

# Microscopia eletrônica de varredura de ovos de *Haemagogus leucocelaenus* (Diptera: Culicidae)

## Scanning electron microscopy of eggs of *Haemagogus leucocelaenus* (Diptera: Culicidae)

Jeronimo Alencar<sup>a</sup>, Anthony Érico Guimarães<sup>a</sup>, Rubens Pinto Mello<sup>a</sup>, Catarina Macedo Lopes<sup>a</sup>, Nicolas Dégalier<sup>b</sup> e Jacenir R Santos-Mallet<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Entomologia da Fundação Instituto Oswaldo Cruz (Fiocruz). Rio de Janeiro, RJ, Brasil. <sup>b</sup>Instituto de Pesquisa para o Desenvolvimento. Brasília, DF, Brasil

### Descritores

Dipteros, ultra-estrutura. Culicidae, ultra-estrutura. Ovos. Microscopia eletrônica de varredura. *Haemagogus*.

### Resumo

#### Objetivo

Observar detalhes morfológicos de ovos de *Haemagogus leucocelaenus* visualizados pela primeira vez por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e realizar morfometria das principais estruturas.

#### Métodos

Foram utilizados ovos de *Hg. leucocelaenus* provenientes de fêmeas capturadas na Reserva Biológica do Tinguá, RJ, sendo parte destinada à eclosão e outra ao processamento de MEV, dos quais três foram submetidos à análise morfométrica. O material foi fixado em glutaraldeído 2,5% e pós-fixado em tetróxido de ósmio 1%, ambos em tampão cacodilato de sódio 0.1M, pH 7.2, processado e observado ao MEV Jeol 5310. Medições foram realizadas com o auxílio do software de análise Semafore.

#### Resultados

Os ovos apresentaram contorno elíptico com aproximadamente 574 µm de comprimento e 169 µm de largura, sendo o índice do ovo (*l/wratio*) 3,39 µm. O exocório é extremamente regular, possuindo ornamentação hexagonal e algumas vezes pentagonal. Nas células coriônicas, observaram-se tubérculos simetricamente dispostos com relação ao eixo longitudinal, e, no interior delas, tubérculos menores, individualizados, dispostos na periferia, e poucos agrupados no centro. A superfície do retículo coriônico não apresentou rugosidades. O aparelho micropilar apresenta colar proeminente, contínuo, com disco micropilar bem evidente.

#### Conclusões

A ornamentação do exocório apresenta diferenças em relação aos tubérculos das células coriônicas e ao retículo coriônico externo entre os ovos de *Hg. leucocelaenus* comparados aos ovos de *Hg. janthinomys* e *Hg. equinus*, bem como com relação aos de *Aedes aegypti*, *Ae. albopictus* e *Ae. bahamensis*.

### Keywords

Diptera, ultrastructure. Culicidae, ultrastructure. Eggs. Microscopy, electron, scanning. *Haemagogus*.

### Abstract

#### Objective

To observe morphological details of the eggs of *Haemagogus* (*Conopostegus*) *leucocelaenus*, seen for the first time via scanning electron microscopy (SEM), with morphometric analysis of the main structures.

### Correspondência para/ Correspondence to:

Jeronimo Alencar  
Departamento de Entomologia - Fiocruz  
Av. Brasil, 4365  
21045-900 Rio de Janeiro, RJ, Brasil  
E-mail: jalencar@ioc.fiocruz.br

Recebido em 16/10/2002. Reapresentado em 1/4/2003. Aprovado em 8/5/2003.

### Methods

Eggs of *Hg. leucocelaenus* were obtained from females captured in the Biological Reserve of Tinguá, State of Rio de Janeiro. Some of the eggs were kept for hatching and others underwent processing for scanning electron microscopy studies. Three eggs were submitted to morphometric analysis. The material was fixed in 2.5% glutaraldehyde and postfixed in 1% osmium tetroxide, both in 0.1M, pH 7.2 sodium cacodylate buffer, then dehydrated in ethanol and dried using the critical point method. This was then set up on metallic supports, covered with gold and observed using the Jeol 5310 scanning electron microscope. Measurements were made with the aid of the Semafore analysis software coupled to the electron microscope.

### Results

The eggs presented elliptical outlines of approximately 574  $\mu\text{m}$  in length and 169  $\mu\text{m}$  in width, with an egg index (l/w ratio) of 3.39. The exochorion was extremely regular and had ornamentation that was usually hexagonal but sometimes pentagonal. Tubercles were observed on the chorionic cells, symmetrically arranged in relation to the longitudinal axis. Inside the cells, there were smaller, individualized tubercles, some arranged peripherally and others grouped to a greater or lesser extent in the center. The surface of the chorionic reticulum did not present rugosity. The micropylar apparatus was formed by a prominent continuous collar of 8.32  $\mu\text{m}$  in thickness, with a slightly irregular surface. The micropylar disk was very evident, and was continuous with the collar. The micropyle was seen at the center of this disk, measuring 1.6  $\mu\text{m}$  and with a micropylar apparatus of 27.3  $\mu\text{m}$  in diameter.

### Conclusions

The ornamentation of the exochorion presents differences in relation to the tubercles of chorionic cells and the external chorionic reticulum between the eggs of *Hg. leucocelaenus*, in comparison with the eggs of *Hg. janthinomys* and *Hg. equinus*, and also in relation to those of *Aedes aegypti*, *Ae. albopictus* and *Ae. bahamensis*. In various aspects, the eggs of *Hg. leucocelaenus* have more resemblance to those of *Hg. equinus* than those of *Hg. janthinomys*, with greater differences presented in relation to the eggs of *Hg. spegazzinii* and *Hg. lucifer*.

## INTRODUÇÃO

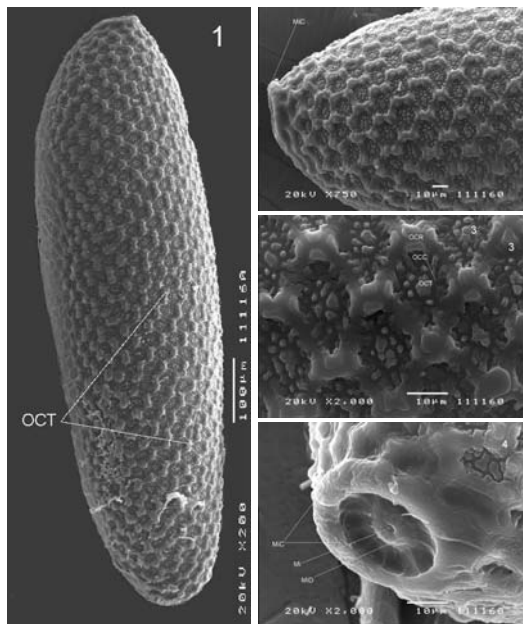
O gênero *Haemagogus* apresenta grande diversidade específica, sendo constituído de 32 espécies (Arnell,<sup>1</sup>1973). Muitas delas são de extrema importância sob o ponto de vista epidemiológico por estarem envolvidas na transmissão do vírus da febre amarela silvestre e outras arboviroses, atuando na manutenção do ciclo natural dessas zoonoses. Os transmissores da febre amarela silvestre atualmente conhecidos no Brasil, são exclusivamente mosquitos, sendo os hospedeiros vertebrados, pertencentes principalmente aos primatas, incluindo o homem (Degallier et al,<sup>5</sup>1992).

*Haemagogus (Conopostegus) leucocelaenus* é uma espécie essencialmente silvestre, que tem a copa das árvores como habitat preferencial, desenvolvendo suas atividades durante o período diurno (Chadee et al,<sup>3</sup>1995; Forattini & Gomes,<sup>6</sup>1988). Esse culicídeo é comumente encontrado no Brasil e sua importância epidemiológica relaciona-se à atuação na

transmissão de arboviroses, dentre elas a febre amarela (Kumm & Cerqueira,<sup>12</sup>1961). O *Haemagogus (Conopostegus) leucocelaenus* foi recentemente incriminado como vetor primário do vírus da febre amarela silvestre no Sudeste do Brasil.\* Os arbovírus *Wyeomyia*, *Ilhéus*, *Maguari*, *Tucunduba* e *Una* também foram isolados nessa espécie (Karabatsos,<sup>11</sup>1985; Hervé et al,<sup>8</sup>1986). Em laboratório, tem se mostrado vetor mais eficiente do vírus amarelíco do que o *Aedes aegypti* (Waddell,<sup>15</sup>1949). O *Hg. leucocelaenus* tem recebido especial atenção devido à sua crescente importância médica (Forattini & Gomes,<sup>6</sup>1988). Sua distribuição geográfica estende-se de Trinidad ao Sul do Brasil e Norte da Argentina. No Brasil, ocorre principalmente nos Estados das regiões Sul, Sudeste e Centro-oeste (Consoli & Lourenço-de-Oliveira,<sup>4</sup>1988).

O primeiro estudo de ovos de mosquitos usando microscopia eletrônica de varredura foi realizado por Matsuo & Kunou<sup>13</sup> (1972). São conhecidos os ovos de apenas quatro espécies de *Haemagogus*: *Hg.*

\*Comunicação pessoal do Professor Pedro Vasconcellos - Laboratório de Arbovirus do Instituto Evandro Chagas.



**Figura - Parte 1** - *Hg. leucocelaenus*. ovo inteiro. OCT: tubérculo coriônico externo. Escala 100 µm. **Parte 2** - Região anterior do ovo, micrópila e exocório. MiC: colar micropilar, OCC: célula coriônica. Escala 20 µm. **Parte 3** - Estruturas das células coriônicas. OCR: retículo coriônico externo, OCT: tubérculo coriônico externo. Escala 20 µm. **Parte 4** - Detalhe do aparelho micropilar. OCR: retículo coriônico externo, MiC: colar micropilar, Mi: micrópila, MiD: disco da micrópila. Escala 10 µm

*spgazzinii* Brèthes, *Hg. lucifer* (Howard, Dyar & Knab) (Mattingly,<sup>14</sup> 1973), *Hg. equinus* e *Hg. janthinomys* (Linley & Chadee,<sup>10</sup> 1991). O presente estudo teve por objetivo observar os ovos de *Hg. leucocelaenus* pela microscopia eletrônica de varredura (MEV), e realizar análise morfométrica das principais estruturas.

## MÉTODOS

Os ovos de *Hg. leucocelaenus* são provenientes de fêmeas capturadas na Reserva Biológica do Tinguá, município de Nova Iguaçu, Estado do Rio de Janeiro, na latitude S 22°28' - 22°39' e longitude W 43°13' - 43°34'. As fêmeas foram capturadas já ingurgitadas na natureza, usando tubo de sucção manual (capturador de Castro) e levadas no mesmo dia para o laboratório sendo somente utilizadas fêmeas em perfeito estado. As fêmeas foram isoladas individualmente em um tubo de vidro de fundo plano, com 25 mm de diâmetro e 50 mm de altura, contendo ao fundo uma porção de algodão umedecido, coberto com papel de filtro, com a função de servir como substrato para oviposição (Bates & Roca-Garcia,<sup>2</sup> 1945). Foram utilizadas cerca de 10 fêmeas, tendo sido obtidos 20 ovos, dos quais três foram submetidos à análise morfométrica.

Imediatamente após a postura, o material foi fixado em glutaraldeído 2,5% e pós-fixado em tetróxido de ósmio 1%, ambos em tampão cacodilato de sódio 0.1M, pH 7,2. Após a lavagem no mesmo tampão, os ovos foram desidratados em séries crescentes de etanol e submetidos ao método de secagem pelo ponto crítico, utilizando CO<sub>2</sub> superseco em aparelho Balzers. A seguir, foram montados em suportes metálicos, recobertos com ouro e observados ao microscópio eletrônico de varredura Jeol 5310.

As medições foram realizadas diretamente das imagens obtidas, com o auxílio do software de análise Semafore acoplado ao microscópio. Foram utilizados os seguintes parâmetros: comprimento total, largura total, espessura do colar micropilar e tamanho da micrópila, sendo citadas na tabela os máximos, mínimos, médias e desvio padrão.

A terminologia utilizada para a descrição dos ovos segue Harbach & Knight<sup>7</sup> (1980).

## RESULTADOS

Os ovos de coloração fortemente negra são ovipostos isolados e firmemente aderidos ao substrato. Apresentam contorno elíptico com aproximadamente 574 µm de comprimento e 169 µm de largura na região central (Figura, parte 1). Nas extremidades, a região anterior apresenta 50 µm na altura da micrópila e 61,9 µm na região posterior. O índice do ovo, ou seja, a razão entre o comprimento e a largura, foi calculado utilizando-se a largura da região central obtendo-se 3,39 µm.

O revestimento externo dos ovos apresenta o exocório extremamente regular. A maioria das células do exocório possui ornamentação de aspecto hexagonal e algumas vezes pentagonal (Figura, parte 2).

Na borda dessas células coriônicas, observa-se tubérculos de 1.49-6.32 µm de diâmetro simetricamente dispostos com relação ao eixo longitudinal e, no interior delas, tubérculos menores, individualizados, alguns dispostos na periferia, e outros agrupados no centro (Figura, parte 3).

A sua densidade é de 18 a 25 (21,1±2,08; n=10) por célula na região ventral anterior. O aspecto dos tubérculos é liso, não apresentando nenhum tipo de nódulo em sua superfície. A superfície do retículo coriônico não apresenta rugosidades. Na região anterior do ovo, observou-se o aparelho micropilar, formado por um colar proeminente e contínuo, apresentando cerca de 8,32µm de espessura, cuja superfície é ligeiramente irregular (Figura, parte 4).

No centro observa-se um disco micropilar bem evidente com cerca de 7,29  $\mu\text{m}$  de diâmetro, apresentando continuidade com o colar sob a forma de pregas membranosas dispostas uniformemente de maneira helicoidal. Visualiza-se no centro desse disco um orifício bem evidente, a micrópila, medindo 1,6  $\mu\text{m}$ . O diâmetro total externo do aparelho micropilar é de 27,3  $\mu\text{m}$  (Figura, parte 4).

## DISCUSSÃO

Excelente parâmetro de comparação entre espécies, a ornamentação do exocório revela significativas diferenças, principalmente no que se refere à presença de tubérculos nas células coriônicas. Os ovos de *Hg. janthinomys* e *Hg. equinus* examinado por Linley & Chadee<sup>10</sup> (1991) diferenciavam-se pela forma das células e distribuição destes tubérculos. Esses autores observaram em *Hg. janthinomys* células coriônicas de aspecto hexagonal e algumas vezes ligeiramente ovaladas. Em *Hg. equinus* estas apresentam aspecto hexagonal e algumas vezes pentagonal, o que também foi, no presente estudo, observado em *Hg. leucocelaenus* (Figura, parte 2). *Hg. equinus* apresenta pequenos tubérculos coriônicos espalhados uniformemente no centro e na periferia da célula, enquanto que em *Hg. janthinomys* eles se dispõem no centro das células. Não foram encontradas similaridade de distribuição desses tubérculos em *Hg. leucocelaenus*. Em *Hg. equinus* muitos deles apresentam-se fusionados, outros claramente espalhados, diferindo de *Hg. leucocelaenus* por apresentar em suas superfícies pequenos nódulos. O retículo coriônico externo observado em *Hg. leucocelaenus* possui aspecto liso diferindo do observado por Linley & Chadee<sup>10</sup> (1991) em *Hg. janthinomys* e *Hg. equinus*. Linley<sup>9</sup>

(1989) verificou que o retículo coriônico externo em *Aedes aegypti*, *Ae. albopictus* e *Ae. bahamensis* também apresenta rugosidades, possuindo uma fina malha reticular. O mesmo autor relata que nessas espécies ocorre somente um tubérculo central no interior das células coriônicas, o que diverge das observações realizadas em *Haemagogus*.

Em *Hg. spegazzinii* Mattingly<sup>14</sup> (1973) não visualizou a micrópila em suas observações ao microscópio óptico. Bem diferente dos ovos de *Hg. spegazzinii* e *Hg. lucifer*, que não apresentam um colar apical circular, os ovos de *Hg. leucocelaenus* assemelham-se mais aos de *Hg. equinus* do que ao de *Hg. janthinomys*. A micrópila também se apresenta menor do que nessas duas espécies. O disco micropilar, situado no centro do aparelho micropilar, difere do observado em ovos de *Hg. janthinomys* (Linley & Chadee,<sup>10</sup> 1991), uma vez que nesses últimos não há continuidade do disco com o colar.

Linley & Chadee<sup>10</sup> (1991) relataram que em *Hg. janthinomys* e *Hg. equinus* a superfície dorsal do ovo encontrava-se aderida ao substrato por meio de tubérculos filamentosos. Esses autores ressaltam que estas estruturas teriam possíveis funções de melhorar a fixação do ovo, impedindo a remoção física por predadores, bem como permitir a flutuação em águas pluviais. Esses filamentos não foram observados em *Hg. leucocelaenus*.

## AGRADECIMENTOS

Ao Laboratório de Biologia Celular Hertha Meyer, do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, pela cessão do microscópio eletrônico de varredura.

## REFERÊNCIAS

1. Arnell JH. Mosquitos studies (Diptera, Culicidae). XXXII. A revision of the genus *Haemagogus*. *Contr Amer Entomol Inst* 1973;10:1-174.
2. Bates M, Roca-Garcia M. The laboratory studies of Saimiri *Haemagogus* cycle of jungle yellow fever. *Am J Trop Med* 1945;25:203-16.
3. Chadee DD, Ganesh R, Hingwan JO, Tikasingh ES. Seasonal abundance, biting cycle and parity of the mosquito *Haemagogus leucocelaenus* in Trinidad, west Indies. *Med Vet Entomol* 1995;9:372-6.
4. Consoli RAGB, Lourenço-de-Oliveira R. *Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 1998. p. 225.
5. Dégallier N, Travassos da Rosa APA, Hervé JP, Travassos da Rosa JFS, Vasconcelos PFC, Silva CJM et al. A comparative study of yellow fever in África and South América. *Ciência e Cultura* 1992;44(2/3):143-51.

6. Forattini OP, Gomes AC. Biting activity of *Aedes scapularis* and *Haemagogus* mosquitoes in southern Brazil (Diptera: Culicidae). *Rev Saúde Pública* 1988;22:84-93.
7. Harbach RE, Knight KL. *Taxonomists' glossary of mosquito anatomy*. Marlton: Plexus; 1980.
8. Hervé JP, Dégallier N, Travassos da Rosa APA, Pinheiro FP, Sá GC. Aspectos ecológicos. In: Instituto Evandro Chagas. *Evandro Chagas: 50 anos de contribuição às ciências biológicas e à medicina tropical*. Belém: Fundação Serviço Especial de Saúde Pública; 1986. p. 409-37. cap. 1.
9. Linley JR. Comparative fine structure of the eggs of *Aedes albopictus*, *Ae. aegyti*, and *Ae. bahamensis* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* 1989;26:510-21.
10. Linley JR, Chadee DD. Fine structure of the eggs of *Haemagogus equines* and *Hg. janthinomys* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* 1991;28:434-45.
11. Karabatsos N. *Internacional catalogue of arboviruses including certain other viruses of vertebrates*. 3<sup>rd</sup> ed. San Antonio: American Society of Tropical Medicine and Hygiene; 1985. p. 1147.
12. Kumm HW, Cerqueira NL. The role of *Aedes leucocelaenus* in the epidemiology of jungle yellow fever in Brazil. *Bull Ent Res* 1961;42:195-9.
13. Matsuo KYY, Kunou I. The scanning electron microscopy of mosquitoes. I. The egg surfaces of five species of *Aedes* and *Armigeres subalbatus*. *J Kyoto Pref Univ Med* 1972;81:358-63.
14. Mattingly PF. Mosquitoes eggs. XXII. Eggs of two species of *Haemagogus* Williston. *Mosq Syst* 1973;5:24-6.
15. Waddell MB. Comparative efficacy of certain South American *Aedes* and *Haemagogus* mosquitoes as laboratory vectors of yellow fever. *Am J Trop Med* 1949;29:567-75.