

UM PANORAMA SOBRE AS DIETAS ARTIFICIAIS ALTERNATIVAS AO SANGUE DE VERTEBRADOS PARA CRIAÇÃO EM MASSA DE *Aedes aegypti* (DIPTERA: CULICIDAE): UMA REVISÃO SISTEMÁTICA

AN OVERVIEW OF ARTIFICIAL DIETS ALTERNATIVE TO VERTEBRATE BLOOD FOR MASS BREEDING OF *Aedes aegypti* (DIPTERA: CULICIDAE): A SYSTEMATIC REVIEW

Yohan Guiller Lopes de Araújo¹, Hecylana Oliveira de Melo², Marcela Alvares Oliveira³

¹Licenciado em Ciências Biológicas, Centro Universitário Aparício Carvalho-FIMCA, e-mail: yohanguiller@gmail.com, lattes: <http://lattes.cnpq.br/2563191696952518>

²Doutoranda em Biologia Experimental, Universidade Federal de Rondônia (UNIR), e-mail: hecylanaoliveira@gmail.com, lattes: <http://lattes.cnpq.br/4704355872216101>

³Docente do curso de Ciências Biológicas, Centro Universitário Aparício Carvalho-FIMCA, Doutoranda em Biodiversidade e Biotecnologia, Universidade Federal de Rondônia (UNIR), e-mail: marcela.mugrabe@gmail.com, lattes: <http://lattes.cnpq.br/9346965102777187>

DOI: <https://doi.org/10.37157/fimca.v8i1.217>

RESUMO

As fêmeas *Aedes aegypti* são responsáveis pela transmissão de diversos patógenos causadores de doenças em seres humanos, como o vírus Dengue (1-4), Chikungunya, Zika e Febre Amarela. A criação desses vetores em laboratório atende a diversas finalidades como, estudos de comportamento, fisiologia, genética, infectividade e susceptibilidade a agentes químicos, no entanto, isso requer a utilização de sangue de vertebrados, o que implica em um grande obstáculo devido ao risco de contaminação ligado ao uso de materiais biológicos, regulamentações éticas, além de ser caro para adquirir e difícil de armazenar por longos períodos. Estudos vêm demonstrando o potencial de possíveis dietas artificiais como substitutos ao sangue de vertebrados na criação massal de *Ae. aegypti*. Este estudo de revisão tem como objetivo ressaltar a importância da utilização de dieta artificial na criação massal de mosquitos em laboratório. Portanto, buscou-se especificamente realizar um levantamento bibliográfico através de uma revisão sistemática, em que foram verificados os primeiros estudos baseados em dietas artificiais e sua evolução até os dias atuais para *Ae. aegypti*. De maneira geral, são utilizados nas refeições Soro Albumina Bovina (BSA) como principal fonte proteica para fins de produção de ovos além de outros nutrientes como açúcares, lipídios, vitaminas, fontes de ferro e um sistema tampão adequado e são geralmente disponibilizadas através de alimentadores artificiais por meio de membrana. Podemos concluir que é possível formular uma dieta quimicamente definida para criação massal da referida espécie em substituição ao sangue de vertebrados tornando-se uma abordagem desejável não apenas no ponto de vista financeiro, mas também ético.

Palavras-chave: Dietas artificiais, Laboratório, Manutenção, Refeições livres de sangue.

ABSTRACT

Aedes aegypti females are responsible for the transmission of several pathogens causing diseases in humans, such as Dengue virus (1-4), Chikungunya, Zika and Yellow Fever. The rearing of these vectors in the laboratory serves several purposes as, studies of behavior, physiology, genetics, infectivity and susceptibility to chemical agents, however, this requires the use of vertebrate blood, which implies a great obstacle due to the risk of contamination linked to the use of biological materials, ethical regulations, besides being expensive to acquire and difficult to store for long periods. Studies have demonstrated the potential of possible artificial diets as substitutes for the blood of vertebrates in the mass rearing of *Ae. aegypti*. This review study aims to highlight the importance of using artificial diets in the laboratory rearing of this species. Therefore, it was specifically aimed to perform a bibliographic survey through a systematic review, in which the first studies based on artificial diets and their evolution until the present days for *Ae. aegypti* were verified. In general, Serum Albumin Bovine (BSA) is used in meals as the main protein source for egg production purposes in addition to other nutrients such as sugars, lipids, vitamins, iron sources and a suitable buffer system and are generally available through feeders. artificial by means of membrane. We can conclude that it is possible to formulate a chemically defined diet for the mass rearing of this species as a replacement for the blood of vertebrates, becoming a desirable approach not only financially, but also ethically.

Key words: Artificial diets, Laboratory, Maintenance, Blood free meals.

INTRODUÇÃO

De acordo com as revisões realizadas por Weaver e Barrett (2004) e Kuno e Gwong-Jen (2005), são considerados arbovírus os vírus transmitidos por artrópodes hematófagos para hospedeiros vertebrados suscetíveis e para que ocorra a transmissão. É necessário o envolvimento de três elementos primordiais: vetor-vírus-vertebrado. Ou seja, ao se alimentarem do sangue de um animal infectado as fêmeas de mosquitos (vetor) se contaminam e durante a próxima refeição sanguínea transmitem o vírus através da saliva a um novo hospedeiro. Uma vez infectado o mosquito pode transmitir o vírus o resto da vida (WHO, 2020).

O *Aedes aegypti* é considerado o principal vetor responsável pela transmissão das arboviroses: Dengue (DENV1-4), Febre Amarela (YFV), Chikungunya (CHIKV) e Zika (ZIKV), causadoras de doenças em seres humanos (VASCONCELOS, 2015; MARCONDES e XIMENES, 2016; WHO, 2020). Portanto, o *Aedes aegypti* desempenha papel importante na introdução e manutenção de ciclos epidêmicos urbanos de diversos arbovírus (VASCONCELOS e CALISHER, 2016) e

o risco de surtos epidêmicos das doenças causadas pelos vírus supracitados vêm causando grande preocupação aos órgãos de Saúde Pública (WHO, 2020).

O mosquito *Aedes aegypti* pertence à ordem Diptera e família Culicidae. Foi introduzido no Brasil através das grandes navegações oriundas do continente africano provavelmente com o grande fluxo do transporte de escravos, fato ocorrido no período colonial (CONSOLI e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994). No Brasil essa espécie é urbana e vive associada a aglomerações humanas sendo considerada endofílico e preferencialmente antropofílico (BARATA et al., 2001; GOMES et al., 2005; HONÓRIO et al., 2009). Além disso, são encontrados em áreas tropicais e subtropicais onde a temperatura e umidade favorecem sua proliferação (TAUIL, 2002; IOC, 2020).

O *Ae. aegypti* possui características singulares que o difere de outros gêneros de mosquitos, pois dispõe de listras preto e brancas no corpo inteiro. A espécie tem escamas prateadas em seu escudo que forma o desenho de uma lira, diferente do *Aedes albopictus* que embora também apresente esse padrão de manchas preto e branca pelo corpo, possui uma faixa

longitudinal em seu escudo e uma coloração um pouco mais escura (CONSOLI e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994).

Os mosquitos adultos têm como alimento básico os açúcares e é um recurso exclusivo para os machos e comuns para fêmeas. Os açúcares naturais utilizados pelos mosquitos incluem a glicose, frutose, sacarose, maltose e melitose, normalmente obtidos do néctar das flores, seivas e frutos (NAYAR e SAUERMAN, 1975). A ingestão de substâncias açucaradas é importante para suprir a necessidade de metabolismo energético com o acúmulo de glicogênio e triglicerídeos, necessários para atividades como voo e sobrevivência (NAYAR e SAUERMAN, 1973), para longevidade e fecundidade (ANDERSSON, 1992), além de uma importante fonte de energia durante o primeiro ciclo gonotrófico e na produção de ovos através da síntese de lipídeos e proteínas do ovo (ZHOU; PENNINGTON; WELLS, 2004).

As fêmeas alimentam-se necessariamente de sangue de vertebrados. Esse comportamento hematofágico é essencial para produção e maturação dos ovos (GONZÁLEZ et al., 2019), através da utilização de proteínas presentes no sangue (CLEMETS, 1992; BRIEGEL, 2003), em que os aminoácidos provenientes da digestão dessas proteínas podem ser usados na síntese de lipídeos e proteínas do ovo, bem como para obtenção de energia (ZHOU; PENNINGTON; WELLS, 2004). Além disso, as refeições sanguíneas podem influenciar em parâmetros biológicos como fecundidade, fertilidade (RICHARDS et al., 2012; PHASOMKUSOLSIL et al., 2013; GUNATHILAKA et al., 2017) e sobrevivência (XUE; ALI; BARNARD, 2008; PHASOMKUSOLSIL et al., 2013).

O estabelecimento de colônias de insetos em laboratório atende a diversas finalidades como estudos de comportamento, fisiologia, genética, infectividade e susceptibilidade a agentes químicos (CONSOLI e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994) e isso requer uma criação massal de mosquitos para a realização dos experimentos. No entanto, a criação de mosquitos em laboratório depende de sangue de vertebrados para produção de ovos, e sua utilização implica em riscos ligados ao uso de materiais biológicos (contaminação), regulamentações extensas para utilização de sangue humano ou de animais (CEP ou CEUA), além de custos elevados, validade de curto período, refrigeração constante e pode ser difícil sob condições de campo. A obtenção de sangue “fresco” de vertebrados implica em um grande obstáculo para criação massal de mosquitos em laboratório (GONZALES et al., 2015; GONZALES e HANSEN, 2016; MARQUES et al., 2020).

Na tentativa de mitigar os gargalos da utilização de sangue de vertebrados na criação massal de mosquitos, pesquisadores propõem a utilização de dietas artificiais e sistemas de alimentação com membrana para mosquitos que seja equivalente ao sangue na produção de ovos. Além disso, dietas artificiais possuem uma composição padronizada, contendo componentes e concentrações definidas enquanto o sangue de vertebrados não é equivalente (MARQUES et al., 2020).

Dentro dessa perspectiva, a utilização de uma dieta artificial em substituição à alimentação sanguínea na criação de mosquitos em laboratório para fins de produção de ovos, pode ser uma importante ferramenta aliada a esse processo, diminuindo os custos e trâmites legais envolvendo a manutenção de colônias de insetos vetores, além dos riscos de contaminação relacionados ao uso do sangue.

Portanto, esta revisão tem como objetivo elucidar a importância de estudos sobre dietas artificiais em substituição do sangue de

vertebrados na criação massal de mosquitos em laboratório, destacando sua composição e concentração e se foram ou não baseados nos componentes do sangue.

MATERIAIS E MÉTODOS

Trata-se de uma revisão sistemática, elaborada conforme descrito pelas diretrizes PRISMA (Principais Itens para Relatar Revisões sistemáticas e Meta-análises), no qual consiste em um checklist de 27 itens e um fluxograma que orientam para a descrição clara de revisões sistemáticas e meta-análise (MOHER et al., 2015). De acordo com os autores, uma revisão sistemática requer uma pergunta de forma clara, utilizando métodos sistemáticos e explícitos para identificar, selecionar e avaliar de maneira crítica pesquisas relevantes, além de coletar e avaliar dados desses estudos que são incluídos na revisão.

Portanto, o processo para a escrita desta revisão sistemática consistiu em: formular a pergunta de pesquisa (i); definir a estratégia de busca (ii); fazer a busca nos bancos de dados (iii); identificar os artigos através do título e abstract (iv); recuperar os artigos (v); selecionar os artigos primários de acordo com os critérios de inclusão e exclusão (vi); extrair os dados (vii); avaliação da qualidade (viii); sumarização dos resultados coletados (ix).

Esta revisão teve como enfoque principal dietas artificiais em substituição do sangue de vertebrados para criação massal de mosquitos em laboratório. A pesquisa foi realizada utilizando as seguintes bases de dados eletrônicas: Scielo, Lilacs, Google Scholar e Medline, utilizando os descritores: *Aedes aegypti*, Blood-free meal, Artificial diets, Vitellogenesis e Embryogenesis.

Foram incluídos: Artigos em inglês; Artigos que abordaram o tema dieta artificial livre de sangue de vertebrados; Espécie estudada *Aedes aegypti*. Foram considerados excluídos: Guidelines, Artigos de revisão e de Opinião, Short communication, Editoriais e artigos de dietas artificiais contendo sangue ou frações de sangue de vertebrados.

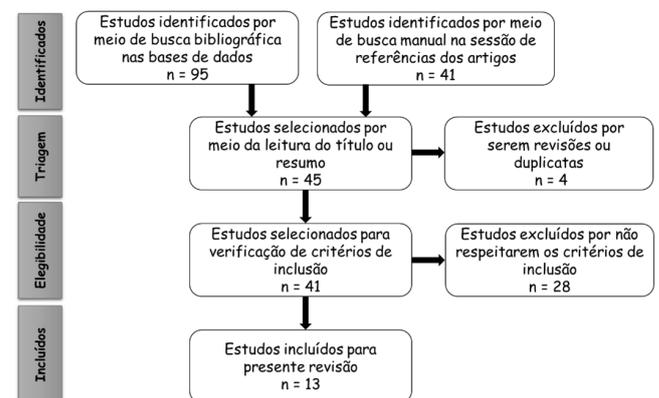


Figura 1. Fluxograma da informação com diferentes fases da revisão sistemática.

RESULTADOS

O conceito de autogenia e anautogenia foi definido em 1929 por Roubaud, em que os insetos se caracterizavam com base em sua estratégia reprodutiva. O primeiro é utilizado para definir insetos que são capazes de realizar seu primeiro ciclo gonotrófico sem refeições sanguíneas, enquanto a anautogenia é um termo utilizado para muitas espécies de mosquitos e outros insetos que obrigatoriamente necessitam de sangue para iniciar a ovogênese (ROUBAUD, 1929), como por exemplo, o *Aedes aegypti*, que se

alimenta preferencialmente de sangue humano (FITZPATRICK et al., 2019).

É durante as refeições sanguíneas que ocorre a vitelogenese, evento fisiológico de síntese e secreção de precursores da proteína da gema (principalmente a vitelogenina), importantes para o desenvolvimento dos ovócitos (RAIKHEL et al., 2002). Os aminoácidos provenientes das refeições sanguíneas são os principais nutrientes responsáveis pela ovogênese e podem estar ligados a uma proteína ou livres no plasma (DIMOND et al., 1955; BRIEGEL, 1985; ZHOU e MIESFELD, 2009).

Para criação de mosquitos são necessários vertebrados vivos ou sangue coletado de vertebrados, para fins reprodutivos. Esse sangue pode ser oferecido às fêmeas através da alimentação da pele ou através de um sistema de alimentação artificial

geralmente por membrana. É importante ressaltar que o uso de animais vertebrados como fonte de sangue está sujeito a regulamentações extensas pelos comitês éticos, sendo recomendado o uso de alimentadores artificiais de sangue em vez de animais vivos, além disso, comprar e armazenar sangue para programas de criação em massa é caro e o sangue tem um prazo de validade de duas semanas (GONZALES et al., 2018). Portanto, a dependência do sangue é um fator limitante na criação de mosquitos em massa.

A partir dessas informações, vários estudos vêm sendo realizados na tentativa de definir quais requisitos nutricionais do sangue são essenciais para produção de ovos em fêmeas de *Ae. aegypti* (Tabela 1).

Tabela 1. Estudos em ordem cronológica contendo suas metodologias e principais achados.

Estudo	Componentes da Dieta	Modelo de Alimentador	Resultado Principal
Lea et al., (1955)	Leite desnatado e mel	Discos de Algodão	O leite desnatado permitiu a produção de ovos.
Dimond et al., (1955)	Mistura de 18 aminoácidos e mel 10% em água	Discos de Algodão	Baixo número de 5,2 ovos/fêmeas foi relatado.
Lea et al., (1956)	Mistura de 12 aminoácidos, dextrose, levulose e sais em água	Discos de Algodão	Aumenta a produção média para 35 ovos/fêmeas.
Dimond et al., (1956)	Mistura de 11 aminoácidos, sais (NaCl e NaOH) e glicose ou frutose em água	Discos de Algodão	Produção média de 40 ovos/fêmea, após 14 dias de oviposição, indicando que a estimulação para o desenvolvimento dos ovos ainda não foi ativada.
Kogan (1990)	Proteínas Suínas: Albumina (102 mg/mL) Hemoglobina (8 mg/mL) y-Globulina (15 mg/mL), ATP (1 mM), NaCl (5-10 mM), NaHCO ₃ (120 mM) em água	Membrana Parafilm	Média de 101 ± 6,8 ovos/fêmea. Criação de <i>Aedes aegypti</i> por oito gerações.
Cosgrove e Wood (1996)	Proteínas Bovinas: Globulina (30 mg/mL), hemoglobina (8 mg/mL), albumina (100 mg/mL) e ATP (1 mM) em solução Ringer	Membrana de colágeno	Média de 64,56 ± 5,1 ovos/fêmea e 54,1 % taxa de eclosão larval. Colônia de <i>Aedes aegypti</i> criada por mais de 25 gerações.
Griffith e Turner (1996)	Ovoalbumina (2,25 g/100mL) e Leite de Soja (3,3 g/100mL), NaCl (0,15 M), NaHCO ₃ (10 ⁻² M), ATP (10 ⁻³ M) em água	Membrana de Cera Parafilm	Permitiu a criação de <i>Aedes aegypti</i> durante cinco gerações com posterior declínio no peso e na fecundidade dos adultos.
Gonzales et al., (2015)	BSA (200 mg/mL), cloreto de ferro-III (0,5 mg/mL), ATP (1 mM) em APS	Membrana de Parafilm	Produção média de 66 ± 10,8 ovos/fêmea e taxa de eclosão larval de aproximadamente 33%
Talyuli et al., (2015)	Proteínas Bovinas: Hemoglobina (8 mg/mL), Albumina (100 mg/mL), gamaglobulina (30 mg/mL), colesterol (2 mg/mL), isolectina ou fosfatidilcolina (70 mg/mL) e LDL (0,8 mg/mL) em Soro Fisiológico	Membrana de Parafilm	Boa produção de ovos, com médias de aproximadamente 75 ovos/fêmea. Foi possível observar dentre outros parâmetros, a formação da Membrana Peritrófica, bem como em mosquitos alimentados com sangue.
Dutra et al., (2017)	Proteína do leite (125 mg/mL), fórmula (15 mg/mL), glóbulos vermelhos bovino e ATP (2 mM), em APS (10x)	Sistema Hemotek Membrana	Média de ≈ 100 ovos/fêmea e taxa de eclosão larval de 80%. Foi relatado 100% de transmissão materna a partir de fêmeas infectadas com <i>Wolbachia</i> na progênie F1 e F2.
Gonzales et al., (2018)	BSA (200 mg/mL), Hemoglobina Bovina (5 mg/mL), Gema de ovo de galinha (5 mg/mL), Glicose (50 mM), ATP (3 mM) em mAPS	Membrana de Parafilm	Dieta denominada SkitoSnack patenteada. Média de 51 ovos/fêmea e taxa de 75 % de eclosão larval. Colônia de <i>Aedes aegypti</i> criada por mais de 20 gerações. Mosquitos possuem traços de vida semelhantes aos mosquitos criados com sangue.
Gaugler, et al., (2019)	Soro albumina bovina (20%), Colesterol (0,2%) e Açúcar (5%) em tampão PBS	Livre em Plataformas de alimentação	Não utiliza ATP e nem membrana, não é espécie específica e suportou a produção de ovos e a criação de diferentes espécies de mosquitos (incluindo do gênero <i>Aedes</i>) por várias gerações.
Kandel et al., (2020)	Metodologia utilizada por Gonzales et al., (2018). Dieta SkitoSnack	Membrana de Parafilm	A dieta mostrou-se eficaz em todas as cepas de <i>Ae. aegypti</i> . Também se mostrou adequada para a criação de <i>Aedes albopictus</i> , criados por 11 gerações. Não permitiu o desenvolvimento em <i>Cimex lectularius</i> .

As primeiras tentativas de substituir o sangue incluía o oferecimento de leite com mel em algodão (LEA et al., 1955), proteínas isoladas (LEA et al., 1956), ou uma mistura de aminoácidos, sais e açúcares (DIMOND et al., 1956).

Lea et al., (1955) relataram que os gastos e o tempo necessários na criação de rotina dos mosquitos alimentados com sangue de cobaia viva (coelho) eram grandes, portanto, investigações foram realizadas para encontrar uma dieta alternativa para criação de *Ae. aegypti* que fosse capaz de suportar a produção de ovos a

partir de um material mais barato e facilmente disponível. Experimentos contendo leite desnatado e mel em algodão (37°C) resultaram na produção de ovos (fecundidade), parâmetro essencial na biologia reprodutiva de mosquitos hematófagos. De acordo com os autores, essa dieta poderia substituir o sangue utilizado rotineiramente na criação de *Ae. aegypti* em laboratório.

O sucesso na produção de ovos particularmente com os hidrolisados de proteínas, sugeriu que a oviposição poderia ocorrer se fêmeas de mosquitos fossem alimentadas com uma mistura de aminoácidos, sendo possível determinar os requisitos nutricionais necessários para reprodução de fêmeas de *Ae. aegypti*. Um estudo com uma mistura de 18 aminoácidos (baseadas nas concentrações do sangue e da caseína) e mel a 10%, diluídos em água foram oferecidos aos mosquitos em discos de algodão. De acordo com dados obtidos no estudo, uma dieta composta por esses aminoácidos resultou na produção de ovos em fêmeas de *Ae. aegypti*, com maiores proporções para primeira dieta com 2.600 para cada 500 fêmeas, ou seja, uma média de 5,2 ovos por fêmea, sendo considerada improdutiva (DIMOND et al., 1955).

Em continuidade aos estudos supracitados, Lea et al., (1956) investigaram uma refeição baseada em fontes alimentares provenientes de diferentes proteínas ou seus hidrolisados enzimáticos (sangue bovino citratado, leite desnatado, albumina do ovo, proteose-peptona e digestão enzimática de soja, levedura, caseína e lactalbumina), outra dieta a partir de uma combinação de 12 aminoácidos (em diferentes concentrações), dextrose, levulose e uma mistura de sais diluídos em água, além de uma dieta com a omissão de alguns desses aminoácidos. De acordo com resultados, apenas certas proteínas ou seus hidrolisados enzimáticos estimularam a produção de ovos, na formulação da dieta proteína-açúcar, o fator nutricional essencial para a produção de ovos estava ligado à ingestão da proteína e que a alimentação açucarada sozinha não induz a produção de ovos em *Ae. aegypti*. Além disso, foi constatado que a omissão de oito aminoácidos tornava a dieta inviável para produção de ovos e que a concentração ideal dos aminoácidos foi fundamental para estabelecer uma dieta que estimulasse a produção de uma média de 14.000 ovos em 14 dias a partir de 400 fêmeas de mosquitos.

Baseado em estudos preliminares realizados por Lea et al., (1955) e Dimond et al., (1955), foi averiguado por Dimond et al., (1956) quais aminoácidos são requeridos pelas fêmeas de *Ae. aegypti* para fins de produção de ovos. A dieta foi quimicamente definida após verificação das concentrações ideais de 11 aminoácidos e suas combinações. O meio continha, além dos aminoácidos, uma mistura de sais (NaCl e NaOH) e açúcares (glicose ou frutose) diluídos em água e oferecidos aos mosquitos em algodões embebidos com a dieta. De acordo com os autores, a arginina, isoleucina, leucina, lisina, fenilalanina, treonina, triptofano e valina foram considerados aminoácidos extremamente essenciais para produção de ovos, pois quando omitidos não ocorria oviposição pelas fêmeas. A formulação ideal induziu a produção de 16.000 ovos a partir de 400 fêmeas (média de 40 ovos por fêmea), no entanto a contagem dos ovos ocorreu após 14 dias da alimentação, contudo, geralmente são necessários apenas 3 dias para os ovos serem desenvolvidos após uma refeição de sangue, sugerindo que os sinais para estimulação do desenvolvimento do ovo não foram ativados com essa dieta (KOGAN, 1990).

Começaram então a serem realizados estudos que pudessem inferir os fatores que estimulam o ingurgitamento em *Ae. aegypti*. Em ensaios foi possível notar a importância e a relação do ATP (adenosina trifosfato) como um fagoestimulante essencial para o

ingurgitamento desta espécie em dietas artificiais (GALUN et al., 1984; GALUN et al., 1985).

Diferentemente da metodologia de entrega do alimento em discos de algodão realizados por Lea et al., (1955; 1956) e Dimond et al., (1955; 1956), Kogan (1990) sugere que é mais fácil alimentar um grande número de mosquitos em um intervalo relativamente curto através de alimentadores artificiais, como por exemplo aqueles contendo membrana de Parafilm com temperatura constante. Segundo o autor, a dieta alternativa deve ser prontamente ingerida através do alimentador artificial e resultar na produção de ovos e no tempo de desenvolvimento similar ocorrido nas refeições sanguíneas para que a metodologia seja vantajosa. Idealmente, tal refeição deve ser bem definida, de fácil preparo, baixo custo, além de disponível e reproduzível.

Através de um alimentador artificial por membrana Parafilm, Kogan (1990) observou que uma mistura de proteínas suínas (albumina, hemoglobina e γ -globulina), sais (NaCl, NaHCO₃) e ATP suportava a produção de ovos em *Ae. aegypti*. Os dados indicaram que existe uma correlação positiva entre a concentração das proteínas e o número de ovos produzidos, visto que, as dietas contendo uma concentração total das proteínas de 60 mg/mL, foi obtido uma média de 65 ovos e quando modificada para 125 mg/mL, a média aumenta para 101 ovos. Com esta dieta foi possível a criação desses mosquitos por oito gerações. De acordo com o autor, foi considerada a necessidade de outros componentes na dieta para melhorar a produção de ovos, como lipídios e colesterol, que são provenientes de refeições sanguíneas.

Cosgrove e Wood (1996), tentaram reproduzir a dieta artificial utilizada por Kogan (1990) com *Ae. aegypti* através de alimentador artificial, porém não conseguiram reproduzir seus resultados. Logo, os autores realizaram modificações na formulação original na tentativa de melhorar o rendimento na produção de ovos, eclosão larval e pupação dos mosquitos, além de minimizar o custo dos constituintes da fórmula original. Para os experimentos foram utilizados um grupo controle com sangue e as dietas artificiais utilizadas no estudo foram: (i) formulação original Kogan; (ii) formulação original Kogan suplementada com isoleucina; (iii) formulações modificadas a partir de Kogan. De acordo com os dados obtidos por Cosgrove e Wood (1996), o melhor resultado foi obtido a partir da Formulação Modificada contendo as proteínas bovinas hemoglobina, globulina 30 mg/mL e albumina com média de 64 ovos, 54% de eclosão larval e média de 34 pupas. No entanto, esses resultados foram inferiores ao controle sangue com 2 vezes mais ovos obtidos e 25% de pupas a mais. Com esta formulação foi possível manter a colônia de *Ae. aegypti* por mais de 2 anos por pelo menos 25 gerações, sem acesso ao sangue ou animal vivo. Os autores sugerem que, embora as fêmeas fossem capazes de utilizar as proteínas das dietas como produtos adequados para ovogênese e vitelogênese, a composição necessita de outros fatores nutricionais como a adição de um lipídio e ou suplementos minerais.

Atualmente o valor por mililitro para sangue desfibrinado (Hemostat Laboratories) é estimado entre: bovino, \$0,14 – \$0,60; ovelhas, \$0,05 – \$0,38; e coelho, \$0,39 – \$0,73 (GONZALES e HANSEN, 2016). De acordo com Pitts (2014), 10 mL de sangue custou \$35,00 e foi possível alimentar aproximadamente 3.000 mosquitos utilizados para fins experimentais, no entanto, para criação em larga escala de mosquitos se torna caro. Além disso, o sangue total tem uma vida útil de duas semanas dependendo do anticoagulante usado e deve ser comprado com frequência, o que

umenta o custo geral. Além disso, a origem animal de sangue ou anticoagulante pode ter um impacto na fecundidade e viabilidade do mosquito (GONZALES e HANSEN, 2016).

Os estudos posteriores passaram a avaliar outros parâmetros biológicos como viabilidade dos ovos a partir da eclosão larval, sobrevivência dos adultos e o fitness. Conforme observado por Griffith e Turner (1996), que através de uma dieta artificial composta por ovoalbumina, leite de soja, ATP e sais (NaCl e NaHCO₃) para *Ae. aegypti* oferecida através de alimentador artificial por membrana permitiu a criação desta espécie durante cinco gerações com posterior declínio no peso e na fecundidade dos adultos, sendo então interrompida. Os autores sugerem que a eficácia da dieta avaliada através da produção de ovos e emergência de adultos era nutricionalmente abaixo do ideal.

Estudos mais recentes sugerem que uma dieta artificial alternativa ao sangue deve atender alguns parâmetros antes de inferir a refeição como eficaz. Dentre eles podemos citar: bom ingurgitamento, a vitelogenese deve ser iniciada nas fêmeas, produção de grandes lotes de ovos, a prole deve ser comparável aos mosquitos selvagens, a microbiota do inseto deve permanecer inalterada, a imunidade e comportamento não devem ser afetados, exibindo características semelhantes aqueles criados com sangue (GONZALES et al., 2015; GONZALES et al., 2018).

Ao longo dos estudos foi observada que para atender os parâmetros supracitados era necessária a adição de outros componentes além de aminoácidos e proteínas, como o enriquecimento com ferro, lipídeos, vitaminas, tampão, açúcares (GONZALES e HANSEN, 2016) e minerais (LEA et al., 1956).

A produção de ovos em fêmeas de *Ae. aegypti* pode estar ligada a composição de sais do tampão de uma dieta artificial além de proteínas séricas como a albumina. Gonzales et al., (2015) formularam uma dieta baseada em soro albumina bovina (BSA) diluída em diferentes tampões: solução salina tamponada com fosfato (PBS), solução salina fisiológica *Aedes* (APS), solução salina tamponada com fosfato de sódio (NaPBS) e solução salina tamponada com fosfato de potássio (KPBS) e fagoestimulante ATP. Os alimentos foram disponibilizados por um sistema de alimentação artificial por membrana. Os dados indicaram que o APS foi o tampão que resultou na maior média de ovos (66 ovos/fêmea) em comparação aos demais. A taxa de eclosão larval com a dieta BSA em APS obteve proporções significativamente menores ($\approx 18\%$) em relação ao controle sangue ($\approx 75\%$). Devido a esse fator, a dieta foi enriquecida com cloreto de ferro – III resultando em duas vezes mais produção de ovos viáveis, sugerindo que o ferro desempenha um papel importante no desenvolvimento embrionário.

Além do desenvolvimento do ovo comumente utilizado para avaliar a viabilidade de uma dieta artificial, Talyuli et al., (2015) investigaram a formação da Membrana Peritrófica-MP (envolve o bolo alimentar), a produção de Espécies Reativas do Oxigênio (sugerido como fator antioxidante) e expressão de Catalase e Ferritina (genes com funções antioxidantes). A dieta foi baseada naquela descrita por Kogan (1990) e modificada por Cosgrove e Wood (1996). Denominada SBM (Substitute Blood Meal), sua composição era baseada em hemoglobina, albumina, gamaglobulina, colesterol, isolectina ou fosfatidilcolina e LDL (lipoproteína de baixa densidade) diluída em soro fisiológico e disponibilizada por alimentador artificial através de membrana. Segundo dados relatados, o colesterol da dieta foi um fator importante para o desenvolvimento do ovo. Além disso, as espécies reativas do oxigênio também foram desencadeadas pela

SBM, houve a formação da MP no lúmen intestinal, a proliferação da microbiota do intestino médio e a expressão da catalase em níveis semelhantes aos encontrados após uma refeição de sangue e a expressão da ferritina em níveis inferiores. Não houve diferença significativa na produção média de ovos da dieta (75 ovos) em comparação com o sangue (100 ovos), indicando que a SBM, é capaz de reproduzir as mudanças fisiológicas nesta espécie, bem como o sangue.

Pesquisas baseadas em controle de vetores frequentemente utilizam uma técnica de infecção por bactérias endossimbióticas *Wolbachia*, que pode tornar os mosquitos refratários a infecções virais (WALKER et al., 2011) tem por finalidade introduzir esses endossimbiontes em populações de campo, porém requer um grande número de fêmeas infectadas com *Wolbachia* (RAINEY et al., 2014), para serem liberadas em campo e substituir as populações de mosquitos silvestres por populações infectadas com *Wolbachia* (GONZALES et al., 2015).

Foi desenvolvido por Dutra et al., (2017), uma dieta artificial em substituição ao sangue especificamente para *Ae. aegypti* infectados com a bactéria *Wolbachia*. A dieta tinha como finalidade não interferir na densidade bacteriana desses mosquitos, nem no bloqueio de infecções pelo vírus ZIKA, além disso foram comparados os níveis de incompatibilidade citoplasmática, produção e viabilidade dos ovos, longevidade e transmissão da bactéria para a prole dos mosquitos, bem como aqueles alimentados com sangue. A dieta foi denominada ADM (Artificial Diet for wMel-infected *Aedes aegypti*) e é composta pela proteína do leite, fórmula, glóbulos vermelhos bovino e ATP, diluídos em APS e oferecidos aos mosquitos através de alimentador artificial por membrana Hemotek. Os resultados demonstraram 100% de transmissão materna a partir de fêmeas infectadas com *Wolbachia* na progênie F1 e F2, incompatibilidade citoplasmática e nenhum custo para longevidade, fecundidade (média ≈ 100 ovos) ou taxa de eclosão ($\approx 80\%$) associada à alimentação com ADM, podendo ser liberados em campo pois não perdem a capacidade de transmitir a bactéria aos mosquitos selvagens (DUTRA et al., 2017).

Recentemente, Gonzales et al., (2018) padronizaram e patentearam uma dieta artificial denominada SkitoSnack (SS) para *Ae. aegypti*. O SS contém: soro albumina bovina (BSA), hemoglobina bovina (fonte de ferro), bem como gema de ovo (fonte de lipídeo), glicose (carboidrato), ATP e um tampão mAPS (solução salina fisiológica *Aedes* modificado). A dieta quimicamente definida utilizou o BSA como principal fonte de proteína bem como observado na maioria das formulações de dieta artificial. A dieta foi oferecida aos mosquitos por meio de alimentador artificial através de membrana e foi possível a criação desta espécie por mais de 20 gerações consecutivas em paralelo com mosquitos alimentados com sangue como controle. Os parâmetros de fecundidade e fertilidade avaliados através da média de ovos e taxa de eclosão larval, não indicaram diferença significativa entre o SS (51 ovos/fêmea e $\approx 75\%$ de eclosão) e o sangue (55 ovos/fêmea e $\approx 83\%$ de eclosão). Também foi relatado que os adultos resultantes da SS possuem traços de vida semelhante aos mosquitos criados com sangue, como o fitness, a microbiota, capacidade e competência vetorial, sugerindo que o SS é adequado na criação massal de *Ae. aegypti* e pode substituir o sangue de vertebrados, além de ser uma alternativa ética ao uso de animais vertebrados vivos (GONZALES et al., 2018).

Outra patente foi desenvolvida por cientistas de Rutgers (Universidade estadual de Nova Jersey – Estados Unidos) e consistia em um sistema de alimentação sem membrana e uma

formulação de dieta artificial para diferentes espécies de mosquitos. A dieta é oferecida livremente em Plataformas de Alimentação que consistiam em três modalidades: (i) a plataforma de alimentação flutua sobre a formulação de dieta sem sangue no reservatório de dieta; (ii) pelo menos uma parte da plataforma de alimentação é hidrofóbica; (iii) a plataforma de alimentação é uma malha. No entanto, todas as plataformas devem ser produzidas a partir de material não umectante, como por exemplo polipropileno, podendo ter qualquer formato (ex: quadrado, retangular, triangular, redondo ou poligonal). A formulação da dieta inclui soro albumina bovina, colesterol e açúcar, em PBS (tampão fosfato-salino). Segundo os cientistas, a metodologia confere vantagens por ser totalmente livre de sangue, não utiliza membrana ou calor (fatores que imitam o hospedeiro), não utiliza ATP como fagoestimulante, a dieta pode ser armazenada por longos períodos, não é espécie específica e suporta a fecundidade, fertilidade e sobrevivência desses mosquitos semelhante a dieta com sangue. Essa dieta suportou a criação de diferentes espécies de mosquitos por várias gerações, entre eles *Ae. albopictus* (GAUGLER et al., 2019).

O ATP é um requisito para o ingurgitamento de *Ae. aegypti* e provavelmente protege o mosquito de cometer erros na seleção da dieta na natureza (GALUN et al., 1984), contudo, possui algumas limitações. É um componente sujeito a degradação, dependendo das condições de armazenamento. Segundo Baughman et al., (2017), quando armazenado separadamente em tampão de pH 7,4, o ATP é estável por mais de um mês e não requer armazenamento em freezer.

Conforme relatado por Gonzales et al., (2018), o ATP presente na formulação em pó do SkitoSnack poderia ser armazenada a -20°C indefinidamente ou aproximadamente por três meses em temperatura ambiente (25°C) e quando hidratada, só pode ser utilizada dentro de três horas. Outra limitação deste componente é o valor do produto que chega a 80% do custo total dos componentes presentes na formulação, em torno de \$ 78,90 (Sigma Aldrich) (DUTRA et al., 2017) além de perder atividade em poucas horas, tendo que ser adicionada novamente à solução (KOGAN, 1990).

Mesmo após padronização do SkitoSnack (SS), os autores sugeriram a necessidade de avaliar outros parâmetros para constatar se a formulação poderia atender todos os quesitos que uma refeição sanguínea fornece na história de vida de *Ae. aegypti*. Portanto de acordo com Gonzales et al., (2018) havia necessidade de estudos adicionais para confirmar que o SS também é eficaz em outras cepas de laboratório, outras espécies de mosquitos, longevidade, moinho de voo, sucesso de acasalamento, competitividade de acasalamento dos machos, comportamento de busca pelo sangue, além verificar sua eficácia em outros artrópodes hematófagos, antes de ser estabelecido como substituto do sangue nas instalações de criação de mosquito em massa.

Para responder esses questionamentos, Kandel et al., (2020), deram continuidade e avaliaram os parâmetros adicionais supracitados, utilizando a metodologia de Gonzales et al., (2018). De acordo com os autores, este estudo fornece evidências que os mosquitos criados ao longo de 30 gerações com SkitoSnack possuem características de história de vida e aptidão iguais aos mosquitos criados com sangue de vertebrados. As três cepas de *Ae. aegypti* (UGAL, ROCK e Black Eye Liverpool) utilizadas não apresentaram diferenças significativas na porcentagem de mosquitos que ingurgitaram o SS e resultou no desenvolvimento de ovos viáveis em números comparáveis aos desenvolvidos por

mosquitos que se alimentam de sangue, além de não ter diferença nos parâmetros de longevidade e igual sucesso de acasalamento. A dieta também se mostrou adequada para criação de *Aedes albopictus* e que esta espécie foi criada por 11 gerações. Foi constatado durante os ensaios que mesmo após manter a cepa UGAL exclusivamente com SS por mais de 30 gerações, o comportamento de busca por sangue e sua propensão por picadas continuam inalteradas. Pela primeira vez, o desempenho de voo dos machos criados com SS é similar aos criados com sangue. A dieta não promoveu o desenvolvimento em *Cimex lectularius* (percevejo de cama).

Formular uma dieta quimicamente definida significa ter uma composição padrão, ou seja, sua utilização em dada espécie manterá sempre o mesmo padrão de resposta, além de ser saber exatamente os componentes presentes e concentrações das formulações (MARQUES et al., 2020), enquanto que os componentes nutricionais provenientes do sangue total não são equivalentes, com variações na produção e viabilidade dos ovos dependendo da fonte alimentar entre diferentes espécies de mamíferos e entre diferentes populações humanas (BAUGHMAN et al., 2017), refletindo na qualidade dos experimentos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

É possível concluir que dietas artificiais livres de sangue tem sido foco de pesquisa desde a década de 1950 até os dias atuais com vários graus de sucesso. Ao decorrer desta revisão observamos que ao longo dos estudos ia-se supondo a necessidade do enriquecimento da dieta para melhorar os requisitos nutricionais necessários para reprodução em fêmeas de *Aedes aegypti* com a adição de componentes que permitissem cada vez mais chegar perto de uma fórmula de sucesso. Os estudos explanados sugerem que é possível formular uma dieta quimicamente definida para criação massal da referida espécie em substituição ao sangue de vertebrados vivos ou sangue coletado de vertebrados e essa abordagem se torna desejável não apenas no ponto de vista financeiro, mas também ético. No entanto, uma formulação pode não ter a mesma eficácia em diferentes espécies ou até em cepas de uma mesma espécie, sendo necessários ajustes na composição da formulação ou uma formulação espécie específica.

REFERÊNCIAS

- ANDERSSON, H. The effect of sugar meals and body size on fecundity and longevity of female *Aedes communis* (Diptera: Culicidae). *Physiological Entomology*, v. 17, n. 3, p. 203-207, 1992. <<https://doi.org/10.1111/j.1365-3032.1992.tb01011.x>>
- BARATA, E. A. M. F.; COSTA, A. I. P.; NETO, F. C.; GLASSER, C. M.; BARATA, J. M. S.; NATAL, D. População de *Aedes aegypti* (L.) em área endêmica de dengue, sudeste do Brasil. *Revista de Saúde Pública*, v. 35, n. 3, p. 237-42, 2001. <<https://doi.org/10.1590/S0034-89102001000300004>>
- BAUGHMAN, T.; PETERSON, C.; ORTEGA, C.; PRESTON, S. R.; PATON, C.; WILLIAMS, J.; GUY, A.; OMODEL, G.; JOHNSON, WILLIAMS, B. H.; O'NEILL, S. L.; RITCHIE, S. A.; DOBSON, S. L.; MADAN, D. A highly stable blood meal alternative for rearing *Aedes* and *Anopheles* mosquitoes. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 11, n. 12, e0006142, 2017. <<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006142>>
- BRIEGEL, H. Mosquito reproduction: incomplete utilization of the blood meal protein for oogenesis. *Journal Insect Physiology*, V. 31, n. 1, p. 15-21, 1985. <[https://doi.org/10.1016/0022-1910\(85\)90036-8](https://doi.org/10.1016/0022-1910(85)90036-8)>
- BRIEGEL, H. Physiological bases of mosquito ecology. *Journal of Vector Ecology*, v. 28, n.1, p. 1-11, 2003.
- CLEMENTS, A. N. *Biology of mosquitoes: development, nutrition, and reproduction*. Wallingford: CABI Publishing, 1992.
- CONSOLI, R. A. G. B.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. *Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil*. Rio de Janeiro: 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. <<https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.1996.tb00740.x>>

- DIMOND, J. B.; LEA, A. O.; BROOKS, R. F.; DE LONG, D. M. A preliminary note on some nutritional requirements for reproduction in female *Aedes aegypti*. **The Ohio Journal of Science**, v. 55, n. 5, p. 209-211, 1955.
- DIMOND, J. B.; LEA, A. O.; HAHNERT JR, 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. <https://doi.org/10.4039/Ent8857-2>
- DUTRA, H. L. C.; RODRIGUES, S. L.; MANSUR, S. B.; OLIVEIRA, S. P.; CARAGATA, E. P.; MOREIRA, L. A. Development and physiological effects of an artificial diet for *Wolbachia*-infected *Aedes aegypti*. **Scientific Reports**, v. 7, p. 15687, 2017. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16045-6>
- FITZPATRICK, D. M.; HATTAWAY, L. M.; HSUEH, A. N.; RAMOS-NIÑO, M. E.; CHEETHAM, S. M. PCR-Based bloodmeal analysis of *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) in St. George Parish, Grenada. **Journal of Medical Entomology**, v. 56, n. 4, p. 1170-1175, 2019. <https://doi.org/10.1093/jme/tjz037>
- GALUN, R.; KOONTZ, L. C.; GWADZ, R. W. Engorgement response of anopheline mosquitoes to blood fractions and artificial solutions. **Physiological Entomology**, v. 10, n. 2, p. 145-149, 1985. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3032.1985.tb00029.x>
- GALUN, R.; OREN, N.; ZECHARIA, M. Effect of plasma components on the feeding response of the mosquito *Aedes aegypti* L. to adenine nucleotides. **Physiological Entomology**, v. 9, n. 4, p. 403-408, 1984. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3032.1984.tb00781.x>
- GAUGLER, R.; SUMAN, D. S.; CHANDEL, K.; WANG, Y. Non-membrane feeding device and diet formulation for mosquito colony production. **Patent Application Publication**. US/0246608, A1, 2019.
- GOMES, A. C.; SOUZA, J. M. P.; BERGAMASCHI, D. P.; SANTOS, J. L. F.; ANDRADE, V. R.; LEITE, O. F.; RANGEL, O.; SOUZA, S. S. L.; GUIMARÃES, N. S. N.; LIMA, V. L. C. Atividade antropolítica de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* em área sob controle e vigilância. **Revista de Saúde Pública**, v. 39, n. 2, p. 206-210, 2005. <https://doi.org/10.1590/S0034-89102005000200010>
- GONZALES, K. K.; HANSEN, I. A. Artificial diets for mosquitoes. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 13, n. 12, p. 1267, 2016. <https://doi.org/10.3390/ijerph13121267>
- GONZALES, K. K.; RODRIGUEZ, S. D.; HAE-NA, C.; KOWALSKI, M.; VULCAN, J.; MOORE, E. L.; LI, Y.; WILLETTE, S. M.; KANDEL, Y.; VOORHIES, W. A. V.; HOLGUIN, F. O.; HANLEY, K. A.; HANSEN, I. A. The effect of SkitoSnack, an artificial blood meal replacement, on *Aedes aegypti* life history traits and gut microbiota. **Scientific Reports**, v. 8, p. 11023, 2018. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29415-5>
- GONZALES, K. K.; TSUJIMOTO, H. and HANSEN, I. A. Blood serum and BSA, but neither red blood cells nor hemoglobina can support vitellogenesis and egg production in the dengue vector *Aedes aegypti*. **PeerJ**, v. 3, p. e938, 2015. <https://doi.org/10.7717/peerj.938>
- GONZÁLEZ, F. M. I.; VÁZQUEZ, A. M. J.; SESMA, M. E.; FALCÓN, L. J. A.; GONZÁLEZ, A. C.; CORREA, M. F. Efecto de diferentes fuentes de alimentación sanguínea sobre *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) en condiciones de insectario. **Horizonte sanitario**, v. 18, n. 2, p. 177-183, 2019. <https://doi.org/10.19136/hs.a18n2.2717>
- GRIFFITH, J. S. R.; TURNER, G. D. Culturing *Culex quinquefasciatus* mosquitoes with a blood substitute diet for the females. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 10, n. 3, p. 265-268, 1996. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.1996.tb00741.x>
- GUNATHILAKA, N.; RANATHUNGE, T.; UDAYANGA, L.; ABEYEWICKREME, W. Efficacy of blood sources and artificial blood feeding methods in rearing of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) for sterile insect technique and incompatible insect technique approaches in Sri Lanka. **BioMed Research International**, v. 2017, p. 3196924, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/3196924>
- HONÓRIO, N. A.; CASTRO, M. G.; BARROS, F. S. M.; MAGALHÃES, M. A. F. M.; SABROZA, P. C. Padrões da distribuição espacial do *Aedes albopictus* e *Aedes albopictus* em uma zona de transição no Rio de Janeiro, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, v. 25, n. 6, p. 1203-1214, 2009.
- INSTITUTO OSWALDO CRUZ (IOC). **Dengue, vírus e vetor: Longa trajetória**. <http://www.ioc.fiocruz.br/dengue/textos/longatraje.html>. Acesso em: 17 junho de 2020.
- KANDEL, Y.; MITRA, S.; JIMENEZ, X.; RODRIGUEZ, S. D.; ROMEROID, A.; BLAKELY, B. N.; CHO, S. Y.; PELZMAN, C.; HANSEN, I. A. Long-term mosquito culture with SkitoSnack, an artificial blood meal replacement. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 9, p. e0008591, 2020. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008591>
- KOGAN, P. H. Substitute blood meal for investigating and maintaining *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 27, n. 4, p. 709-712, 1990. <https://doi.org/10.1093/jmedent/27.4.709>
- KUNO, G.; GWONG-JEN, J. C. Biological transmission of arboviruses: reexamination of and new insights into components, mechanisms, and unique traits as well as their evolutionary trends. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 18, n. 4, p. 608-637, 2005. <https://doi.org/10.1128/CMR.18.4.608-637.2005>
- 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. <https://doi.org/10.1126/science.123.3203.890>
- LEA, A. O.; KNIERIM, J. A.; DIMOND, J. B.; DELONG, D. M. A preliminary note on egg production from milk-fed mosquitoes. **The Ohio Journal of Science**, v. 55, n. 1, p. 21-22, 1955.
- MARCONDES, C. B.; XIMENES, M. F. F. M. Zika virus in Brazil and the danger of infestation by *Aedes (Stemomyia)* mosquitoes. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 49, n. 1, p. 4-10, 2016.
- MARQUES, J.; CARDOSO, J. C. R.; FÉLIX, R. C.; POWER, D. M.; SILVEIRA, H. A Blood-free diet to rear anopheline mosquitoes. **Journal of Visualized Experiments**, v. 31, n. 155, e60144, 2020. <https://doi.org/10.3791/60144>
- MOHER, D.; LIBERATI, A.; TETZLAFF, J.; ALTMAN, D. G. Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses: The PRISMA Statement. **PLoS Med**, v. 6, n. 7, p. e1000097, 2009. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1000097>
- NAYAR, J. K.; SAUERMAN, JR. D. M. A comparative study of flight performance and fuel utilization as a function of age in females of Florida mosquitoes. **Journal of Insect Physiology**, v. 19, n. 10, p. 1977-1988, 1973. <https://doi.org/10.1016/0022-1910(73)90192-3>
- NAYAR, J. K.; SAUERMAN, JR. D. M. The effects of nutrition on survival and fecundity in Florida mosquitoes. Part 3. Utilization of blood and sugar for fecundity. **Journal of Medical Entomology**, v. 12, n. 2, p. 220-225, 1975. <https://doi.org/10.1093/jmedent/12.2.220>
- PHASOMKUSOLSIL, S.; TAWONG, J.; MONKANNA, N.; PANTUWATANA, K.; DAMDANGDEE, N.; KHONGTAK, W.; KERTMANEE, Y.; EVANS, B. P.; 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. <https://doi.org/10.1111/j.1948-7134.2013.12006.x>
- RAIKHEL, A. S.; KOKOZA, V. A.; ZHU, J.; MARTIN, D.; WANG, S.; LI, C.; SUN, G.; AHMED, A.; DITTMER, N.; 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. <https://doi.org/10.1016/s0965-1748(02)00090-5>
- RAINEY, S. M.; SHAH, P.; KOHL, A.; DIETRICH, I. Understanding the *Wolbachia*-mediated inhibition of arboviruses in mosquitoes: progress and challenges. **Journal of General Virology**, v. 95, n. 3, p. 517-530, 2014. <https://doi.org/10.1099/vir.0.057422-0>
- RICHARDS, S. L.; ANDERSON, S. L.; YOST, S. A. Effects of blood meal source on the reproduction of *Culex pipiens quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). **Journal of Vector Ecology**, v. 37, n. 1, p. 1-7, 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1948-7134.2012.00194.x>
- ROUBAUD, E. Cycle autogène d'attente et générations hivernales suractives apparentes chez le moustique commun *Culex pipiens*. **Comptes rendus de l'Académie des Sciences**, v. 188, p. 735-738, 1929.
- TALYULI, O. A. C.; BOTTINO-ROJAS, V.; TARACENA, M. L.; SOARES, A. L. M.; OLIVEIRA, J. H. M.; OLIVERIA, P. L. The use of a chemically defined artificial diet as a tool to study *Aedes aegypti* physiology. **Journal of Insect Physiology**, v. 83, p. 1-7, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2015.11.007>
- TAUIL, P. L. Aspectos críticos do controle do dengue no Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, v. 18, n. 3, p. 867-871, 2002. <https://doi.org/10.1590/S0102-311X200200300035>
- VASCONCELOS, P. F. C. Doença pelo vírus Zika: um novo problema emergente nas Américas? **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 6, n. 2, p. 9-10, 2015. <https://doi.org/10.5123/S2176-62232015000200010>
- VASCONCELOS, P. F. C. Febre amarela. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 2, p. 275-93, 2003.
- VASCONCELOS, P. F. C. Yellow fever in Brazil: thoughts and hypotheses on the emergence in previously free areas. **Revista de Saúde Pública**, v. 44, n. 6, p. 1144-1149, 2010. <https://doi.org/10.1590/s0034-89102010005000046>
- VASCONCELOS, P. F. C.; CALISHER, C. H. Review: emergence of human arboviral diseases in the Americas, 2000-2016. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 16, n. 5, p. 205-301, 2016. <https://doi.org/10.1089/vbz.2016.1952>
- WALKER, T.; JOHNSON, P.; MOREIRA, L.; ITURBE-ORMAETXE, I.; FRENTIU, F.; MCMENIMAN, C.; LEONG, Y. S.; DONG, Y.; AXFORD, J.; KRIESNER, P. The wMel *Wolbachia* strain blocks dengue and invades caged *Aedes aegypti* populations. **Nature**, v. 476, p. 450-453, 2011. <https://doi.org/10.1038/nature10355>
- WEAVER, S. C.; BARRETT, A. D. T. Transmission cycles, host range, evolution and emergence of arboviral disease. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 10, p. 789-801, 2004. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1006>
- WORD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2020. **Dengue and severe dengue: Key facts**. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue> Acesso em: 27 de julho de 2020.
- XUE, R.; ALI, A.; BARNARD, D. R. Host species diversity and post-blood feeding carbohydrate availability enhance survival of females and fecundity in *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). **Experimental Parasitology**, v. 119, n. 2, p. 225-228, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2008.01.007>
- ZHOU, G.; MIESFELD, R. Differential utilization of blood meal amino acids in mosquitoes. **Dove Press Journal**, v. 2009, n. 1, p. 1-12, 2009. <https://doi.org/10.2147/OAIP.S7160>
- ZHOU, G.; PENNINGTON, J. E.; WELLS, M. A. Utilization of pre-existing energy stores of female *Aedes aegypti* mosquitoes during the first gonotrophic cycle. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 34, n. 9, p. 919-925, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2004.05.009>