentados, através de membrana de pele de pintos, com sangue heparinizado de galinha. Galun et al. (9), trabalhando com membrana Silverlight, conseguiram índices de alimentação, em *A. aegypti*, de até  $85 \pm 1,6$  % adicionando tetrafosfato de adenosina à fonte alimentar. Rutledge et al. (15) ingurgitaram de 6 a 82% de fêmeas de *A. aegypti* em sangue de galinha, fornecido através de membrana de Baudruche. Galun & Rice (8) alimentaram em aparato artificial constituído com membrana de Baudruche em proporções de até 83% de *A. aegypti*, quando testavam o papel das plaquetas sobre a fagoestimulação.

Tabela 1. Comparação dos resultados obtidos na alimentação de 4 grupos de 30 fêmeas de *Aedes aegypti*, através de membrana de silicone, com sangue de diferentes espécies de doadores e em voluntário humano

| Origem do sangue             | Nº e percentagens de fêmeas ingurgitadas por repetição |           |           |           | Média              |
|------------------------------|--|-----------|-----------|-----------|--------------------|
|                              | I  | II        | III       | IV        |                    |
| Controle (Voluntário humano) | 29 (96,7)  | 28 (93,3) | 28 (93,3) | 29 (96,7) | 28,5 <sup>a</sup>  |
| Humano                       | 29 (96,7)  | 25 (83,3) | 27 (90,0) | 26 (86,7) | 26,75 <sup>a</sup> |
| Bovino                       | 9 (30,0)   | 7 (23,3)  | 8 (26,7)  | 7 (23,3)  | 7,75 <sup>b</sup>  |
| Camundongo                   | 5 (16,7)   | 9 (30,0)  | 7 (23,3)  | 6 (20,0)  | 6,75 <sup>b</sup>  |

Números entre parênteses significam a percentagem de fêmeas ingurgitadas. Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si.

Das fêmeas alimentadas com sangue de bovinos e de camundongos através da membrana de silicone, 25,8% e 22,5% ingurgitaram e ovipositaram, em média, 80,2 e 62 ovos por lote, respectivamente. Os valores obtidos, quando da alimentação com sangue citratado de bovino e de camundongo, não diferiram entre si ( $p=0,36$ ); houve, entretanto, diferença significativa quando comparados com os grupos alimentados com sangue de

origem humana (Tabelas 1 e 2). Estes resultados confirmam a preferência da espécie por alimentar-se de sangue humano.

Tabela 2. Comparação dos resultados do número médio de ovos produzidos por grupo de fêmeas e por grupo de *Aedes aegypti*, alimentadas através de membrana de silicone com sangue de diferentes espécies de doadores e em voluntário humano

| Tratamentos                  | Nº médio de ovos por grupo de fêmeas ingurgitadas por repetição |     |     |     |                    |
|------------------------------|---|-----|-----|-----|--------------------|
|                              | I   | II  | III | IV  | Média              |
| Controle (Voluntário humano) | 455   | 441 | 379 | 468 | 435 <sup>a</sup>   |
| Humano                       | 411   | 326 | 348 | 344 | 357,2 <sup>a</sup> |
| Bovino                       | 77  | 84  | 82  | 78  | 80,2 <sup>b</sup>  |
| Camundongo                   | 56  | 71  | 67  | 54  | 62 <sup>b</sup>    |

Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si.

O aumento de temperatura e a presença do sangue produziram agitação dos mosquitos, que passaram a realizar múltiplas cópulas, após as quais observou-se que as fêmeas pousavam sobre a superfície de alimentação e testavam aleatoriamente a membrana até identificar o local adequado para ingestão de sangue. Esta característica termofílica está de acordo com o descrito por Greenberg (11) e parece ter sido o fator responsável pela atração dos mosquitos. A importância do aquecimento do sangue para garantia do ingurgitamento foi descrita por Galun (7) e por Pipkin & Connor (13).

A membrana de silicone mostrou-se eficiente para o completo ingurgitamento de fêmeas de *A. aegypti* (Figura 1a). Assim também ficou demonstrado em trabalhos realizados por Wetzel (19), por Stone et al. (17), por Davis et al. (5) e por Butler et al. (3), que alimentaram, respectivamente, moscas do gênero *Glossina*, dípteros nematóceros *Culicoides mississippiensis* e diferentes espécies do gênero *Ornithodoros*, através de membrana de silicone. Waladde et al. (18) obtiveram sucesso alimentando *Rhipicephalus appendiculatus* até o completo ingurgitamento, através de membrana Baudruche. Butler et al. (3) destacaram as virtudes da alimentação artificial com membrana de silicone, em especial pela facilidade de produzi-las em série, pela textura superficial adequada para ensaios com diferentes artrópodes, além de ser reutilizável e autoclavável. Moura et al. (12) e Rocha et al. (14) utilizaram a mesma metodologia descrita no presente trabalho para alimentar *Amblyomma cajennense* e *Rhodnius pictipes*, respectivamente.

Embora o sangue tenha ficado à disposição das fêmeas por um período de aproximadamente 30 minutos, observou-se que a maioria dos espécimes ingurgitava-se nos 15 minutos seguintes ao início do procedimento alimentar. Os períodos de pré-postura não variaram nos limites de tempo

observados, tendo sido sempre de três dias para todos os tratamentos. Os ovos obtidos foram posteriormente imersos em água, tendo sido observada a eclosão de larvas de forma homogênea, independente do tipo de sangue ingerido. Não houve diferença significativa ao nível de 1% com relação ao número de ovos entre as fêmeas do grupo controle e as alimentadas com sangue humano através da membrana de silicone ( $p=0,034$ ). Também não houve diferença entre as fêmeas alimentadas com sangue bovino e de camundongo ( $p=0,026$ ).

A descalcificação do sangue resultante da adição do citrato de sódio, para prevenir a coagulação, não diminuiu as qualidades nutritivas do sangue utilizado quando comparados os efeitos sobre a produção de ovos. Esta observação está de acordo com a realizada por Woke (20) ao comparar os efeitos de diferentes tratamentos sobre a oviposição de *A. aegypti*.

O sistema de alimentação artificial descrito propiciou o estabelecimento de colônia de *A. aegypti*, utilizando sangue humano, bovino ou de camundongos, tendo confirmado o caráter antropofílico da espécie. A utilização do citrato de sódio como anticoagulante não interferiu no número de fêmeas alimentadas ou mesmo na produção de ovos.

#### AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Ricardo Lourenço de Oliveira, que gentilmente cedeu os ovos de *Aedes aegypti*, utilizados para realização do trabalho. Às alunas de Iniciação Científica e bolsistas do CNPq, Janaína Valverde Ney e Magda Alves de Medeiros, pelo auxílio na fase experimental do trabalho.

#### SUMMARY

Behaviour of *Aedes aegypti* L., 1792 (Diptera: Culicidae) artificially fed with the blood of different donor species

We compared the effects of artificial feeding over the engorgement and oviposition of *Aedes aegypti* L, utilizing human, bovine and murine blood. Sixteen groups of 30 females and 10 males of this species, 4 to 7 weeks of age, were previously fed with a saccharose solution and kept in a temperature controlled environment ( $28 \pm 0.5^\circ \text{C}$ ), humidity of  $80 \pm 5\%$  and photoperiod of 12/12 hours. The mosquitoes were exposed to the feeding apparatus containing the blood from the different species for a 20 to 30 minute period. The blood temperature varied from  $37$  to  $39^\circ \text{C}$ , and was offered through a very thin silicone membrane. The control group was fed directly on a voluntary human host. The females were kept in cages with a clean source of water after feeding. 95% of the females directly fed in the human voluntary engorged, and produced a mean of 435 eggs, per group. Engorgement of the females that fed on the apparatus from human, bovine and murine blood was 89%, 25.8 and 22.5%, respectively. The mean number of eggs produced per

group was 357.2, 80.2 and 62, respectively. There was no variation on the preoviposition period.

KEYWORDS: *Aedes aegypti*. Artificial feeding. Silicon membrane.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bishop, A., Gilchrist, B.M. Method for collecting sporozoites of *Plasmodium gallinaceum* by feeding infected *Aedes aegypti* through animal membranes. *Nature*, 3893: 713-714, 1944.
2. Bishop, A., Gilchrist, B.M. Experiments upon the feeding of *Aedes aegypti* through animal membranes with a view to applying this method to the chemotherapy of malaria. *Parasitology*, 35:85-100, 1946.
3. Butler, J.F.; Hess, W.R.; Endris, R.G., Holcher, K.H. *In vitro* feeding of *Ornithodoros* ticks for rearing and assessment of diseases transmission. In D.A. Griffiths and C.E. Bowman (ed.), *Acarology VI*, Vol 2. Ellis Horwood, West Sussex, England, 1984. p. 1075-1081.
4. Consoli, R.A.G.B., Oliveira, R.L. *Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil*. Rio de Janeiro, Fiocruz., 1994. 228 p.
5. Davis, E.L.; Butler, J.F.; Roberts, R.H.; Reinert, J.F., Kleine, D.L. Laboratory blood feeding of *Culicoides mississippiensis* (Diptera: Ceratopogonidae) through a reinforced membrane *J. Med. Entomol.*, 20:177-182, 1983.
6. Friend, W.G. & Smith, J.J.B. Factors affecting feeding by bloodsucking insects. *Ann. Rev. Entomol.*, 22:309-331, 1977.
7. Galun, R. Feeding stimuli and artificial feeding. *Bull. Wld. Hlth. Org.*, 36:590-593, 1967.
8. Galun, R., Rice, M.J. Role of blood platelets in haematophagy. *Nature New Biology.*, 233:110-111, 1971.
9. Galun, R.; Avi-Dor, Y., Bar-Zeev, M. Feeding response in *Aedes aegypti*: stimulation by Adenosine Triphosphate. *Science*, 142: 1674-75, 1963.
10. Gerberg, E.J. Manual for mosquito rearing and experimental techniques. *Amer. Mosquito Control Assoc. Bull.*, 5:1-109, 1970.
11. Greenberg, J. A method for artificially feeding mosquitoes. *Mosquito News.*, 9:48-50, 1949.
12. Moura, S.T.; Fonseca, A.H.; Fernandes, C.G., Butler, J. Artificial feeding of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) through silicone membrane. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 92:545-548, 1997.
13. Pipkin, A.C., Connor, J.C. A temperature controlled feeding apparatus for hematophagous arthropods. *J. Med. Ent.*, 5:507-509, 1968.
14. Rocha, D.S.; Fonseca, A.H.; Costa, F.A.; Jurberg, J., Galvão, C. Desenvolvimento de *Rhodnius pictipes* Stal, 1872 alimentado através de membrana de silicone e em camundongos (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 92:553-558, 1997.
15. Rutledge, L.C.; Moussa, M.A., Belletti, C.J. An *in vitro* blood-feeding system for quantitative testing of mosquito repellents. *Mosquito News*, 36:283-293, 1976.
16. St. John, J.H.S., Simmons, J.S., Reynolds, F.H.K. Transmission of dengue virus from infected to normal *Aedes aegypti*. *Amer. J. Trop. Med.*, 10:23-24, 1930.
17. Stone, B.F.; Commins, M.A., Kemp, D.H. Artificial feeding of the Australian paralysis tick *Ixodes holocyclus* and collection of paralyzing toxin. *Int. J. Parasitol.*, 13:447-454, 1983.
18. Waladde, S.M., Ochieng, S.A., gichuhi, P.M. Artificial membrane feeding of the ixodid tick *Rhipicephalus appendiculatus* to reptile. *Experimental and Applied Acarology*, 11:297-306, 1991.
19. Wetzel, H. Artificial membrane for *in vitro* feeding of piercing-sucking arthropods. *Entomol. Exp. Appl.*, 25:117-119, 1979.
20. Woke, P.A. Effects of various blood fractions on egg production of *Aedes aegypti* Linn. *Am. J. Hyg.*, 25:372-380, 1937.