

Ministério da Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz  
Centro de Pesquisas René Rachou  
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

**ASPECTOS BIOLÓGICOS DA INFECCÃO PELAS CEPAS *w*Mel e *w*MelPop de  
*Wolbachia* SOBRE POPULAÇÕES NATURAIS DE  
*Aedes aegypti* DO RIO DE JANEIRO**

por

HEVERTON LEANDRO CARNEIRO DUTRA

Belo Horizonte  
Fevereiro/2014

DISSERTAÇÃO MBCM – CPqRR

H. L. C. DUTRA

2014

Ministério da Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz  
Centro de Pesquisas René Rachou  
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

**ASPECTOS BIOLÓGICOS DA INFECÇÃO PELAS CEPAS *w*Mel e *w*MelPop de  
*Wolbachia* SOBRE POPULAÇÕES NATURAIS DE  
*Aedes aegypti* DO RIO DE JANEIRO**

por

HEVERTON LEANDRO CARNEIRO DUTRA

Dissertação apresentada com vistas à obtenção  
do Título de Mestre em Ciências na área de  
concentração de Biologia Celular e Molecular

Orientação: Dr. Luciano Andrade Moreira  
Co-orientação: Dr. Rafael Maciel de Freitas

Belo Horizonte

Fevereiro/2014

Catálogo-na-fonte  
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ  
Biblioteca do CPqRR  
Segemar Oliveira Magalhães CRB/6 1975

D978a Dutra, Heverton Leandro Carneiro.  
2014

Aspectos biológicos da infecção pelas cepas *wMel* e *wMelpop* de *Wolbachia* sobre populações naturais de *Aedes aegypti* do Rio de Janeiro / Heverton Leandro Carneiro Dutra. – Belo Horizonte, 2014.

XVIII, 98 f.: il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f.: 104 - 116

Dissertação (Mestrado) – Dissertação para obtenção do título de Mestre em Ciências pelo Programa de Pós - Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

1. Dengue/prevenção & controle 2. *Aedes*/crescimento & desenvolvimento 3. Controle de Vetores I. Título. II. Moreira, Luciano Andrade (Orientação). III. Freitas, Rafael Maciel de. (Co-orientação)

CDD – 22. ed. – 616.918 52

Ministério da Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz  
Centro de Pesquisas René Rachou  
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

**ASPECTOS BIOLÓGICOS DA INFECÇÃO PELAS CEPAS *w*Mel e *w*MelPop de  
*Wolbachia* SOBRE POPULAÇÕES NATURAIS DE  
*Aedes aegypti* DO RIO DE JANEIRO**

por

HEVERTON LEANDRO CARNEIRO DUTRA

Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Luciano Andrade Moreira (Presidente)  
Prof. Dr. Denise Valle  
Prof. Dr. Nelder de Figueiredo Gontijo  
Suplente: Dr. José Manuel Latorre Estivalis

Dissertação defendida e aprovada em: 25/02/2014

“Em algum lugar alguma coisa incrível está  
esperando ser descoberta.”

Carl Sagan

## DEDICATÓRIAS

Dedicado a minha família, em especial a minha mãe Maria das Graças pelo apoio incondicional. Aos professores que passaram pela minha vida e deixaram um pouco de seu conhecimento ao longo desta jornada.

## AGRADECIMENTOS

A minha mãe Maria das Graças pelo apoio em todos os momentos de minha vida. Um exemplo de caráter, dedicação e amor no qual procuro me espelhar dia após dia. Te amo dona Maria!

A minha irmã Marcela pela compreensão e momentos de companheirismo.

Aos amigos e amigas de Mariana/Ouro Preto os quais a distância física provou-se pequena quando a amizade sincera é maior.

Às amizades virtuais que provam que não é porque não se tem o contato físico diário que a amizade não é sincera.

Ao meu orientador Dr. Luciano Andrade Moreira pelo exemplo não só de pesquisador, mas de pessoa, de caráter. Muito obrigado por ter acreditado em mim e me aceitado como aluno. Agradeço por todo conhecimento aprendido ao longo desta jornada assim como a atenção a mim dedicada a cada vez que eu batia em sua porta pedindo ajuda ou mandava um email nos finais de semana, sendo prontamente respondido. Obrigado por ser este pesquisador incrível!

Ao meu co-orientador Dr. Rafael Maciel de Freitas que mesmo distante, me ajudou sempre da melhor forma possível com conselhos valiosos, dicas importantes e momentos de muita risada. Valeu por abrir as portas de seu laboratório e fazer de tudo para que eu me sentisse bem recepcionado.

A todos os membros do Laboratório de Malária do Centro de Pesquisas René Rachou pela convivência diária, tanto nos momentos de descontração como nos momentos difíceis, em especial a Alice Sabatino por sempre me acudir de imediato nos momentos de desespero e ao Geraldo, o famoso “Gegê” por providenciar o nosso material de cada dia.

A toda a família do Insetário do Laboratório de Malária por estar comigo em todos os momentos, ajudando nos experimentos, dando dicas, pedindo conselhos, tudo sempre com um sorriso no rosto. Em especial a Dra. Caroline de Oliveira por ter me acolhido quando entrei no laboratório, ao Dr. Luke Baton pelos valiosíssimos conselhos e conversas horas a fio discutindo nada além de pura ciência! Agradeço também a Jéssica Barreto pela grande ajuda na reta final do meu projeto. Vocês são demais!

A toda a equipe do Laboratório de Transmissores de Hematozoários na FIOCRUZ- RJ no qual desde o primeiro dia já fui acolhido como parte da família por todos os membros.

Agradeço em especial a Vanessa Lopes pela fundamental ajuda nos meus experimentos e claro, pelos constantes momentos de descontração.

Ao Dr. Carlos Jorge Logullo de Oliveira do Laboratório de Química e Função de Proteínas e Peptídeos da Universidade Estadual do Norte Fluminense por ter aberto as portas de seu laboratório e de sua casa para que eu realizasse meus experimentos da melhor forma possível. Em especial a Ma. Mariana Fernandes por toda a ajuda durante a minha estadia.

A Dra. Zélia Maria Profeta da Luz, atual diretora do CPqRR – FIOCRUZ por nos fornecer meios de ampliar a estrutura física do Insetário, permitindo assim um maior conforto e capacidade de trabalho.

A Bruna, minha namorada, uma das minhas grandes conquistas deste mestrado. Obrigado pelo carinho, compreensão, apoio e momentos de alegria!

## **AGRADECIMENTOS ÀS INSTITUIÇÕES FINANCIADORAS**

À Rede PRONEX Dengue, ao Ministério da Ciência, Tecnologia (CNPq) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelos recursos financeiros que permitiram o desenvolvimento deste projeto.

À Fundação Oswaldo Cruz, ao Centro de Pesquisas René Rachou e ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde pela oportunidade ofertada, além de excelente infraestrutura no que diz respeito a reagentes e equipamentos necessários para trabalho.

Ao Ministério da Saúde (Secretaria de Vigilância em Saúde – SVS e Departamento de Ciência e Tecnologia da Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos – DECIT/SCTIE).

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	XIII
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	XV
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS</b> .....	XVI
<b>RESUMO</b> .....	XVII
<b>ABSTRACT</b> .....	XVIII
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	19
1.1 Dengue no mundo: situação e histórico atual.....	19
1.2 Dengue no Brasil: situação e histórico atual.....	22
1.3 O <i>Aedes aegypti</i> (Linnaeus, 1762) e <i>Aedes albopictus</i> (Skuse, 1894).....	23
1.4 O controle da dengue.....	27
1.4.1 Controle mecânico do vetor.....	28
1.4.2 Controle de vetores via inseticidas de origem química.....	28
1.4.3 Resistência a inseticidas químicos em <i>A. aegypti</i> .....	29
1.4.4 Formas alternativas de controle do vetor.....	30
1.4.4.1 A técnica de insetos estéreis (SIT).....	30
1.4.4.2 Liberação de insetos carregando um gene letal Dominante (RIDL).....	31
1.4.4.3 RNAi.....	32
1.4.4.4 <i>Homing Endonuclease Genes</i> (HEGS).....	32
1.5 <i>Wolbachia</i> : um breve histórico.....	33
1.6 Distribuição e filogenia de <i>Wolbachia</i> .....	34
1.7 <i>Wolbachia</i> e os efeitos causados no hospedeiro.....	35
1.8 <i>Wolbachia</i> e o seu uso no controle da dengue.....	38
1.9 O programa “eliminar a dengue” .....	41
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	42
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	44
3.1 Objetivo geral.....	44
3.2 Objetivos específicos.....	44

<b>4 MÉTODOS.....</b>	<b>45</b>
4.1 Manutenção de colônias de mosquitos.....	45
4.2 Retrocruzamento <i>wMelPop</i> e <i>wMel</i> .....	45
4.3 Monitoramento da infecção por <i>Wolbachia</i> .....	48
4.3.1 Monitoramento de <i>wMelPop</i> via PCR convencional.....	48
4.3.2 Monitoramento de <i>wMel</i> via PCR em tempo real.....	49
4.4 Geração de uma linhagem de <i>A. aegypti</i> curada da infecção por <i>wMel</i> .....	49
4.5 Criação das larvas em diferentes condições de <i>stress</i> .....	50
4.5.1 Tempo de desenvolvimento larval.....	50
4.5.2 Longevidade.....	51
4.5.3 Fecundidade e fertilidade.....	51
4.5.4 Morfometria.....	52
4.5.5 Dosagens teciduais.....	54
4.5.5.1 Quantificação de glicogênio em <i>wMelPopBr</i> .....	54
4.5.5.2 Quantificação de glicogênio em <i>wMelBr</i> .....	55
4.6 Incompatibilidade citoplasmática.....	55
4.7 Curso da infecção pela cepa <i>wMel</i> ao longo do tempo em <i>A. aegypti</i> .....	56
4.8 Transmissão materna.....	57
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>58</b>
5.1 Retrocruzamento <i>wMelPop</i> e <i>wMel</i> .....	58
5.2 Tempo de desenvolvimento larval.....	65
5.2.1 <i>wMelPopBr</i> .....	65
5.2.2 <i>wMelBr</i> .....	68
5.3 Longevidade.....	71
5.4 Fecundidade e fertilidade.....	72
5.5 Incompatibilidade citoplasmática.....	75
5.6 Morfometria.....	77
5.6.1 <i>wMelPopBr</i> .....	77
5.6.2 <i>wMelBr</i> .....	78
5.7 Quantificação de glicogênio.....	80
5.7.1 <i>wMelPopBr</i> .....	80
5.7.2 <i>wMelBr</i> .....	81
5.8 Curso da infecção pela cepa <i>wMel</i> ao longo do tempo em <i>A. aegypti</i> .....	82
5.9 Transmissão materna.....	88

<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	88
6.1 Tempo de desenvolvimento larval.....	88
6.2 Longevidade.....	90
6.3 Fecundidade e fertilidade.....	93
6.4 Incompatibilidade citoplasmática.....	94
6.5 Morfometria.....	95
6.6 Quantificação de glicogênio.....	96
6.7 Curso da infecção pela cepa wMel ao longo do tempo em <i>A. aegypti</i> .....	97
6.8 Transmissão materna.....	99
<b>7 CONCLUSÕES</b> .....	100
<b>8 ANEXOS</b> .....	101
<b>8.1 Anexo 1</b> - Cruzamento recíproco do experimento de incompatibilidade citoplasmática. Macho (♂) não infectado e fêmea (♀) infectada pela cepa wMel.....	101
<b>8.2 Anexo 2</b> - Cruzamento recíproco do experimento de incompatibilidade citoplasmática. Macho (♂) e fêmea (♀) infectados pela cepa wMel.....	101
<b>8.3 Anexo 3</b> - Cruzamento recíproco do experimento de incompatibilidade citoplasmática. Macho (♂) e fêmea (♀) não infectados pela cepa wMel.....	102
<b>8.4 Anexo 4</b> - Cruzamento recíproco do experimento de incompatibilidade citoplasmática. Macho (♂) infectado pela cepa wMel e fêmea (♀) não infectada.....	102
<b>8.5 Anexo 5</b> - Cruzamento recíproco do experimento de incompatibilidade citoplasmática. Indivíduos que apresentaram amplificação duvidosa.....	103
<b>9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	104

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> Infestação por <i>Aedes aegypti</i> durante as décadas de 1930 e 1970.....	20
<b>Figura 2</b> Distribuição dos sorotipos virais da dengue no mundo em 1970 (A) e (B) 2004.....	21
<b>Figura 3</b> Distribuição global de <i>Aedes aegypti</i> .....	21
<b>Figura 4</b> Casos notificados de dengue no Brasil e grandes regiões no período de 1990-2013.....	22
<b>Figura 5</b> Fêmea do mosquito <i>A. aegypti</i> durante o repasto sanguíneo.....	25
<b>Figura 6</b> Criadouros naturais e artificiais de <i>A. aegypti</i> .....	25
<b>Figura 7</b> Ciclo de vida de <i>A. aegypti</i> . Duração de 15 a 20 dias em condições ideais...	27
<b>Figura 8</b> Fenótipos induzidos por <i>Wolbachia</i> nas diferentes ordens de insetos conhecidas.....	36
<b>Figura 9</b> Revisão esquemática do processo de retrocruzamento utilizado para transferir <i>Wolbachia</i> para o <i>background</i> genético brasileiro.....	47
<b>Figura 10</b> Asa direita de <i>A. aegypti</i> demonstrando a marcação digital dos 18 pontos para análise do tamanho do centróide.....	53
<b>Figura 11</b> Cruzamentos realizados no experimento de incompatibilidade citoplasmática.....	56
<b>Figura 12</b> PCR da geração parental dos machos de <i>A. aegypti</i> provenientes de diferentes regiões do Rio de Janeiro.....	59
<b>Figura 13</b> PCR da geração parental das fêmeas de <i>A. aegypti</i> provenientes da Austrália, infectadas pela cepa <i>wMelPop</i> de <i>Wolbachia</i> .....	59
<b>Figura 14</b> PCR da geração B1 do processo de retrocruzamento da cepa <i>wMelPop</i> .....	61
<b>Figura 15</b> PCR da geração B3 do processo de retrocruzamento da cepa <i>wMelPop</i> .....	61
<b>Figura 16</b> PCR da geração B4 do processo de retrocruzamento da cepa <i>wMelPop</i> .....	62
<b>Figura 17</b> <i>Screening</i> por PCR em tempo real de todas as gerações existentes no laboratório da cepa <i>wMelPop</i> retrocruzada.....	63
<b>Figura 18</b> PCR da geração B1C do processo de retrocruzamento da cepa <i>wMel</i> .....	64
<b>Figura 19</b> PCR da geração B2 do processo de retrocruzamento da cepa <i>wMel</i> .....	64
<b>Figura 20</b> <i>Screening</i> por PCR em tempo real das gerações das existentes no laboratório da cepa <i>wMel</i> retrocruzada.....	65
<b>Figura 21</b> Tempo mediano de desenvolvimento larval da cepa <i>wMelPop</i> .....	66

<b>Figura 22</b> Tempo mediano de desenvolvimento larval da cepa <i>wMelPop</i> . A) Fêmeas. B) Machos.....	67
<b>Figura 23</b> Tempo mediano de desenvolvimento larval da cepa <i>wMel</i> .....	67
<b>Figura 24</b> Tempo mediano de desenvolvimento larval da cepa <i>wMel</i> . A) Fêmeas. B) Machos.....	70
<b>Figura 25</b> Efeito da cepa <i>wMel</i> sobre a longevidade de adultos de <i>A. aegypti</i> .....	71
<b>Figura 26</b> <i>wMel</i> não apresenta efeito sobre a fecundidade de <i>A. aegypti</i> criado em condições ideais de laboratório.....	72
<b>Figura 27</b> <i>wMel</i> não interfere na fecundidade ao longo do tempo de vida de <i>A. aegypti</i> .....	73
<b>Figura 28</b> Efeito da densidade larval sobre a fecundidade de <i>A. aegypti</i> ao longo do tempo de vida de <i>A. aegypti</i> .....	74
<b>Figura 29</b> <i>wMel</i> causa forte incompatibilidade citoplasmática unidirecional em população de <i>A. aegypti</i> do Rio de Janeiro.....	76
<b>Figura 30</b> Tamanho médio do centroide de <i>A. aegypti</i> criado em diferentes densidades larvais e <i>status</i> de infecção pela cepa <i>wMelPop</i> .....	78
<b>Figura 31</b> Tamanho médio do centroide de <i>A. aegypti</i> criado em diferentes densidades larvais e <i>status</i> de infecção pela cepa <i>wMel</i> .....	79
<b>Figura 32</b> Dosagem tecidual de glicogênio em fêmeas de <i>A. aegypti</i> infectadas com a cepa <i>wMelPop</i> .....	80
<b>Figura 33</b> Dosagem tecidual de glicogênio em fêmeas de <i>A. aegypti</i> infectadas com a cepa <i>wMel</i> .....	82
<b>Figura 34</b> Densidade de <i>wMel</i> na cabeça/tórax de <i>A. aegypti</i> em diferentes intervalos de tempo.....	84
<b>Figura 35</b> Densidade de <i>wMel</i> na carcaça de <i>A. aegypti</i> em diferentes intervalos de tempo.....	85
<b>Figura 36</b> Densidade de <i>wMel</i> no intestino de <i>A. aegypti</i> em diferentes intervalos de tempo.....	86
<b>Figura 37</b> Densidade de <i>wMel</i> nos túbulos de Malpighi de <i>A. aegypti</i> em diferentes intervalos de tempo.....	87
<b>Figura 38</b> Densidade de <i>wMel</i> nos ovários de <i>A. aegypti</i> em diferentes intervalos de tempo.....	88
<b>Figura 39</b> Transmissão materna de <i>Wolbachia</i> .....	89

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> Fenótipos induzidos por <i>Wolbachia</i> , o benefício adaptativo ao simbionte e os grupos afetados.....	37
<b>Tabela 2</b> Espécies de <i>Anopheles</i> e <i>Aedes</i> negativas para a presença de <i>Wolbachia</i> .....	39
<b>Tabela 3</b> Análise de regressão logística da influência da densidade e o <i>status</i> da infecção no sucesso de oviposição de <i>A. aegypti</i> infectado com a cepa wMel.....	75
<b>Tabela 4</b> Comparação entre os fenotípicos observados na infecção com as cepas wMel e wMelPop.....	89

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

**µg** – Micrograma

**µL** – Microlitro

**Br** – Brasileiros

**C-** – Controle negativo

**C+** – Controle positivo

**DNA** – *Deoxyribonucleic Acid* (ácido desoxirribonucléico)

**dNTPs** – Desoxirribonucleotídeos trifosfatados

**EDTA** – Ácido etilenodiaminotetracético

**EIP** – Período de incubação extrínseco

**KCl** – Cloreto de potássio

**MgCl<sub>2</sub>** - Cloreto de magnésio

**mL** – Mililitro

**Mm** – milímetros

**mM** – Milimolar

**N** – Número de indivíduos

**NaCl** – Cloreto de sódio

**Nm** – Nanômetros

**nM** - Nanomolar

**OD** – Densidade óptica

**pb** – Pares de base

**PCR** – *Polimerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase)

**pH** – Potencial hidrogeniônico

**PM** – Marcador de massa molecular

**qPCR** – PCR em tempo real

**Rps** - Proteína ribossomal de mosquitos S17

**X g** – Gravidade

**Wsp** – Proteína de superfície de *Wolbachia*

## RESUMO

*Wolbachia* constitui um gênero de bactérias endossimbiontes, gram-negativas, matematicamente transmitidas, intracelulares obrigatórias. Estima-se que cerca de 20 a 70% de todas as espécies de artrópodes conhecidas estão infectadas por estas alfa-proteobactérias, as quais em seus hospedeiros causam uma série de efeitos biológicos incluindo “parasitismo reprodutivo”, o qual favorece a dispersão da bactéria na população de campo. Interessante notar que populações naturais de um dos mais importantes vetores de doença, *Aedes aegypti*, não estão infectadas por *Wolbachia*, mas quando duas cepas da bactéria, *wMelPop* e *wMel* foram independentemente inseridas nesta espécie, elas diminuíram significativamente a competência vetorial para os vírus DENV e Chikungunya. Recentemente, *Wolbachia* foi proposta como uma nova estratégia para reduzir a incidência da dengue (ED = [www.eliminatedengue.org](http://www.eliminatedengue.org)). Entretanto, o controle da dengue baseado em *Wolbachia* só será efetivo se a infecção bacteriana gerada em laboratório for capaz de se fixar na população de campo. Com isto em mente, nós avaliamos os efeitos das cepas *wMelPop* e *wMel* de *Wolbachia* em uma variedade de parâmetros biológicos de *A. aegypti* recém retrocruzados, contendo o *background* genético brasileiro, em preparação para liberações em campo, criados em diferentes condições estressantes. Para ambas as cepas estudadas, houve uma diferença significativa no tempo de desenvolvimento larval apenas na condição mais estressante, independente do sexo. Com relação à infecção por *wMel*, nós observamos uma série de mudanças fenotípicas, indo desde nenhum efeito aparente para alguns parâmetros (fecundidade e fertilidade), a parcialmente prejudiciais (longevidade e tamanho corpóreo na condição mais estressante), e parcialmente benéficos (níveis elevados de glicogênio, uma fonte chave de reserva nutricional, sob a condição mais estressante). Em termos dos níveis da infecção por *Wolbachia*, houve de forma geral, uma maior concentração da bactéria no *background* genético dos mosquitos brasileiros ao longo do tempo para a cepa *wMel*, comparado ao *background* genético dos mosquitos australianos, exibindo uma taxa de transmissão materna de 94%. A taxa de incompatibilidade citoplasmática no *background* genético dos mosquitos brasileiros foi de 99,51% para esta mesma cepa. Para a cepa mais virulenta, *wMelPop*, houve de forma surpreendente, efeitos fenotípicos benéficos: o tempo de desenvolvimento larval foi menor nos indivíduos infectados, os quais apresentaram um maior tamanho corpóreo e maior reserva de glicogênio na condição altamente estressante comparado a fêmeas não infectadas. Em conclusão, nosso trabalho salienta alguns dos efeitos fenotípicos chave de *Wolbachia* na biologia de *A. aegypti* brasileiros, aonde ela é capaz de se fixar sem causar mudanças prejudiciais à biologia do hospedeiro. Nós também acreditamos que o trabalho contribui com informações relevantes com relação aos efeitos benéficos da cepa *wMel*, sendo esta adequada para aplicação destes mosquitos infectados no campo para possivelmente controlar no futuro os surtos de dengue no Brasil.

## ABSTRACT

*Wolbachia* constitutes a genus of obligate, intracellular, maternally-transmitted, gram-negative bacterial endosymbionts. It is estimated that between 20 to 70% of all known arthropods are infected by these alphaproteobacteria, which in their hosts cause a variety of biological effects including "reproductive parasitism", which favors the spread of the bacteria in wild populations. Interestingly, natural populations of one of the most important disease vectors, *Aedes aegypti*, do not harbor *Wolbachia*, but when two *Wolbachia* strains, *wMelPop* and *wMel* were independently inserted into this species, they have significantly reduced the mosquito vectorial competence for DENV and Chikungunya viruses. Recently, *Wolbachia* has been trialed as a novel strategy for reducing the incidence of dengue fever (ED = [www.eliminatedengue.org](http://www.eliminatedengue.org)). However, *Wolbachia*-based control of dengue will only be effective if the bacterial infection generated in the laboratory is able to fixate into wild mosquito population. With this in mind, we evaluated the effects of the *wMelPop* and *wMel* strains of *Wolbachia* on a variety of biological parameters of recently backcrossed Brazilian *A. aegypti* mosquitoes genetic background, in preparation for field releases, reared under different stress conditions. For both strains studied, there was a significant difference in larval development time only in the most stressful condition, where infected individuals developed more rapidly than uninfected, regardless of sex. With respect to the *wMel* infection, we observed several phenotypic changes, ranging from no effect at all for some parameters (fecundity, fertility), to partially detrimental (longevity and body size in highest stress condition), and partially beneficial effects (increased levels of glycogen, a key nutritional reserve, under the highest stress condition). In terms of *Wolbachia* infection levels, there was generally a higher bacterial concentration in the Brazilian genetic background over time for the *wMel* strain compared to the Australian genetic background, exhibiting a maternal transmission rate of 94%. The *wMel* rate of cytoplasmic incompatibility in the Brazilian genetic background was 99.51%. For the more virulent strain, *wMelPop*, there were surprisingly beneficial phenotypic effects: larval development time was lower in infected individuals, which also had an increased body size and glycogen content in highest stress condition compared to uninfected females. In conclusion, our work highlights some of the key phenotypic effects of *Wolbachia* on the biology of Brazilian *A. aegypti*, where it is able to reach fixation without causing detrimental changes to its host biology. We also think it contributes with relevant information regarding the beneficial effects of the *wMel* strain, being suitable for the application of these infected mosquitoes in the field and possibly control dengue outbreaks in the future in Brazil.

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Dengue no mundo: situação e histórico atual

Estima-se que em todo o mundo existam cerca de 2,5 bilhões de pessoas, metade da população mundial, vivendo em áreas de risco de transmissão epidêmica de dengue, principalmente em regiões tropicais e subtropicais (GUBLER, 2002; BEATTY *et al.*, 2008). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2009), mais de 50 milhões de casos da doença são relatados anualmente ao redor do mundo, englobando 100 países nos quais o vírus circula. Isto faz com que atualmente a dengue seja considerada como a mais importante enfermidade viral transmitida por mosquitos vetores (WHO, 2009; GUZMAN *et al.*, 2010).

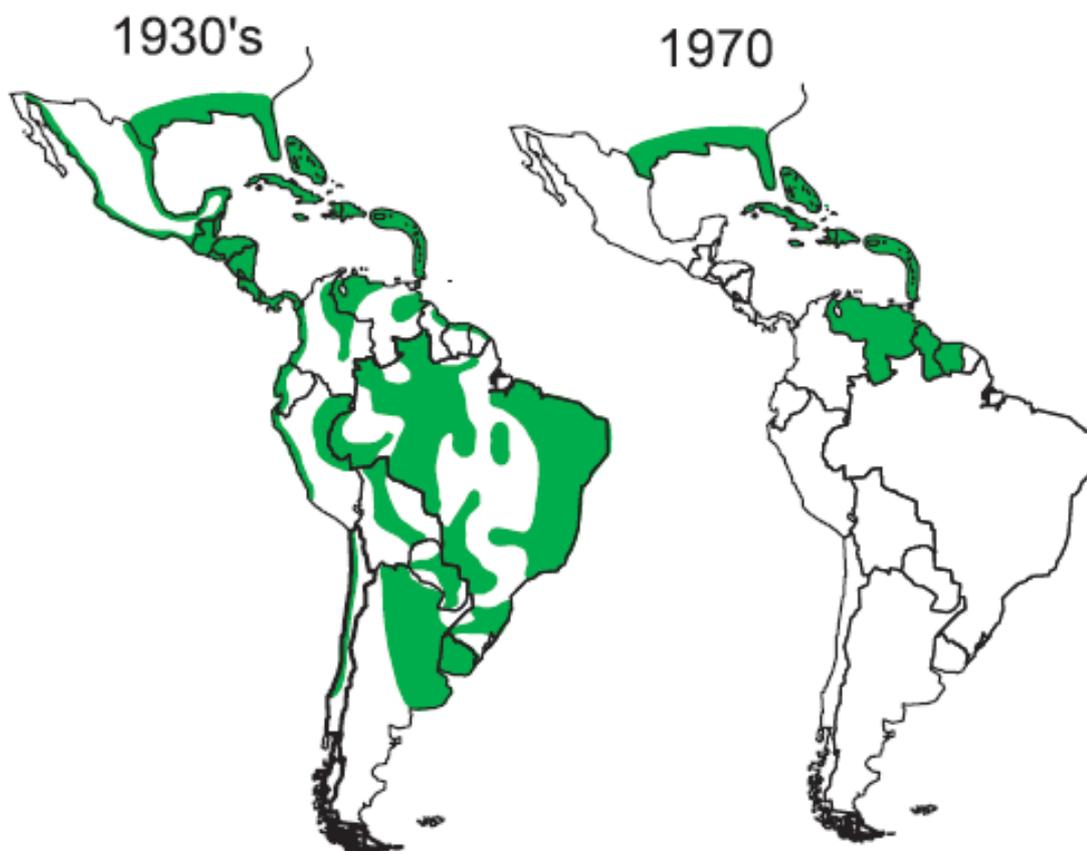
Muito antes da dengue se consolidar como uma epidemia nos continentes tropicais, casos compatíveis com a doença já eram registrados no mundo. O primeiro registro que se tem conhecimento ocorreu durante a dinastia Chin (265 a 420 D.C), caso registrado na Enciclopédia Chinesa do sintoma de doenças e remédios, passando por duas reedições, a primeira no ano 610 D.C durante a dinastia Tang e a segunda no ano 992 D.C da dinastia Sung do norte (NOBUCHI, 1979; GUBLER, 1998).

Introduzida nos países tropicais e subtropicais por meio de atividades humanas como o tráfico de escravos africanos durante os séculos XVI a XIX para as Américas (SIMMONS *et al.*, 2012), a dengue antes da Segunda Guerra Mundial possuía uma distribuição restrita aos trópicos. Tendo como base para dispersão o transporte marítimo, as epidemias eram esporádicas com um grande intervalo de tempo entre elas (GUBLER, 1998).

O ponto de partida para a pandemia atual da dengue iniciou-se durante a Segunda Guerra Mundial. Devido à movimentação de suprimentos e das tropas aliadas e japonesas, as áreas do Pacífico e Ásia apresentaram um crescente número de casos da doença, principalmente entre os soldados. Com o final da guerra e o desmatamento desenfreado, devido ao crescimento econômico proporcionado a diversas regiões asiáticas, a doença fixou-se até os dias atuais como uma hiperepidemia na qual os 4 sorotipos virais circulam ao mesmo tempo (Figura. 2) (GUBLER, 2011).

No continente americano, as epidemias de dengue durante as décadas de 1950, 1960 e boa parte da década de 1970 eram raras devido à erradicação do vetor em 19 países da América Latina, além de alguns países da América Central (GUBLER, 1998; GUBLER,

2011). Este processo havia ocorrido logo após uma epidemia na região continental do Delta do Mississippi em 1945, o que acarretou um esforço por parte da Organização Pan-Americana de Saúde para a erradicação do vetor em 1947 (Figura 1) (TAPIA-CONYER, 2012).



**Figura 1:** Infestação por *Aedes aegypti* durante as décadas de 1930 e 1970. Fonte: Adaptado de Gubler, D. J. 2011.

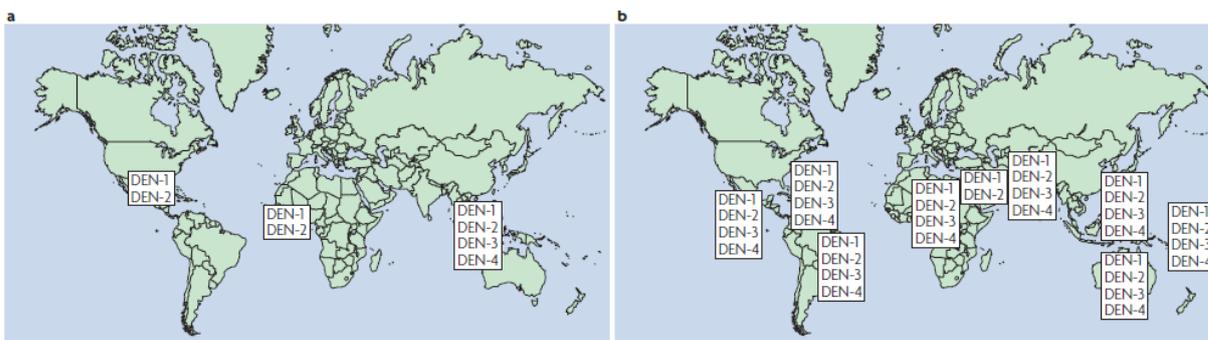
Novos casos de dengue começaram a surgir no continente americano em meados de 1970, com o término do programa de combate a este agouro. Devido ao crescimento do transporte aéreo no mundo, o que aumentou consideravelmente o fluxo de pessoas, esses aumentaram ainda mais com a introdução de novos sorotipos virais vindos da Ásia, (GUBLER, 1998).

Regiões que anteriormente não possuíam casos de dengue passaram a observar um número cada vez maior da doença, seja por forma natural ou via ação direta do homem (SAN MARTIN, 2010).

Nas décadas seguintes, o que se viu foi um crescente nos casos de dengue ao redor do mundo, além da dispersão dos sorotipos virais (Figura 2, 3). Em 2011 até a semana

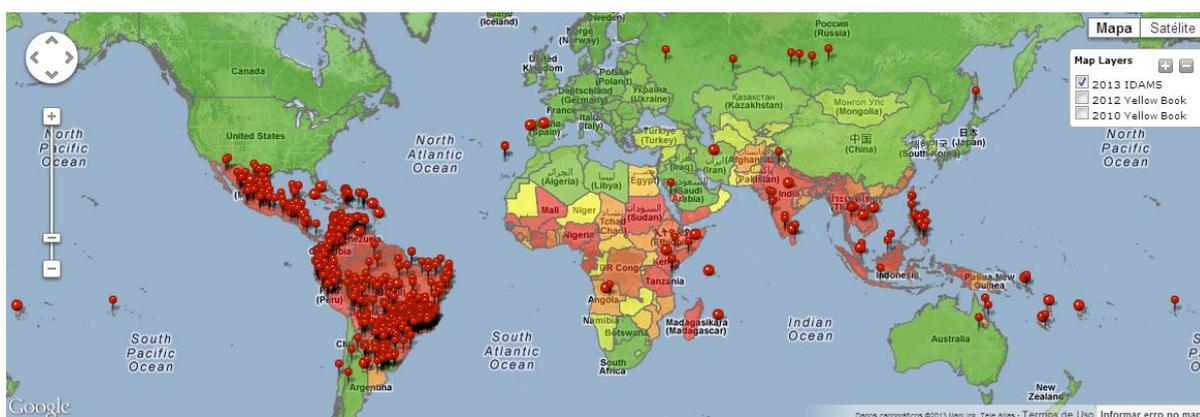
epidemiológica 50, 1 milhão de casos de dengue já tinham sido registrados em toda a América Latina, com um total de 716 mortes, sendo que destes, 764.032 foram registrados no Brasil. Já no ano de 2012, até a semana epidemiológica 42 registrou-se nas Américas um total de 982.142 casos da doença, com 23.925 casos severos e 521 mortes, com o Brasil apresentando durante todo este ano, 589.591 casos. Nos primeiros meses de 2013, segundo o *HealthMap*, 2061 alertas já haviam sido emitidos no mundo, correspondendo a casos da doença, como pode ser observado na figura 4 que apresenta a distribuição global de *Aedes aegypti*, e neste mesmo ano, no Brasil, registrou-se um total de 1.470.387 casos da doença (TAPIA-CONYER, 2012).

Como se não bastasse todo o desgaste físico causado pela dengue, via impacto direto na saúde humana, calcula-se que anualmente somente no continente Americano, a dengue custe aos cofres públicos o equivalente a \$2,1 bilhões de dólares, sem contar os custos no combate ao vetor (GUBLER, 2011).

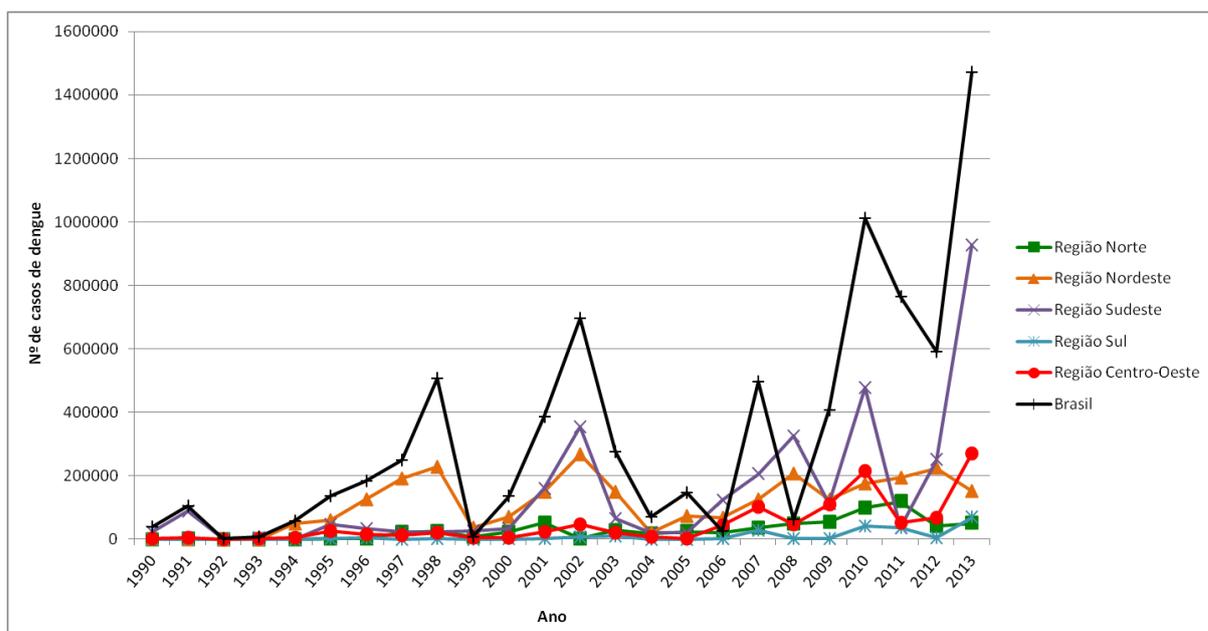


**Figura 2: Distribuição dos sorotipos virais da dengue no mundo em 1970 (A) e 2004 (B).**

Adaptado de Guzman *et al.*, 2010.



**Figura 3: Distribuição global de *Aedes aegypti*.** Regiões em vermelho representam áreas em que há casos de dengue ocorrendo, em laranja áreas de grande risco para a transmissão da doença, em amarelo, áreas incertas, em verde claro áreas improváveis e em verde escuro áreas sem casos. Círculos vermelhos mostram as transmissões locais e regionais do vírus da dengue coletadas pelo *HealthMap*.



**Figura 4:** Casos notificados de dengue no Brasil e grandes regiões no período de 1990-2013. Fonte: SES/SINAN (SINAN a partir de 1999).

## 1.2 Dengue no Brasil: histórico e situação atual

As campanhas de combate ao vetor da dengue e da febre amarela no Brasil tiveram início com Oswaldo Cruz no Rio de Janeiro (1902-1907), sendo intensificadas entre 1930 e 1940 pela Fundação Rockefeller, após a primeira epidemia de febre amarela urbana entre os anos de 1928 e 1929. Em 1947 a Organização Pan-Americana de Saúde resolveu, em ações conjuntas entre os países que a constituíam, erradicar de vez o *Ae. aegypti* do hemisfério ocidental (BRAGA & VALLE, 2007).

O vetor foi declarado erradicado do Brasil em 1958 (BRAGA & VALLE, 2007). Em 1967, ocorre a primeira reintrodução do *Ae. aegypti* no país, sendo em seguida eliminado em 1973. Em 1976, o vetor foi reintroduzido no país em um foco em Salvador, via recolonização do *Ae. aegypti* no Brasil, onde, a partir da década de 1980, iniciou-se um processo de intensa proliferação viral, e casos de epidemias alarmantes têm atingido diversas regiões desde então (SCHATZMAYR, 2000) (Figura 4).

A primeira epidemia de dengue documentada clínica e laboratorialmente no país ocorreu em 1983 e 1984, em Boa Vista (RR), com circulação dos sorotipos 1 e 4, sendo essa posteriormente eliminada (OSANAI *et al.*, 1983). A partir de 1986, foram registradas

epidemias em diversos estados. Estima-se, pelos inquéritos sorológicos realizados, que no Rio de Janeiro, pelo menos um milhão de pessoas tenham sido afetadas pelo sorotipo 1, nos anos de 1986 e 1987. Nesse mesmo ano, houve expansão das áreas de transmissão e foram registradas epidemias de dengue em outros estados (VASCONCELOS *et al.*, 1999).

Na década de 1990, houve agravamento do quadro epidemiológico nacional, e a introdução e expansão, em várias regiões do país, do sorotipo 2. Além da circulação dos sorotipos 1 e 2 em 18 estados, houve em 2000, o isolamento do sorotipo 3 no Rio de Janeiro (FIGUEIREDO, 2003) e mais recentemente do sorotipo 4 (ROCCO *et al.*, 2012).

Dado que a proliferação de *Ae. aegypti* depende do clima, o aumento da temperatura pode resultar em um aumento da sobrevivência, ou migração do vetor para áreas que anteriormente não possibilitavam a manutenção do mosquito. Entretanto, o clima não atua de forma isolada como sendo o único fator responsável pela intensificação do quadro epidemiológico da dengue. A expansão da transmissão de dengue nas últimas décadas relaciona-se também com o aumento da população, o processo descontrolado de urbanização e questões socioeconômicas desfavoráveis, como baixa renda e falta de infraestrutura (MURRAY *et al.*, 2013).

### **1.3 O *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) e *Aedes albopictus* (Skuse, 1894)**

Os mosquitos *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762), *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse, 1894) são os principais vetores do vírus da febre amarela e da dengue no mundo. Existem duas subespécies de *A. aegypti* ao redor do globo: *Ae. aegypti formosus* e *Ae. aegypti aegypti* os quais diferem no que diz respeito ao comportamento, ecologia, variações gênicas e suscetibilidade ao vírus dengue. (MACCLELLAND, 1974; TABACHNICK & POWELL, 1979; FAILLOUX *et al.*, 2002).

O *A. albopictus*, também chamado popularmente de “tigre asiático”, responsável pela transmissão da dengue em áreas silvestres, originou-se nas florestas do sudeste asiático e atualmente é encontrado em áreas rurais e de florestas. Raramente era visto em centros urbanos muito povoados (PAUPY *et al.*, 2001), devido à ausência de *habitats* que permitiam a proliferação da espécie, como áreas de parques e jardins residenciais (RUDNICK & HAMMON, 1960), porém a situação está mudando, sendo esse o vetor primário de dengue em algumas províncias da China (WU *et al.*, 2011).

Existem registros de casos de dengue em países da Ásia desde a década de 1950, aonde o vetor dispersou-se para áreas temperadas e tropicais. No Brasil, o primeiro foco de *A. albopictus* foi encontrado no Rio de Janeiro (FORATTINI, 1986), espalhando-se rapidamente para os demais estados do país (SANTOS, 2003). Porém, atualmente, *Ae. albopictus* é responsável pela transmissão esporádica da doença em apenas alguns países fora do continente asiático, sem que algum caso tenha sido confirmado no Brasil nos últimos anos (IBANEZ-BERNAL *et al.*, 1997).

Não existem atualmente características taxonômicas físicas definitivas entre as subespécies supracitadas de *Ae. aegypti* (FAILLOUX *et al.*, 2002). O fluxo gênico entre elas é restrito. *Ae. ae. formosus*, nativa do continente africano, de coloração escura é encontrada nas matas, provavelmente espalhou-se a partir das florestas tropicais para as áreas urbanas do leste asiático e norte do país, constituindo-se vetor de uma parcela dos casos de dengue nas matas da região oeste do continente (GUBLER, 1998). Já *Ae. ae. aegypti* possui coloração clara, localização doméstica e é antropofílica, tendo a sua distribuição pelo mundo já acima descrita.

O mosquito *Ae. aegypti* é um inseto que em sua forma adulta apresenta o corpo levemente enegrecido, com escamas ornamentais formando um padrão de manchas/faixas prateadas ao longo do corpo, com detalhe da presença de duas listras no formato de lira em seu tórax (Figura 5), com as subespécies *A. aegypti aegypti*, *A. aegypti formosus* mudando consideravelmente o padrão e a intensidade de sua coloração (GADELHA, 1985).

Possui hábitos diurnos, realiza o repasto sanguíneo especialmente durante as primeiras horas da manhã e, ao entardecer, a fêmea hematófaga atua de forma persistente sobre a sua fonte preferencial de alimentação: humanos (JANSEN, & BEEBE, 2010). Esta se alimenta mais de uma vez durante o período de oviposição (discordância gonotrófica), em especial quando é perturbada antes que tenha se alimentado por completo (BARATA *et al.*, 2001). É comumente encontrado em áreas de peridomicílio.



**Figura 5:** Fêmea do mosquito *A. aegypti* durante o repasto sanguíneo.

Fonte: <https://www.vectorbase.org/organisms/aedes-aegypti#>

Os ovos de *A. aegypti* podem ser encontrados tanto em criadouros naturais como em vãos de rochas, cascas de frutas e internódios de bambus, quanto em criadouros artificiais, que incluem caixas d'água, pneus, latas, recipientes plásticos e piscinas, entre outros (Figura 6) (PAUPY *et al.*, 2008), onde as fêmeas depositam os seus ovos na parede interna do recipiente contendo água (URDANETA-MARQUEZ *et al.*, 2010).



**Figura 6:** Criadouros naturais e artificiais de *A. aegypti*. Fonte:

[http://www.cdc.gov/dengue/entomologyEcology/m\\_habitats.html](http://www.cdc.gov/dengue/entomologyEcology/m_habitats.html)

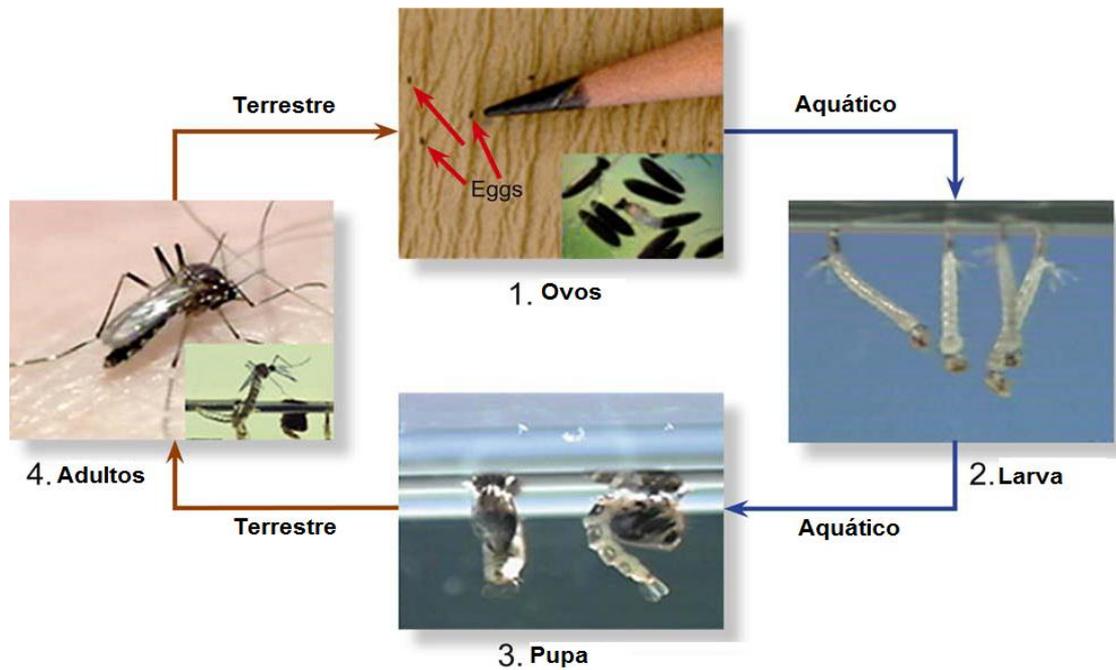
Apesar da sua localização preferencial em países tropicais e subtropicais, *A. aegypti* é capaz de suportar as mais adversas condições ambientais, já tendo sido encontrado em torno de cidades situadas no deserto indiano, onde a temperatura no verão excede o limite laboratorial suportado pelos mosquitos adultos (40°C) (CHRISTOPHERS, 1960; TAYAGI *et al.*, 2004), e também em áreas em que, no inverno, a temperatura atinge 0°C (REITER *et al.*, 2001).

A resistência deve-se principalmente à diapausa, fase em que não ocorre qualquer tipo de desenvolvimento dos ovos até que as condições favoráveis façam-se presentes, levando assim à eclosão e início do ciclo de vida (HAWLEY, 1989).

O ciclo de desenvolvimento de *A. aegypti* tem quatro diferentes estágios, sendo: ovo, larva (4 estádios: L1-L4), pupa e inseto adulto, dividido em duas fases: aquática e alada (na figura representada pelo termo “terrestre”) (Figura 7).

O ciclo tem início quando as fêmeas depositam os ovos na parede interna de depósitos com água parada, levando à eclosão dos ovos assim que estes entram em contato com a água (após o período necessário para completar o desenvolvimento do embrião no seco). Com o passar dos dias, estas larvas alimentam-se de microrganismos e matéria orgânica particulada, trocando neste período, a sua cutícula corpórea por três vezes, indo assim do estágio L1 ao L4 até realizarem metamorfose e se transformarem em pupas onde ocorre uma série de mudanças fisiológicas e anatômicas (sem que ocorra alimentação durante este período), levando ao surgimento dos mosquitos adultos, que emergem após romperem a cutícula do mesotórax, atingindo assim o meio terrestre, saindo da fase aquática para a alada.

Todo o ciclo de vida aquático do mosquito, seja ele macho ou fêmea, leva cerca de 8~10 dias (sendo que os machos geralmente completam primeiro o seu desenvolvimento) no meio ambiente, dependendo de fatores como densidade larval, a taxa de alimentação das larvas e a temperatura ambiente.



**Figura 7:** Ciclo de vida de *A. aegypti*. Duração de 15 a 20 dias em condições ideais.  
 Fonte: Modificado de [www.cdc.gov/dengue/entomologyEcology/m\\_lifecycle.html](http://www.cdc.gov/dengue/entomologyEcology/m_lifecycle.html).

#### 1.4 O controle da dengue

Por anos, a comunidade científica busca uma vacina eficaz contra a dengue. A grande dificuldade em se obter um produto final que tenha resultados satisfatórios está no fato de que existem quatro diferentes sorotipos virais conhecidos para esta doença (DENV 1-4). A reação a esses sorotipos têm sobreposição parcial, o que pode exacerbar a infecção com anticorpos subneutralizantes (GUY, *et al.*, 2011). Recentemente ainda foi descoberto o quinto sorotipo viral, tornando este processo ainda mais complicado (NORMILE, 2013).

Por décadas, pesquisadores têm buscado as mais diferentes abordagens na tentativa de criar um candidato à vacina. Atualmente a mais avançada pertence ao Sanofi Pasteur, denominada CYD-TDV, uma vacina tetravalente, recombinante, criada a partir de formas vivas atenuadas, tendo como base a linhagem vacinal 17D da febre amarela (GUY, *et al.*, 2011.)

Estudos de campo completados recentemente em uma parcela da população tailandesa demonstraram que tal vacina apresentou uma eficácia protetora de apenas 30,2%, o que

comprova mais uma vez a complexidade de se desenvolver uma vacina tetravalente contra esta arbovirose (SABCHAREON *et al.*, 2012).

Portanto, torna-se necessário buscar formas alternativas de combater a dengue. As estratégias envolvem desde o combate ativo via eliminação dos focos de água parada pela população, passando pelo manejo de produtos químicos para controle dos mosquitos, até formas mais atuais de controle que envolvem o controle biológico e a manipulação genética do vetor. Todas estas formas serão detalhadas abaixo.

#### **1.4.1 Controle mecânico do vetor**

A forma mais simples e eficiente de combater vetores responsáveis pela transmissão de patógenos é o controle ativo dos focos de criação do mosquito. A eliminação da água parada em recipientes naturais (cascas de frutas, vãos de rochas, internódios de bambus, entre outros) e artificiais (caixa d'água, pneu, vaso de planta, vaso sanitário, entre outros) evita o surgimento do mosquito adulto e com isso interrompe o ciclo de transmissão e contaminação.

Esta depende diretamente do engajamento da população para que não deixe água acumular, sendo necessários apenas 10 minutos semanais para a remoção dos focos de criação do mosquito e redução dos casos da doença, como observado em estudo realizado em Cingapura, que foi capaz de interromper o pico de epidemia no país com ações semanais da população dentro de suas residências, de apenas 10 minutos, para limpeza dos principais criadouros do *A. aegypti* (<http://www.ioc.fiocruz.br/dengue/textos/10minutos.html>).

#### **1.4.2 Controle de vetores via inseticidas de origem química**

Uma das maiores revoluções no combate aos vetores com potencial danoso a humanos foi a criação de compostos químicos com ação inseticida. Atualmente os inseticidas, cuja origem pode ser orgânica ou inorgânica, correspondem, após o controle mecânico ativo pela população, à maior parte do combate ao vetor por parte da vigilância epidemiológica em todo o mundo (ROSE, 2001).

O primeiro a ser utilizado em larga escala e com alto índice de eficiência, foi o organoclorado dicloro-difenil-tricloroetano (DDT) que, quando era utilizado em residências, permanecia ativo por um longo tempo, tendo ação desalojante e repelente (OPAS, 1997). Porém, o mesmo atualmente encontra-se banido na maioria dos países devido ao seu potencial risco danoso (não confirmado) a insetos e vertebrados (SANTACOLOMA *et al.*, 2010).

Atualmente, dentre os inseticidas mais utilizados mundialmente, destaca-se a classe dos organofosforados descobertos subsequentemente ao desenvolvimento dos organoclorados, que têm como principais representantes o temephos para o combate de larvas e o malation para o combate de insetos adultos. Existe ainda a classe dos piretroides (mais comercializados atualmente), compostos bastante estáveis e que, assim como os organofosforados, são biodegradáveis e não se acumulam em tecidos, apresentando o preço como desvantagem em relação aos demais (RODRIGUEZ *et al.*, 2005).

#### **1.4.3 Resistência a inseticidas químicos em *A. aegypti***

*A. aegypti* se encontra resistente ao DDT em praticamente todo o mundo (com exclusão de alguns países africanos), assim como resistente a alguns compostos organofosforados e piretroides, como já registrado há anos em populações de mosquitos brasileiros, asiáticos (MS, 2011).

Entretanto é necessário cautela quando se trata de resistência a DDT. Segundo Braga e Valle: “a publicação de trabalhos relacionados a este químico relatando a presença da substância no leite materno e sua associação com a ocorrência de câncer em humanos fez com que a OMS encomendasse a um grupo de especialistas, reunidos em comitê, a revisão completa da literatura sobre o inseticida. As conclusões desse comitê, apresentadas em 1993, foram no sentido de que em decorrência da falta de evidência suficiente e convincente acerca dos efeitos adversos da exposição ao DDT pelas aplicações residuais para controle de vetores, não existe justificativa toxicológica ou epidemiológica para alterar a política de uso do produto no controle da malária e leishmaniose. O documento entretanto, sugere que os países ainda usuários do DDT façam a substituição por outros inseticidas, deixando de considera-lo como única possibilidade.”

Na América Latina, também já foram relatados casos de resistência do mosquito aos compostos piretroides e organofosforados, atingida via a ação de enzimas de detoxificação e

alteração do sítio alvo (RODRIGUEZ *et al.*, 2005). Outro grande responsável pelo aparecimento de fenótipos resistentes aos organoclorados e organofosforados são mutações na enzima acetilcolinesterase. No Brasil, dados recentes indicam que há uma rápida disseminação de resistência a piretroides na população de *A. aegypti* (MARTINS *et al.*, 2009).

#### **1.4.4 Formas alternativas de controle do vetor**

O aumento do número de casos de dengue ao redor do mundo tem demonstrado que apesar do uso de inseticidas ter se mostrado eficaz em determinados contextos, faz-se necessário o uso de métodos complementares para o combate ao vetor. Os altos custos associados à aplicação dos agentes químicos podem tornar o seu uso impraticável, seja pela logística associada à aplicação nas áreas altamente urbanizadas até áreas remotas, ou pelo surgimento de casos de resistência por parte do vetor (MARCOMBE *et al.*, 2012; NKYA *et al.*, 2013).

As práticas desenvolvidas nos últimos anos focam em duas formas principais para combater a doença: a redução da população de mosquitos e o bloqueio da transmissão do vírus pelo mosquito. Associadas às medidas clássicas de combate ao vetor, estas práticas constituem atualmente as quatro principais classes de intervenção. Importante ressaltar que nenhuma abordagem por si só é perfeita. Para se ter um combate eficiente dos vetores, é necessário uma combinação das mais diferentes abordagens disponíveis.

##### **1.4.4.1 A técnica de insetos estéreis (SIT)**

A técnica de insetos estéreis (SIT em inglês) é a forma mais antiga e mais utilizada de modificação genética de vetores. Utiliza-se machos como base para o controle populacional. Estes são expostos à radiação gama ou a agentes químicos esterilizantes, o que causa uma série de danos no nível cromossômico, ou mutações dominantes letais no esperma destes indivíduos (ALPHEY *et al.*, 2010). Em seguida, faz-se a liberação maciça destes machos, em número idealmente muito superior aos machos presentes no ambiente. Após a cópula com fêmeas selvagens, não há produção de prole viável, reduzindo-se assim, ao longo do tempo, o contingente populacional de mosquitos.

Alguns pontos devem ser levados em consideração na hora da liberação de machos nesta técnica. O primeiro é a garantia de que não ocorrerá a liberação de fêmeas, pois isto acarretaria no aumento da população de vetores e até na introdução de genes mutados via esterilização. Em segundo lugar, há a probabilidade que os machos não sejam completamente estéreis. Isso faz com que haja a transferência de genes mutados para a população selvagem. Migração é outro ponto importante; caso não ocorra a eliminação total dos vetores no ambiente, novas liberações são necessárias para reduzir agora o novo contingente populacional resultante de migração entre áreas.

O controle via SIT já apresentou resultados positivos ao redor do mundo, diminuindo a população em estudo (apesar de não ter alterado a população em outros lugares). Dentre os estudos de sucesso, inclui-se a eliminação de *Anopheles albimanus*, um vetor local de malária, em uma área de 15km<sup>2</sup> em El Salvador (LOFGREN *et al.*, 1974; BENEDICT & ROBINSON, 2003). Destaque para o fato de que tal técnica é utilizada a mais de 50 anos na agricultura, apresentando resultados positivos no controle de pestes, aonde têm-se como desvantagem o fato de que os insetos estéreis precisam ser constantemente liberados no ambiente (MORRISON *et al.*, 2010).

#### **1.4.4.2 Liberação de insetos carregando um gene letal dominante (RIDL)**

A técnica de liberação de insetos carregando um gene letal dominante, ou *release of insects carrying a dominant lethal* (RIDL) em inglês, pode ser considerada como um aprimoramento da técnica de liberação de machos estéreis, desta vez tendo a fêmea como foco. Neste sistema, os machos carregam e transmitem (ao copularem com fêmeas selvagens) transgenes para a prole e conseqüentemente para a população.

Existem duas principais abordagens genéticas quando se trata de RIDL. Na primeira, o transgene construído atua reduzindo a expressão de um gene ativo na musculatura de voo das pupas do sexo feminino. Como resultado, tem-se que as filhas dos machos transgênicos liberados não conseguem voar, o que impede com que sua alimentação ou cópula no meio ambiente (FU *et al.*, 2010).

A segunda abordagem envolve um transgene que induz a morte em uma determinada etapa de vida do vetor, seja no estágio de pupa (PHUC *et al.*, 2007) ou no estágio adulto (BARGIELOWSKI *et al.*, 2011). A criação desta linhagem de mosquitos em laboratório

envolve um processo de seleção via uso de antibiótico. Nesse sistema, o transgene construído está sob controle de um repressor que é ativado na presença de tetraciclina. A vantagem desta abordagem é que o efeito sob o *fitness* do macho transgênico é menor em comparação ao SIT, visto que a transcrição do transgene só acontece em fêmeas e em promotores específicos de determinados estágios de vida (WISE DE VALDEZ *et al.*, 2011). Tal técnica já está sendo aplicada no Brasil ([www.oxitec.com.br](http://www.oxitec.com.br)).

#### **1.4.4.3 RNAi**

Existe ainda, mesmo que em estágios bem iniciais de desenvolvimento, outra abordagem genética para o bloqueio da transmissão da dengue. Trata-se do uso de RNA de interferência (RNAi) para reconhecer e degradar o RNA viral invasor, como forma de ampliar as defesas naturais do vetor.

Pesquisadores, utilizando esta técnica, foram capazes de produzir mosquitos expressando cópias inversas do RNA genômico do vírus Dengue 2. Com isto, o RNA de fita dupla gerada é capaz de ativar a resposta via RNAi, protegendo assim o vetor da colonização viral (FRANZ *et al.*, 2006). O método ainda necessita ser aperfeiçoado, visto a diminuição de sua eficácia em colônias mantidas por várias gerações em laboratório (FRANZ *et al.*, 2009).

Outra abordagem envolvendo o uso de RNAi consiste no uso de densovírus, geneticamente modificados para produzirem cópias de RNA de genes necessários para a competência vetorial no mosquito (GU *et al.*, 2011). Tal abordagem leva em consideração o fato de que RNAi inibe a transcrição de genes que apresentam um cópia de RNA de fita dupla de si próprios.

#### **1.4.4.4 *Homing Endonuclease Genes* (HEGS)**

Por fim, em se tratando de abordagens genéticas para o controle da dengue, têm-se ainda a utilização de *Homing endonuclease genes* (HEGS), os elementos genéticos do tipo egoísta. Descobertos inicialmente em bactérias, estes genes codificam endonucleases capazes de reconhecer e clivar sequências específicas de DNA de aproximadamente 30 pb. Após a

clivagem, os HEGS se introduzem nestas sequências específicas de forma a se proteger de sua própria ação de clivagem. Em heterozigotos, a HEG inserida em uma cópia do gene (um cromossomo) irá se clivar e se inserir na outra cópia deste gene, resultando em um indivíduo homozigoto. Como é possível criar HEGS capazes de clivar sequências específicas, logo há a possibilidade de se criar elementos que irão interferir diretamente nos genes envolvidos na competência vetorial (WINDBICHLER *et al.*, 2011), assim como pode-se utilizar tal abordagem com o intuito de reduzir o tamanho populacional, seja via esterilização ou redução do tempo de vida dos mosquitos (BURT, 2003; DEREDEC *et al.*, 2011). Destaca-se que tal abordagem já está sendo aplicada para *A. aegypti* (TRAVER *et al.*, 2009).

### **1.5 *Wolbachia*: um breve histórico**

A espécie *Wolbachia pipientis* foi primeiramente observada nos tecidos reprodutivos do mosquito *Culex pipiens* e deste então, define-se o gênero *Wolbachia* como sendo organismos procariotos intracelulares obrigatórios, pertencentes à ordem Rickettsiales (WEISS, & MOULDER, 1984).

O primeiro trabalho a caracterizar fidedignamente tais bactérias foi publicado em 1924. Realizado em um estudo sazonal de dissecação que incluiu machos e fêmeas de *Culex pipiens*, pelos pesquisadores Marshall Hertig e S. Burt Wolbach, a bactéria foi descrita como sendo “organismo gram-negativo, intracelular pleomórfico, em forma de bastonete, só observada nos ovários e nos testículos e que está presente nos ovos e conseqüentemente na progênie das fêmeas” (HERTIG & WOLBACH, 1924).

Na década de 1950, realizando cruzamentos com *Culex pipiens*, Ghelelovitch observou incompatibilidade em determinados cruzamentos intraespecíficos, onde havia o nascimento de poucos indivíduos ou, não raramente, nenhum (GHELELOVITCH, 1952). Posteriormente nesta mesma década, Laven determinou que este fator de incompatibilidade possuía na verdade um padrão de herança citoplasmática (herança através das fêmeas e não dos machos). Tal fator passou então a ser chamado pelos autores de “incompatibilidade citoplasmática” (LAVEN, 1951; 1959).

Foi somente 20 anos após as descobertas da década de 1950 que se fez conexão entre incompatibilidade citoplasmática e *Wolbachia*, através de um experimento no qual os autores Yen e Barr curaram uma linhagem de *Culex pipiens* com antibiótico. Com isso, voltaram a

observar a produção normal de progênie pelas fêmeas nos cruzamentos onde estas estavam infectadas e os machos curados (YEN & BARR, 1971).

O que antes havia sido observado inicialmente somente em *Culex pipiens* passou, nos anos seguintes, a ser visto nos mais diversos grupos de insetos ao redor do mundo, incluindo mariposa (BROWER, 1975), vespa (RICHARDSON *et al.*, 1987), mosca da fruta (HOFFMAN, 1988), besouro (O'NEILL, 1989), dentre outros. Os diversos tipos de manipulações fenotípicas causadas por *Wolbachia* serão descritas a seguir (STOUTHAMER, 1990).

Desde então, os avanços no que diz respeito aos estudos com *Wolbachia* têm ocorrido a passos largos, inclusive no campo da filogenia, no qual diversos autores demonstraram que independente do efeito fenotípico causado pela bactéria, ela está sempre agrupada em um grupo monofilético na ordem Rickettsiales (BREEUWER *et al.*, 1992).

## **1.6 Distribuição e filogenia de *Wolbachia***

A designação de cada cepa é baseada na identificação do hospedeiro de origem e no supergrupo pertencente (ver a seguir). Tais bactérias são encontradas presentes, segundo dados e modelos estatísticos, em 20% a 76% de todas as espécies de artrópodes (WERREN *et al.*, 1995a; JEYAPRAKASH *et al.*, 2000; ZUG & HAMMERSTEIN, 2012). *Wolbachia* também pode ser encontrada em outro grupo taxonômico, os nematódeos (ANDRÉ *et al.*, 2002).

Quando se analisa a literatura sobre *Wolbachia* fica clara a divergência em relação às análises filogenéticas do grupo (BALDO & WERREN, 2007). Inicialmente consideravam-se semelhantes os clados que não apresentassem mais que 3% de divergência entre si, segundo sequências do 16S rDNA (STACKEBRANDT & GOEBEL, 1994). Entretanto, tal critério é cada vez mais inapropriado quando se procura resolver questões filogenéticas em procariotos, tornando-se necessária a utilização de diferentes abordagens tais como: gene específicas (ZHOU *et al.*, 1998), multilocus (BALDO *et al.*, 2006), ou até mais recentemente marcadores que contenham número variado de repetições em *tandem* (RIEGLER *et al.*, 2012).

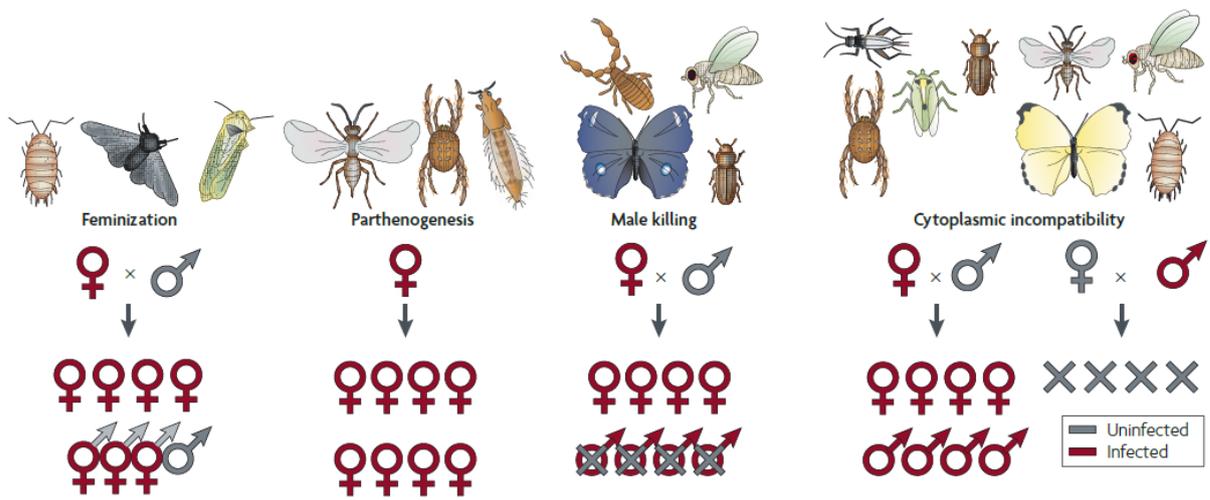
Atualmente existem 8 supergrupos/clados bem reconhecidos de *Wolbachia* (MERCOT & POINSOT, 2009), sendo os supergrupos A e B encontrados em sua grande maioria em

insetos e isópodos terrestres (WERREN *et al.*, 1995b). Recentemente descobriu-se que a classe Maxillopoda, que engloba 15.000 espécies de crustáceos terrestres, possui uma cepa em estreita relação com o supergrupo B (CORDAUX *et al.*, 2012). Os supergrupos C e D incluem somente *Wolbachia* encontrada em nematódeos (BANDI *et al.*, 1998). O supergrupo E foi descrito em 2004 em Collembolla (CZARNETZKI & TEBBE, 2004). O supergrupo F foi o primeiro no qual encontrou-se infecção em artrópodes e nematódeos, derrubando assim a hipótese de que determinado clado de *Wolbachia* infecta somente um grupo taxonômico (CASIRAGHI *et al.*, 2005). Os dois últimos supergrupos descritos, G e H, foram resultado de um estudo na Austrália envolvendo ácaros e aranhas (BORDENSTEIN *et al.*, 2005; ROWLEY *et al.*, 2004).

Existe ainda discussão envolvendo a inclusão de mais 3 supergrupos. O primeiro descrito em duas espécies de pulgas: *Ctenocephalides felis* (pulga comumente encontrada em felinos), *Orchopeas leucopus* (pulga comumente encontrada em roedores), ambos da ordem Siphonaptera. O segundo encontrado em *Dipetalonema gracile*, um nematódeo da ordem Spirurida e, o terceiro, encontrado em uma espécie de ácaro do gênero *Bryobia* (família Tetranychidae). Em todos os casos foram utilizados, como base de análise, os genes *ftsZ*, *gltA* e *groEL* (ROS *et al.*, 2009). Caso tal inclusão seja definitivamente aceita, isto aumentaria o total existente de supergrupos para 11 (I,J,K).

### **1.7 *Wolbachia* e os efeitos causados no hospedeiro**

Fica claro, ao se analisar o sucesso da dispersão de *Wolbachia* nos mais diferentes hospedeiros, que esse está diretamente relacionado a dois fatores principais: o primeiro é a eficiência com que esta é transmitida através da linhagem germinativa das fêmeas, sendo que em machos a bactéria não está presente no esperma maduro. Nestes indivíduos, a taxa de transmissão através da linhagem germinativa é da ordem de 2%, como observado em *Drosophila sp.* (HOFFMANN & TURELLI, 1988). O segundo diz respeito à manipulação do processo reprodutivo do hospedeiro via indução de uma série de fenótipos, favorecendo sempre a fêmea. Dentre os efeitos observados na natureza, têm-se: feminização, partenogênese, morte dos machos e incompatibilidade citoplasmática (Figura 8) (Tabela 1) (WERREN *et al.*, 2008).



**Figura 8:** Fenótipos induzidos por *Wolbachia* nas diferentes ordens de insetos conhecidas.

Fonte: WERREN *et al.*, 2008.

**Tabela 1: Fenótipos induzidos por *Wolbachia*, o benefício adaptativo ao simbionte e os grupos afetados.** Fonte: Adaptado de ENGELSTÄDTER, & HURST, 2009.

<b>Manipulação</b>	<b>Descrição</b>	<b>Lógica adaptativa para a manipulação</b>	<b>Grupo de hospedeiros afetados</b>	<b>Referência</b>
<b>Feminização</b>	Conversão de hospedeiros geneticamente machos, para se desenvolverem como fêmeas	Conversão de macho não transmissor da bactéria, para fêmea	Amphipoda, Acari, Crustacea, Hemiptera, Isopoda, Lepidoptera	RIGAUD, 1997; TERRY <i>et al.</i> , 1999; WEEKS <i>et al.</i> , 2001; HIROKI <i>et al.</i> , 2002; NEGRI <i>et al.</i> , 2006
<b>Partenogênese</b>	Indução do desenvolvimento de filhas assexuadas, eliminando machos do processo reprodutivo	Aumento da transmissão da bactéria via eliminação dos machos	Vários taxa haplodiplóides, incluindo Acari, Thysanoptera e Hymenoptera	HUIGENS & STOUTHAMER, 2003
<b>Morte precoce do macho</b>	Morte do hospedeiro masculino durante a embriogênese	Realocação de recursos dos machos para as fêmeas através da redução dos recursos energéticos sendo fornecidos ao embrião masculino	Pseudoscorpiones, Diptera, Lepidoptera, Coleoptera, Hemiptera, Hymenoptera	HURST <i>et al.</i> , 2003; ZEH & ZEH, 2006
<b>Morte tardia do macho</b>	Morte do hospedeiro masculino durante os estádios larvais	Ganho de transmissão horizontal do parasita a partir da linhagem masculina	Diptera, Lepidoptera	HURST <i>et al.</i> , 2003; NAKANISHI <i>et al.</i> , 2008
<b>Incompatibilidade Citoplasmática</b>	Esterilidade de cruzamentos entre machos infectados e fêmeas que são tanto não infectadas ou infectadas com uma cepa diferente	Remoção de linhagens não infectadas	Acari e Diptera	BOURTZIS <i>et al.</i> , 2003

Em mosquitos, o efeito mais importante no que diz respeito à dispersão de *Wolbachia* ao longo das gerações é a incompatibilidade citoplasmática. Descrita inicialmente em *Culex pipiens* durante a década de 1950 (LAVEN, 1951; GHELELOVITCH, 1952; LAVEN, 1959), esta divide-se em 2 formas, unidirecional e bidirecional. Na unidirecional, quando machos infectados cruzam com fêmeas não infectadas, não há a produção de descendentes viáveis. Já a incompatibilidade bidirecional acontece quando tanto o macho quanto a fêmea estão infectados com diferentes cepas da bactéria, acarretando a incompatibilidade no cruzamento entre estes hospedeiros (WERREN, 1997; SINKINS, 2004).

### **1.8 *Wolbachia* e o seu uso no controle da dengue**

Um fato interessante sobre a ampla distribuição de *Wolbachia* nos artrópodes terrestres está relacionado com a sua completa ausência em espécies de grande importância médica como *Anopheles spp.* (mais de 30 espécies, nos 4 continentes já foram analisadas) e *A. aegypti* (29,6% das 27 espécies do gênero *Aedes* analisadas estavam infectadas) que não são naturalmente infectadas por nenhuma linhagem conhecida da bactéria (TABELA 2) (JAMNONGLUK *et al.*, 2000; BROWNSTEIN, *et al.*, 2003; RASGON, J. L., 2008).

Quando se pensa na utilização de *Wolbachia* para um programa efetivo de controle de vetores, a incompatibilidade citoplasmática já citada é um dos principais componentes que permitem a rápida invasão da bactéria na população. Na década de 1960, em Myanmar e na Índia, Laven utilizou *Wolbachia* como forma de combater o mosquito *C. pipiens*, vetor da filariose (LAVEN, 1967).

**Tabela 2: Espécies de *Anopheles* e *Aedes* negativas para a presença de *Wolbachia*.** Fonte: adaptado de KITTAYAPONG *et al.*, 2000; RASGON, J. L., 2008)

<i>Anopheles gambiae s.s.s.</i>	<i>Aedes vexans</i>
<i>Anopheles funestus</i>	<i>Aedes vittatus</i>
<i>Anopheles culicifacies</i>	<i>Aedes annulirostris</i>
<i>Anopheles arabiensis</i>	<i>Aedes (Diceromyia) spp.</i>
<i>Anopheles nilili</i>	<i>Aedes assamensis</i>
<i>Anopheles pharoensis</i>	<i>Aedes chrysolineatus</i>
<i>Anopheles dirus species A &amp; B B</i>	<i>Aedes (Finlaya) spp.</i>
<i>Anopheles dravidicus</i>	<i>Aedes formosensis</i>
<i>Anopheles jamesiii</i>	<i>Aedes harveyi</i>
<i>Anopheles mouchetiti</i>	<i>Aedes (Verrallina) ssp.</i>
<i>Anopheles maculipennis</i>	<i>Aedes macfarlanei</i>
<i>Anopheles atroparousus</i>	<i>Aedes niveoides</i>
<i>Anopheles kochihi</i>	<i>Aedes pseudotaeniatus</i>
<i>Anopheles maculatus</i>	<i>Aedes lineatopennis</i>
<i>Anopheles minimus</i>	<i>Aedes vigilax</i>
<i>Anopheles sacharovi</i>	<i>Aedes aegypti</i>
<i>Anopheles superpictus</i>	<i>Aedes desmotes</i>
<i>Anopheles plumbeus</i>	<i>Aedes gardnerii imitator</i>
<i>Anopheles freeborni</i>	<i>Aedes malayensis</i>
<i>Anopheles barbirostris</i>	<i>Anopheles vagus.</i>
<i>Anopheles peditaeniatus</i>	<i>Anopheles swadwonpornini</i>
<i>Anopheles hyrcanus</i>	<i>Anopheles speditus</i>
<i>Anopheles aconitisis</i>	<i>Anopheles subpictus</i>
<i>Anopheles nivipes</i>	<i>Anopheles tessellatus</i>
<i>Anopheles pseudowillmori</i>	
<i>Anopheles varunana</i>	

Porém, a longevidade dos mosquitos também exerce papel fundamental no controle da população, visto que a maioria dos patógenos transmitidos por insetos vetores têm que passar por período de desenvolvimento no vetor antes que possa ser transmitido a um novo hospedeiro (o que denomina-se “período de incubação extrínseco”, inglês é EIP). No caso da dengue, após o repasto sanguíneo infectante do mosquito, o arbovírus deve primeiramente infectar as células do epitélio intestinal do vetor. Em seguida inicia-se o processo de maturação dos vírions, que passam das células intestinais para a hemocele, via lâmina basal, e assim infectam órgãos secundários como as glândulas salivares, de onde então poderão ser transmitidos. Estima-se que este período seja de cerca de duas semanas em *A. aegypti* (BÄCK, & LUNDKVIST, 2013). Evidências indicam que o EIP pode variar de acordo com fatores como o genótipo do vírus, genótipo do hospedeiro, além da carga viral inicial ingerida pelo vetor. Já foi demonstrado que, dependendo da linhagem viral, é possível detectar partículas virais nas glândulas salivares até mesmo 4 dias após o repasto sanguíneo infectado (SALAZAR *et al.*, 2007).

Para que fêmeas de *A. aegypti* possam contribuir para novos casos da doença, estas devem inicialmente sobreviver por mais de dois dias até que possam realizar repasto sanguíneo e, além disto, sobreviverem por um período superior ao EIP necessário para a maturação das partículas virais em seu organismo. De forma geral, observa-se que este tempo em campo é considerado longo, consumindo boa parte do tempo de vida do hospedeiro, o que faz com que só uma parcela da população (os indivíduos mais velhos) seja capaz de transmitir o vírus. Logo, estratégias que buscam a redução do tempo de vida destes mosquitos poderiam contribuir de forma efetiva para a redução da transmissão de patógenos devido à relação sensível entre sobrevivência e capacidade vetorial (COOK *et al.*, 2008).

Estudos realizados inicialmente com *Drosophila melanogaster* (MIN & BENZER, 1997) e posteriormente com *A. aegypti* (MOREIRA *et al.*, 2009a; BIAN *et al.*, 2010), após introdução artificial da cepa patogênica de *Wolbachia*, denominada *popcorn* ou *wMelPop* através da técnica de microinjeção em embriões do mosquito (MCMENIMAN *et al.*, 2009) e adaptação da bactéria em linhagens de células (MCMENIMAN *et al.*, 2008), demonstraram que quando estes hospedeiros estavam infectados, havia redução de cerca de 50% no tempo de vida dos mesmos. A redução da sobrevivência foi atribuída ao fato de *wMelPop* se replicar a níveis elevados, nos mais diversos tecidos do hospedeiro, incluindo o sistema nervoso central e o tecido gorduroso (MIN & BENZER, 1997; DOBSON *et al.*, 1999).

Demonstrou-se ainda que além de reduzir a longevidade dos mosquitos infectados, *Wolbachia* é capaz de reduzir de forma quase completa a carga viral, com este efeito tendo relação direta com a cepa em questão. A cepa *wMel* possui efeitos mais brandos tanto no hospedeiro quanto no vírus (não reduzindo drasticamente a longevidade do mosquito e não bloqueando totalmente a replicação viral). Já a cepa *wMelPop* por sua vez é mais agressiva com relação ao hospedeiro e ao vírus (MOREIRA *et al.*, 2009b; BIAN *et al.*, 2010; WALKER *et al.*, 2011).

Logo, é possível a utilizar as cepas acima citadas como forma de controle biológico de *A. aegypti*, as quais reduziriam a transmissão da dengue via bloqueio ou diminuição da replicação viral (SINKINS & O'NEILL, 2000; BROWNSTEIN, *et al.*, 2003; MCMENIMAN *et al.*, 2009). Tal método inclusive já está em aplicação em diversos países do mundo seguindo padrão de estudo similar ao utilizado na Austrália onde o projeto teve início com o trabalho de campo consistindo em uma fase inicial de caracterização da população local de mosquitos seguida de liberações programadas e monitoradas na natureza de mosquitos contendo *Wolbachia*. Após aprovação das agências regulatórias australianas, os trabalhos de liberação de *A. aegypti* contendo *Wolbachia* se iniciaram em janeiro de 2011. Foi realizado 1 mês de supressão (pela coleta massal de ovos) da população local de mosquitos (para assegurar que não haveria um aumento considerável do número de mosquitos após as liberações) seguido por 10 liberações semanais de aproximadamente 10.000-20.000 mosquitos adultos com *Wolbachia* a cada liberação, em duas localidades.

Foi verificado que após liberação em campo na Austrália de espécimes de *A. aegypti* contendo *Wolbachia*, em poucas gerações a bactéria se disseminou por toda a população de mosquitos das localidades sob ensaio (WALKER *et al.*, 2011). Os mosquitos com *Wolbachia* passaram a bactéria para as próximas gerações. Até hoje – 2013 - cerca de 95 - 100% da população de *A. aegypti* destas duas localidades se mantém positiva para a bactéria.

## **1.9 O programa “eliminar a dengue”**

O Programa “eliminar a dengue” consiste de uma série de projetos de pesquisa operando em diferentes países, sob um tema comum de tecnologia: o uso da infecção da bactéria *Wolbachia* para controlar a transmissão de dengue por mosquitos. Atualmente o programa, iniciado na Austrália, tem parcerias com uma ampla gama de instituições internacionais. Disponibiliza metodologias de aplicação desta abordagem para a

implementação da tecnologia do método de uso de *Wolbachia* para controlar a dengue. É apoiado por uma diversa rede de financiadores, da qual a Fundação Bill e Melinda Gates tem papel majoritário. Cada projeto local funciona de forma independente, mas situa-se sob um programa científico comum que permite a transferência de tecnologia através de projetos, possibilitando avanço mais rápido do programa como um todo. Atualmente estão em curso projetos na Austrália, Brasil, China, Colômbia, Indonésia, e Vietnã ([www.eliminatedengue.org](http://www.eliminatedengue.org)).

## 2 JUSTIFICATIVA

Dentre as doenças transmitidas pelo mosquito *A. aegypti* ao redor do mundo, a dengue se destaca como uma das mais frequentes em número de casos, e conseqüentemente, de maior relevância à saúde pública. Nos últimos anos estima-se que, em todo o mundo, principalmente em regiões tropicais e subtropicais, existam 2,5 bilhões de pessoas, dois quintos da população mundial, vivendo em áreas de risco de transmissão epidêmica e que 50 milhões de novos casos sejam diagnosticados a cada ano, com pelo menos 500.000 casos de dengue grave e aproximadamente 12.500 óbitos, principalmente crianças (WHO, 2009).

Devido à inexistência de uma vacina contra a dengue, o controle do vetor é uma forma eficaz de se combater a doença, e dado o aumento de casos de resistência a inseticidas por parte dos vetores, inclusive no Brasil, torna-se de extrema relevância a busca de formas alternativas de controle da dengue.

Uma nova abordagem para o controle da dengue recém-proposta teve como alvo inicial o tempo de vida do mosquito, ao invés do número absoluto de indivíduos (abundância). Esta se baseia na introdução de uma cepa da bactéria *Wolbachia pipientis*, bactéria intracelular maternalmente transmitida, (a wMelPop), que causa redução na longevidade da população de *A. aegypti*. Após o repasto sanguíneo infectante do mosquito, o arbovírus deve primeiramente infectar as células do epitélio intestinal do vetor. Em seguida inicia-se o processo de maturação dos vírions fazendo com que estes necessitem se disseminar das células intestinais para a hemocele, via lâmina basal, e assim possam infectar órgãos secundários como as glândulas salivares aonde então poderão ser transmitidos. Estima-se que este tempo seja de cerca de duas semanas em *A. aegypti* (BÄCK, & LUNDKVIST, 2013). Este período de incubação extrínseco do vírus no organismo do mosquito vetor é longo (cerca de 15 dias), em comparação com a longevidade do inseto (cerca de 30 dias no campo). Assim,

a infecção por *Wolbachia*, com potencial de se disseminar pela população de mosquitos e causar redução na longevidade de *A. aegypti*, pode resultar em redução da transmissão de patógenos sem que seja necessário eliminar a população de mosquitos (BROWNSTEIN *et al.*, 2003; RASGON *et al.*, 2003; COOK *et al.*, 2008).

Mais recentemente foi descoberto que certas cepas dessa bactéria bloqueiam o desenvolvimento de patógenos (MOREIRA *et al.*, 2009; WALKER *et al.*, 2011), o que veio colocar o bloqueio como estratégia principal de controle dos patógenos transmitidos por *A. aegypti*, em se tratando de uso de *Wolbachia* como forma de controle alternativo da dengue.

McMeniman e colaboradores introduziram com sucesso, uma cepa de *Wolbachia* originária de *D. melanogaster* (*wMelPop*) em *A. aegypti* (MCMENIMAN *et al.*, 2009), mosquito que não hospeda naturalmente essa bactéria. Posteriormente verificou-se que mosquitos infectados com a bactéria têm sua competência vetorial severamente comprometida, com grande taxa de bloqueio à infecção pelos vírus dengue e Chikungunya (MOREIRA *et al.*, 2009a). Entretanto, foi mostrado que essa mesma cepa de *Wolbachia* (*wMelPop*) compromete a viabilidade do mosquito vetor, o que poderia reduzir a chance do inseto se multiplicar na natureza (MOREIRA *et al.*, 2009b). Logo, outra linhagem de *A. aegypti* foi então gerada, desta vez contendo a cepa *wMel*, também originária de *Drosophila*. Esta cepa tem a vantagem de bloquear o vírus dengue no organismo do mosquito sem alterar seu desempenho biológico (WALKER *et al.*, 2011), característica comprovada com a sua disseminação eficiente em ensaio em campo (HOFFMANN *et al.*, 2011). Como discutido anteriormente, a cepa *wMel* não causa redução da longevidade, mas esse efeito perdeu importância após a comprovação de bloqueio aos patógenos (MOREIRA *et al.*, 2009a).

Contudo, para prever se a *Wolbachia*, ao longo das gerações, será capaz de se fixar na população de campo, torna-se necessário analisar precisamente os parâmetros acima citados, além de outros como a fecundidade e a fertilidade das fêmeas infectadas, dentro do *background* genético da população em estudo, no caso mosquitos brasileiros provenientes de diferentes localidades do Rio de Janeiro (Paquetá, Jurujuba (Niterói) , Tubiacanga, Belford Roxo, Vila Valqueire), cidade sede para início do projeto no país. O *background* genético pode influenciar diretamente os efeitos no *fitness* do hospedeiro causados pela *Wolbachia*, como ação direta sobre a incompatibilidade citoplasmática e a densidade bacteriana (KONDO *et al.*, 2005; SINKINS *et al.*, 2005, YEAP *et al.*, 2011).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos das cepas *wMel* e *wMelPop* de *Wolbachia* sobre as populações naturais de mosquitos *A. aegypti* provenientes do Rio de Janeiro.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Realizar o retrocruzamento entre as populações de mosquitos naturais do Rio de Janeiro e as populações provenientes da Austrália, uma infectada com a cepa *wMel* e outra com a cepa *wMelPop*.
- Avaliar os efeitos da cepa *wMel* sobre:
  - a. Tempo de desenvolvimento de imaturos
  - b. Fecundidade
  - c. Fertilidade
  - d. Longevidade
  - e. Incompatibilidade citoplasmática
  - f. Tamanho corpóreo dos adultos (morfometria)
  - g. Níveis teciduais de glicogênio
  - h. Curso da infecção de *Wolbachia* ao longo do tempo de vida do mosquito
  - i. Taxa de transmissão materna
- Avaliar os efeitos da cepa *wMelPop* sobre:
  - a. Tempo de desenvolvimento de imaturos
  - b. Tamanho corpóreo dos adultos (morfometria)
  - c. Níveis teciduais de glicogênio

## 4 MÉTODOS

### 4.1 Manutenção de colônias de mosquitos

Todos os estágios das colônias retrocruzadas e as colônias de mosquitos brasileiros (descritas a seguir) foram mantidas em um sistema controlado, a temperatura média de  $27 \pm 1^\circ\text{C}$ , umidade de  $70 \pm 10\%$  e fotoperíodo de 12:12 horas. Os ovos foram eclodidos em bandejas de plástico (40,8 cm x 29 cm x 12,8 cm) contendo aproximadamente 3 litros de água filtrada e desclorada. As larvas foram alimentadas a cada dois dias com um tablete de ração para peixe Tetramin<sup>®</sup> Tropical Fish Food tablets (Tetra, Blacksburg, Alemanha, Cat. No. 16110-03).

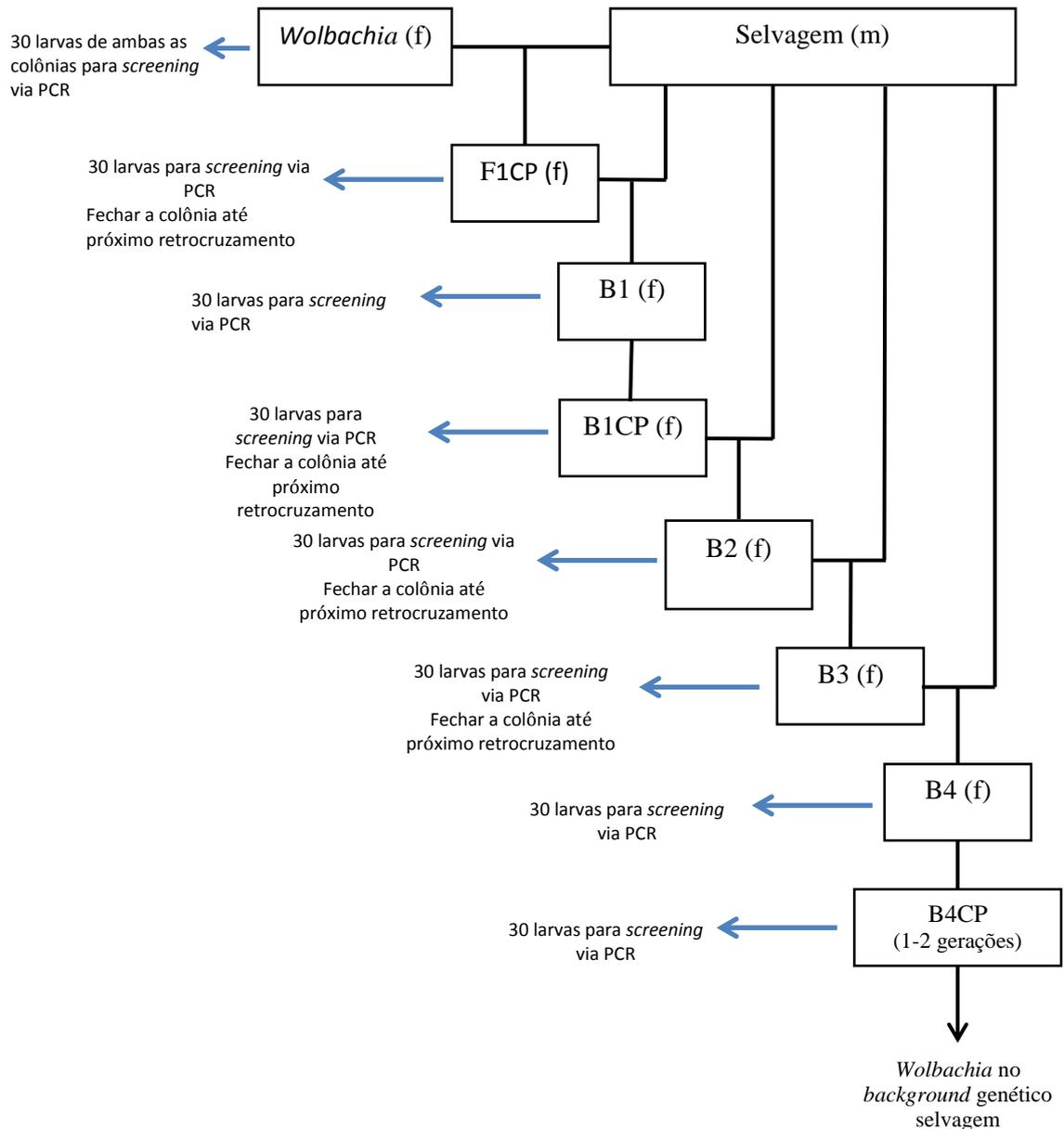
Aos mosquitos adultos foi disponibilizada solução de sacarose 10% *ad libitum*, e as fêmeas foram alimentadas, cerca de uma semana após terem emergido, para produção de ovos, com sangue humano, proveniente de banco de sangue, previamente testado para a presença do vírus dengue pelo kit Dengue NS1 Ag Strip<sup>®</sup> (BioRad Laboratories, California, EUA, Cat. No. 70700). Três dias após o repasto sanguíneo, foi colocado no interior da gaiola um recipiente de 6 cm de diâmetro contendo água filtrada, desclorada e papel filtro cilíndrico para que as fêmeas realizassem a postura dos ovos. Após 72 h, este recipiente foi retirado e os ovos armazenados em copos plásticos telados por 48 h no ambiente do insetário, para completar a embriogênese. Após esta etapa, as fitas de postura contendo os ovos foram envoltas em papel toalha e armazenadas em sacos plásticos tipo *ziplock*, devidamente identificados.

### 4.2 Retrocruzamento *wMelPop* e *wMel*

A linhagem de mosquitos infectados com a cepa *Popcorn* de *Wolbachia* (*wMelPop*) foi gerada por meio do cruzamento de uma linhagem não infectada de mosquitos brasileiros (provenientes do campo; daqui para frente estes mosquitos serão chamados de Br e serão o grupo controle nos experimentos) com uma linhagem de mosquitos australianos infectados pela cepa *wMelPop*. Os mosquitos brasileiros não infectados por *Wolbachia* foram obtidos em 2012, a partir de milhares de ovos coletados em ovitrampas instaladas em quatro localidades

diferentes do estado do Rio de Janeiro, (Brasil): o município de Belford Roxo e os bairros de Paquetá, Jurujuba (em Niterói) e Tubiacanga. As linhagens infectadas por *Wolbachia* foram importadas da Austrália (licença IBAMA 11BR005873/DF), em colaboração com a Universidade de Queensland, Austrália, após infecção artificial de *A. aegypti*, via microinjeção nos embriões e manutenção em laboratório (MCMENINAM *et al.*, 2009). O mesmo procedimento foi realizado para a cepa *wMel* de *Wolbachia*, com a diferença de que a fonte de mosquitos de campo de Belford Roxo foi substituída pelo bairro de Vila Valqueire, também do Rio de Janeiro. O grupo controle utilizado nos experimentos consistiu-se de mosquitos retrocruzados tratados com antibiótico tetraciclina (*wMelTET*) (item 4.3).

Foram utilizadas, a cada geração, 250 fêmeas australianas infectadas virgens e 200 machos brasileiros não infectados na geração parental. Nas gerações seguintes, utilizou-se 250 fêmeas filhas do cruzamento inicial. O elevado número de indivíduos ajude a minimizar qualquer ameaça de deriva genética. Esta possui maior efeito sob populações de tamanho reduzido, as quais apresentam baixa diversidade genética e por consequência, maior susceptibilidade a variações ambientais (KLIMAN *et al.*, 2008). Após o cruzamento inicial, 50% do “*background* genético” desses descendentes (chamados de “F1C” no esquema) serão da população de *A. aegypti* de campo (Figura 9).



**Figura 9:** Revisão esquemática do processo de retrocruzamento utilizado para transferir *Wolbachia* para o *background* genético brasileiro. “m” representa indivíduos do sexo masculino e “f” indivíduos do sexo feminino. “B” representa geração retrocruzada (no inglês “*backcrossed*”), “CP” representa geração fechada. Indivíduos copulando entre si e não com parentais (do inglês “*closed population*”).

## 4.3 Monitoramento da infecção por *Wolbachia*

### 4.3.1 Monitoramento de *wMelPop* via PCR convencional

A infecção por *Wolbachia* foi monitorada a cada geração retrocruzada para conter qualquer contaminação em potencial (na PCR em tempo real acompanhou-se também a densidade bacteriana, item 4.3.2), de forma que para a cepa *wMelPop*, este monitoramento foi realizado via PCR convencional utilizando-se o gene da proteína de superfície de *Wolbachia* (*wsp*) (BRAIG *et al.*, 1998).

Brevemente, o DNA total de 30 fêmeas aleatoriamente selecionadas a cada geração da colônia foi extraído individualmente via homogeneização em 80 µL de “*Squash buffer*” (4 mM EDTA, 20mM Trisbase, 0,4 mM NaCl) usando Mini-Beadbeater-16 (BioSpec, Bartlesville, Oklahoma; Cat. No. 607) onde adicionou-se a cada tubo uma esfera de vidro e macerou-se as amostras utilizando o Mini-Beadbeater por 1 min e 30 seg. Em seguida, centrifugou-se as amostras por 30 seg a 4°C e 16.000 g, incubou-se por 10 min a 97° C em banho seco seguido de incubação das amostras em gelo por 15 min e por fim, centrifugação por 10 min a 4° C e 16.000 g. Do produto final, retirou-se 10 µL do sobrenadante que foram adicionados a 90 µL de água mili-Q estéril. As reações de PCR foram realizadas no termociclador Veriti® (Applied Biosystems, Carlsbad, CA) utilizando *primers* previamente descritos na literatura que amplificam um fragmento de 201 pares de base (pb) do gene *wsp* (WSPqPCR *forward*: 5'- ATC TTT TAT AGC TGG TGG TGG T -3'; e WSPqPCR *reverse*: 5'- GGA GTG ATA GGC ATA TCT TCA AT -3') (MOREIRA *et al.*, 2009a). Como controle positivo, de forma a confirmar a presença de DNA molde na amostra extraída, utilizou-se *primers* que amplificam um fragmento de 302 pb do gene ribossomal S17 de *A. aegypti* (RPS-17 *forward*: 5'- CTG GAG ATT TTC CGT TGT CA - 3'; e RPS-17 *reverse* 5'-GAC ACT TCC GGC ACG TAG TT- 3') (MOREIRA *et al.*, 2009). O volume total da reação foi de 15 µL, consistindo de 0,2 µM de concentração final para cada *primer* (*forward* e *reverse*), 200 nM dNTPs, 20 mM Tris-HCL (pH 8,0), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> e 1 unidade de Taq polimerase (Invitrogen, Grand Island, NY; CAT. No. 11615-010) e aproximadamente 20 ng de DNA molde. A amplificação em termociclador consistiu dos seguintes passos: desnaturação inicial a 95° C por 5 min; seguida de 35 ciclos de: 95° C por 30 seg, 55° C por 30 seg e 72° C por 30 seg, e como passo final, extensão por 72° C por 5 min. Os produtos de PCR foram aplicados em gel de agarose a 2%, junto com marcador de peso molecular de 100 pb (Promega, Madison, WI; Cat. No. G2101) e visualizado por coloração com brometo de

etídio (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA, Cat. No E7637) e/ou gelred (Biotium, Hayward, CA, Cat. No 41002) na diluição de 1:10.000.

#### 4.3.2 Monitoramento de *wMel* via PCR em tempo real

O processo de monitoramento da infecção por *Wolbachia* no retrocruzamento envolvendo a cepa *wMel* foi realizado via qPCR utilizando o sistema de PCR em Tempo Real 7500 (Applied Biosystems, Carlsbad, CA) onde a extração do DNA ocorreu da mesma forma que a acima descrita para a cepa *wMelPop*. A quantificação relativa de *Wolbachia* ocorreu utilizando-se os mesmos *primers* utilizados acima na PCR convencional. Uma reação de dois passos foi realizada nas seguintes condições de amplificação: desnaturação inicial a 95 °C por 10 min seguida de 35 ciclos de 95° C por 15 seg e por fim, 60° C por 30 seg. O volume total da reação foi de 10 µL, contendo SYBR Green PCR Master Mix 2x (Applied Biosystems, Carlsbad, CA; Cat. No. 4309155). Cada *primer* (*forward* e *reverse*) foi adicionado a uma concentração final de 0,5 µM, e aproximadamente 20 ng de DNA foram utilizados em cada reação. Cada amostra foi analisada em duplicata para os genes *wsp* e *rps17* via método de quantificação relativa  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ .

#### 4.4 Geração de uma linhagem de *A. aegypti* curada da infecção por *wMel*

A colônia retrocruzada de *wMel* foi curada de sua infecção por *Wolbachia* via um tratamento sucessivo das fêmeas e machos adultos com o antibiótico tetraciclina, como previamente descrito (YEN & BARR, 1973; DOBSON *et al.*, 2001). Os mosquitos adultos foram expostos *ad libitum* a uma concentração final de 0,1 mg/mL de hidrocloreto tetraciclina (Sigma, St Louis, MO; Cat. No. T3383) em solução açucarada a 10%, por aproximadamente 10 a 14 dias, durante três gerações consecutivas. Em torno de mil adultos foram tratados a cada geração, de forma a minimizar os efeitos de deriva genética. Em cada geração, 24 fêmeas e 12 machos, escolhidos aleatoriamente, foram analisados usando PCR em tempo real como descrito anteriormente (ver subitem 4.3.2), para detectar a presença de *Wolbachia*.

A colônia curada da infecção foi mantida nas mesmas condições de criação das demais larvas no insetário (ver item 4.1). Após a retirada da tetraciclina da colônia de *A. aegypti*

tratada com o antibiótico, os experimentos foram iniciados depois de duas gerações de manutenção da mesma, como forma de permitir a reaquisição de qualquer microbiota ambiental associada anteriormente a estes mosquitos, além da recuperação de qualquer possível efeito colateral devido ao tratamento com antibiótico.

#### **4.5 Criação das larvas sob diferentes condições de *stress***

Foram utilizadas como base para os experimentos abaixo descritos (exceto incompatibilidade citoplasmática e curso da infecção) três densidades larvais intraespecíficas. Estas consistiram de 10 larvas, 50 larvas e 250 larvas. As larvas foram separadas no estágio larval L1, 1 hora após eclosão dos ovos em 1 litro de água filtrada, desclorada, em bacias de (27 cm x 20 cm x 10 cm) para os experimentos com a cepa *wMelPop*. As larvas infectadas pela cepa *wMel* de *Wolbachia* passaram pelo mesmo processo, com a diferença de que foram criadas em potes redondos (ovitrampas) em um volume de 150 mL de água filtrada e desclorada (10 cm x 8,8 cm).

Cada larva necessita diariamente de 0,25 mg de ração de peixe para o seu desenvolvimento ideal (YEAP *et al.*, 2011). Como forma de alimentação, cada bacia referente à densidade larval específica, recebeu diariamente 2,5 mg de uma mistura de duas rações para peixe (Goldfish Colour, Alcon, Camboriú, Santa Catarina, Cat. No. 0504-2; Tetramin® Tropical Fish Food flakes (Tetra, Blacksburg, Alemanha, Cat. No. 77102-18), independente da densidade larval estudada. Cada densidade foi replicada 5 vezes nos experimentos com a cepa *wMelPop* e o grupo controle. Para a cepa *wMel* e o seu controle *wMelTET*, a densidade de 10 larvas possuiu 40 réplicas, a densidade de 50 larvas possuiu 10 réplicas e a última densidade de 250 larvas teve ao todo 5 réplicas.

##### **4.5.1 Tempo de desenvolvimento larval**

Ovos das linhagens retrocruzadas infectadas com *Wolbachia* (*wMelBr* e *wMelPopBr*) e linhagens livre de infecção (*wMelTET* e *Br*, respectivamente) foram eclodidos de forma sincronizada em recipientes separados, em água filtrada e desclorada, por 1 h.

Após a eclosão, larvas de primeiro estágio (n = 10, 50 e 250) foram separadas em bacias como descrito acima (item 4.5). Análises a cada 24 h foram realizadas para determinar o número de dias que cada larva levou para atingir o estágio de pupa. O sexo de cada pupa era analisado a cada 24 h. Todos os dados do tempo de desenvolvimento de imaturos para cada cepa foram analisados de forma conjunta utilizando o teste de Kruskal-Wallis (após teste de normalidade dos dados) seguido por uma comparação par a par utilizando-se o teste de Dunn para determinar qual grupo diferenciou significativamente um do outro, via *software* PRISM versão 5.03 (GraphPad, San Diego, CA).

#### **4.5.2 Longevidade**

Para investigar os efeitos da *Wolbachia* sobre o tempo de vida dos mosquitos, o gênero de pupas de *wMel* e do grupo controle *wMelTET* foi identificado e as fêmeas colocadas em gaiolas contendo 30 indivíduos por densidade alvo testada na fase larval (10, 50 e 250). Aos mosquitos foi disponibilizada solução açucarada 10% *ad libitum*, e a mortalidade em cada gaiola foi monitorada diariamente, removendo-se os indivíduos que morriam, até que todos tivessem sido removidos. Os dados de sobrevivência foram analisados de forma conjunta utilizando o teste de Log-Rank (Mantel-Cox).

#### **4.5.3 Fecundidade e fertilidade**

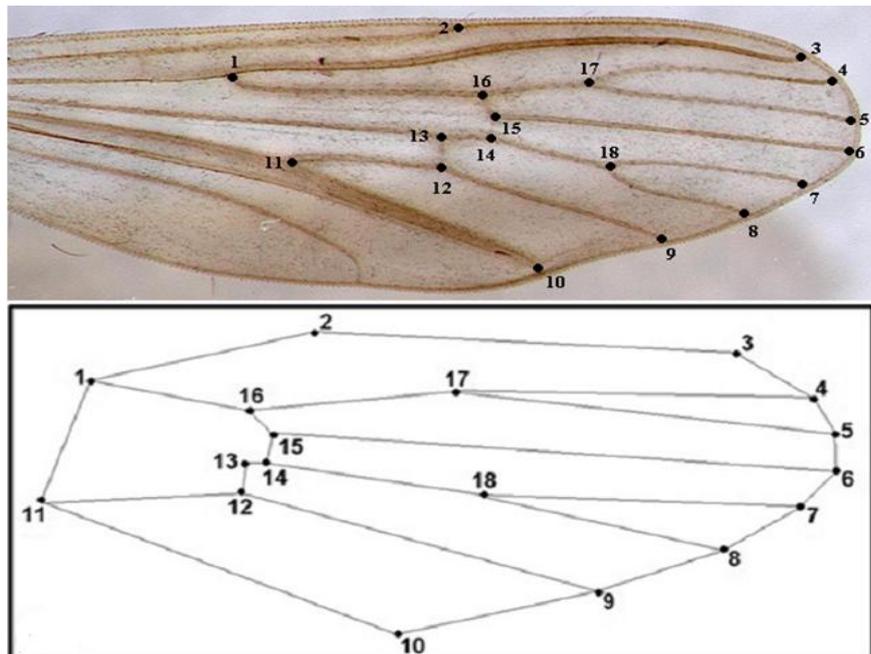
Pupas referentes às densidades larvais de 10, 50 e 250, infectadas ou não por *Wolbachia*, tiveram seu gênero identificado e cada sexo colocado na proporção de 30 fêmeas e 30 machos por gaiola. Após a emergência, aos adultos foi disponibilizada solução açucarada 10% *ad libitum*, e após uma semana de vida, as fêmeas passaram por repasto sanguíneo artificial e foram individualizadas em tubos de cerca de 10 cm de altura contendo algodão umedecido com água e papel filtro circular, para oviposição. Após 72 h, retirou-se o papel de postura e contabilizou-se o número total de ovos por fêmea/densidade larval (fecundidade). O processo foi repetido por um total de 3 ciclos gonotróficos, com as fêmeas individualizadas nos tubos contendo algodão umedecido com solução açucarada 10% *ad libitum* e retirado apenas 24 h antes do repasto sanguíneo.

Para a análise de fertilidade de cada fêmea, ovos provenientes de cada ciclo gonotrófico foram secos em câmara úmida por 3 dias, em seguida armazenados em câmara seca por mais 3 dias e colocados individualmente para eclosão em água desclorada. Após um período de 48h pós-eclosão, contabilizou-se o número de ovos eclodidos por fêmea, que foram então analisados entre os grupos, pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis para o dado de fecundidade proveniente do experimento de incompatibilidade citoplasmática. Já para os dados de fecundidade provenientes dos 3 ciclos gonotróficos, normalizou-se os dados via transformação log, onde a normalidade foi testada via teste de Shapiro-Wilk. Em seguida, analisou-se via MANOVA o número médio de ovos. O sucesso de oviposição foi analisado através de regressão logística.

#### **4.5.4 Morfometria**

O tamanho corpóreo do mosquito correlaciona-se diretamente com o tamanho de sua asa (JIRAKANJANAKIT *et al.*, 2007; LORENZ, 2012). Fêmeas de *wMelBr* e *wMelPopBr*, juntamente com os grupos controle tiveram suas asas direitas removidas e tratadas manualmente de forma a remover as escamas, antes de serem montadas em lâminas. As fotos das asas foram capturadas utilizando-se câmera AxioCam MRc Zeiss (Carl Zeiss, Jena, Alemanha) acoplada ao estereomicroscópio Stemi SV 6 (Carl Zeiss, Jena, Alemanha) com o aumento de 30,2 vezes via *software* AxioVision 4.8.1.0 (Carl Zeiss, Jena, Alemanha).

Marcou-se dezoito pontos de referência nas asas de cada indivíduo utilizando o *software* tpsDIG2 v. 2.17 (JAMES ROHLF, 2013), de forma que as coordenadas de cada imagem foram utilizadas para calcular o tamanho do centroide e conseqüentemente, o tamanho corpóreo das fêmeas (Figura 10)



**Figura 10:** Asa direita de *A. aegypti* demonstrando a marcação digital dos 18 pontos para análise do tamanho do centroide.

O comprimento das asas foi estimado utilizando-se medidas isométricas do tamanho do centroide, o qual representa a raiz quadrada da soma dos quadrados das distâncias euclidianas entre os pontos de referência e o centroide (ponto médio no interior de uma forma geométrica que define o seu centro geométrico e dado pela média das coordenadas de cada ponto nos eixos x e y) (BOOKSTEIN, 1991). Para tal, utilizou-se os *softwares* tpsUtil v. 1.58, TpsRelw 1.53 (JAMES ROHLF, 2013) e Prisma v. 5.03 (Graphpad), onde realizou-se uma análise par a par, sendo que os grupos que passaram no teste de normalidade foram analisados via teste T não pareado quando o tamanho amostral e variância dos grupos diferiram entre si. Utilizou-se teste T com correção de Welch quando os grupos apresentaram o mesmo tamanho amostral mas com valores distintos de variância. Usou-se o teste de Mann-Whitney no caso das amostras que não apresentaram distribuição normal.

## 4.5.5 Dosagens teciduais

### 4.5.5.1 Quantificação de glicogênio em *wMelPopBr*

A quantificação de glicogênio na cepa *wMelPop* de *Wolbachia* foi feita com base no método criado por Handel e Jonathan (HANDEL & DAY, 1988) com pequenas alterações. Brevemente, fêmeas de *A. aegypti* correspondentes a cada tratamento (indivíduos infectados e não infectados por *Wolbachia* em diferentes condições de criação de densidade larval) foram individualmente dispostas em tubos de 1,5 mL e maceradas em 200 µL de solução de sulfato de sódio 2% usando Mini-Beadbeater-16 (BioSpec, Bartlesville, Oklahoma; Cat. No. 607), por 1 min e 30 seg, após adição, a cada tubo, de uma esfera de vidro.

Em seguida, transferiu-se todo o volume para um novo tubo de ensaio de vidro (10 x 100 mm). Os tubos foram lavados duas vezes com 800 µL de solução de clorofórmio/metanol 1:1 (v/v) e centrifugados a 6.000 g por 1 min. Transferiu-se o sobrenadante (contendo açúcar e lipídeo) para um novo tubo de ensaio de vidro (10 x 100 mm) com marcação indicando a volumetria de 5 mL e reteve-se o *pellet* do tubo anterior para quantificação de glicogênio. Adicionou-se 600 µL de água deionizada ao sobrenadante e homogeneizou-se, centrifugando em seguida a 6.000 g por 1 min. Após isto, separou-se a fração superior para a dosagem de açúcares totais e a fração inferior (contendo clorofórmio) para a dosagem de lipídeos.

Para a dosagem de glicogênio, adicionou-se a solução do reagente Anthrone [150 mL água deionizada, 380 mL ácido sulfúrico 98%, 750 mg reagente Anthrone (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA, Cat. No 319899) até a marca de 5 mL e homogeneizou-se o tubo manualmente. Aqueceu-se a solução por 15-20 min em banho seco 90° C. Após isto, removeu-se a solução do banho seco, que esfriou à temperatura ambiente por 40 min, para estabilização. Por fim, colocou-se 350 µL do volume total em microplaca de ELISA para determinar OD a 525 nm e analisou-se µg glicogênio vs. OD para calibrar a curva padrão (feita a partir de diluição seriada de solução de glicose 1 mg/ mL; contendo 25; 50; 100; 150 e 200 µg de glicose).

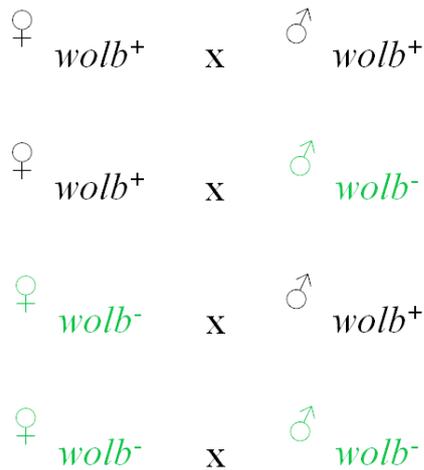
#### 4.5.5.2 Quantificação de glicogênio em *wMelBr*

Para a quantificação de glicogênio com a cepa *wMel*, utilizou-se um processo de dosagem mais rápido e simples antes por nós desconhecido, agilizando o trabalho. Fêmeas de *A. aegypti* correspondentes a cada tratamento foram homogeneizadas em 100  $\mu\text{L}$  de tampão acetato de sódio 200 mM, pH 4,8. Os homogenatos foram então submetidos à centrifugação a 2000 g por 10 minutos e 40,0  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foram recolhidos em duplicata em tubos de ensaio contendo 120  $\mu\text{L}$  acetato de sódio. Quarenta microlitros (40  $\mu\text{L}$ ) da enzima  $\alpha$ -amiloglucosidase (1,0 mg/mL) foram adicionados e incubou-se este meio a 40°C por 4 horas. Aos tubos foram adicionados 300  $\mu\text{L}$  fosfato de sódio pH 7,4. Em seguida, 500  $\mu\text{L}$  de Glucox 500 (a 15 mg/mL) (Doles, Goiânia, Goiás, Registro no M.S: 10231810011) foram adicionados e incubados a 37°C por 15 minutos. A leitura das amostras foi realizada em espectrofotômetro (UVmini-1240;SHIMADZU, Kyoto, Japão) a 510 nm. Calculou-se o conteúdo de glicogênio nas fêmeas com base em uma curva padrão de glicogênio submetido às mesmas condições do ensaio contendo 8 pontos de diluição seriada.

O conteúdo de proteínas totais foi quantificado via método de Bradford (BRADFORD, 1976) utilizando-se o corante “Coomassie brilliant blue” BG-250 e albumina do soro bovino (BSA) para a calibração com curva padrão contendo 7 pontos de uma diluição seriada

#### 4.6 Incompatibilidade citoplasmática

Os cruzamentos foram feitos entre adultos curados com o antibiótico tetraciclina da infecção por *Wolbachia* (*wMelTET*) e indivíduos retrocruzados infectados (*wMelBr*). Pupas de cada linhagem tiveram seu sexo determinado via análise visual de sua terminália. Cinquenta pupas do sexo masculino e 50 do sexo feminino foram colocadas juntas em uma única gaiola (cada gaiola representando um cruzamento específico) (Figura 11) por um período de cinco dias para que os adultos copulassem livremente entre si. No quinto dia, as fêmeas de cada gaiola passaram por repasto sanguíneo com alimentadores artificiais por 1 hora. Vinte e quatro horas após o repasto, 30 fêmeas foram removidas das gaiolas e colocadas individualmente em placas de Petri contendo papel de filtro umedecido com 5 mL de água filtrada e desclorada para oviposição.



**Figura 11: Cruzamentos realizados no experimento de incompatibilidade citoplasmática.**  $wolb^+$  representa indivíduos infectados por *Wolbachia*.  $wolb^-$  representa indivíduos não infectados.

Após dois dias, contou-se o número total de ovos colocados por cada fêmea tirando-se uma foto de cada papel filtro e analisando-se o número de ovos via *software* EggCounter v.1.0 (MOLLAHOSSEINI *et al.*, 2012). Os ovos foram então colocados para secar por uma semana. Após isto, os ovos foram colocados para eclodir em 5 mL de água filtrada e desclorada por um período de 48h, onde contabilizou-se individualmente o número de ovos eclodidos utilizando estereomicroscópio. As fêmeas que não colocaram nenhum ovo tiveram a sua espermateca dissecada e verificada para a presença de espermatozoide, como forma de confirmar a cópula. A infecção por *Wolbachia* foi confirmada via *screening* por PCR convencional e em tempo real para as fêmeas e a progênie, como descrito anteriormente.

#### 4.7 Curso da infecção pela cepa *wMel* ao longo do tempo em *A. aegypti*

Cerca de 1000 mosquitos adultos infectados retrocruzados (*wMelBr*), e infectados australianos (*wMelAu*) foram mantidos em gaiolas contendo solução açucarada 10% *ad libitum*, e alimentados artificialmente com sangue semanalmente. Cinquenta fêmeas tiveram seus tecidos dissecados em tampão PBS 1X, pH 7,4 (cabeça/tórax; intestino; ovários; túbulos de Malpighi; carcaça) para quantificar a densidade de *Wolbachia* via quantificação absoluta por PCR em tempo real (vide subitem 4.3.2 alterando-se o volume final de reação para 20  $\mu$ L)

nos intervalos de tempo de 1, 5, 10, 20 e 40 dias após emergência dos adultos, sendo que cada ponto (de um total de 5 pontos por intervalo de tempo) consiste de um *pool* de 10 tecidos dissecados.

Analisou-se os dados via método de quantificação absoluta, utilizando-se curva padrão contendo 9 pontos de uma diluição seriada plasmidial ( $10^9$  a  $10^1$  cópias do gene *wsp* de *Wolbachia*), no qual o número de cópias de *wMel* foi estimado dividindo-se o número de cópias de *wsp* de cada amostra (no caso o *pool* de tecidos) pelo número de tecidos em cada *pool* (no caso 10 tecidos) e multiplicando-se o valor final obtido, pelo fator de diluição das amostras. Comparou-se os grupos através do teste de Mann-Whitney.

#### 4.8 Transmissão materna

A taxa de transmissão materna da cepa *wMel* foi testada via *screening* das mães e suas proles para a infecção por *Wolbachia* via PCR em tempo real através de *primers* Rps17 e *wsp* além de sondas TaqMan® (Jean Popovici, comunicação pessoal):

*A. aegypti* (gene da proteína ribossomal RPS17):

- Rps17\_TaqM\_FW: 5' - TCCGTGGTATCTCCATCAAGCT -3'

- Rps17\_TaqM\_RV: 5' - CACTTCCGGCACGTTAGTTGTC -3'

- Rps17\_Probe: 5' - **FAM**-CAGGAGGAGGAACGTGAGCGCAG-**BHQ1** -3'

*wMel* (gene WD513, específico para *wMel* e não presente em *wMelPop*)

- TM513\_TaqM\_FW: 5' - CAAATTGCTCTTGTCTGTGG -3'

- TM513\_TaqM\_RV: 5' - GGGTGTTAAGCAGAGTTACGG -3'

- TM513\_Probe: 5' - **Cy5**-TGAAATGGAAAATTGGCGAGGTGTAGG-**BHQ3** -3'

O processo de extração de DNA das amostras se deu como descrito anteriormente (item 4.3.1). As reações de PCR foram realizadas via qPCR utilizando o sistema de PCR em Tempo Real ABI 7500 (Applied Biosystems, Carlsbad, CA). Uma reação de dois passos foi realizada nas seguintes condições de amplificação: desnaturação inicial a 95 °C por 10 min seguida de 40 ciclos de 95° C por 15 seg e 60° C por 1 min. O volume total da reação foi de

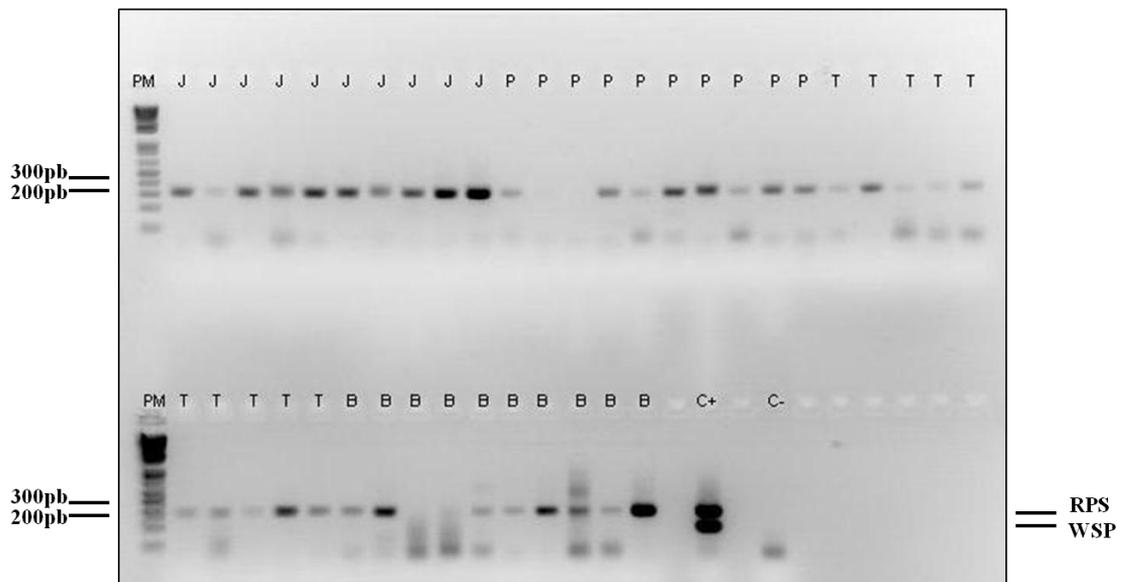
15 µL, contendo TaqMan Universal PCR Master Mix (Roche, Branchburg, CA; Cat. No. 4304437). Os *primers* RPS17 (*forward* e *reverse*) e *wsp* (*forward* e *reverse*) foram adicionados a uma concentração final de 0,25 e 0,3 µM respectivamente. As sondas Rps17 e TM513 foram adicionadas a uma concentração de final de 0,1 e 0,3 µM respectivamente. Utilizou-se aproximadamente 20 ng de DNA em cada reação.

Dez (10) fêmeas infectadas de cada cruzamento provenientes do experimento de incompatibilidade citoplasmática (item 4.6) tiveram toda a sua prole testada.

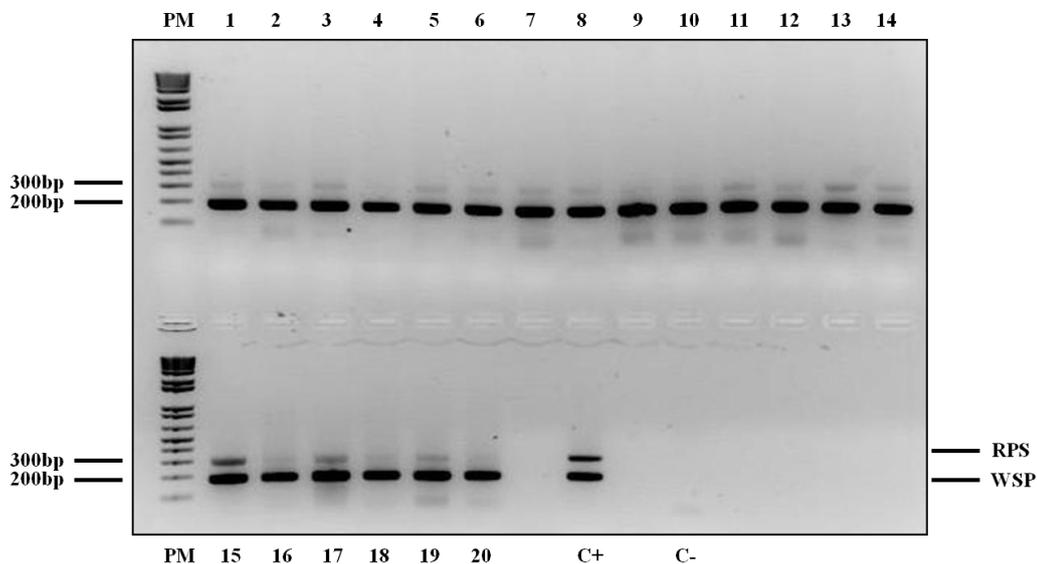
## **5 RESULTADOS**

### **5.1 Retrocruzamento *wMelPop* e *wMel***

O processo de retrocruzamento com a cepa *wMelPop* iniciou-se com o cruzamento de indivíduos do sexo masculino de diferentes regiões do Rio de Janeiro (brasileiros), não infectados por *Wolbachia* (Figura 12) com indivíduos do sexo feminino infectados pela bactéria, provenientes da Austrália e estabelecidos no insetário do Grupo de Pesquisa Mosquitos Vetores: Endossimbiontes e Interação Patógeno-Vetor / CPqRR – FIOCRUZ (Figura 13).



**Figura 12: PCR da geração parental dos machos de *A. aegypti* provenientes de diferentes regiões do Rio de Janeiro.** Os produtos obtidos da PCR multiplex (com *primers* específicos para os genes da proteína de superfície de *Wolbachia* “*wsp*” e da proteína ribossomal de mosquitos S17 “*rps17*”) foram analisados em gel de agarose a 2,0 % corado com brometo de etídio. **PM:** Marcador molecular, **J:** Jurujuba/Niterói, **P:** Paquetá, **T:** Tubiacanga, **B:** Belford Roxo, **C+:** Controle positivo, **C-:** Controle negativo.

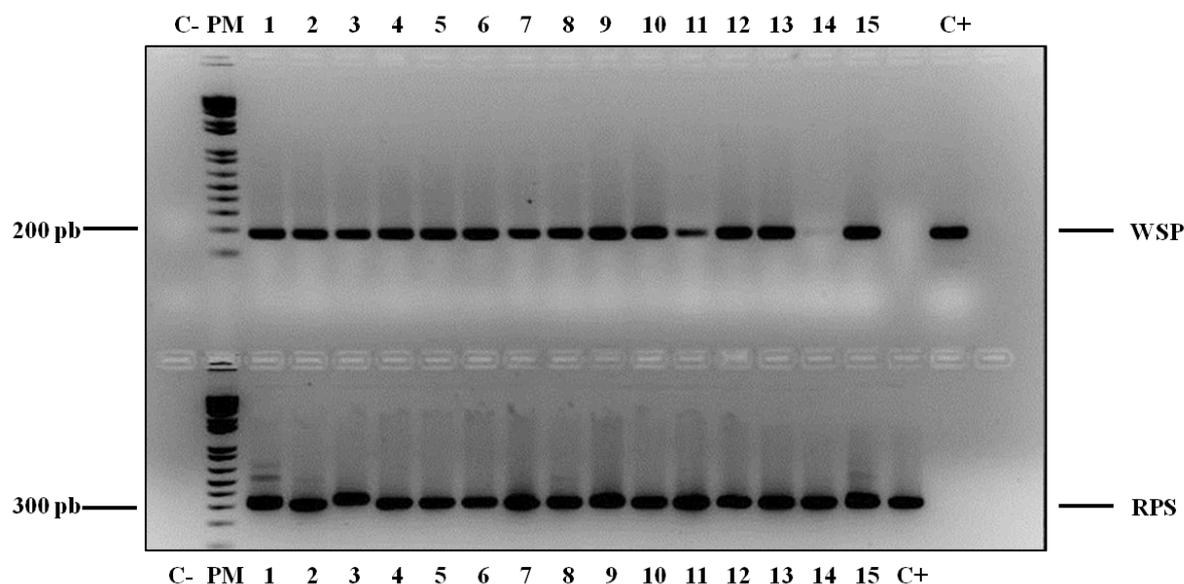


**Figura 13: PCR da geração parental das fêmeas de *A. aegypti* provenientes da Austrália, infectadas pela cepa *wMelPop* de *Wolbachia*.** Os produtos obtidos da PCR multiplex (com *primers* específicos para os genes da proteína de superfície de *Wolbachia* “*wsp*” e da proteína ribossomal de mosquitos S17 “*rps17*”) foram analisados em gel de agarose a 2,0 % corado com brometo de etídio. **PM:** Marcador molecular, **C+:** Controle positivo, **C-:** Controle negativo.

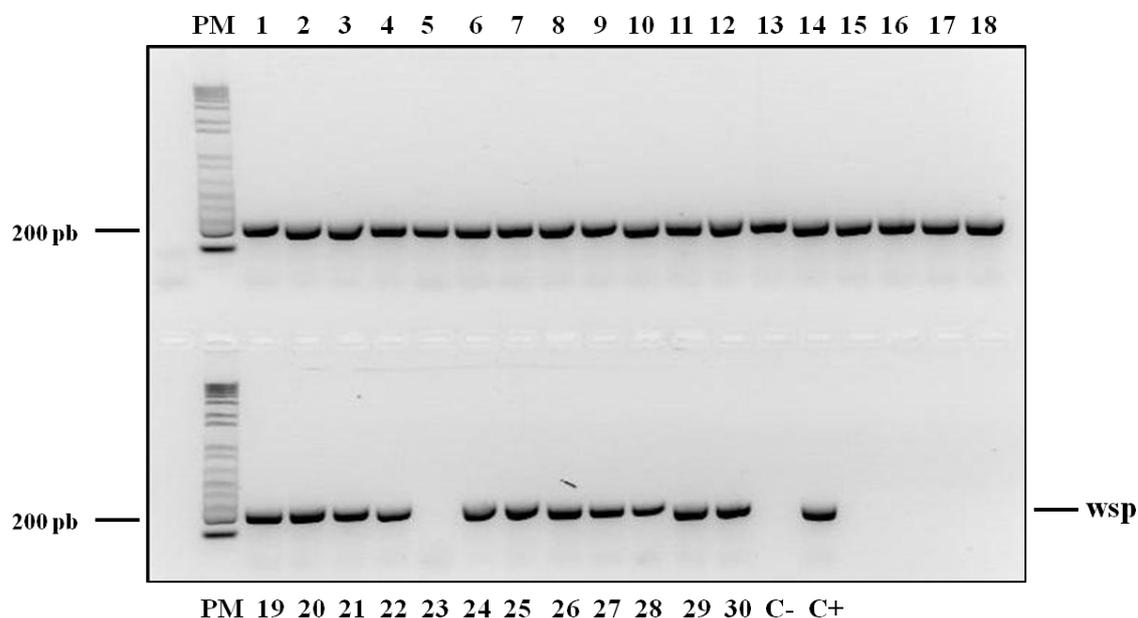
Os passos seguintes consistiram no processo clássico de retrocruzamento via cruzamento de 250 fêmeas australianas infectadas com 200 machos brasileiros no primeiro passo e nos seguintes, cruzamento de 250 indivíduos da progênie com 200 machos parentais. A cada geração, examinou-se o *status* da infecção por *Wolbachia* na prole resultante dos cruzamentos (Figuras 14 e 15).

O procedimento de retrocruzamento visa estabelecer mosquitos *A. aegypti* com *Wolbachia* possuindo um *background* genético da localidade de destino (tipo selvagem). Isto é feito através do cruzamento de fêmeas de *A. aegypti* infectadas por *Wolbachia* com machos de *A. aegypti* de campo (tipo selvagem). As fêmeas geradas neste cruzamento são em seguida cruzadas com machos de *A. aegypti* do tipo selvagem. Este procedimento é repetido por pelo menos quatro gerações. Após o cruzamento inicial, 50% do “*background* genético” desses descendentes (F1C) serão da população de *A. aegypti* selvagem. Esta proporção irá aumentar para 75% na progênie (B1) do primeiro retrocruzamento e para 87,5% da progênie (B2) do segundo retrocruzamento. No quarto retrocruzamento, espera-se que mais de 95% do *background* genético desta geração (B4) seja do tipo selvagem.

O processo de retrocruzamento foi suspenso após a primeira geração retrocruzada (B1) com uma geração interveniente em que a população não foi retrocruzada, mas “fechada” (B1CP). A vantagem de se fechar a população é que isto permite que a incompatibilidade citoplasmática, causada pela *Wolbachia*, aja por uma geração. Isto ajuda a remover possíveis indivíduos não infectados da população, que por acaso possam ter surgido devido à contaminação ou transferência materna imperfeita da bactéria. Indivíduos não infectados são removidos porque a grande maioria dos machos na população fechada estarão infectados, e quando estes copularem com uma fêmea não infectada, irão levar a um caso de morte embrionária na descendência, devido à ação da incompatibilidade citoplasmática.

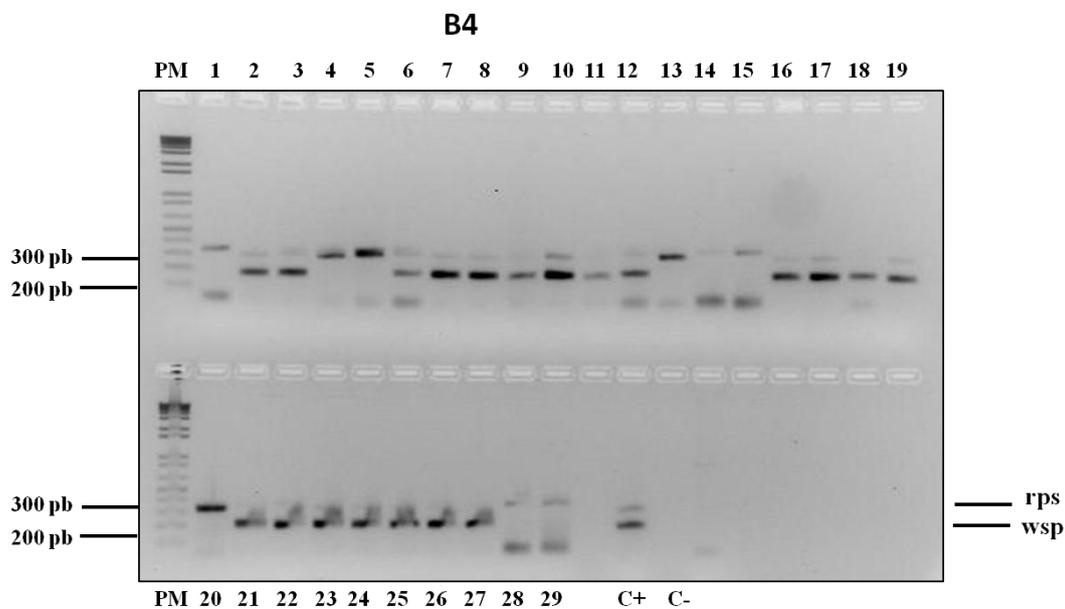


**Figura 14: PCR da geração B1 do processo de retrocruzamento da cepa *wMelPop*.** Os produtos obtidos da PCR (com o *primer* específico para o gene da proteína de superfície de *Wolbachia* “*wsp*” e da proteína ribossomal de mosquitos S17 “*rps17*”) foram analisados em gel de agarose a 2,0 % corado com brometo de etídio. **PM:** Marcador molecular, **C+:** Controle positivo, **C-:** Controle negativo.

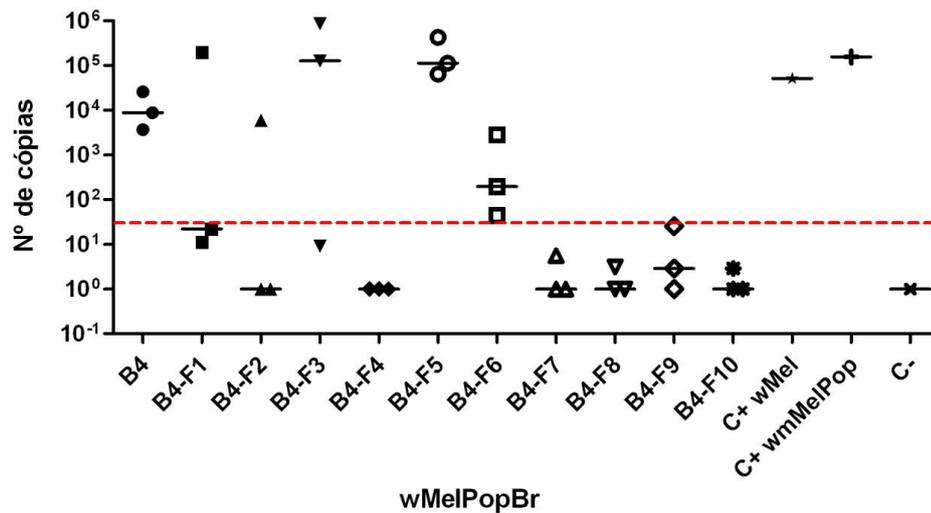


**Figura 15: PCR da geração B3 do processo de retrocruzamento da cepa *wMelPop*.** Os produtos obtidos da PCR (com o *primer* específico para o gene da proteína de superfície de *Wolbachia* “*wsp*”) foram analisados em gel de agarose a 2,0 % corado com brometo de etídio. **PM:** Marcador molecular, **C+:** Controle positivo, **C-:** Controle negativo.

Começamos a detectar problemas de perda de infecção pela bactéria ao final deste processo de retrocruzamento (Figura 16), bem como nas gerações seguintes, até que a cepa *wMelPop* tivesse sido completamente eliminada do *background* genético dos mosquitos selvagens brasileiros (Figura 17).

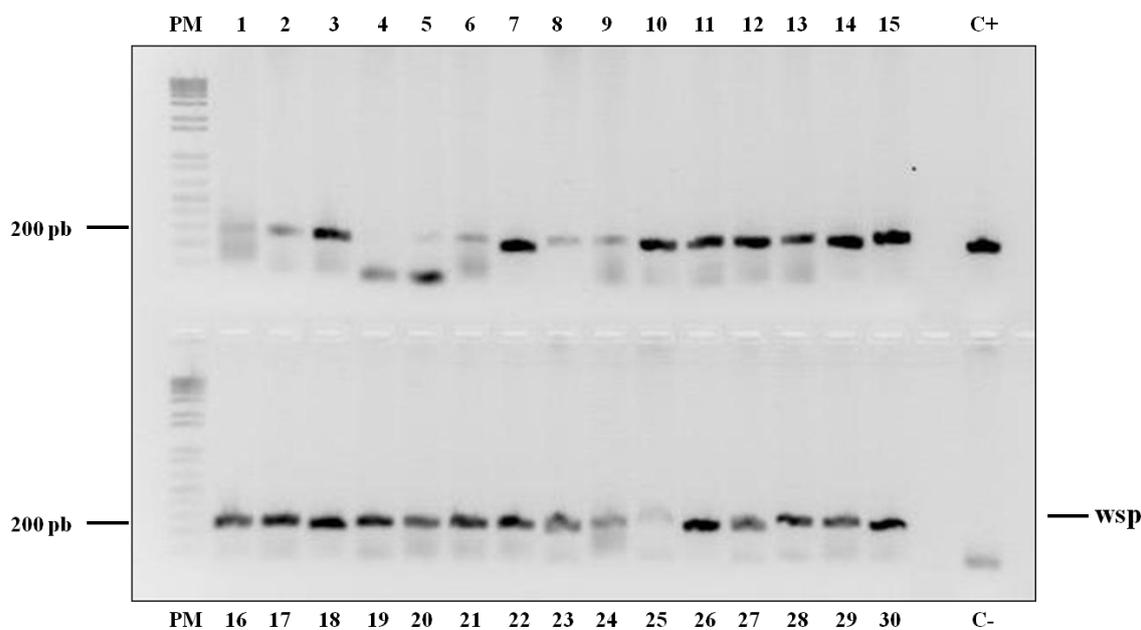


**Figura 16: PCR da geração B4 do processo de retrocruzamento da cepa *wMelPop*.** Os produtos obtidos da PCR multiplex (com *primers* específicos para os genes da proteína de superfície de *Wolbachia* “*wsp*” e da proteína ribossomal de mosquitos S17 “*rps17*”) foram analisados em gel de agarose a 2,0 % corado com brometo de etídio. **PM:** Marcador molecular, **C+:** Controle positivo, **C-:** Controle negativo.

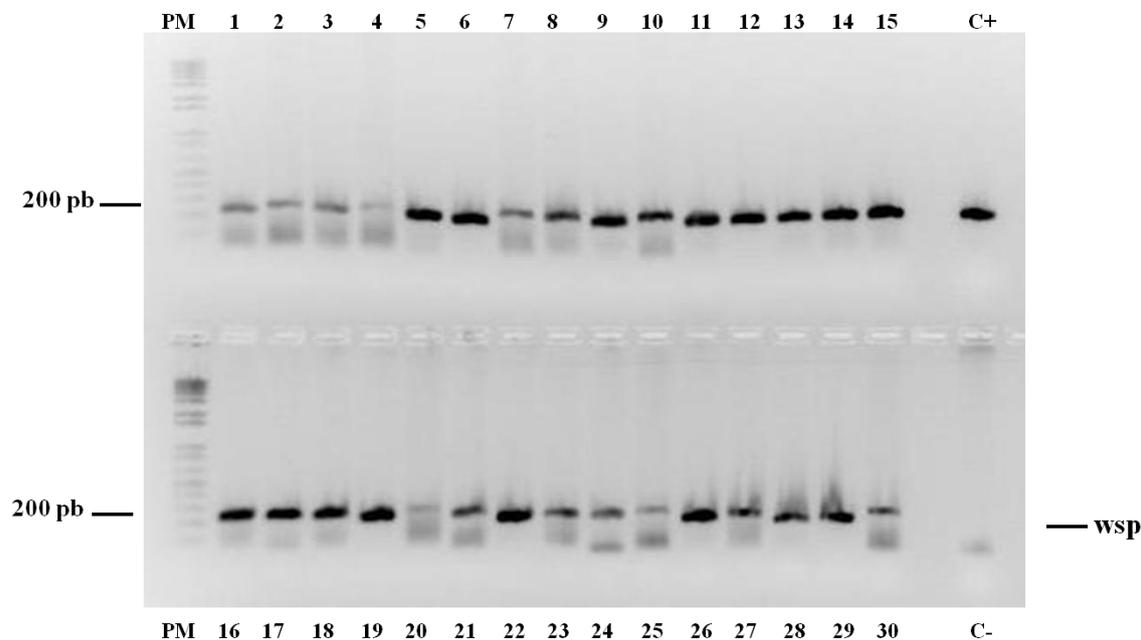


**Figura 17: *Screening* por PCR em tempo real de todas as gerações existentes no laboratório da cepa *wMelPop* retrocruzada.** Os produtos da qPCR foram analisados pelo método comparativo do  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ . Cada figura geométrica representa uma única fêmea adulta de *A. aegypti*. C+: Controle positivo, C-: Controle negativo. As linhas horizontais representam a média do número de cópias do gene *wsp*, em cada geração. A linha tracejada vermelha horizontal representa o limite entre amostras positivas e negativas.

Após o ocorrido com a cepa *wMelPop*, iniciou-se o processo de *screening* da colônia retrocruzada da cepa *wMel* via qPCR (a partir da geração B4) tomando desta vez o cuidado para que a partir da geração B4 em diante, o processo de *screening* dos mosquitos não fosse mais feito por PCR convencional seguida de eletroforese, mas sim via PCR em tempo real (Figura 18, 19, 20). Tal mudança passou a fornecer a cada geração, uma visão mais precisa da densidade bacteriana presente nos mosquitos, sendo possível reverter uma eventual queda da densidade de *Wolbachia*, fato que vem sendo comprovado devido à estabilidade com a qual a cepa vem se mantendo na colônia de mosquitos do laboratório, sem que ocorram alterações na densidade bacteriana ao longo das gerações.

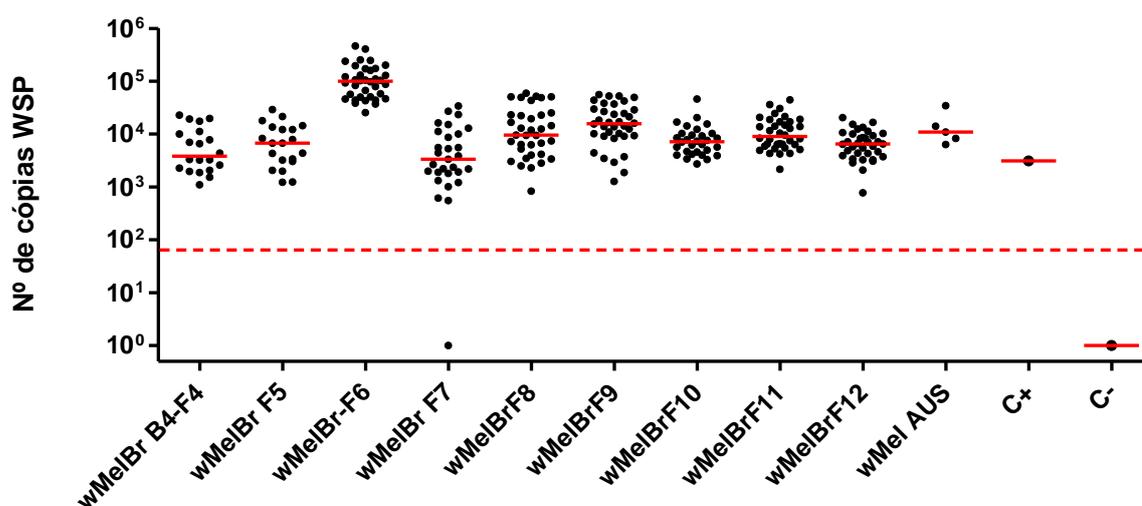


**Figura 18: PCR da geração B1C do processo de retrocruzamento da cepa *wMel*.** Os produtos obtidos da PCR (com o *primer* específico para o gene da proteína de superfície de *Wolbachia* “*wsp*”) foram analisados em gel de agarose a 2,0 % corado com gel red 1:10.000. **PM:** Marcador molecular, **C+:** Controle positivo, **C-:** Controle negativo.



**Figura 19: PCR da geração B2 do processo de retrocruzamento da cepa *wMel*.** Os produtos obtidos da PCR (com o *primer* específico para o gene da proteína de superfície de *Wolbachia* “*wsp*”) foram analisados em gel de agarose a 2,0 % corado com gel red 1:10.000. **PM:** Marcador molecular, **C+:** Controle positivo, **C-:** Controle negativo.

## wMelBR Gerações F4 a F12

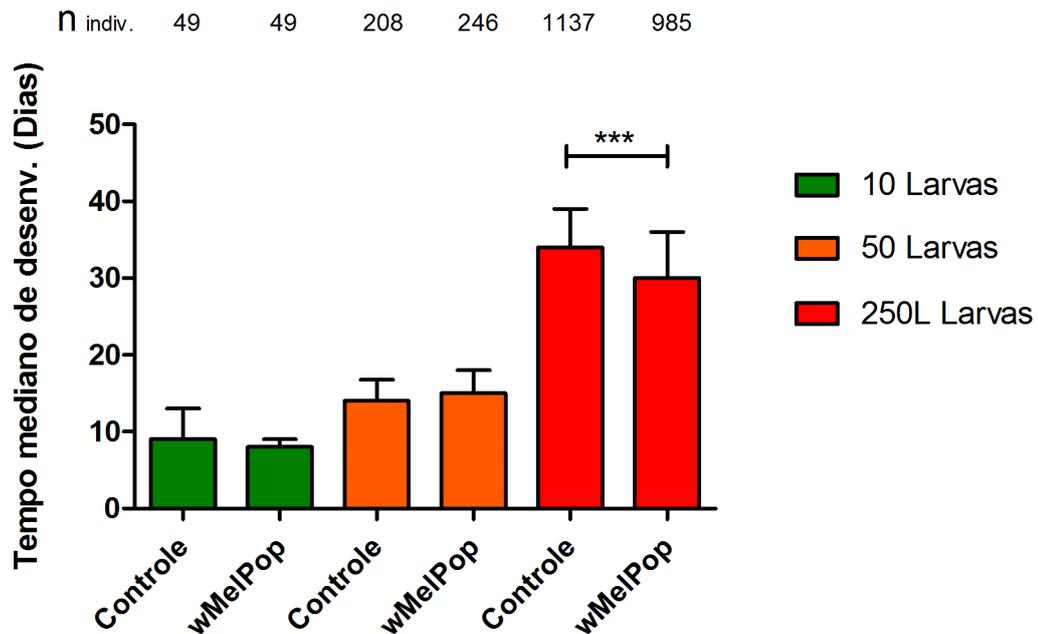


**Figura 20: Screening por PCR em tempo real das gerações existentes no laboratório da cepa *wMel* retrocruzada.** Os produtos da qPCR foram analisados pelo método comparativo do  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ . C+: Controle positivo, C-: Controle negativo. Cada círculo representa uma única fêmea adulta. As linhas horizontais representam a média do número de cópias do gene *wsp*. A linha vermelha tracejada horizontal representa o limite entre amostras positivas e negativas.

## 5.2 Tempo de desenvolvimento larval

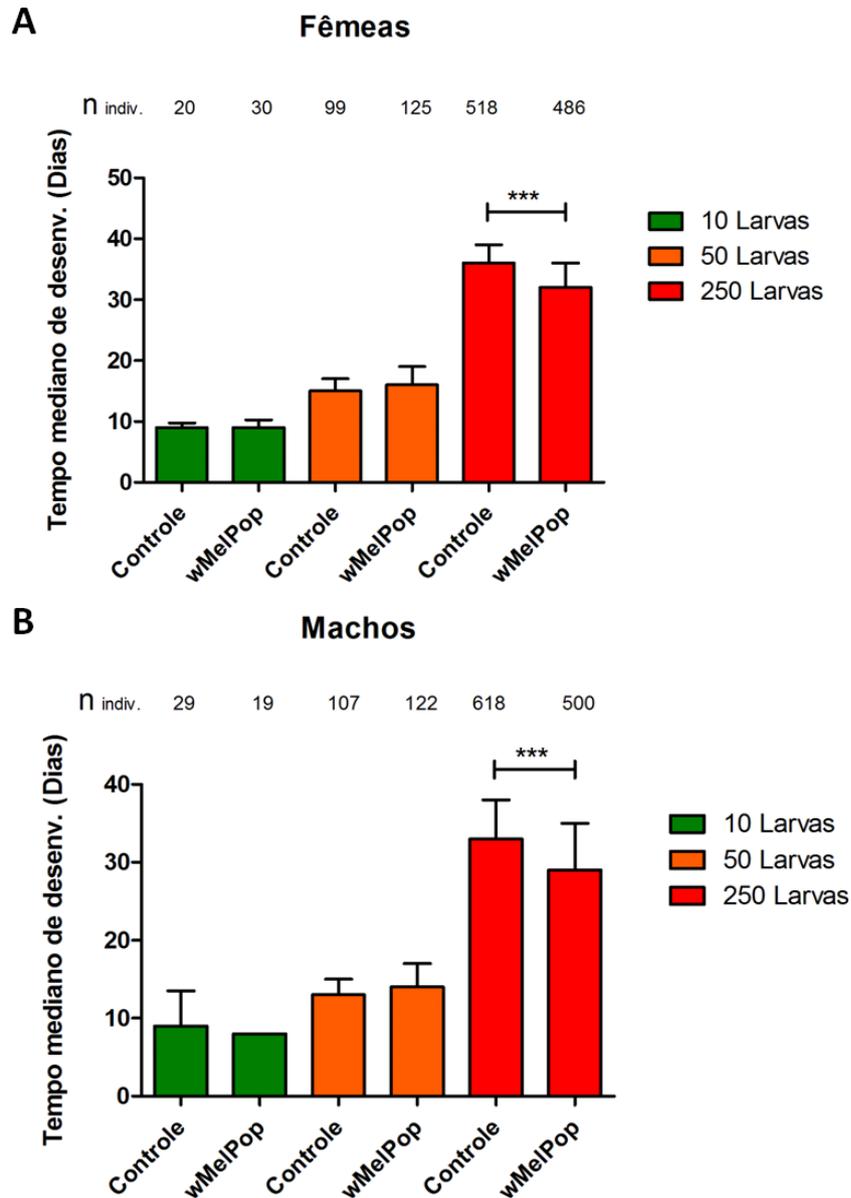
### 5.2.1 *wMelPopBr*

Com relação à cinética de desenvolvimento de imaturos houve, como esperado, correlação entre as densidades e o tempo de desenvolvimento. Quanto maior a densidade larval, mais tempo as larvas demoraram a atingir o estágio de pupa. Não houve diferença no tempo mediano geral de desenvolvimento entre os indivíduos infectados e não infectados na condição de 10 larvas e na condição de 50 larvas, havendo diferença apenas na condição de 250 larvas, na qual os indivíduos infectados pela cepa virulenta *wMelPop* desenvolveram-se significativamente mais rápido que os indivíduos brasileiros que não possuíam a bactéria (Figura 21).



**Figura 21. Tempo mediano de desenvolvimento larval da cepa wMelPop.** O número total de indivíduos analisados ( $n_{\text{indiv.}}$ ) está indicado na figura, acima dos dados para cada grupo. As barras representam o tempo mediano de desenvolvimento junto com o intervalo interquartil. O tempo mediano de desenvolvimento difere apenas na densidade de 250 larvas (Teste de Kruskal-Wallis:  $p < 0,0001$  seguido do teste de Dunn), onde a comparação marcada com asterisco (\*\*\*) representa os grupos que diferiram entre si. Os dados representam uma única réplica biológica (uma única geração de mosquitos da colônia de *A. aegypti* do laboratório).

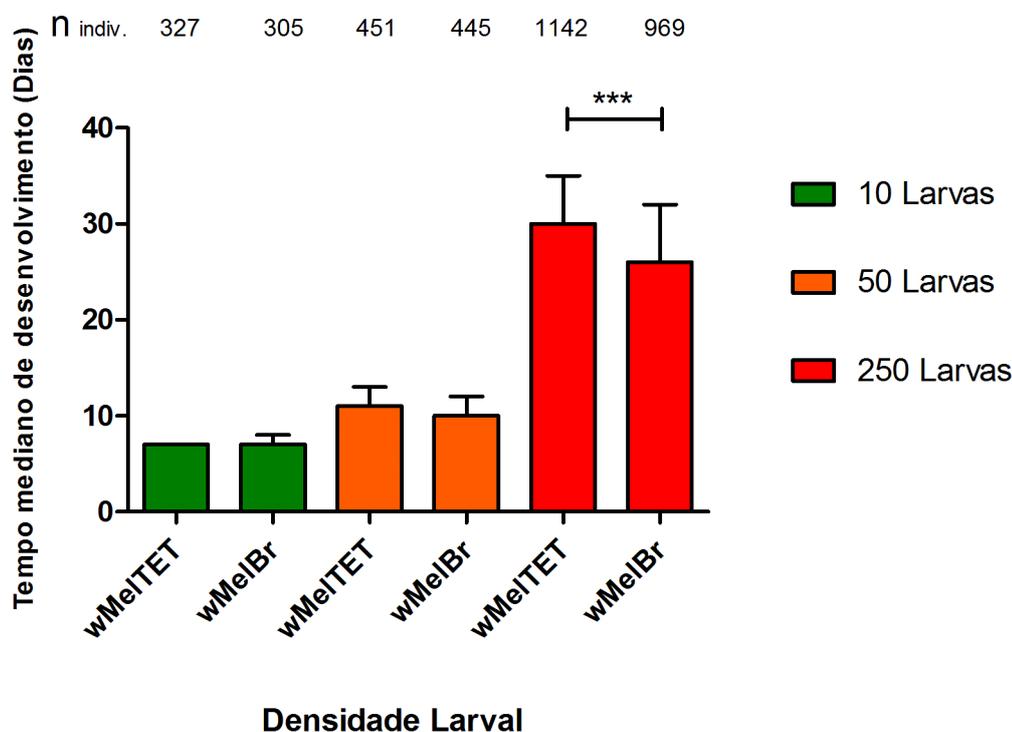
Quando analisamos separadamente os sexos, percebe-se que não houve uma clara diferença no tempo mediano de desenvolvimento dos machos com relação ao tempo de desenvolvimento das fêmeas. O mesmo foi observado com relação ao *status* da infecção dos indivíduos, onde não houve diferença entre os infectados e os não infectados por *Wolbachia* nas densidades de 10 e 50 larvas, houve diferença apenas na densidade de 250 larvas, na qual, os indivíduos infectados pela cepa virulenta wMelPop desenvolveram-se significativamente mais rápido (mediana = 32 dias para fêmeas e 29 dias para machos) que os indivíduos brasileiros do grupo controle (36 dias fêmeas e 33 dias para machos) (Figura 22).



**Figura 22: Tempo mediano de desenvolvimento larval da cepa wMelPop. A) fêmeas, B) machos:** O número total de indivíduos analisados ( $n_{\text{indiv.}}$ ) está indicado na figura, acima dos dados para cada grupo. As barras representam o tempo mediano de desenvolvimento junto com o intervalo interquartil. As comparações marcadas com asterisco (\*\*\*) representam os grupos que diferiram entre si. O tempo mediano de desenvolvimento difere apenas na densidade de 250 larvas (Teste de Kruskal-Wallis:  $p < 0,0001$ , seguido do teste de Dunn).

## 5.2.2 wMelBr

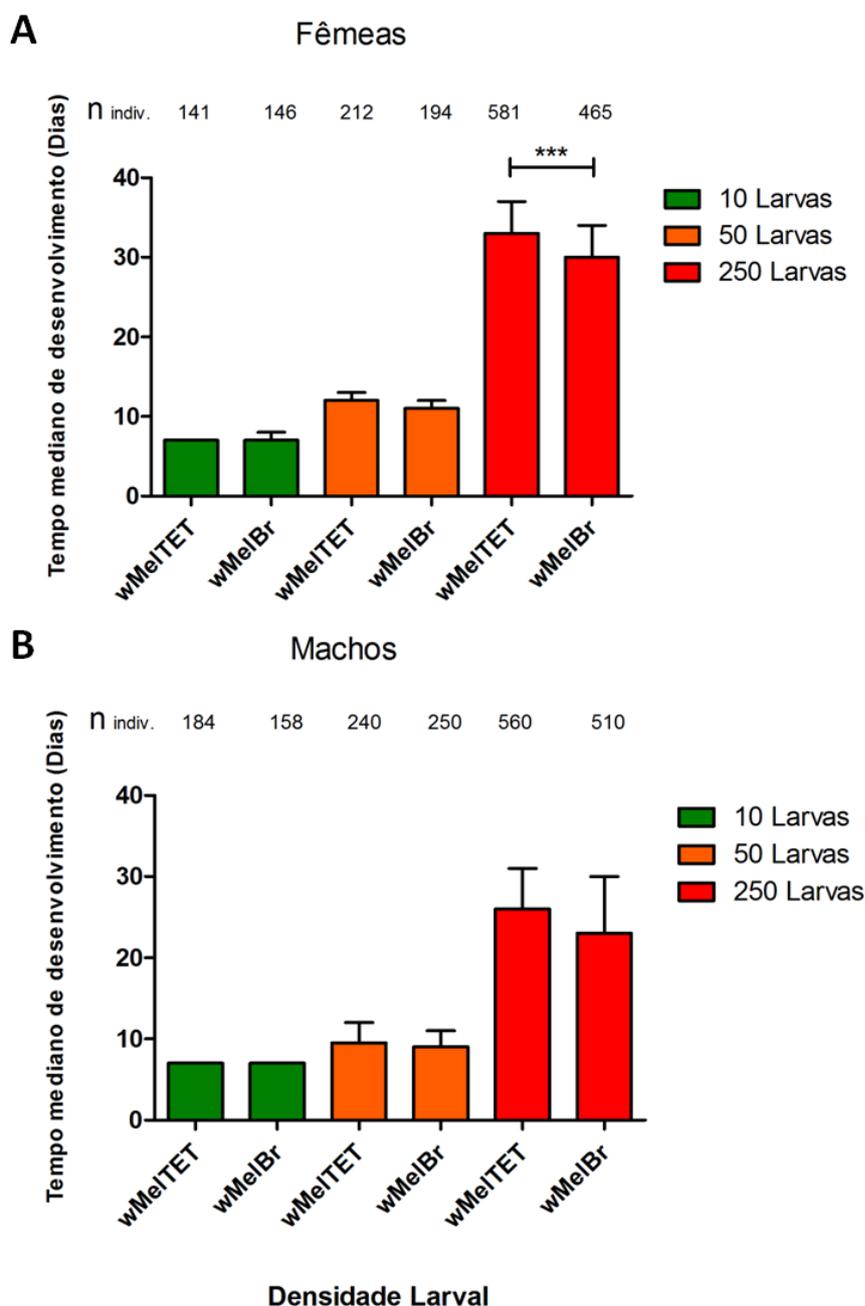
Ao analisar a cepa wMel no *background* genético brasileiro, com relação à cinética de desenvolvimento de imaturos, percebemos que assim como a cepa virulenta wMelPop, não houve diferença significativa entre as densidades iniciais de 10 larvas e 50 larvas, havendo somente na condição de maior estresse nutricional (250 larvas), onde mais uma vez, indivíduos infectados por *Wolbachia* apresentaram desenvolvimento do estágio larval ao estágio de pupa mais rápido que os indivíduos do grupo controle, no caso aqui representado pela colônia tratada com o antibiótico tetraciclina (Figura 23).



**Figura 23: Tempo mediano de desenvolvimento larval da cepa wMel.** O número total de indivíduos analisados ( $n_{\text{indiv.}}$ ) está indicado na figura, acima dos dados para cada grupo. As barras representam o tempo mediano de desenvolvimento junto com o intervalo interquartil. A comparação marcada com asterisco (\*\*\*) representa os grupos que diferiram entre si. O tempo mediano de desenvolvimento difere apenas na densidade de 250 larvas (Teste de Kruskal-Wallis:  $p < 0,0001$ ; seguido do teste de Dunn). Os dados representam uma única réplica biológica (uma única geração de mosquitos da colônia de *A. aegypti* do laboratório).

Da mesma forma que para *wMelPopBr*, ao analisarmos cada gênero separadamente, o tempo mediano de desenvolvimento das larvas de *wMelBr*, percebe-se que não houve uma clara diferença no desenvolvimento de machos e fêmeas nas densidades de 10 larvas e 50 larvas, houve diferença apenas na condição de maior estresse nutricional (250 larvas) nas fêmeas (*wMelTET* mediana = 33 dias; *wMelBr* mediana = 30 dias). Além disso, no geral, as fêmeas levaram mais tempo para completar o seu desenvolvimento em comparação com machos (medianas de 33 dias fêmeas x 26 dias machos *wMelTET*; 30 dias fêmeas x 23 dias machos *wMelBr*).

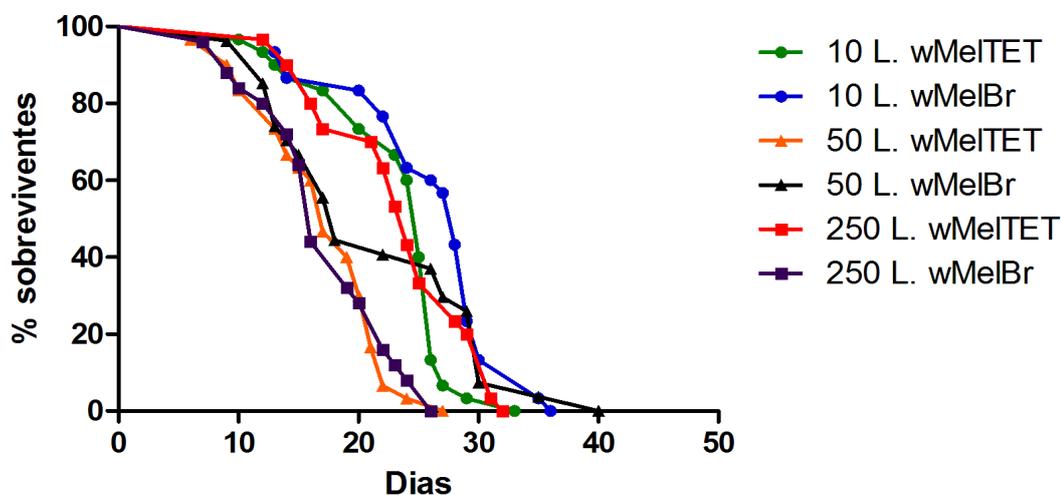
Ao se analisar o *status* de infecção dos indivíduos, percebe-se que houve diferença entre os infectados e os não infectados por *Wolbachia* apenas na densidade de 250 larvas para as fêmeas, onde estas completaram o seu desenvolvimento mais rápido que as fêmeas curadas com o antibiótico tetraciclina (Figura 24).



**Figura 24: Tempo mediano de desenvolvimento larval da cepa *wMel*. A) fêmeas, B) machos.** O número total de indivíduos analisados ( $n_{\text{indiv.}}$ ) está indicado na figura, acima dos dados para cada grupo. As barras representam o tempo mediano de desenvolvimento junto com o intervalo interquartil. A comparação marcada com asterisco (\*\*\*) representa os grupos que diferiram entre si. O tempo mediano de desenvolvimento difere apenas na densidade de 250 larvas (Teste de Kruskal-Wallis:  $p < 0,0001$ ; seguido do teste de Dunn).

### 5.3 Longevidade

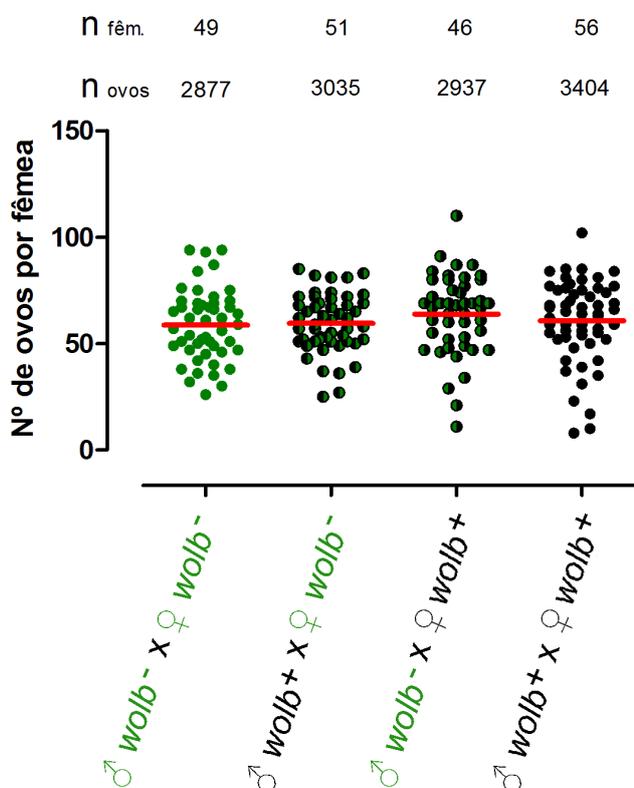
Fêmeas de *A. aegypti* foram agrupadas como descrito no item 4.5.2 onde então analisou-se a sobrevivência de indivíduos adultos que haviam sido criados sob diferentes condições de *stress* nutricional durante a fase larvar (Figura 25). Na densidade de 10 larvas, a sobrevivência média foi de 28 dias para as larvas infectadas com a cepa *wMel* e de 25 dias para as curadas com o antibiótico tetraciclina. Na condição de 50 larvas, a média de sobrevivência foi de 18 dias nos indivíduos infectados e de 17 dias nos não infectados. Por fim, na condição de 250 larvas, o tempo médio de vida foi de 24 dias para as fêmeas tratadas com antibiótico e de 16 dias para as infectadas por *wMel*. As curvas de sobrevivência analisadas via teste de Log-Rank (Mantel-Cox) foram diferentes entre si na densidade de 10 larvas ( $\chi^2 = 10,17$ ,  $p = 0,0014$ ); 50 larvas ( $\chi^2 = 6,71$ ,  $p = 0,0096$ ); 250 larvas ( $\chi^2 = 16,49$ ,  $p < 0,0001$ ).



**Figura 25:** A cepa *wMel* tem efeito positivo sobre a longevidade de *A. aegypti* quando criadas em condição de alta densidade larvar. Gráfico mostrando as curvas de sobrevivência Kaplan-Meier para fêmeas criadas em diferentes condições de *stress*. Os dados representam uma única réplica biológica (uma única geração de mosquitos da colônia de *A. aegypti* do laboratório). O número de indivíduos foi de 30 fêmeas adultas para a densidade de 10 larvas *wMel*TET e *wMel*Br. 30 fêmeas adultas para a densidade de 50 larvas *wMel*TET, 27 fêmeas adultas para a densidade de 50 larvas *wMel*Br. 30 fêmeas adultas para a densidade de 250 larvas *wMel*TET e 25 fêmeas adultas para a densidade de 250 larvas *wMel*Br.

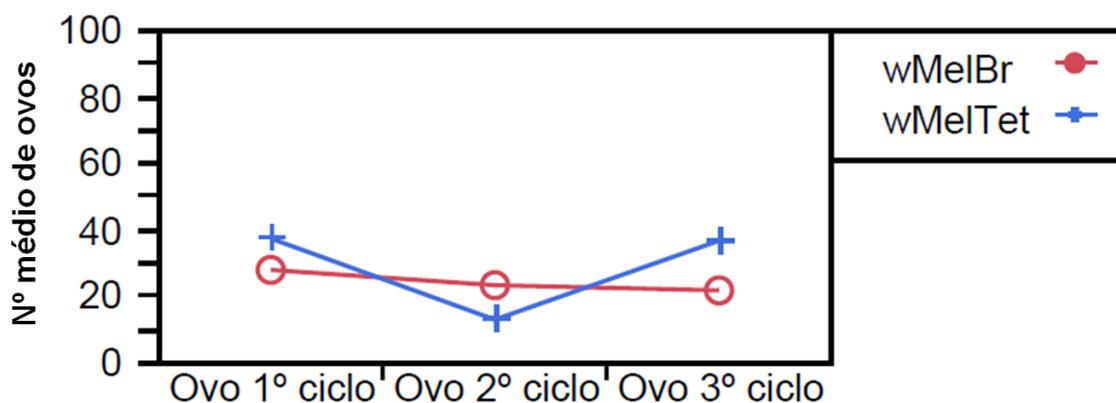
## 5.4 Fecundidade e fertilidade

Em conjunto com o experimento de incompatibilidade citoplasmática (item 5.5) analisou-se a fecundidade de cada fêmea em cada um dos cruzamentos possíveis. Observou-se que a cepa *wMel* de *Wolbachia* não apresentou nenhum efeito sobre a fecundidade (número de ovos por fêmea) das fêmeas de *A. aegypti* criadas em condições ideais de laboratório (baixa densidade larval e abundância de alimento), no contexto do *background* genético da população de mosquitos do Rio de Janeiro (Br) (Figura 26).



**Figura 26:** *wMel* não apresenta efeito sobre a fecundidade de *A. aegypti* criado em condições ideais de laboratório. O número total de fêmeas analisadas ( $n_{\text{fêm.}}$ ) está indicado na figura, acima dos dados para cada grupo. Cada círculo representa uma única fêmea adulta, enquanto que as linhas horizontais vermelhas indicam a mediana do número de ovos por fêmea. Os dados apresentados representam duas diferentes réplicas biológicas (duas gerações diferentes de mosquitos da colônia de *A. aegypti* do laboratório). Não houve diferença entre os grupos analisados (Teste de Kruskal-Wallis,  $p=0,2466$ ).

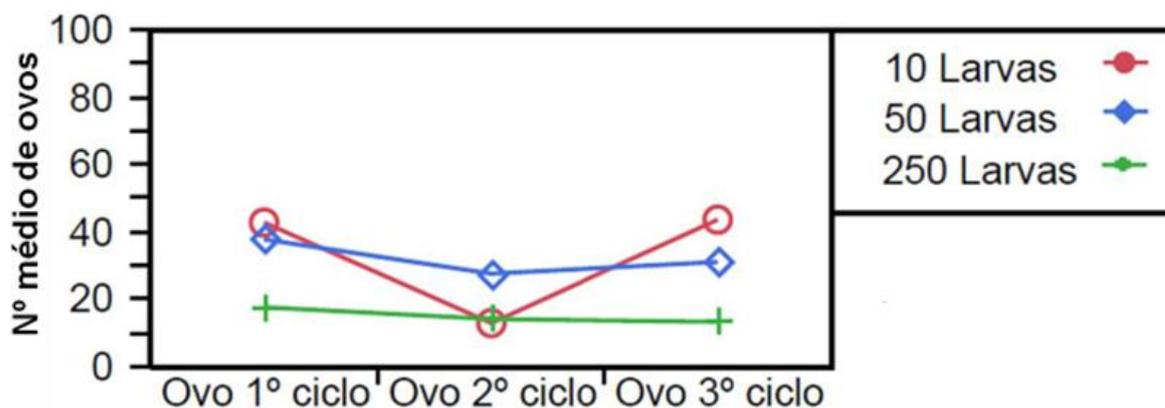
Ao se analisar o efeito do *status* da infecção sobre a fecundidade ao longo de três ciclos gonotróficos, também não se observou um efeito da cepa *wMel* sobre o número médio de ovos de *A. aegypti* (Figura 27).



**Figura 27: *wMel* não interfere na fecundidade ao longo do tempo de vida de *A. aegypti*.**

O número total de indivíduos analisados por ciclo gonotrófico foi de: 1º ciclo: 41 fêmeas *wMelBr*/29 fêmeas *wMelTET*. 2º ciclo: 33 fêmeas *wMelBr* / 24 fêmeas. 3º ciclo: 26 fêmeas *wMelBr*/25 fêmeas *wMelTET*. Cada círculo/cruz representa a média do número de ovos colocados por todas as fêmeas em cada ciclo gonotrófico. Os dados representam uma única réplica biológica (uma única geração de mosquitos da colônia de *A. aegypti* do laboratório). Não houve diferença entre os grupos analisados ( $F= 1,7491$ ; g.l. numerador: 1; g.l. denominador: 29;  $P= 0,1963$ ).

No que diz respeito ao efeito da criação das larvas sob diferentes condições de *stress*, ao se analisar em conjunto as os indivíduos infectados e não infectados, observou-se uma correlação inversamente proporcional entre o número médio de ovos colocados pelas fêmeas de *A. aegypti* e a densidade, de forma que à medida que se aumentou a densidade larval, o número médio de ovos decaiu (Figura 28).



**Figura 28: Efeito da densidade larval sobre a fecundidade de *A. aegypti* ao longo do tempo de vida de *A. aegypti*.** O número total de indivíduos analisados por ciclo gonotrófico foi de: 1º ciclo: densidade larval (DL) 10: 26 fêmeas. DL: 50: 27 fêmeas. DL: 250: 17. 2º ciclo: DL 10: 16 fêmeas. DL: 50: 28 fêmeas. DL: 250: 13. 3º ciclo: DL 10: 13 fêmeas. DL: 50: 26 fêmeas. DL: 250: 12. Cada círculo/cruz/losango representam a média do número de ovos colocados por todas as fêmeas em cada ciclo gonotrófico. Os dados representam uma única réplica biológica (uma única geração de mosquitos da colônia de *A. aegypti* do laboratório). Houve diferença entre os grupos analisados ( $F= 9,5240$ ; g.l. numerador: 1; g.l. denominador: 29;  $P= 0,0007$ ).

Independente do número de ovos colocados pelas fêmeas de *A. aegypti*, analisou-se também o sucesso de oviposição destas, ou seja, se a cada ciclo gonotrófico, as fêmeas referentes à densidade/*status* específicas foram capazes de realizar oviposição ou não, independente do número de ovos. Observou-se que há uma relação significativa entre o efeito da criação larval em diferentes condições de *stress* e o sucesso de oviposição, onde mosquitos provenientes de ambiente mais competitivo apresentam maior probabilidade de não colocar ovos ( $\chi^2=12,01$ ;  $p= 0,0172$ ). Quando se analisa com relação ao *status* da infecção, observou-se que a cepa *wMel* não influenciou positiva ou negativamente o sucesso de oviposição das fêmeas ( $\chi^2=2,89$ ;  $p= 0,2353$ ) (Tabela 3).

**Tabela 3: Análise de regressão logística da influência da densidade e o *status* da infecção no sucesso de oviposição de *A. aegypti* infectado com a cepa *wMel*.**

Fonte	Graus de liberdade	$\chi^2$	P-valor
Ciclo	2	6,22756625	<b>0,0444</b>
<i>Status</i>	1	0,17168577	0,6786
Densidade	2	7,70116e-8	1,0000
Ciclo E <i>status</i>	2	2,89416605	<b>0,2353</b>
Ciclo E densidade	4	12,0187812	<b>0,0172</b>
Linhagem E Densidade	2	0,44062309	0,8023

### 5.5 Incompatibilidade citoplasmática

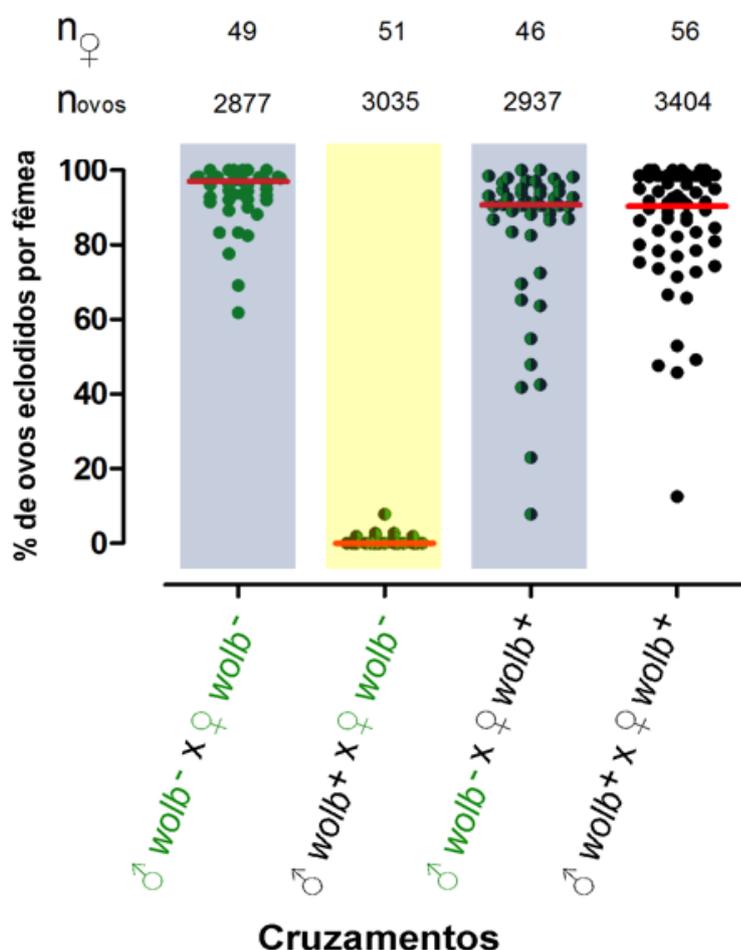
Realizou-se cruzamentos recíprocos entre mosquitos *A. aegypti* retrocruzados curados da infecção pela cepa *wMel* de *Wolbachia* (*wolb*<sup>-</sup>) via antibiótico e mosquitos retrocruzados infectados pela bactéria (*wolb*<sup>+</sup>) (Figura 29). Quando fêmeas não infectadas (♀ *wolb*<sup>-</sup>) foram cruzadas com machos infectados por *Wolbachia* (♂ *wolb*<sup>+</sup>), uma mediana de apenas 0,5% dos ovos eclodiram por fêmea neste cruzamento “incompatível”, enquanto que uma mediana de 90,7 a 97% dos ovos eclodiram por fêmea nos outros três cruzamentos compatíveis.

De modo geral, a força da incompatibilidade citoplasmática gerada por *wMel* no *background* genético brasileiro foi de 99,51%, com apenas 0,49% (15 ovos) do número total de ovos do cruzamento “incompatível” (3035 ovos) eclodindo (nenhum dos ovos eclodidos deu origem a larvas viáveis; todas, sem exceção, morreram durante o estágio larval L1).

Exame via microscópio das espermatecas confirmou a ocorrência de cópula, e dissecação dos ovários confirmou a não produção de ovos por parte das fêmeas que não ovipuseram (eliminando a possibilidade de retenção do ovo), fazendo com que estas fossem eliminadas do experimento devido ao fato de não terem realizado repasto sanguíneo.

Diagnóstico através de PCR convencional para o gene *wsp* (e por tempo real via sonda TaqMan das amostras que apresentaram padrão de banda duvidoso na eletroforese; método

descrito no item 4.8) confirmou com exatidão a infecção dos indivíduos de ambos os sexos envolvidos nos cruzamentos (vide item 8.0).



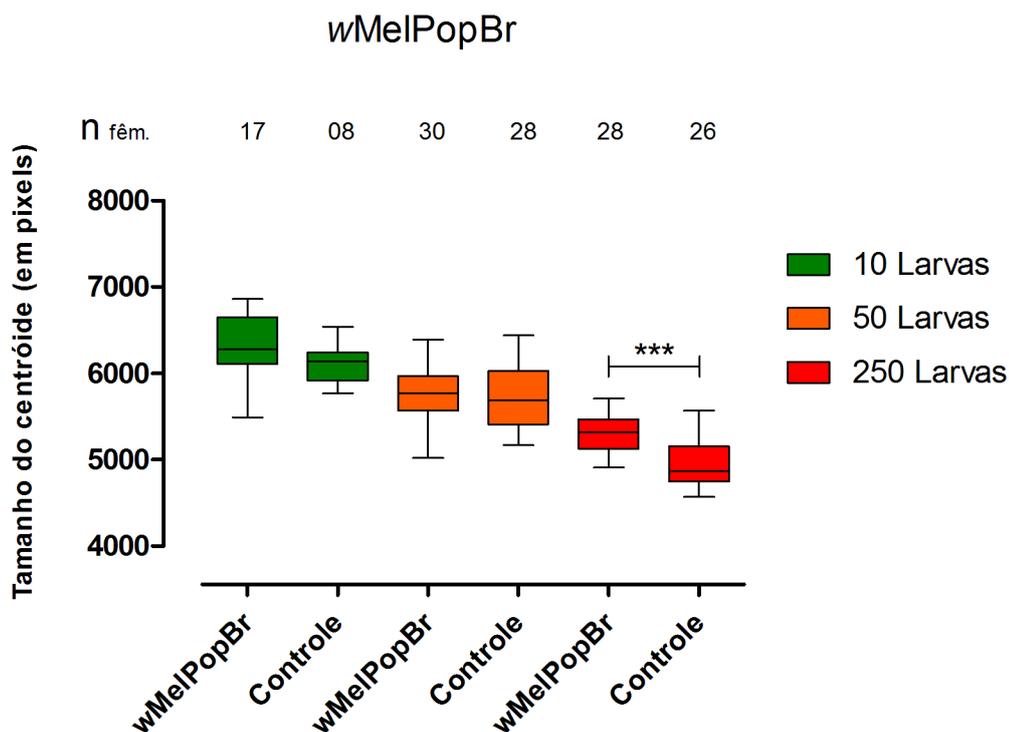
**Figura 29: *w*Mel causa forte incompatibilidade citoplasmática unidirecional em população de *A. aegypti* do Rio de Janeiro.** Cada círculo representa uma única fêmea adulta, enquanto que as linhas vermelhas horizontais indicam o número mediano de ovos eclodidos por fêmea. Os dados aqui utilizados são provenientes de duas réplicas biológicas independentes (duas gerações distintas das colônias de *A. aegypti* do laboratório). O número total de fêmeas ( $n_{\text{♀}}$ ) e o número total de ovos ( $n_{\text{Ovos}}$ ) estão indicados na figura, acima dos dados para cada cruzamento. Todos os dados de ambas as réplicas biológicas foram analisados juntos utilizando o teste de Kruskal-Wallis ( $p < 0,0001$ ), seguido por uma comparação pareada utilizando o teste de Dunn para determinar qual cruzamento diferenciou significativamente entre si. A cor amarela e azul envolvendo os pontos no gráfico indicam o resultado do teste de Dunn (Dt). O cruzamento ( $\text{♀ } wolb^{-} \times \text{♂ } wolb^{+}$ ) em amarelo diferenciou significativamente dos outros três cruzamentos ( $p < 0,001$ ) e o cruzamento ( $\text{♀ } wolb^{+} \times \text{♂ } wolb^{-}$ ) diferenciou significativamente do cruzamento ( $\text{♀ } wolb^{-} \times \text{♂ } wolb^{-}$ ) ambos em azul ( $p < 0,05$ ).

## 5.6 Morfometria

### 5.6.1 *wMelPopBr*

O tamanho médio do centroide apresentou o seu maior valor (entre as 3 densidades) na densidade de 10 larvas, nos indivíduos infectados por *wMelPop* (6320 pixels) variando de 5490 a 6860 pixels. Na linha inversa, o grupo que apresentou o menor valor médio do tamanho do centroide foi a densidade de 250 larvas nos indivíduos não infectados pela bactéria (4938 pixels) variando de 4570 a 5570 pixels.

Quando se analisa os grupos com relação ao *status* da infecção, percebe-se que apenas a condição mais estressante de 250 larvas apresentou diferença significativa em comparação ao grupo controle não infectado pela bactéria, na qual as fêmeas infectadas por *wMelPop* apresentaram um maior tamanho corpóreo (Figura 30).



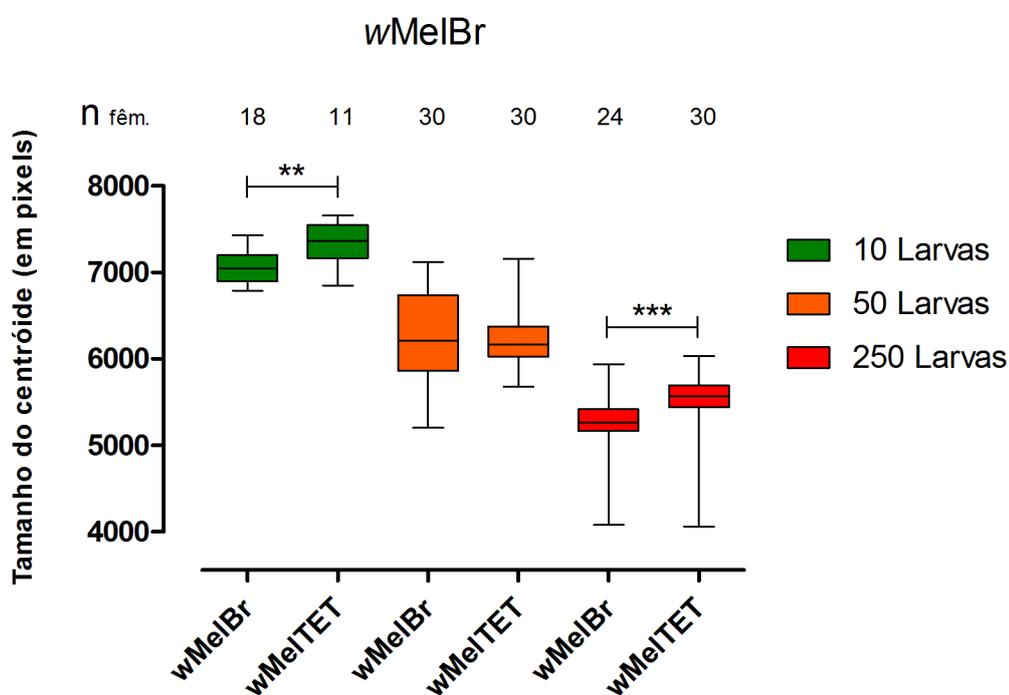
**Figura 30: Tamanho médio do centroide de *A. aegypti* criado em diferentes densidades larvais e *status* de infecção pela cepa *wMelPop*.** O número total de fêmeas analisadas ( $n_{\text{fêm.}}$ ) está indicado na figura, acima dos dados para cada grupo. Os retângulos no gráfico representam a média e o erro padrão. As linhas dentro de cada retângulo no gráfico representam o valor médio do centroide e as barras verticais representam os valores da média juntamente com o desvio padrão. A comparação marcada com asterisco (\*\*\*) representa os grupos que diferiram entre si. Os dados representam uma única réplica biológica (uma única geração de mosquitos da colônia de *A. aegypti* do laboratório) e estes foram analisados via teste T não pareado (10 larvas  $p=0,1758$ ; 50 larvas  $p=0,9117$ ) e teste de Mann-Whitney (250 larvas  $p<0,0001$ ).

### 5.6.2 *wMelBr*

Já no que diz respeito à cepa *wMel*, o tamanho médio do centroide apresentou o seu maior valor na densidade de 10 larvas, nos indivíduos não infectados pela bactéria (7326 pixels) variando de 6850 a 7660 pixels. E, assim como observado para a cepa *wMelPop*, o grupo que apresentou o menor valor médio do tamanho do centroide foi a densidade de 250

larvas, mas desta vez nos indivíduos infectados pela bactéria (5251 pixels) variando de 4080 a 5940 pixels.

Quando analisamos os grupos com relação ao *status* da infecção, percebe-se que desta vez, na condição ideal de criação (10 larvas) houve diferença entre os grupos, com as fêmeas de *A. aegypti* infectadas por *Wolbachia* apresentando um tamanho corpóreo menor que o grupo tratado com tetraciclina. Houve também diferença entre os grupos da condição mais estressante de 250 larvas, no qual as fêmeas infectadas por *wMel* apresentaram também um menor tamanho corpóreo em relação ao grupo tratado com antibiótico (Figura 31).



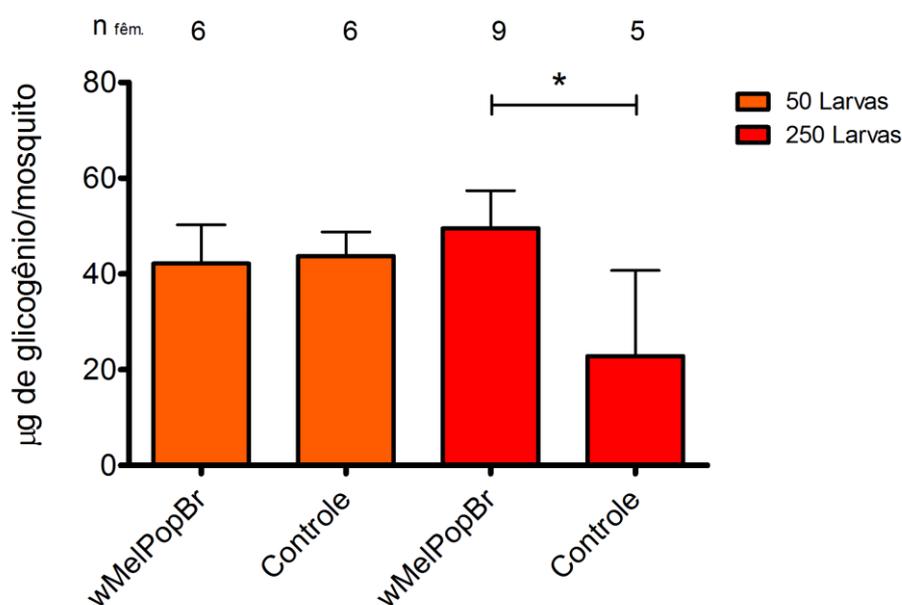
**Figura 31: Tamanho médio do centróide de *A. aegypti* criado em diferentes densidades larvais e *status* de infecção pela cepa *wMel*.** O número total de fêmeas analisadas ( $n_{fêm.}$ ) está indicado na figura, acima dos dados para cada grupo. Os retângulos no gráfico representam a média e o erro padrão. As linhas dentro de cada retângulo no gráfico representam o valor médio do centróide e as barras verticais representam os valores da média juntamente com o desvio padrão. A comparação marcada com asterisco (\*\*/\*\*\*\*) representa os grupos que diferiram entre si. Os dados representam uma única réplica biológica (uma única geração de mosquitos da colônia de *A. aegypti* do laboratório) e estes foram analisados via teste T não pareado (10 larvas  $p= 0,0045$ ), teste T pareado com correção de Welch (50 larvas  $p= 0,8149$ ) e teste de Mann-Whitney (250 larvas  $p< 0,0001$ ).

## 5.7 Quantificação de glicogênio

### 5.7.1 *wMelPopBr*

Realizou-se a dosagem bioquímica de glicogênio individualmente em fêmeas de *A. aegypti* criadas em diferentes densidades larvais (a densidade de 10 larvas não apresentou indivíduos suficientes, por isso foi excluída das análises).

Ao se analisar as densidades, percebe-se que as fêmeas infectadas por *Wolbachia* na densidade de 50 larvas apresentaram uma concentração mediana de glicogênio de 42,20  $\mu\text{g}$  contra 43,72  $\mu\text{g}$  do grupo controle. Já na condição de 250 larvas, o grupo de fêmeas infectadas por *wMelPop* apresentaram uma concentração mediana de glicogênio duas vezes superior ao grupo controle (49,55  $\mu\text{g}$  contra 22,81  $\mu\text{g}$ ) ( $p=0,0420$ ). (Figura 32).

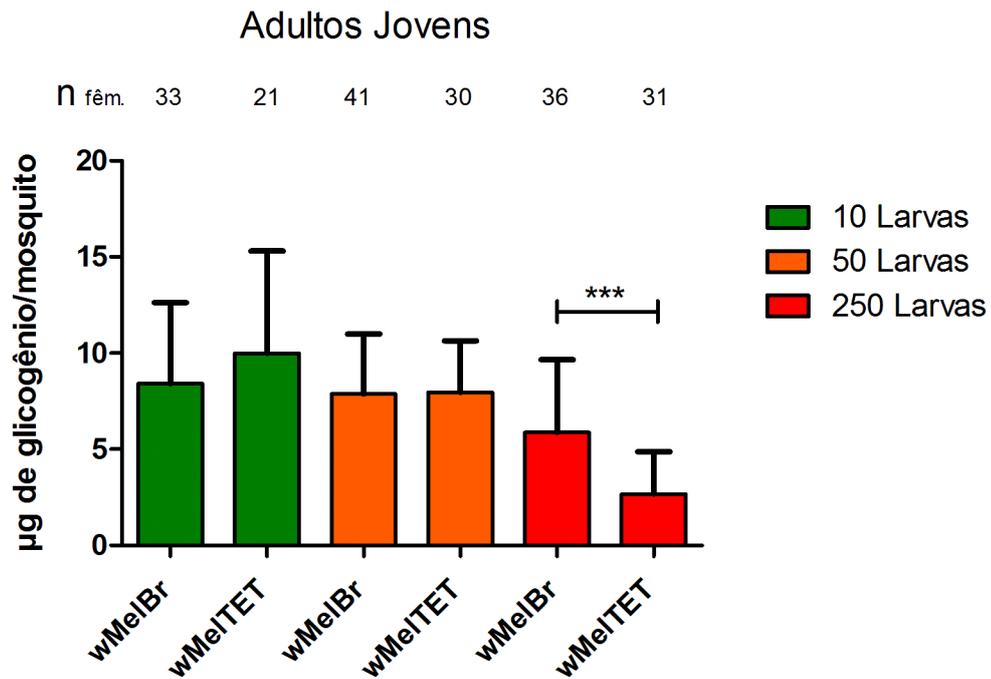


**Figura 32: Dosagem bioquímica de glicogênio em fêmeas de *A. aegypti* infectadas com a cepa *wMelPop*.** O número total de fêmeas analisadas ( $n_{\text{fêm.}}$ ) está indicado na figura, acima dos dados para cada grupo. As barras representam o valor mediano de glicogênio junto com o intervalo interquartil. Dados provenientes de uma réplica biológica (uma geração da colônia de *A. aegypti* do laboratório). Utilizou-se o teste de Mann-Whitney para comparar as densidades com relação ao *status* da infecção por *Wolbachia*. A comparação marcada com asterisco (\*) representa os grupos que diferiram entre si.

### 5.7.2 *wMelBr*

Como feito anteriormente para a cepa *wMelPop*, realizou-se a dosagem tecidual de glicogênio individualmente em fêmeas de *A. aegypti* criadas em diferentes densidades larvais, para isto utilizamos um protocolo simplificado (item 4.5.5.2) o qual não interferiu nas comparações por nós desejadas, que era de comparar indivíduos infectados e não infectados com uma mesma cepa bacteriana e não entre diferentes infecções por cepas.

Ao se analisar as densidades larvais, percebe-se que as fêmeas infectadas por *Wolbachia* na densidade de 10 larvas apresentaram uma concentração média de glicogênio por mosquito de 8,41 µg de glicogênio enquanto o grupo tratado com tetraciclina apresentou 9,98 µg. Na condição 5 vezes mais estressante, o valor foi de 7,88 µg de glicogênio para o grupo infectado, contra 7,95 µg para o grupo *wMelTET*. A diferença ficou por conta da condição 25 vezes mais estressante, onde o grupo infectado por *wMel* apresentou uma concentração média de glicogênio quase três vezes maior que o grupo não infectado (5,87 µg contra 2,67 µg) (Figura 33).



**Figura 33: Dosagem tecidual de glicogênio em fêmeas de *A. aegypti* infectadas com a cepa *wMel*.** O número total de fêmeas analisadas ( $n_{fêm.}$ ) está indicado na figura, acima dos dados para cada grupo. As barras representam o valor médio de glicogênio junto com desvio padrão. Dados são provenientes de uma réplica biológica (uma geração da colônia de *A. aegypti* do laboratório). A comparação marcada com asteriscos (\*\*\*) representa os grupos que diferiram entre si. Utilizou-se o teste T não pareado para comparar as densidades de 10 e 50 larvas ( $p=0,2301$ ;  $p=0,9156$  respectivamente) e o teste de Mann-Whitney para comparar as densidades de 250 larvas com relação ao *status* da infecção por *Wolbachia* ( $p= 0,0001$ ).

### 5.8 Curso da infecção pela cepa *wMel* ao longo do tempo em *A. aegypti*

Estudou-se a dinâmica populacional bacteriana da cepa *wMel* no *background* genético brasileiro (*wMelBr*) e no australiano (*wMelAu*), via dissecação de diversos tecidos chave dos mosquitos em diferentes intervalos de tempo (cabeça/tórax, carcaça, intestino, túbulos de Malpighi, ovários) (item 4.7) (Figuras 34, 35, 36, 37, 38).

Ao se analisar a cabeça/tórax, têm-se o 1º dia como sendo o que apresentou alta densidade de *Wolbachia*, especialmente no *background* genético brasileiro (*wMelBr* = 732.445 cópias de *wsp*), valor que decai ao longo do tempo e atinge o menor valor mediano no 40º dia (*wMelBr* = 24.823 cópias de *wsp*). Fêmeas brasileiras de *A. aegypti* apresentaram

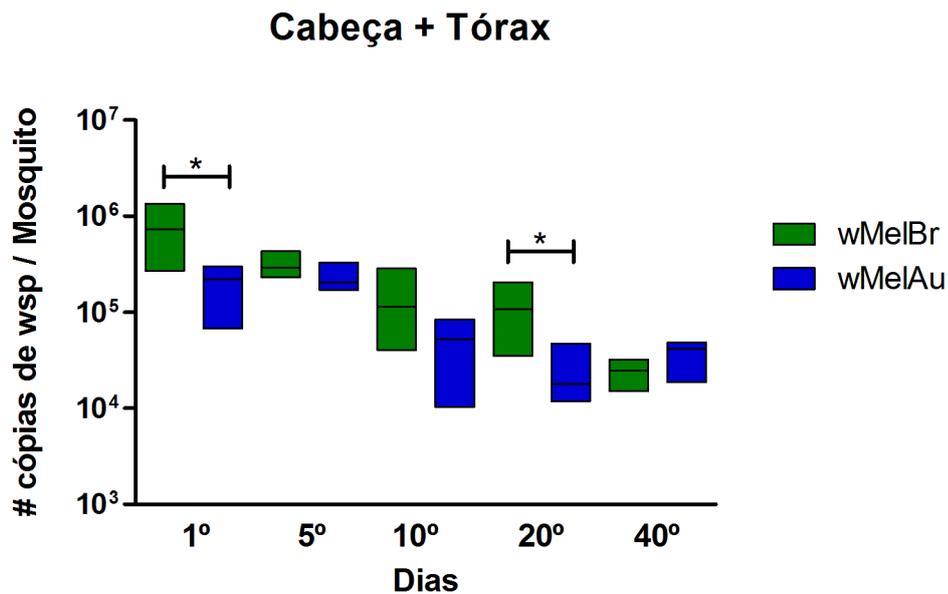
uma concentração bacteriana maior ou igual às fêmeas australianas em todos os intervalos de tempo (casos que apresentaram significância estatística).

Foi a carcaça que apresentou a maior diferença entre os grupos. De forma geral, houve um decaimento na densidade da bactéria ao longo do tempo, o 1º dia apresentando também alta densidade de *Wolbachia*, especialmente no *background* genético brasileiro ( $wMelBr = 1.82 \times 10^6$  cópias de *wsp*) atingindo o menor valor mediano no 20º dia ( $wMelAu = 171.955$  cópias de *wsp*). Mais uma vez as fêmeas brasileiras de *A. aegypti* apresentaram uma concentração bacteriana maior ou igual às fêmeas australianas em todos os intervalos de tempo (casos que apresentaram significância estatística).

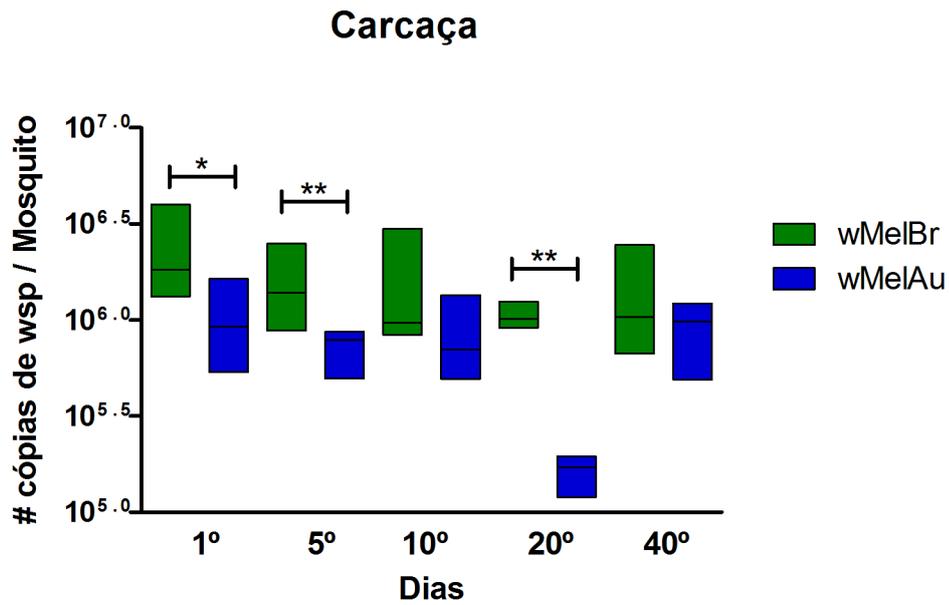
A densidade bacteriana presente no intestino manteve o seu valor mediano relativamente constante ao longo do tempo, tendo o seu valor mais alto no 40º dia ( $wMelAu = 233.531$  cópias de *wsp*). Em comparação à carcaça e cabeça/tórax, o intestino foi o único órgão onde  $wMelAu$  apresentou maior densidade de *Wolbachia* em comparação a  $wMelBr$ , o que ocorre tal fato no 10º ( $wMelAu = 133.342$  cópias de *wsp*) e 40º dia.

Os túbulos de Malpighi por sua vez obtiveram o seu pico de densidade de *Wolbachia* no 5º dia ( $wMelAu = 603.015$  cópias de *wsp*) e esta decaiu rapidamente nos dias seguintes atingindo o seu menor valor mediano no 40º dia ( $wMelAu = 19.210$  cópias de *wsp*). Fêmeas brasileiras de *A. aegypti* apresentaram uma concentração bacteriana significativamente maior que as fêmeas australianas em todos os intervalos de tempo.

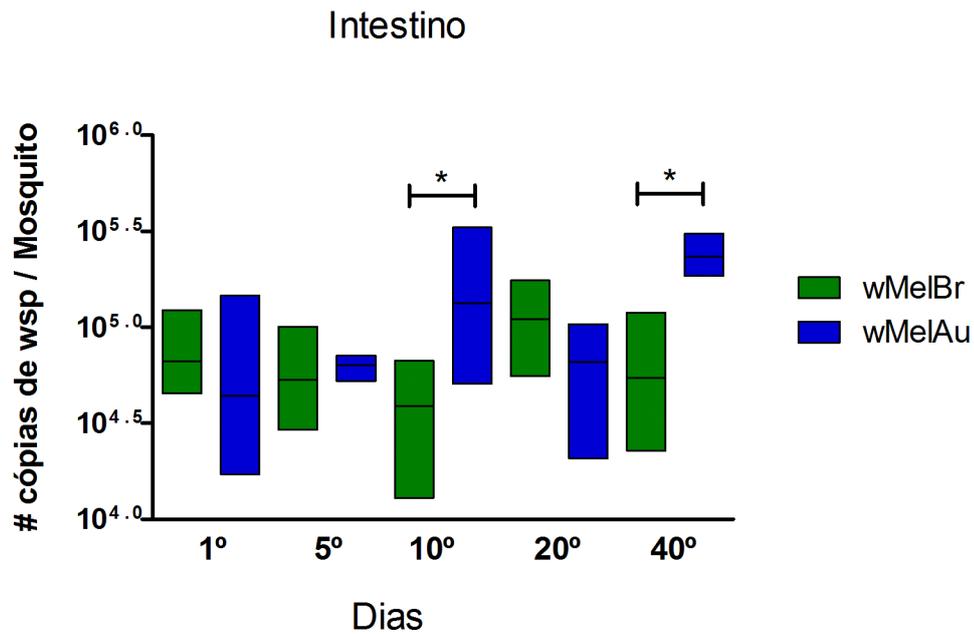
Os ovários foram os órgãos que apresentaram resultado mais discrepante em comparação aos demais tecidos analisados. Neste órgão, a densidade bacteriana de  $wMel$  teve o seu menor valor no 1º dia de vida das fêmeas de *A. aegypti* ( $wMelBr = 946.643$  cópias de *wsp*) e, a partir daí, o seu valor cresceu exponencialmente e se manteve constante do 5º dia em diante.



**Figura 34: Densidade de *wMel* na cabeça/tórax de *A. aegypti* em diferentes intervalos de tempo.** Cada barra representa um conjunto de 5 *pools* (exceto *wMelAu* 40° dia que possui 3 *pools*) contendo 10 tecidos individualmente dissecados, as linhas horizontais dentro dos retângulos no gráfico representam o valor mediano da densidade de *Wolbachia*. Os dados representam uma única réplica biológica (uma única geração de mosquitos da colônia de *A. aegypti* do laboratório). Comparações marcadas com um asterisco (\*) foram significativamente diferentes entre si via teste de Mann-Whitney (1° dia  $p= 0,0159$ ; 20° dia  $p= 0,0159$ ).

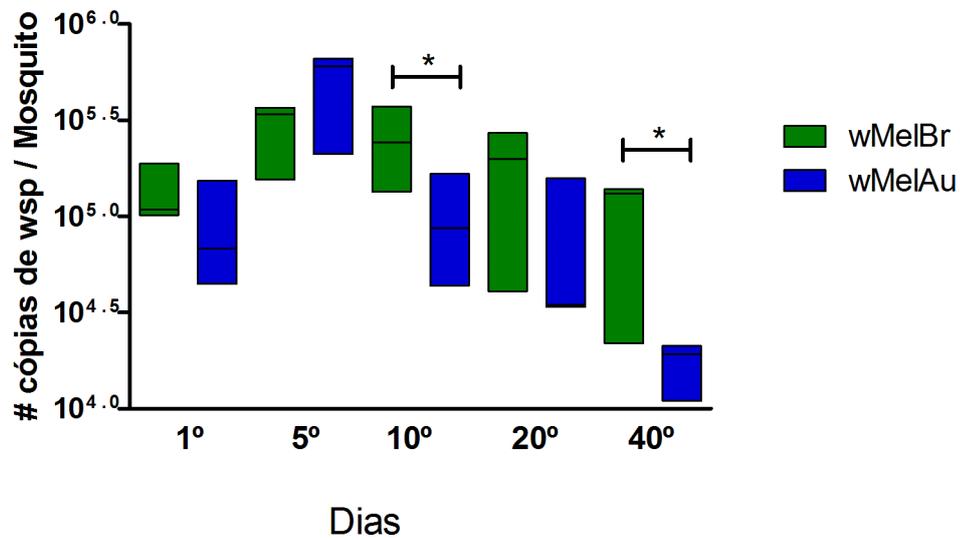


**Figura 35: Densidade de *wMel* na carcaça de *A. aegypti* em diferentes intervalos de tempo.** Cada barra representa um conjunto de 5 *pools* (exceto *wMelAu* 40° dia que possui 3 *pools*) contendo 10 tecidos individualmente dissecados, as linhas horizontais dentro dos retângulos no gráfico representam o valor mediano da densidade de *Wolbachia*. Os dados representam uma única réplica biológica (uma única geração de mosquitos da colônia de *A. aegypti* do laboratório). Comparações marcadas com um asterisco (\*) foram significativamente diferentes entre si via teste de Mann-Whitney (1° dia  $p= 0,0159$ ; 5° dia  $p= 0,0079$ ; 20° dia  $p= 0,0079$ ).

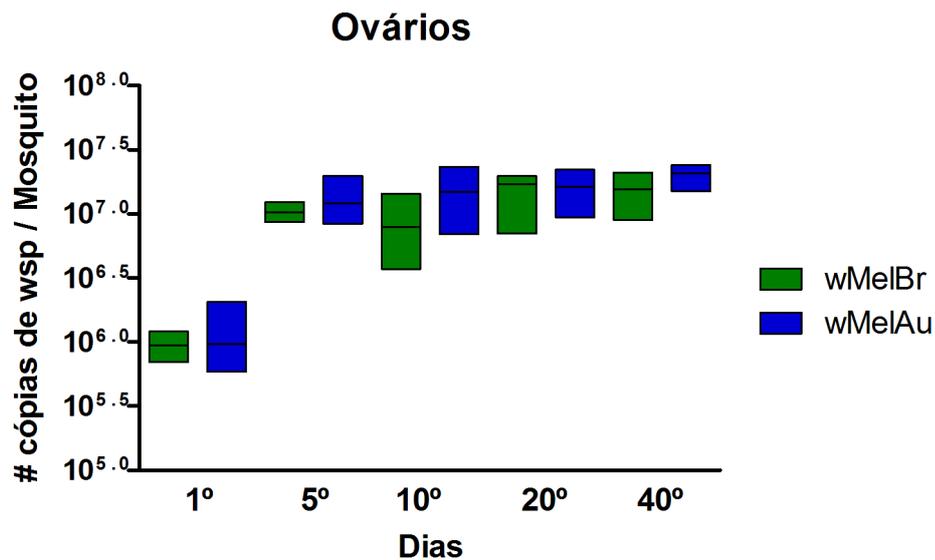


**Figura 36: Densidade de *wMel* no intestino de *A. aegypti* em diferentes intervalos de tempo.** Cada barra representa um conjunto de 5 *pools* (exceto *wMelAu* 40° dia que possui 3 *pools*) contendo 10 tecidos individualmente dissecados, as linhas horizontais dentro dos retângulos no gráfico representam o valor mediano da densidade de *Wolbachia*. Os dados representam uma única réplica biológica (uma única geração de mosquitos da colônia de *A. aegypti* do laboratório). Comparações marcadas com um asterisco (\*) foram significativamente diferentes entre si via teste de Mann-Whitney (10° dia  $p= 0,0317$ ; 40° dia  $p= 0,0357$ ).

### Túbulos de Malpighi



**Figura 37: Densidade de wMel nos túbulos de Malpighi de *A. aegypti* em diferentes intervalos de tempo.** Cada barra representa um conjunto de 5 *pools* (exceto wMelAu 40° dia que possui 3 *pools*) contendo 10 tecidos individualmente dissecados, as linhas horizontais dentro dos retângulos no gráfico representam o valor mediano da densidade de *Wolbachia*. Os dados representam uma única réplica biológica (uma única geração de mosquitos da colônia de *A. aegypti* do laboratório). Comparações marcadas com um asterisco (\*) foram significativamente diferentes entre si via teste de Mann-Whitney (10° dia  $p= 0,0159$ ; 40° dia  $p= 0,0357$ ).

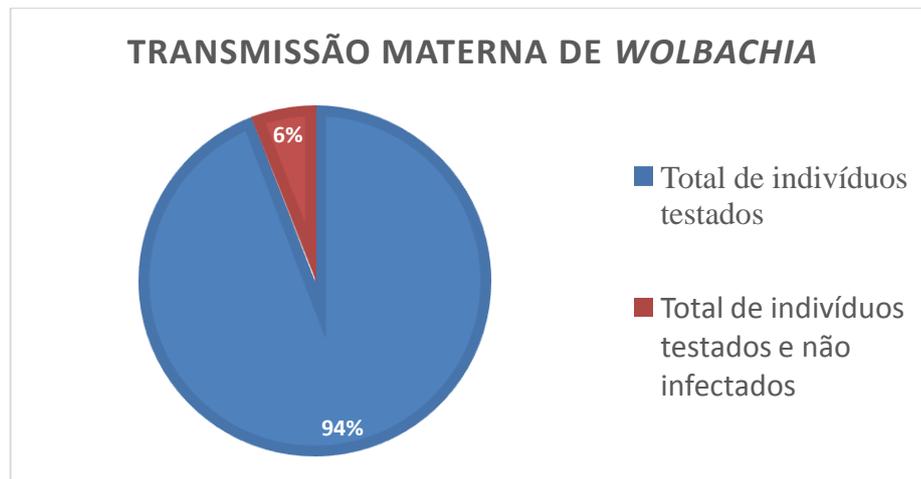


**Figura 38: Densidade de *wMel* nos ovários de *A. aegypti* em diferentes intervalos de tempo.** Cada barra representa um conjunto de 5 *pools* (exceto *wMelAu* 40° dia que possui 3 *pools*) contendo 10 tecidos individualmente dissecados, as linhas horizontais dentro dos retângulos no gráfico representam o valor mediano da densidade de *Wolbachia*. Os dados representam uma única réplica biológica (uma única geração de mosquitos da colônia de *A. aegypti* do laboratório).

## 5.9 Transmissão materna

Fêmeas infectadas provenientes dos cruzamentos recíprocos do experimento de incompatibilidade citoplasmática foram analisadas, assim como a sua progênie, para verificar o *status* da infecção por *Wolbachia* (item 4.8). Observou-se que, do total dos indivíduos analisados (518), apenas uma pequena parcela (32) apresentou resultado negativo para a infecção pela bactéria (Figura 39). Logo, a taxa de transmissão materna observada foi de 94% para a cepa *wMel*, no *background* genético dos mosquitos brasileiros.

Todos os resultados encontrados neste trabalho encontram-se resumidos na tabela 4 abaixo, comparando-se o efeito fenotípico observado na infecção com ambas as cepas estudadas, *wMel* e *wMelPop*, no *background* genético dos mosquitos brasileiros.



**Figura 39: Transmissão materna de *Wolbachia*.** O gráfico representa a porcentagem de indivíduos que apresentaram resultado positivo para a infecção pela cepa *wMel* de *Wolbachia*. A análise se deu via PCR em tempo real utilizando sondas TaqMan<sup>®</sup>. Total de indivíduos analisados: 518. Total de indivíduos negativos: 32.

**Tabela 4:** Comparação entre os fenotípicos observados na infecção com as cepas *wMel* e *wMelPop*.

<i>wMel</i>	<i>wMelPop</i>
Larvas desenvolvem-se mais rápido sob condição altamente estressante	Larvas desenvolvem-se mais rápido sob condição altamente estressante
Não há efeito sobre a fecundidade	Parâmetro não analisado para esta cepa
Não há efeito sobre a fertilidade	Parâmetro não analisado para esta cepa
Redução da longevidade sob condição altamente estressante	Parâmetro não analisado para esta cepa
Tamanho corpóreo reduzido sob condição altamente estressante	Tamanho corpóreo aumentado sob condição altamente estressante
Fêmeas adultas apresentaram níveis elevados de glicogênio	Fêmeas adultas apresentaram níveis elevados de glicogênio
Taxa de incompatibilidade citoplasmática foi de 99,51%	Parâmetro não analisado para esta cepa
Taxa de transmissão materna de 94%	Parâmetro não analisado para esta cepa

## 6 DISCUSSÃO

### 6.1 Tempo de desenvolvimento larval

A competição dependente da densidade é um importante fator na regulação do crescimento populacional devido aos seus efeitos na expressão tanto de caracteres fenotípicos como genotípicos, importantes na caracterização da história de vida dos indivíduos. Tal observação torna-se ainda mais relevante quando se analisa os insetos, nos quais a competição dependente da densidade populacional de imaturos tem efeito direto na taxa de mortalidade, atraso no desenvolvimento e tamanho corpóreo reduzido, como já observado há anos por Nicholson em estudos envolvendo a mosca-varejeira *Lucilia cuprina* (NICHOLSON, 1957) e posteriormente discutido e aprimorado por diversos pesquisadores no que se chama “teoria da seleção natural dependente de densidade” (MACARTHUR, 1962; MACARTHUR & WILSON, 1967; MUELLER, 1997).

Em mosquitos, a competição de imaturos por comida e espaço é fator determinante dos caracteres fenotípicos. Já se demonstrou que um aumento na densidade populacional de larvas, dentre outros fatores citados acima para insetos no geral, tem influência na taxa metabólica, fecundidade (número de ovos por ciclo gonotrófico) e principalmente capacidade vetorial (MOORE & FISHER, 1969; REISEN, 1975; MORI, 1979).

Importante ainda é a análise por sexo, porque apesar de machos e fêmeas competirem ao mesmo tempo com indivíduos de ambos os sexos, os machos, por apresentarem uma menor massa corpórea, desenvolvem-se mais rapidamente e com isso utilizam boa parte do recurso disponível, influenciando assim o desenvolvimento das fêmeas e conseqüentemente, de forma indireta, a capacidade de crescimento da população (GAVOTTE *et al.*, 2009).

Buscou-se analisar dentro do nosso trabalho, além do efeito da densidade larval nos componentes fenotípicos dos mosquitos no geral e separados por sexo, o efeito da bactéria endossimbionte *Wolbachia* nos indivíduos sob tais condições de criação, uma vez que estudos recentes demonstraram que diferentes cepas da bactéria possuem diferentes efeitos fenotípicos sobre o seu hospedeiro (BRELSFOARD & DOBSON, 2011; DE ALMEIDA *et al.*, 2011; RASGON, 2012; BATON *et al.*, 2013).

As comparações da cinética de desenvolvimento de imaturos mostraram que, tanto para a cepa *wMelPop* quanto *wMel* ocorreu, como observado por outros autores (SERPA *et al.*, 2008; GAVOTTE *et al.*, 2009; REISKIND & LOUNIBOS, 2009), aumento no tempo

necessário para as larvas tanto do grupo controle como as infectadas por *Wolbachia*, completarem o desenvolvimento de L1 até o estágio de pupa, na medida em que se aumentou a densidade larval (Figuras 21,23).

Houve efeito da cepa *wMelPop* somente na condição de maior densidade (250 larvas) de forma que seja na análise geral (Figura 21) ou de fêmeas ou machos (Figura 22), as larvas infectadas por *Wolbachia* desenvolveram-se mais rapidamente que as não infectadas, sugerindo então um efeito benéfico da bactéria sob indivíduos em condições de *stress*.

Com relação à cepa *wMel*, o resultado observado foi semelhante ao encontrado com a cepa *wMelPop*, houve diferença apenas na condição de 250 larvas na análise geral (Figura 23) e na análise separada por sexo (Figura 24), as fêmeas infectadas completaram o seu desenvolvimento de forma mais rápida que as fêmeas curadas com o antibiótico tetraciclina, resultado contrário ao observado por Gavotte e colaboradores em estudo envolvendo *A. albopictus* e as cepas *wAlbA* e *wAlbB* (GAVOTTE *et al.*, 2010).

Logo, com o efeito benéfico observado tanto para a cepa *wMelPop* quanto para a cepa *wMel*, pode-se concluir que ambas as cepas estão de alguma forma providenciando uma fonte de vitaminas ao hospedeiro em condições de *stress* nutricional advindo da condição ambiental. É comum o fornecimento de um aporte nutricional por parte dos simbiossomas em associações obrigatórias (ZIENZ *et al.*, 2004), como o que ocorre em nematódeos infectados por *Wolbachia*, onde acredita-se que haja um fornecimento dentre outros, de nucleotídeos e vitaminas essenciais (FOSTER *et al.*, 2005). Brownlie e colaboradores, em estudo envolvendo *Drosophila melanogaster* criada sob regime de baixo teor de ferro, observaram a capacidade da cepa *wMel* em suprir a demanda de ferro do hospedeiro, além de possivelmente providenciar uma proteção ao *stress* oxidativo (BROWNLIE *et al.*, 2009).

Portanto, fica claro que tal resultado depende da cepa bacteriana e da condição de competição em estudo, visto que autores encontraram resultados distintos, como por exemplo a cepa *wAlbA* não apresentou nenhum custo aparente ao tempo de desenvolvimento de imaturos (ISLAM & DOBSON, 2006).

## 6.2 Longevidade

A sobrevivência de mosquitos adultos (especialmente fêmeas) apresenta grande importância na dinâmica populacional relacionada à pressão evolutiva que ocorre no ambiente, além de ser importante quando se analisa modelos matemáticos relacionados à transmissão de doenças como a dengue (KUNO, 1995; LUZ *et al.*, 2003).

No que diz respeito ao *fitness* do hospedeiro, a probabilidade diária de sobrevivência é o fator de maior peso quando se busca modelar o papel do vetor na transmissão de determinado patógeno (RASGON *et al.*, 2003). Em mosquitos, mais especificamente *A. aegypti*, não é diferente (DYE, 1992).

A importância da sobrevivência em campo dos mosquitos foi inicialmente observada por MacDonald em 1957 e analisada posteriormente em componentes entomológicos separados por Garrett-Jones em 1964. Estes demonstraram o efeito da intensidade de transmissão de malária em função de aspectos fisiológicos, comportamentais e ecológicos. A capacidade com que um vetor transmite determinado patógeno aumenta de forma linear em relação a fatores como, competência vetorial e densidade do vetor. Porém, o parâmetro tempo de vida dos mosquitos aumenta de forma exponencial a transmissão da doença (MACDONALD, 1957; GARRETT-JONES, 1964).

A maioria dos patógenos transmitidos por insetos vetores, como *Plasmodium* e o vírus dengue devem passar pelo que é conhecido como “período de incubação extrínseco” (inglês EIP) antes que possam ser transmitidos a um novo hospedeiro. Tal período depende diretamente de fatores genéticos e ambientais (CARRINGTON *et al.*, 2013; TJADEN *et al.*, 2013). Para o vírus dengue, o EIP varia de 10 a 14 dias (SILER *et al.*, 1926). De forma geral, observa-se que este período em campo é considerado longo, consumindo boa parte do tempo de vida do vetor, o que faz com que só uma parcela da população (os indivíduos mais velhos) seja capaz de transmitir a doença (COOK *et al.*, 2008).

Diversos autores já analisaram a cepa wMel de *Wolbachia* em busca dos efeitos que esta causa no hospedeiro. Isto acabou por gerar resultados conflitantes, desde os que reportam ausência de efeitos da bactéria sobre o hospedeiro (HARCOMBE & HOFFMANN, 2004; MONTENEGRO *et al.*, 2006), como efeitos positivos da mesma sobre a longevidade (ALEXANDROV *et al.*, 2009). Todos estes casos são resultantes de infecção natural de *Wolbachia* em *D. melanogaster*.

No nosso trabalho, observou-se que a cepa *wMel*, introduzida artificialmente em *A. aegypti* causou redução no tempo de vida de *A. aegypti* apenas na densidade de 250 larvas em comparação com as fêmeas curadas da infecção. Além disto, observou-se que não houve correlação direta entre a densidade larval e a sobrevivência dos indivíduos: o grupo de 250 larvas *wMelTET* se comportou como os indivíduos da densidade de 10 larvas (no que diz respeito ao tempo de sobrevivência) (Figura 25).

Chrostek e colaboradores demonstraram, ao estudarem *D. melanogaster* infectada pelas cepas *wMel*, *wMelCS*, *wMel-Like* e *wMelCS-Like*, que há relação direta entre a densidade bacteriana no indivíduo e a patogenicidade causada por esta no hospedeiro (CHROSTEK *et al.*, 2013). Logo, uma das possíveis explicações para a sobrevivência observada no nosso trabalho seria a recente infecção de *Wolbachia* no *background* genético dos mosquitos brasileiros, que poderia estar causando um efeito patogênico mais exagerado, fazendo com que os mosquitos infectados apresentassem uma redução no seu tempo de vida.

Diversos autores já observaram o efeito de *Wolbachia* no tempo de vida do hospedeiro. Baton e colaboradores (BATON *et al.*, 2013) demonstraram que a cepa *wFlu* não causou nenhum efeito aparente no tempo de vida de *A. fluviatilis*. Já Yeap e colaboradores (YEAP *et al.*, 2011) observaram uma redução brusca no tempo de vida de *A. aegypti* quando infectados pela cepa *wMelPop*. Walker e colaboradores (WALKER *et al.*, 2011) viram que a cepa *wMel* reduziu cerca de 10% o tempo de vida dos mosquitos. Como já citado anteriormente, viu-se aqui também uma redução no tempo de vida dos mosquitos infectados, porém tal valor ultrapassou a marca dos 10% facilmente em alguns tratamentos (na condição de 250 larvas, o tempo médio de vida foi de 24 dias para as fêmeas tratadas com antibiótico e de 16 dias para as infectadas por *wMel*).

### 6.3 Fecundidade e fertilidade

A fecundidade (número total de ovos) e fertilidade (número de ovos que eclodem, ou seja, viáveis) são dois pontos críticos quando se busca estudar *fitness* de insetos e consequentemente mosquitos (HARD *et al.*, 1989), sendo portanto parâmetros importantes quando se estuda aspectos ecológicos, epidemiológicos e evolutivos de insetos vetores.

Ao se analisar na literatura os efeitos de *Wolbachia* sobre a fecundidade dos mosquitos, encontram-se resultados mistos, dependendo da cepa bacteriana em estudo. Tem-

se desde um efeito benéfico, aumentando a fecundidade (VAVRE *et al.*, 1999; DOBSON *et al.*, 2002; DOBSON *et al.*, 2004), a efeitos negativos, como a redução da fecundidade de fêmeas de *A. aegypti* infectadas por *wMelPop* (MCMENIMAN & O'NEILL 2010).

Assim como BATON e colaboradores (BATON *et al.*, 2013) que não observaram nenhum efeito aparente da cepa *wFlu* na fecundidade de *A. fluviatilis*, no nosso trabalho, a cepa *wMel* não apresentou nenhum efeito sobre a fecundidade de *A. aegypti* criado sob condições ideais de laboratório (Figura 26). Também não houve qualquer efeito sobre a fecundidade ao longo de três ciclos gonotróficos nem sob o sucesso de oviposição destas fêmeas em diferentes condições de *stress* (Figura 27; Figura 28; Tabela 3). Tais resultados contrastam WALKER e colaboradores (WALKER *et al.*, 2011) que observaram uma redução de 10% na fecundidade das fêmeas infectadas por esta mesma cepa bacteriana.

#### **6.4 Incompatibilidade citoplasmática**

Para que o controle biológico utilizando *Wolbachia* seja efetivo é necessário que haja um alto grau de incompatibilidade citoplasmática (SINKINS, 2004), como forma de contornar a transmissão materna imperfeita da bactéria, assim como possíveis custos ao *fitness* do hospedeiro (TURELLI, 2010). Este feito fenotípico foi primeiramente observado por Laven (LAVEN, 1967) e associado com *Wolbachia* por Yen e Barr (YEN & BARR, 1971).

Caspari e Watson foram alguns dos primeiros pesquisadores a modelar matematicamente o processo dinâmico de mosquitos infectados com *Wolbachia* e os efeitos da incompatibilidade citoplasmática por esta causada (CASPARI & WATSON, 1959). De forma resumida, segundo esses pesquisadores, para que *Wolbachia* invada uma população, o benefício reprodutivo associado à incompatibilidade citoplasmática tem que ser maior que a redução da fecundidade associada à infecção.

Como forma de determinar se a cepa *wMel* causa no *background* genético brasileiro uma taxa de incompatibilidade citoplasmática, semelhante à observada em outras cepas e espécies/populações de mosquitos (TRPIS *et al.*, 1981; KAMBHAMPATI *et al.*, 1993; JAMNONGLUK *et al.*, 2000; WALKER *et al.*, 2011), realizou-se cruzamentos recíprocos envolvendo mosquitos retrocruzados infectados com a bactéria e mosquitos retrocruzados curados com o antibiótico tetraciclina.

A taxa de incompatibilidade citoplasmática causada pela cepa *wMel* no *background* genético brasileiro ainda que parcial, foi alta (99,51%; Figura 29), em comparação com a observada em outros estudos como *A. aegypti* australianos infectados por esta mesma cepa (90%), (RASGON & SCOTT, 2003; DOBSON *et al.*, 2004; DURON *et al.* 2006; WALKER *et al.*, 2011; BATON *et al.*, 2013). Apesar de ainda ser desconhecida a causa dessa incompatibilidade parcial, acredita-se que os responsáveis é o genótipo do hospedeiro, do endossimbionte e o ambiente (JAMNONGLUK *et al.*, 2000; WEEKS *et al.*, 2002). Paralelamente a isto, acredita-se ainda que uma baixa densidade da bactéria nos testículos seja responsável pelo efeito parcial da incompatibilidade citoplasmática visto que há uma correlação entre este efeito fenotípico e a densidade bacteriana (BREEUWER & WERREN, 1993). Caso a infecção reduza a produção de esperma nos testículos, como já evidenciado (SNOOK *et al.*, 2000), haveria então uma pressão seletiva, por parte do hospedeiro, para a eliminação da bactéria dos testículos (ENGELSTÄDTER & HURST, 2009).

## 6.5 Morfometria

Existem evidências de que aumento no tamanho corpóreo das fêmeas de mosquitos pode levar ao aumento na capacidade em transmitir o patógeno, gerando novos casos da doença em questão, como já observado em *A. aegypti* (KELLY & EDMAN, 1992; TUN-LIN *et al.*, 2000). Há também correlação direta entre o tamanho corpóreo (no caso, tamanho alar) e o aumento da fecundidade, como já observado anteriormente por diversos autores (ISTOCK *et al.*, 1975; BRIEGEL, & TIMMERMANN, 2001b; ARMBRUSTER & HUTCHINSON, 2002). Evidências indicam que fêmeas maiores possuem maior capacidade de voo, maior capacidade de encontrar o hospedeiro para realizar repasto sanguíneo, assim como locais para oviposição (NASCI *et al.*, 1991; BRIEGEL & TIMMERMANN, 2001a). Indivíduos maiores possuem mais reservas energéticas (BRIEGEL & TIMMERMANN, 2001a) e, como possuem uma maior razão massa/área de superfície, são mais resistentes à dessecação causada pelo ambiente (MOGI *et al.*, 1996).

Gama e colaboradores (GAMA *et al.*, 2005) demonstraram que há correlação inversamente proporcional entre o aumento da densidade larval e o tamanho corpóreo de *A. aegypti*, assim como observado nas fêmeas deste trabalho (Figura 30, 31). Quando analisamos o efeito da infecção pela cepa *wMelPop* (Figura 30) no tamanho dos indivíduos do sexo feminino percebemos que, na condição de 250 larvas, as fêmeas infectadas pela bactéria

apresentaram um maior tamanho corpóreo, o que nos leva a teorizar que em condições estressantes, *wMelPop* passa de uma relação de comensalismo, onde somente a bactéria se beneficia, sem efeitos negativos aparentes ao hospedeiro, como observado nas densidades de 10 e 50 larvas (Figuras 21, 23, 30, 31) para uma relação mutualística, onde ambos indivíduos se beneficiam. Tal relação foi observada quando criou-se larvas de *A. aegypti* sob condições nutricionais estressantes como a falta de ferro (BROWNLIE *et al.*, 2009).

Tais resultados observados para a cepa virulenta *wMelPop* foram contrastantes com o observado para a cepa *wMel* com relação ao decaimento do tamanho corpóreo à medida em que se aumentou a condição estressante (Figura 31), onde na condição de 250 larvas, houve um efeito inverso, com as fêmeas infectadas pela bactéria apresentando um tamanho corpóreo menor se comparadas as fêmeas tratadas com o antibiótico tetraciclina, este que já foi comprovado não causar nenhuma alteração no tamanho corpóreo de fêmeas de *Cordylocheres scorpioides*, tendo influência apenas na viabilidade do esperma de machos desta espécie (ZEH *et al.*, 2012), o que provavelmente exclui, no nosso caso, a possibilidade de uma interferência deste antibiótico na morfologia observada nos mosquitos.

## 6.6 Quantificação de glicogênio

Os insetos de forma geral estão constantemente consumindo energia, de forma que, quando não estão se alimentando, utilizam as reservas energéticas. Triglicerídeos e glicogênio são as duas formas de reserva energética das células animais. A glicose é armazenada na sua forma polimérica, o glicogênio, o qual pode ser rapidamente degradado, de acordo com a demanda, para ser usado como combustível na via glicolítica (STEELE, 1982).

A glicose é essencial também para outras funções nos insetos, como a síntese de quitina, componente principal da cutícula (LOCKEY, 1988) e para a síntese de açúcares alcoólicos necessários para a adaptação ao frio (STOREY, 1997) ou seca (WATANABE *et al.*, 2002).

Caracterizou-se no presente estudo o perfil de reserva energética (via dosagem de glicogênio) nas fêmeas de *A. aegypti* sob diferentes condições estressantes, buscando assim observar os efeitos das cepas *wMelPop* e *wMel* de *Wolbachia* sobre os níveis de glicogênio.

Com relação à situação de *stress* observou-se para a cepa *wMel*, assim como outros autores (BRIEGEL, 1990; GULLAN & CRANSTON, 1999), que há uma correlação inversa entre a concentração de glicogênio e a densidade larval (Figuras 32, 33). No entanto, para a cepa *wMelPop* (Figura 34) tal resultado não se manteve, provavelmente devido ao número de indivíduos analisados ter sido baixo. Interessante notar que, em ambas as cepas, na densidade de 250 larvas, as fêmeas infectadas possuem uma maior concentração de glicogênio do que o grupo controle não infectado, reforçando a questão levantada de *Wolbachia* proporcionar uma suplementação metabólica ao hospedeiro em situações de baixa disponibilidade de alimento.

### **6.7 Curso da infecção pela cepa *wMel* ao longo do tempo em *A. aegypti***

A densidade de *Wolbachia* nos tecidos é um dos fatores mais importantes para o entendimento dos efeitos biológicos causados por esta bactéria (DOBSON *et al.*, 1999). A redução na densidade bacteriana pode resultar na transmissão materna imperfeita e, conseqüentemente, na perda da infecção. Por outro lado, aumento desta densidade pode levar a efeitos patológicos e por conseqüente, danos ao *fitness* do hospedeiro (MCGRAW *et al.*, 2002; MOREIRA *et al.*, 2009b). Há ainda a interferência com a replicação de patógenos proporcionada pela *Wolbachia*, sendo que a sua presença em tecidos-chave do vetor, como intestino, corpo gorduroso e glândula salivar, é diretamente relacionada com o grau de bloqueio ao patógeno (MOREIRA *et al.*, 2009; ITURBE-ORMAETXE *et al.*, 2011; WALKER *et al.*, 2011; LU *et al.*, 2012).

Dado a pressão seletiva que acaba por ocorrer em ambos, espera-se que algum mecanismo tenha evoluído para controlar a densidade da infecção bacteriana dentro de um limite tolerável, o que leva a concluir que tanto o genótipo do simbiote quanto do hospedeiro podem contribuir para a regulação da densidade bacteriana (MOUTON *et al.*, 2003). No caso de *Wolbachia*, diversos autores já demonstraram que diferentes cepas da bactéria, de diferentes genótipos apresentaram valores bem distintos de densidade populacional no mesmo hospedeiro infectado por uma ou mais cepas bacterianas (IJICHI *et al.*, 2002; KONDO *et al.*, 2002; IKEDA *et al.*, 2003; MOUTON *et al.*, 2003, MOUTON *et al.*, 2004), assim como diferentes hospedeiros (possuindo os seus respectivos genótipos) quando infectados com a mesma cepa de *Wolbachia*, apresentaram valores de densidade bacteriana bem distintos entre si (BOYLE *et al.*, 1993; POINSOT *et al.*, 1998; IKEDA *et al.*, 2003).

Portanto, buscou-se caracterizar a densidade bacteriana da cepa wMel em diferentes tecidos, no *background* genético da colônia brasileira de mosquitos recém retrocruzados e de mosquitos australianos nos quais o processo de introgressão da bactéria se deu há mais tempo. De nosso conhecimento, este é o primeiro trabalho a realizar esta dinâmica da densidade bacteriana ao longo do tempo de vida de *A. aegypti*.

Como esperado tanto para o *background* genético brasileiro e australiano, e de acordo com outros autores (DUTTON & SINKINS, 2004; BATON *et al.*, 2013), a densidade de *Wolbachia* variou consideravelmente ao longo do tempo de vida (e nos tecidos específicos) das fêmeas de *A. aegypti*, com exceção dos ovários, nos quais a densidade bacteriana se manteve constantemente elevada após o primeiro dia, confirmando a alta taxa de transmissão materna da mesma. Assim como observado por diversos autores (UNCKLESS *et al.*, 2009, TORTOSA *et al.*, 2010), houve um decréscimo na densidade bacteriana com o passar do tempo. Resultado contrário foi obtido por Zhao e colaboradores estudando *Tetranychus urticae* via indução de cruzamentos recíprocos específicos, onde observou-se um aumento da densidade bacteriana com o passar do tempo no corpo do inseto como um todo (ZHAO *et al.*, 2013).

Nosso dado comprova a hipótese de que a densidade bacteriana depende diretamente dos genótipos do hospedeiro e da bactéria envolvida, como já observado anteriormente por outros autores (KONDO *et al.*, 2005; AHANTARIG *et al.*, 2008), assim como de questões ambientais (HURST *et al.*, 2000).

No que diz respeito à variação da densidade bacteriana entre mosquitos australianos e brasileiros, observou-se que em todos os tecidos analisados (com exceção do intestino no 10º e 40º dia de vida dos mosquitos), fêmeas brasileiras apresentaram maior densidade de *Wolbachia*, o que nos sugere consequências evolutivas da transmissão materna, a qual teoricamente leva a uma atenuação da “virulência” do simbionte, através de um processo coevolutivo juntamente com o hospedeiro ao longo das gerações, como previamente hipotetizado (LIPSITCH *et al.*, 1996; BONDS, 2006)

Duas possíveis hipóteses não exclusivas podem ser propostas para explicar a alta densidade de *Wolbachia* no *background* genético dos mosquitos brasileiros: 1) *Wolbachia* pode estar mal adaptada ao novo hospedeiro e com isto super explora os mosquitos brasileiros, multiplicando-se rápido demais. Nessa situação, a alta taxa de replicação bacteriana viria de uma super exploração dos recursos energéticos do hospedeiro, além de que os mosquitos brasileiros poderiam também ser considerados (devido à recente infecção)

menos resistentes, já que alguns tecidos apresentaram uma maior densidade bacteriana. 2) os mosquitos brasileiros poderiam estar mal adaptados à presença de um novo simbiote, o que levaria à expressão de uma resposta imune ineficiente e com altos custos para o hospedeiro. Nessa situação, o sistema imune passaria de herói a vilão, onde uma resposta exagerada poderia, além de não levar à redução da carga bacteriana, causar danos ao mosquito (LIPSITCH & MOXON, 1997; SCHNEIDER & AYRES, 2008). Torna-se interessante portanto, a realização futura de estudos dos genes envolvidos na resposta imune destes mosquitos sob diferentes *backgrounds* genéticos, representativos de um processo infeccioso recente e tardio, como forma de comprovar tais hipóteses. Há também a necessidade analisar a influência da densidade bacteriana de *Wolbachia* no processo de bloqueio do vírus dengue.

## 6.8 Transmissão materna

A habilidade de *Wolbachia* em se fixar na população selvagem de mosquitos tem sido exaustivamente modelada matematicamente. Sabe-se que depende de diversos parâmetros, tendo como principais: 1) o nível de incompatibilidade citoplasmática, 2) qualquer possível efeito causado pela bactéria no *fitness* do hospedeiro e 3) taxa de transmissão materna (a proporção de descendentes que falham em herdar a infecção de sua mãe infectada) (CASPARI & WATSON, 1959; EWALD, 1994; LIPSITCH *et al.*, 1996).

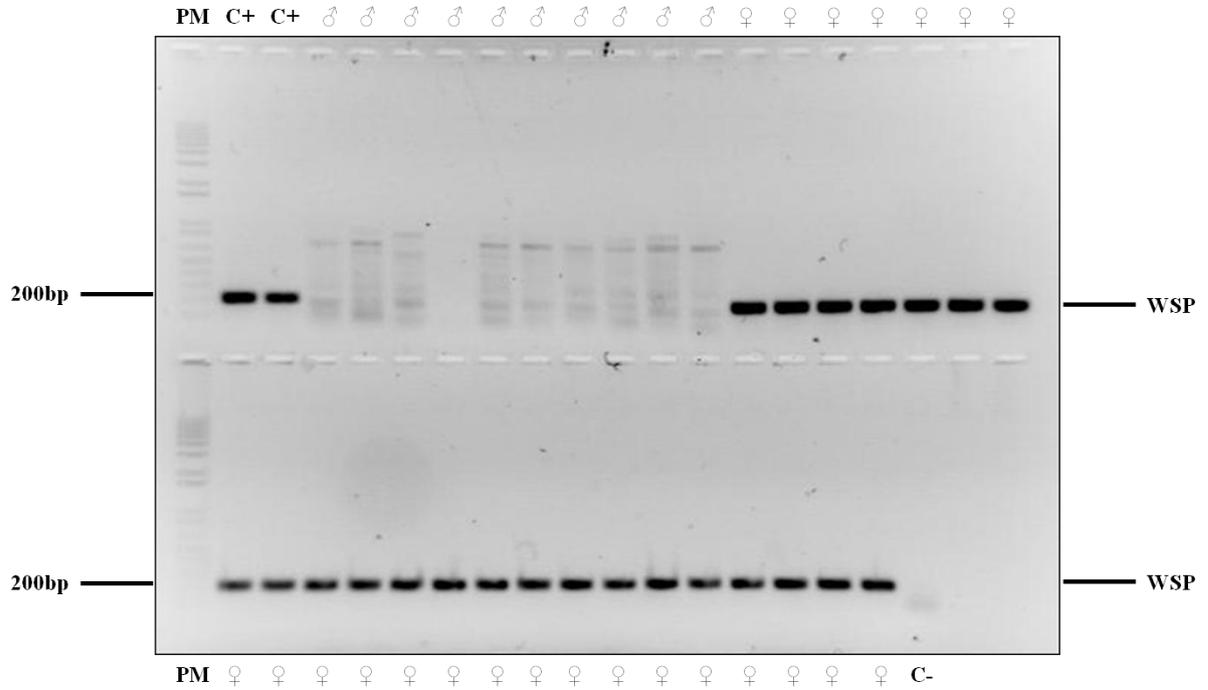
Buscou-se no presente trabalho caracterizar esta taxa no *background* genético brasileiro. Obtivemos 94% de transmissão vertical da bactéria, valor abaixo do encontrado para a cepa *wMel* e *wMelPop* em outros trabalhos (MCMENIMAN *et al.*, 2009, WALKER *et al.*, 2011). Diversos autores já observaram que esta perda de eficiência na transmissão vertical da bactéria pode estar associada a fatores ambientais, como altas temperaturas (STEVENS, 1989), ou a antióticos de ocorrência natural, como no mel de abelhas (STEVENS & WICKLOW, 1992). Além disto, o *background* genético do hospedeiro pode afetar diretamente a taxa de transmissão do endossimbiote (STOUTHAMER *et al.*, 1999), o que acaba sendo uma possível explicação para o efeito observado por nós, visto que estamos trabalhando com uma infecção recente de *Wolbachia* no *background* genético de *A. aegypti* brasileiros nunca antes infectados pela bactéria.

## 7 CONCLUSÕES

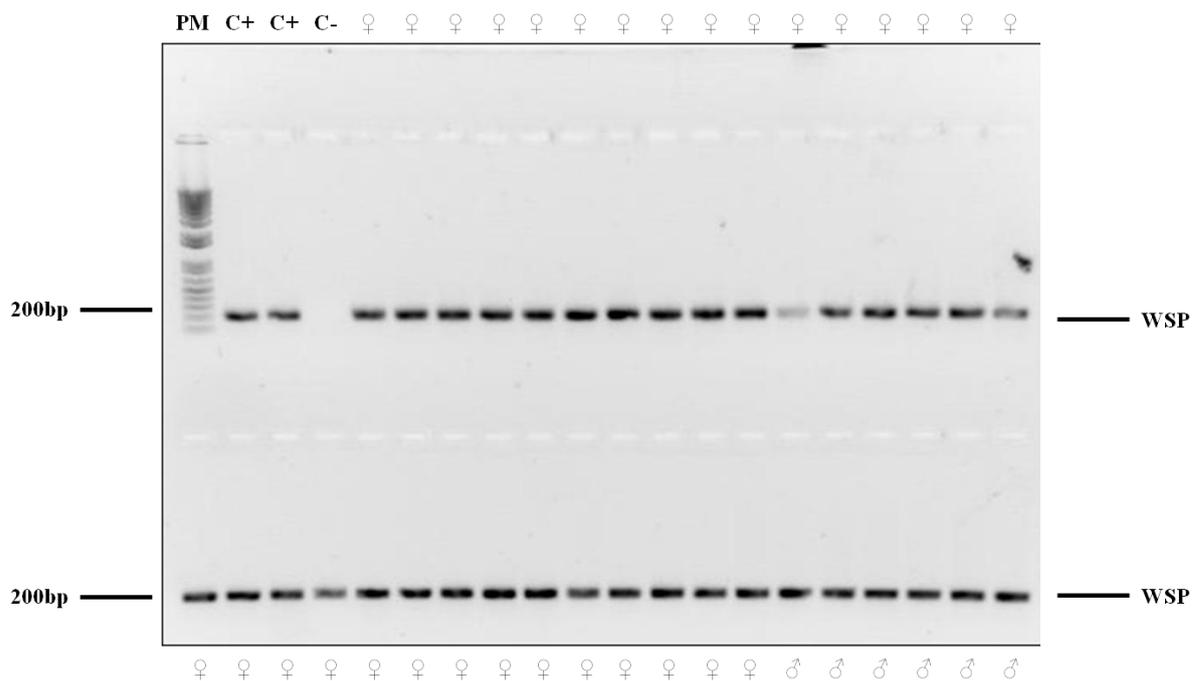
O nosso estudo mostra os efeitos das cepas *wMel* e *wMelPop* alguns parâmetros biológicos de mosquitos *A. aegypti* brasileiros. Dado que os parâmetros aqui analisados são importantes para o potencial dos vetores em transmitir a dengue, pode-se concluir que ambas as cepas têm potencial de serem usadas como agente de controle biológico de vetores nas populações de mosquitos *A. aegypti* do Brasil. Destaque para a cepa *wMel*, que apresenta elevada taxa de incompatibilidade citoplasmática, elevados níveis de transmissão materna e aparentemente não acarreta custo elevado ao *fitness* do hospedeiro, com exceção do tempo de vida de adultos. A cepa ainda se apresenta como sendo benéfica em algumas situações, como imaturos desenvolvendo-se mais rapidamente e apresentando uma maior reserva energética de glicogênio em condições estressantes.

## 8 ANEXOS

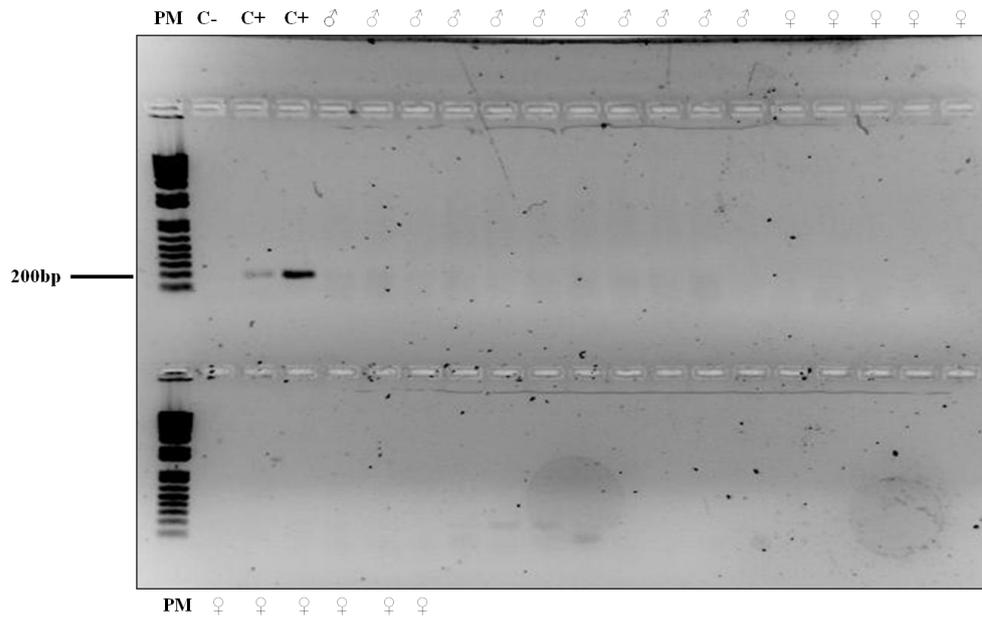
### 8.1 Anexo 1. Cruzamento recíproco do experimento de incompatibilidade citoplasmática. Macho (♂) não infectado e fêmea (♀) infectada pela cepa *wMel*.



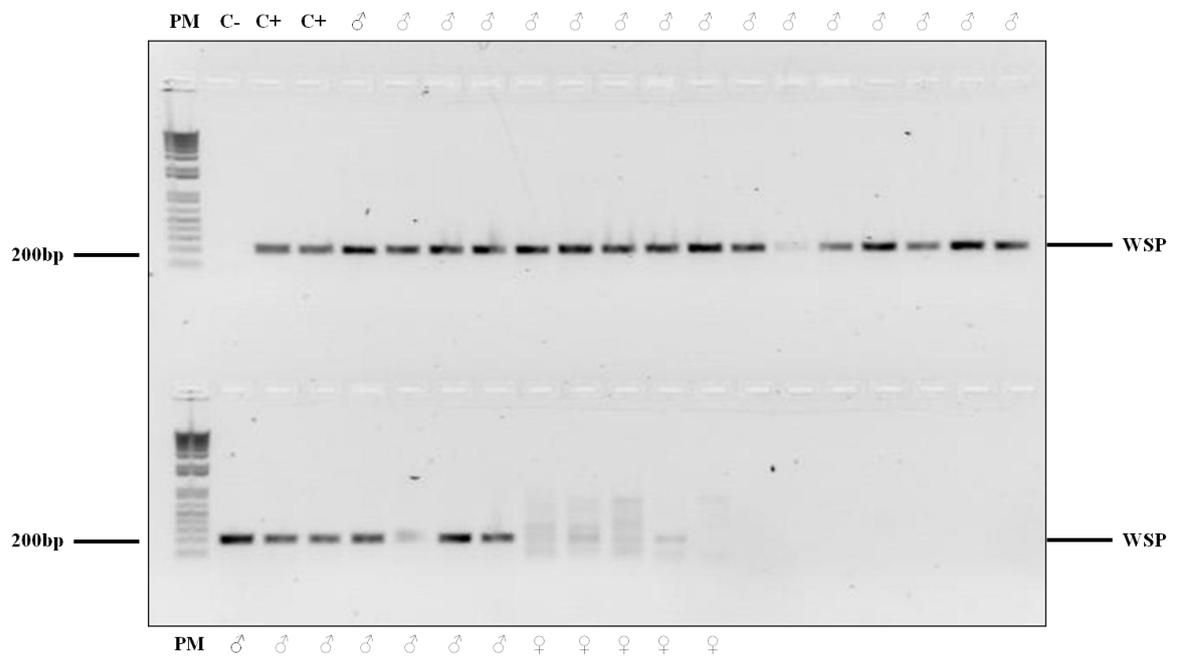
### 8.2 Anexo 2. Cruzamento recíproco do experimento de incompatibilidade citoplasmática. Macho (♂) e fêmea (♀) infectados pela cepa *wMel*.



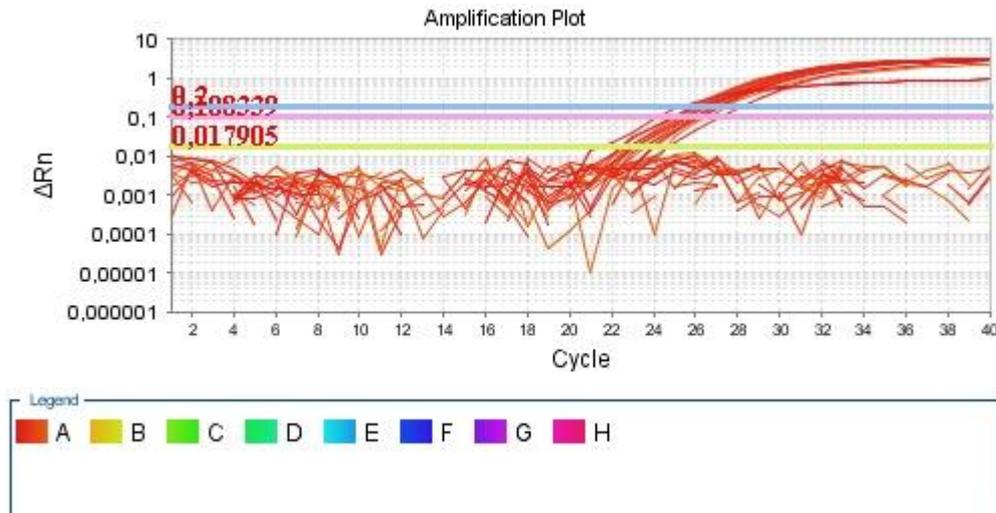
**8.3 Anexo 3. Cruzamento recíproco do experimento de incompatibilidade citoplasmática. Macho (♂) e fêmea (♀) não infectados pela cepa *wMel*.**



**8.4 Anexo 4. Cruzamento recíproco do experimento de incompatibilidade citoplasmática. Macho (♂) infectado pela cepa *wMel* e fêmea (♀) não infectada.**



**8.5 Anexo 5. Cruzamento recíproco do experimento de incompatibilidade citoplasmática. Indivíduos que apresentaram amplificação duvidosa.** Amarelo: Sonda referente ao gene ribossomal RPS17. Rosa: Sonda referente à proteína de superfície *wsp* de *wMel*. Azul: Sonda referente à proteína de superfície *wsp* de *wMelPop*. Houve amplificação na sonda RPS17 e *wsp* de *wMel*.



## 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHANTARIG, A. *et al.* Relative *Wolbachia* density of field-collected *Aedes albopictus* mosquitoes in Thailand. **Journal of vector ecology : journal of the Society for Vector Ecology**, v. 33, n. 1, p. 173–7, 2008.
- ALEXANDROV, I., D., *et al.* Removing endosymbiotic *Wolbachia* specifically decreases lifespan of females and competitiveness in a laboratory strain of *Drosophila melanogaster*. **Russ. J. Genet.** v. 43, p. 1147–1152, 2007.
- ALPHEY, L. *et al.* Sterile-insect methods for control of mosquito-borne diseases: an analysis. **Vector Borne Zoonotic Dis.** v. 10, p. 295–311, 2010.
- ANDRÉ, A., V., S. *et al.* The role of endosymbiotic *Wolbachia* bacteria in the pathogenesis of river blindness. **Science.** v. 295, p.1892-1895; 2002.
- ARMBRUSTER, P. & HUTCHINSON, R. Pupal mass and wing length as indicators of fecundity in *Aedes albopictus* and *Aedes geniculatus* (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 39, n. 4, p. 699–704, 2002.
- BÄCK, A. T. & LUNDKVIST, A. Dengue viruses - an overview. **Infection ecology & epidemiology**, v. 3, p. 1–21, 2013.
- BALDO, L. & WERREN, J., H. Revisiting *Wolbachia* supergroup typing based on WSP: spurious lineages and discordance with MLST. **Curr. Micro- biol.** v. 55, p.81–87, 2007.
- BALDO, L., *et al.*: Multilocus sequence typing system for the endosymbiont *Wolbachia pipientis*. **Applied and Environmental Microbiology.** V. 72, sup 11, p.7098-7110, 2006.
- BANDI, C., *et al.* Phylogeny of *Wolbachia* in filarial nematodes. **Proc. R. Soc. Lond.** v 265, p.2407–2413, 1998.
- BARATA, E., A., M., F., *et al.* *Aedes aegypti* (L.) population in an endemic area of dengue in the Southeast Brazil. **Rev. Saúde Pública**, v.35, p. 237-242, 2001.
- BARGIELOWSKI, I., *et al.* Comparison of life history characteristics of the genetically modified OX513A line and a wild type strain of *Aedes aegypti*. **PLoS ONE.** V.6, e20699, 2011.
- BATON, A., L., *et al.* wFlu: characterization and evaluation of a native *Wolbachia* from the mosquito *Aedes fluviatilis* as a potential vector control agent. **PloS one**, v. 8, n. 3, p. e59619, 2013.
- BEATTY, M., E., *et al.* Estimating the global burden of dengue. In: Abstract Book: Dengue. **The Second International Conference on Dengue and Dengue Haemorrhagic Fever**, Phuket, Thailand. 2008.
- BENEDICT, M. Q., & ROBINSON, A., S. The first releases of transgenic mosquitoes: an argument for the sterile insect technique. **Trends Parasitol.** v. 19, p. 349–355, 2003.
- BIAN, G., *et al.* The endosymbiotic bacterium *Wolbachia* induces resistance to dengue virus in *Aedes aegypti*. **PLoS Pathog.** v.6, e1000833, 2010.
- BONDS, M., H. Host life-history strategy explains pathogen-induced sterility. **Am. Nat. P.** v. 168, p. 281–293, 2006.

- BOOKSTEIN, F., L. Morphometric Tools for Landmark Data Geometry and Biology. New York: Cambridge University Press, 1991.
- BORDENSTEIN, R., B., & ROSENGAUS, S. Discovery of a novel *Wolbachia* supergroup in isopteran. **Curr.Microbiol.** v.51, p.393– 398, 2005.
- BOYLE, L., *et al.* 1993 Interspecific and intraspecific horizontal transfer of *Wolbachia* in *Drosophila*. **Science.** v, 260, p. 1796–1799, 1993.
- BRAGA, I., A. & VALLE, D. *Aedes aegypti*: histórico do controle no Brasil. **Rev. Epidemiol. Serv. Saúde**, v. 16, n. 2, p. 113-118, 2007.
- BRAIG, H., *et al.* Cloning and characterization of a gene encoding the major surface protein of the bacterial endosymbiont *Wolbachia pipientis*. **J. Bacteriol**, v.180, p. 2373–2378, 1998.
- BREEUWER, J., A., J., & WERREN, J., H. Cytoplasmic incompatibility and bacterial density in *Nasonia vitripennis*. **Genetics.** v. 135, p. 565–74, 1993.
- BREEUWER, J., A., J., *et al.* Phylogeny of cytoplasmic incompatibility microorganisms in the parasitoid wasp genus *Nasonia* (Hymenoptera: Pteromalidae) based on 16s ribosomal DNA sequences. **Insect. Mol. Biol.** v.1, p.25–36, 1992.
- BRELSFOARD C., L., & DOBSON, S., L. *Wolbachia* effects on host fitness and the influence of male aging on cytoplasmic incompatibility in *Aedes polynesiensis* (Diptera: Culicidae). **J Med Entomol.** v. 48, p. 1008–1015, 2011.
- BRIEGEL, H., *et al.* *Aedes aegypti*: size, reserves, survival, and flight potential. **J. Vector Ecol.** v. 26, p. 21–31, 2001.
- BRIEGEL, H. Metabolic relationship between female body size, reserves and fecundity of *Aedes aegypti*. **J. In- sect Physiol.** v. 36, p. 165-172, 1990.
- BRIEGEL, H., & TIMMERMANN, S., E. *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae): Physiological aspects of development and reproduction. **J. Med. Entomol.** v 38, p, 566-571, 2001.
- BROWER, J., H. Cytoplasmic incompatibility: occurrence in a stored-product pest *Ephestia cautella*. **Ann. Entomol. Soc. Am.** v. 69, p.1011–15, 1975.
- BROWNLIE, J. C. *et al.* Evidence for metabolic provisioning by a common invertebrate endosymbiont, *Wolbachia pipientis*, during periods of nutritional stress. **PLoS Pathogens**, v. 5, n. 4, p. e1000368, 2009.
- BROWNSTEIN, J., S. *et al.* The potential of virulent *Wolbachia* to modulate disease transmission by insects. **J Invertebr Pathol.** v. 84, p. 24–29, 2003.
- BURT, A. Site-specific selfish genes as tools for the control and genetic engineering of natural populations. Population modelling demonstrating the potential efficacy of HEGs. **Proc. Biol. Sci.** v. 270, p. 921–928, 2003.
- CARRINGTON, L., B., *et al.* Effects of Fluctuating Daily Temperatures at Critical Thermal Extremes on *Aedes aegypti* Life-History Traits. **PLoS One**, v. 8, n. 3, p. e58824, 2013.
- CASIRAGHI, M., *et al.* Phylogeny of *Wolbachia pipientis* based on *gltA*, *groEL* and *ftsZ* gene sequences: clustering of arthropod and nematode symbionts in the F super- group, and evidence for further diversity in the *Wolbachia* tree, **Microbiology.** v.151, p.4015–4022, 2005.

- CASPARI, E., & WATSON, G., S. On the evolutionary importance of cytoplasmic sterility in mosquitoes. **Evolution**. v. 13, p. 568–570, 1959.
- CHRISTOPHERS, S., R. *Aedes aegypti* (L.) the yellow fever mosquito, Its life history bionomics and structure. **University Press, Cambridge**, 1960.
- CHROSTEK, E., *et al.* *Wolbachia* variants induce differential protection to viruses in *Drosophila melanogaster*: A Phenotypic and Phylogenomic Analysis. **PLoS genetics**, v. 9, n. 12, p. e1003896, 2013.
- COOK, P., *et al.* Modifying insect population age structure to control vector-borne disease. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 627, p. 126–40, 2008.
- CORDAUX, R., *et al.* Widespread *Wolbachia* infection in terrestrial isopods and other crustaceans. **ZooKeys**, v. 131, n. 176, p. 123–31, 2012.
- CZARNETZKI, A., B., & TEBBE, C., C. Diversity of bacteria associated with Collembola – a cultivation-independent survey based on PCR-amplified 16S rRNA genes. **FEMS Microbiol. Ecol.** v.49, p.217–227, 2004.
- DE ALMEIDA, F., *et al.* Effects of *Wolbachia* on fitness of *Culex quinquefasciatus* (Diptera; Culicidae). **Infect Genet Evol.** v. 11, p. 2138–2143, 2011.
- DEREDEC, A., *et al.* Requirements for effective malaria control with homing endonuclease genes. **Proc. Natl Acad. Sci.** V. 108, P. E874–E880 2011.
- DOBSON, S., *et al.* Fitness advantage and cytoplasmic incompatibility in *Wolbachia* single- and superinfected *Aedes albopictus*. **Heredity**. v. 93, p. 135–142, 2004.
- DOBSON, S., L. *et al.* *Wolbachia* infections are distributed throughout insect somatic and germ line tissues. **Insect Biochem Mol Biol.** v. 29, p. 153–160, 1999.
- DOBSON, S., L. *et al.* Fitness advantage and cytoplasmic incompatibility in *Wolbachia* single- and superinfected *Aedes albopictus*. **Heredity**. V. 93, P. 135-142, 2004.
- DOBSON, S., L., & RATTANADECHAKUL, W. A novel technique for removing *Wolbachia* infections from *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). **J Med Entomol.** v. 38, p. 844–849, 2001.
- DOBSON, S., *et al.* Mutualistic *Wolbachia* infection in *Aedes albopictus*: Accelerating cytoplasmic drive. **Genetics**. v.160, p. 1087–1094 2002.
- DURON, O. *et al.* High *Wolbachia* density correlates with cost of infection for insecticide resistant *Culex pipiens* mosquitoes. **Evolution**. v. 60, p. 303–314, 2006.
- DUTTON, T., J., & SINKINS, S., P. Strain-specific quantification of *Wolbachia* density in *Aedes albopictus* and effects of larval rearing conditions. **Insect Mol Biol.** v. 13, p.317–322, 2004.
- DYE, C. The analysis of parasite transmission by bloodsucking insects. **Annu. Rev. Entomol.** v.37, p.1-19, 1992.
- ENGELSTÄDTER, J. & HURST, G., D., D. The ecology and evolution of microbes that manipulate host reproduction. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 40, n. 1, p. 127–149, 2009.

- EWALD, P., W. Evolution of Infectious Disease. Oxford: **Oxford University Press**, 1994.
- FAILLOUX, A.-B., *et al.* Geographic genetic variation in populations of the dengue virus vector *Aedes aegypti*. **Journal of Molecular Evolution**. v.55, p.653-663, 2002.
- FIGUEIREDO, L., T., M. Dengue in Brazil: past, present and future perspective. **Dengue Bulletin**, v. 27, p. 25-33, 2003.
- FORATTINI, O., P. Identificação de *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse) no Brasil. **Rev. Saúde Pública**. V.20(3), p. 244-5, 1986.
- FOSTER, J., *et al.* The *Wolbachia* genome of *Brugia malayi*: endosymbiont evolution within a human pathogenic nematode. **PLoS Biol**. V. 3, P. e121. doi:10.1371/journal.pbio.0030121, 2005.
- FRANZ, A. W. *et al.* Engineering RNA interference- based resistance to dengue virus type 2 in genetically modified *Aedes aegypti*. **Proc. Natl Acad. Sci**. v. 103, p. 4198–4203 2006.
- FRANZ, A. W. *et al.* Stability and loss of a virus resistance phenotype over time in transgenic mosquitoes harbouring an antiviral effector gene. **Insect Mol. Biol**. V. 18, P; 661–672, 2009.
- FU, Y, *et al.* Artificial triple *Wolbachia* infection in *Aedes albopictus* yields a new pattern of unidirectional cytoplasmic incompatibility. **Appl Environ Microbiol**. V. 76, P. 5887–5891, 2010.
- GADELHA, D., P., & TODA, A., T. Biologia e comportamento do *Aedes aegypti*. **Rev. Brasil Malariol. D. Trop**. v. 37, p. 29-36, 1985.
- GAMA, R. *et al.* Effect of larvae density on adult size of *Aedes aegypti* reared under laboratory conditions. **Revista da Sociedade**. v. 38, n. 1, p. 64–66, 2005.
- GARRETT-JONES, C. Prognosis for interruption of malaria transmission through assessment of the mosquito's vectorial capacity. **Nature**. v.204, p.1173-5, 1964.
- GAVOTTE, L. *et al.* *Wolbachia* infection and resource competition effects on immature *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). **Journal of medical entomology**. v. 46, n. 3, p. 451–459, 2009.
- GAVOTTE, L., *et al.* . Costs and benefits of *Wolbachia* infection in immature *Aedes albopictus* depend upon sex and competition level. **Journal of invertebrate pathology**. v. 105, p. 341–346, 2010.
- GHELELOVITCH, S. Sur le déterminisme génétique de la sterilité dans Le croisement entre différentes souches de *Culex autogenicus* Roubaud. **C. R. Acad. Sci. Paris**. v.24 p. 2386–88, 1952.
- GU, J., *et al.* Development of an efficient recombinant mosquito densovirus-mediated RNA interference system and its preliminary application in mosquito control. **PLoS ONE**. v. 6, p. e21329, 2011.
- GUBLER, D., J. Dengue and dengue hemorrhagic fever. **Clinical microbiology reviews**, v. 11, n. 3, p. 480–96, 1998.
- GUBLER, D., J. Dengue, Urbanization and Globalization: The Unholy Trinity of the 21(st) Century. **Tropical Medicine and Health**, v. 39, n. 4 Suppl, p. 3–11, 2011.

- GUBLER, D., J. The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems. **Arch Med Res.**; 33: 330\_42, 2002.
- GULLAN, P., J. & CRANSTON, P., S. The insects: an outline of entomology. London: **Kluwer academic publishers**; 1999.
- GUY, B., *et al.* Dengue vaccines prospects: a step forward. **The Lancet**. V377 (9763) P. 381-382, 2011.
- GUZMAN, M. *et al.* Dengue: a continuing global threat. **Nature reviews. Microbiology**, v. 8, n. 12 Suppl, p. S7–16, 2010.
- HANDEL, V., & DAY, J., F. Assay of lipids, glycogen and sugars in individual mosquitoes: correlations with wing length in field-collected *Aedes vexans*. **J. Am. Mosq. Control Assoc.** v. 4, p. 549-550, 1988.
- HARCOMBE, W., & HOFFMANN, A., A. *Wolbachia* effects in *Drosophila melanogaster*: in search of fitness benefits. **J. Invertebr. Pathol.** v. 87, p. 45–50, 2004.
- HARD, J., J. *et al.* Resource- and density-dependent development in tree- hole mosquitoes. **Oikos**. v. 54, p. 137-144, 1989.
- HAWLEY, W., A. Overwintering survival of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) eggs in Indiana. **J. Med. Entomol.**, v.26(2), p. 122-129, 1989.
- HERTIG, M.; & WOLBACH, S., B. Studies on *Rickettsia*-Like Micro-Organisms in Insects. **The Journal of medical research**, v. 44, n. 3, p. 329–374.7, 1924.
- HOFFMANN, A., A. *et al.* Successful establishment of *Wolbachia* in *Aedes* populations to suppress dengue transmission. **Nature**, v. 476, n. 7361, p. 454–7, 2011.
- HOFFMANN, A.A & TURELLI, M. Partial cytoplasmic incompatibility between two Australian populations of *Drosophila melanogaster*. **Entomol. Exp. Appl.** v. 48, p. 61–67, 1988.
- HURST, G. D. D., *et al.* Male-killing *Wolbachia* in *Drosophila*: a temperature-sensitive trait with a threshold bacterial density. **Genetics**. v. 156, p. 699–709, 2000.
- IBANEZ-BERNAL, S., *et al.* First record in America of *Aedes albopictus* naturally infected with dengue virus during the 1995 outbreak at Reynosa, Mexico. **Medical and Veterinary Entomology**. v. 11, p. 305-309, 1997.
- IJICHI, N., *et al.* Internal spatiotemporal population dynamics of infection with three *Wolbachia* strains in the adzuki bean beetle, *Callosobruchus chinensis* (Coleoptera: Bruchidae). **Appl. Environ. Microbiol.** v. 68, p. 4074–4080, 2002.
- IKEDA, T., *et al.* Regulation of *Wolbachia* density in the Mediterranean flour moth, *Ephesia kuehniella*, and the almond moth, *Cadra cautella*. **Zool. Sci.** v. 20, p. 153–157, 2003.
- ISLAM, M. & DOBSON, S. *Wolbachia* effects on *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) immature survivorship and development. **Journal of medical entomology**, v. 43, n. 4, p. 689–695, 2006.
- ISTOCK, C. A., *et al.* Ecology and evolution of the pitcher-plant mosquito: 1. Population dynamics and laboratory responses to food and population density. **Evolution** v. 29, p. 296-312, 1975.

- ITURBE-ORMAETXE, I, *et al.* *Wolbachia* and the biological control of mosquito-borne disease. **EMBO Rep.** v. 12, p. 508–518, 2011.
- JAMNONGLUK, W. *et al.* *Wolbachia* infection and expression of cytoplasmic incompatibility in *Armigeres subalbatus* (Diptera: Culicidae). **J Med Entomol.** v. 37, p. 53–57, 2000.
- JANSEN, C., C., & BEEBE, N. W. The dengue vector *Aedes aegypti*: what comes next. **Microbes and infection / Institut Pasteur.** v.12(4), p.272-9, 2010.
- JEYAPRAKASH, A. & HOY, M., A. Long PCR improves *Wolbachia* DNA amplification: *wsp* sequences found in 76% of sixty-three arthropod species, **Insect Mol. Biol.** v.9, p.393–405, 2000.
- JIRAKANJANAKIT, N., *et al.* Influence of larval density or food variation on the geometry of the wing of *Aedes (Stegomyia) aegypti*. **Trop Med Int Health.** v. 12, p. 1354–1360, 2007.
- KAMBHAMPATI, S., *et al.* Unidirectional cytoplasmic incompatibility in the mosquito, *Aedes albopictus*. **Evolution.** v. 47, p. 673–677, 1993.
- KELLY, R., & EDMAN, J., D. Mosquito size and multiple transmission of avian malaria in the laboratory. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 8, n. 4, p. 386–8, 1992.
- KLIMAN, R., *et al.* Genetic Drift and Effective Population Size. **Nature Education.** v. 1(3), p. 3, 2008.
- KONDO, N., *et al.* Genome fragment of *Wolbachia* endosymbiont transferred to X chromosome of host insect. **Proc. Natl Acad. Sci. USA.** v. 99 (14), p. 280–14 285, 2002b.
- KONDO, N., *et al.* Infection density of *Wolbachia* endosymbiont affected by co-infection and host genotype. **Biology letters**, v. 1, n. 4, p. 488–91, 2005.
- KUNO, G. Review of the factors modulating dengue transmission. **Epi- demiol Rev.** v.17, p. 321–35, 1995.
- LAVEN, H. Crossing experiments with *Culex* strains. **Evolution.** v.5 p.370–75, 1951.
- LAVEN, H. Eradication of *Culex pipiens fatigans* through cytoplasmic incompatibility. **Nature.** v. 2(16), p.383-384, 1967.
- LAVEN, H. Speciation by cytoplasmic isolation in the *Culex pipiens* complex. **Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.** v. 24 p.166–73, 1959.
- LIPSITCH, M. & MOXON, E., R. Virulence and transmissibility of pathogens: what is the relationship? **Trends Microbiol.** v. 5, p. 31–37, 1997.
- LIPSITCH, M., *et al.* The evolution of virulence in pathogens with vertical and horizontal transmission. **Evolution.** v. 50, p. 1729–1741, 1996.
- LOCKEY, K., H. Lipids of the insect cuticle-origin, composition and function. **Comp. Biochem. Physiol.** v. 89, p. 595–645, 1988.
- LOFGREN, C. S. *et al.* Release of chemosterilized males for the control of *Anopheles albimanus* in El Salvador. 3. Field methods and population control. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v. 23, p. 288–297, 1974.

- LORENZ, C., *et al.* Morphometrical diagnosis of the malaria vectors *Anopheles cruzii*, *An. homunculus* and *An. bellator*. **Parasites & vectors**, v. 5, n. 1, p. 257, 2012.
- LU, P. *et al.* *Wolbachia* Induces Density-Dependent Inhibition to Dengue Virus in Mosquito Cells. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 7, p. e1754, 2012.
- LUZ, P., *et al.* Uncertainties regarding dengue modeling in Rio de Janeiro. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v. 87, p.871–8, 2003.
- MACARTHUR, R., H. Some generalized theorems of natural selection. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**. v. 48, p. 1893-1897, 1962.
- MACARTHUR, R., H. & WILSON, E., O. The theory of Island biogeography. **Princeton University Press, New Jersey**. 1967.
- MACCLELLAND, G., A., H. A worldwide survey of variation in scale pattern of the abdominal tergum of *Aedes aegypti* (L.) (*Diptera: Culicidae*). **Transactions of the Royal Entomological Society of London**. v.126, p. 239-259, 1974.
- MACDONALD, G. The epidemiology and control of malaria. **London: Oxford University Press**. 1957.
- MARCOMBE; S., *et al.* Insecticide resistance in the dengue vector *Aedes aegypti* from Martinique: distribution, mechanisms and relations with environmental factors. **PLoS One**, v. 7, e30989, 2012.
- MARTINS, A., *et al.* Voltage-gated sodium channel polymorphism and metabolic resistance in pyrethroid-resistant *Aedes aegypti* from Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 81, p. 108–115, 2009.
- MCGRAW, E., A. *et al.* *Wolbachia* density and virulence attenuation after transfer into a novel host. **Proc Natl Acad Sci USA**. v. 99, p. 2918–2923, 2002.
- MCMENIMAN, C., J. & O'NEILL, S., L. A virulent *Wolbachia* infection decreases the viability of the dengue vector *Aedes aegypti* during periods of embryonic quiescence. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 4, n. 7, p. e748, 2010.
- MCMENIMAN, C. J. *et al.* Host adaptation of a *Wolbachia* strain after long-term serial passage in mosquito cell lines. **Applied and environmental microbiology**, v. 74, n. 22, p. 6963–9, 2008.
- MCMENIMAN, C., J., *et al.* Stable introduction of a life-shortening *Wolbachia* infection into the mosquito *Aedes aegypti*. **Science**. v. 323, p. 141-144. 2009.
- MERÇOT, H. & POINSOT, D. Infection by *Wolbachia*: from passengers to residents. **Comptes rendus biologiques**, v. 332, n. 2-3, p. 284–97, 2009.
- MIN, K., T., & BENZER, S. *Wolbachia*, normally a symbiont of *Drosophila*, can be virulent, causing degeneration and early death. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 20, p. 10792–6, 1997.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS). Balanço Dengue: informe Janeiro a Março/2011. Brasília, DF, Brasil: **Ministério da Saúde**, 2011.

- MOGI, M. *et al.* Inter- and intra- specific variation in resistance to desiccation by adult *Aedes* (*Stegomyia*) spp. (Diptera: Culicidae) from Indonesia. **J. Med Entomol.** v. 33, p. 53–57, 1996.
- MOLLAHOSSEINI, A. *et al.* A user-friendly software to easily count *Anopheles* egg batches. **Parasites & vectors**, v. 5, p. 122, 2012.
- MONTENEGRO, H., *et al.* Fitness effects of *Wolbachia* and *Spiroplasma* in *Drosophila melanogaster*. **Heredity**. v. 127, p. 207–215, 2006.
- MOORE, C., G., & FISHER, B., R. Competition in mosquitoes - density and species ratio effects on growth, mortality, fecundity, and production of growth retardant. **Annals of the Entomological Society of America**. v. 62, p.1325-1331, 1969.
- MOREIRA, L., A, *et al.* A *Wolbachia* symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with dengue, Chikungunya, and Plasmodium. **Cell**. v. 139, p. 1268–1278, 2009.
- MOREIRA, L., A. *et al.* Human probing behavior of *Aedes aegypti* when infected with a life-shortening strain of *Wolbachia*. **PLoS Negl Trop Dis**. v. 3, e568, 2009.
- MORI, A. Effects of larval density and nutrition on some attributes of immature and adult *Aedes albopictus*. **Tropical Medicine**. v. 21, p. 85–103, 1979.
- MORRISON, I., N., *et al.* Genetic Improvements to the Sterile Insect Technique for Agricultural Pests. **AsPac J. Mol. Biol. Biotechnol.** v.18 (2), p. 275-295, 2010.
- MOUTON, L., *et al.* Virulence, multiple infections and regulation of symbiotic population in the *Wolbachia*–*Asobara tabida* symbiosis. **Genetics**. v. 168, p. 181–189, 2004.
- MOUTON, L., *et al.* Strain-specific regulation of intracellular *Wolbachia* density in multiply infected insects. **Mol. Ecol.** v. 12, p. 3459–3465, 2003.
- MUELLER, L., D. Theoretical and empirical examination of density-dependent natural selection. **Annual review of ecology and systematics**. v. 28, p. 269-288, 1997.
- MURRAY, N., E., A. *et al.* Epidemiology of dengue: past, present and future prospects. **Clinical epidemiology**, v. 5, p. 299–309, 2013.
- NASCI, R., S. Influence of larval and adult nutrition on biting persistence in *Aedes aegypti* (Diptera,Culicidae). **J. MedEntomol.** v. 28, p. 522–526, 1991.
- NICHOLSON, A., J. The Self-Adjustment of Populations to Change. **Cold Spring Harbor Symposium in quantitative biology**. v. 22, p. 153-172, 1957.
- NKYA, T., E; *et al.* Impact of environment on mosquito response to pyrethroid insecticides: Facts, evidences and prospects. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 43 (4). p. 407-416, 2013.
- NOBUCHI, H., The symptoms of a dengue-like illness recorded in a Chinese medical encyclopedia. **Kanpo Rinsho**, v.26, p. 422–425, 1979.
- NORMILE, D. Surprising New Dengue Virus Throws a Spanner in Disease Control Efforts. **Science**, 2013.
- O’NEILL, S., L. Cytoplasmic symbionts in *Tribolium confusum*. **J. Invertebr. Pathol.** v.53, p.132–34, 1989.

- ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. Implementação do controle seletivo de vetores da Malária na Região Amazônica. Brasília: OPAS; 1997.
- OSANAI, C., H. *et al.* Surto de dengue em Boa Vista, Roraima. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v.25(1), p. 53-54, 1983.
- PAUPY, C. *et al.* Population structure of *Aedes albopictus* from La Réunion Island (Indian Ocean) with respect to susceptibility to a dengue virus. **Heredity**. v. 87 (3), p. 273-283, 2001.
- PAUPY, C., *et al.* Gene Flow between domestic and sylvan populations of *Aedes aegypti* (*Diptera: Culicidae*) in North Cameroon. **Rev. J. Med. Entomol.** v.45, p. 391-400, 2008.
- PHUC, H. K. *et al.* Late-acting dominant lethal genetic systems and mosquito control. **BMC Biol.** V. 5, P. 11, 2007.
- POINSOT, D., *et al.* *Wolbachia* transfer from *Drosophila melanogaster* into *D. simulans*: host effect and cytoplasmic incompatibility relationships. **Genetics**. v. 150, p. 227–237, 1998.
- RASGON, J., L. *Wolbachia* and *Anopheles* mosquitoes. In: BOURTZIS, K. (Ed.). **Insect Symbiosis Volume 3**. Third Edit ed. [S.l.]: Hoboken : Taylor & Francis Ltd, 2008. p. 321–327, 2008
- RASGON, J., L. & SCOTT, T., W. *Wolbachia* and cytoplasmic incompatibility in the California *Culex pipiens* mosquito species complex: parameter estimates and infection dynamics in natural populations. **Genetics**. v. 165, p. 2029–2038, 2003.
- RASGON, J., L. *Wolbachia* induces male-specific mortality in the mosquito *Culex pipiens* (LIN strain). **PLoS One**. v.7, e30381, 2012.
- REISEN, W., K. Intraspecific competition in *Anopheles stephensi* Liston. **Mosquito News**. v. 35, p. 473–482, 1975.
- REISKIND, M., H., & LOUNIBOS, L., P. Effects of intraspecific larval competition on adult longevity in the mosquitoes *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. **Medical and veterinary entomology**. v. 23, n. 1, p. 62–8, 2009.
- REITER, P. Climate change and mosquito-borne disease. **Environ. Health Perspect.** v.109 (Suppl.1), p. 141-161, 2001.
- RICHARDSON, P., M., *et al.* The effect of tetracycline on reciprocal cross incompatibility in *Mormoniella (Nasonia) vitripennis*. **J. Invertebr. Pathol.** v. 50, p.176–83, 1987.
- RIEGLER, M., *et al.* Tandem repeat markers as novel diagnostic tools for high resolution fingerprinting of *Wolbachia*. **BMC microbiology**, v. 12 Suppl 1, n. Suppl 1, p. S12, 2012.
- ROCCO, I., M., *et al.* First isolation of dengue 4 in the state of São Paulo, Brazil, 2011. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**, São Paulo, v. 54, n. 1, Feb. 2012.
- RODRIGUEZ, M., M. *et al.* Pyrethroid insecticide-resistant strain of *Aedes aegypti* from Cuba induced by deltamethrin selection. **Journal of the American Mosquito Control Association**. v. 21, p. 437–445, 2005.
- ROHLF, F., J. TpsUtil, File Utility Program, Version 1.58. **Department of Ecology and Evolution**, State University of New York at Stony Brook, 2013.
- ROHLF, F., J. TpsDig, Digitize Landmarks and Outlines, Version 2.17. **Department of Ecology and Evolution**, State University of New York at Stony Brook, 2013.

- ROS, V., I., D. *et al.* How diverse is the genus *Wolbachia*? Multiple-gene sequencing reveals a putatively new *Wolbachia* supergroup recovered from spider mites (*Acari: Tetranychidae*). **Applied and environmental microbiology**, v. 75, n. 4, p. 1036–43, 2009.
- ROSE, R., I. Pesticides and public health: integrated methods of mosquito management. **Emerging Infectious Diseases**. v. 7(1), p. 17-23, 2001.
- ROWLEY, S., M. *et al.* *Wolbachia pipientis* in Australian spiders, **Curr. Microbiol.** v.49 p.208–214, 2004.
- RUDNICK, A. & HAMMON, W., M. **Mosquito news**. v. 20, p. 247-249, 1960.
- SABCHAREON, A. *et al.* Protective efficacy of the recombinant, live-attenuated, CYD tetravalent dengue vaccine in Thai schoolchildren: a randomised, controlled phase 2b trial. **Lancet**. v. 380, p. 1559–1567, 2012.
- SALAZAR, M. I. *et al.* Dengue virus type 2: replication and tropisms in orally infected *Aedes aegypti* mosquitoes. **BMC microbiology**, v. 7, p. 9, 2007.
- SAN MARTIN, J., L. *et al.* The epidemiology of dengue in the Americas over the last three decades: a worrisome reality. **Am J Trop Med Hyg.**; v. 35, p 82 128, 2010.
- SANTACOLOMA, V., L. *et al.* Susceptibility of *Aedes aegypti* to DDT, deltamethrin, and lambda-cyhalothrin in Colombia. **Ver. Panam. Salud Publica**. v. 27(1), p. 66-73, 2010.
- SANTOS, R., L., C. Atualização da distribuição de *Aedes albopictus* no Brasil (1997-2002). **Revista Saúde Pública**. v. 37 (5), p. 671-673, 2003.
- SCHATZMAYR, H., G. Dengue situation in Brazil by year 2000. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, (Suppl. 1), v. 95, p. 179-181, 2000.
- SCHNEIDER D., S. & AYRES, J., S. Two ways to survive infection: what resistance and tolerance can teach us about treating infectious diseases. **Nat Rev Immunol**. v. 8, p. 889–895, 2008.
- SERPA, L. *et al.* Competition between *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* larvae in the laboratory. **Revista da Sociedade Brasileira**. v. 41, n. 5, p. 479–484, 2008.
- SILER, J., F. *et al.* Dengue: It's history, epidemiology, mechanism of transmission, etiology, clinical manifestations, immunity and prevention. **Philipp J Sci**. v; 29(1-2), p. 1-304, 1926.
- SIMMONS, C., P. *et al.* Dengue. **The New England journal of medicine**, v. 366, n. 15, p. 1423–32, 2012.
- SINKINS, S., P. *Wolbachia* and cytoplasmic incompatibility in mosquitoes. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 34, n. 7, p. 723–9, 2004.
- SINKINS, S., P., & O'NEILL, S.L. *Wolbachia* as a vehicle to modify insect populations. In **Insect Transgenesis: Methods And Applications** A.A. James, ed. (Boca Raton, CRC Press), pp. 271-287, 2000.
- SINKINS, S., P. *et al.*; MAKEPEACE *et al.* *Wolbachia* variability and host effects on crossing type in *Culex* mosquitoes. **Nature**. v.436, p.257–260, 2005.
- SNOOK, R., R. *et al.* Offsetting effects of *Wolbachia* infection and heat shock on sperm production in *Drosophila simulans*: analyses of fecundity, fertility and accessory gland proteins. **Genetics**. V. 155, P. 167–178, 2000.

- STACKEBRANDT, E. *et al.* Taxonomic Note: A Place for DNA-DNA Reassociation and 16S rRNA Sequence Analysis in the Present Species Definition in Bacteriology. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 44, n. 4, p. 846–849, 1994.
- STEELE, J., E. Glycogen-phosphorylase in insects. **Insect Biochem.** v. 12, p. 131–47, 1982.
- STEVENS, L, & WICKLOW, D., T. Multi species interactions affect cytoplasmic incompatibility in *Tribolium* flour beetles. **Am. Nat.** v. 140, p. 642–53, 1992.
- STEVENS, L. Environmental factors affecting reproductive incompatibility in flour beetles, genus *Tribolium*. **J. Invert. Pathol.** v. 53, p. 78–84, 1989.
- STOREY, K., B. Organic solutes in freezing tolerance. **Comp. Biochem. Physiol.** v 117, p. 319–26, 1997.
- STOUTHAMER, R. *et al.* *Wolbachia pipientis*: microbial manipulator of arthropod reproduction. **Microbiology.** p. 71–102, 1999.
- STOUTHAMER, R.; *et al.* Antibiotics cause parthenogenetic *Trichogramma* (Hymenoptera/Trichogrammatidae) to revert to sex. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v.87, p. 2424–27, 1990.
- TABACHNICK, W., J. & POWELL, J., R. A World-wide survey of genetic variation in the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. **Genetical Research.** v.34, p.215-229, 1979.
- TAPIA-CONYER, R., *et al.* Dengue: an escalating public health problem in Latin America. **Paediatrics and international child health**, v. 32 Suppl 1, p. 7–14, 2012.
- TAYAGI, B.K. & HIRIYAN, J. Breeding of dengue vector *Aedes aegypti* (Linnaeus) in rural Thar desert, North-Western Rajasthan, India. **Dengue Bulletin**, v.28, p. 220-222, 2004.
- TJADEN, N. B. *et al.* Extrinsic Incubation Period of Dengue: Knowledge, Backlog, and Applications of Temperature Dependence. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 6, p. e2207, 2013.
- TORTOSA, P. *et al.* *Wolbachia* age-sex-specific density in *Aedes albopictus*: a host evolutionary response to cytoplasmic incompatibility? **PloS One**, v. 5, n. 3, p. e9700, 2010.
- TRAVER, B. E., *et al.* Homing endonucleases catalyze double-stranded DNA breaks and somatic transgene excision in *Aedes aegypti*. **Insect Mol. Biol.** v. 18, p. 623–633, 2009.
- TRPIS M. *et al.* Control of cytoplasmic incompatibility in the *Aedes scutellaris* complex. **Journal of Heredity.** v. 72, p. 313–317, 1981.
- TUN-LIN, W., *et al.* Effects of temperature and larval diet on development rates and survival of the dengue vector *Aedes Aegypti* in North Queensland, Australia. **Med Vet Entomol.** v. 14, p. 31–37, 2000.
- TURELLI, M. Cytoplasmic incompatibility in population with overlapping generations. **Evolution.** v. 64, p. 232-241, 2010.
- UNCKLESS, R. L. *et al.* *Wolbachia* as populations within individual insects: causes and consequences of density variation in natural populations. **Proceedings. Biological sciences / The Royal Society**, v. 276, n. 1668, p. 2805–11, 2009.

- URDANETA-MARQUEZ, L.& FAILLOUX, A., B. Population genetic structure of *Aedes aegypti*, the principal vector of dengue viruses. **Infection, genetics and Evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases**. v. 11(2), p.253-261, 2010.
- VASCONCELOS, P., F., C. *et al.* *Aedes aegypti*, dengue and re-urbanization of yellow fever in Brazil and other South American countries-Past and present situation and future perspectives. **Dengue Bulletin**, n. 23, p. 55-66, 1999.
- VAVRE, F., *et al.* Phylogenetic status of a fecundity-enhancing *Wolbachia* that does not induce thelytoky in *Trichogramma*, **Insect Mol. Biol.** v. 8, p. 67–72, 1999.
- WALKER, T. *et al.* The *wMel* *Wolbachia* strain blocks dengue and invades caged *Aedes aegypti* populations. **Nature**, v. 476, n. 7361, p. 450–3, 2011.
- WATANABE, M. *et al.* Mechanism allowing an insect to survive complete dehydration and extreme temperatures. **J. Exp. Biol.** v. 205, p. 2799–802, 2002.
- WEEKS, A., R. *et al.* *Wolbachia* dynamics and host effects: what has (and has not) been demonstrated? **Trends Ecol Evol.** v. 17, p. 257– 262, 2002.
- WEISS, E.& MOULDER, J., W. Order I. Rickettsiales Gieszczkiewicz. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 1, ed. NR Krieg, JG Holt, Baltimore: Williams &Wilkins. p. 687–729, 1984.
- WERREN, J., H. Biology of *Wolbachia*. **Annual review of entomology**, v. 42, n. 124, p. 587–609, 1997.
- WERREN, J., H. *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology. **Nature reviews. Microbiology**, v. 6, n. 10, p. 741–51, 2008.
- WERREN, J., H. *et al.* Distribution of *Wolbachia* among neotropical arthropods, **Proc. R. Soc. Lond.** v 262, p.197–204, 1995a.
- WERREN, J., H. *et al.* Evolution and phylogeny of *Wolbachia*: reproductive parasites of arthropods. **Proc. R. Soc. Lond.** v. 261, p.55–63, 1995b.
- WINDBICHLER, N. *et al.* A synthetic homing endonuclease-based gene drive system in the human malaria mosquito. An example of the HEG system and its ability to successfully invade caged populations. **Nature**. v. 473, p. 212–215, 2011.
- WISE DE VALDEZ, M. R. *et al.* Genetic elimination of dengue vector mosquitoes. **Proc. Natl Acad. Sci.** v. 108, p. 4772–4775, 2011.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control**. Geneva, 2009.
- WU, F. *et al.* Distribution of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in northwestern China. **Vector Borne Zoonotic Dis.** v.11 (8), p. 1181–1186, 2011.
- YEAP, H., L. *et al.* Dynamics of the “popcorn” *Wolbachia* infection in outbred *Aedes aegypti* informs prospects for mosquito vector control. **Genetics**, v. 187, n. 2, p. 583–95, 2011.
- YEN, J., H. & BARR, A., R. New hypothesis of the cause of cytoplasmic incompatibility in *Culex pipiens*. **Nature**. v.232 p.657–58, 1971.

- YEN, J., H., BARR, A., R. The etiological agent of cytoplasmic incompatibility in *Culex pipiens*. **J Invertebr Pathol.** v. 22, p. 242–250, 1973.
- ZEH, J. *et al.* From father to son: transgenerational effect of tetracycline on sperm viability. **Scientific reports**, v. 2, p. 375, 2012.
- ZHAO, D., X. *et al.* *Wolbachia*-Host Interactions: Host Mating Patterns Affect *Wolbachia* Density Dynamics. **PloS One**, v. 8, n. 6, p. e66373, 2013.
- ZHOU, W. *et al.* Phylogeny and PCR-based classification of *Wolbachia* strain using *wsp* gene sequences. **Proc. R. Soc. London Ser. V** 265, p.509–15, 1998.
- ZIENTZ, E. *et al.* Metabolic interdependence of obligate intracellular bacteria and their insect hosts. **Microbiol Mol Biol Rev.** v. 68, p. 745–770, 2004.
- ZUG, R. & HAMMERSTEIN, P. Still a host of hosts for *Wolbachia*: analysis of recent data suggests that 40% of terrestrial arthropod species are infected. **PloS one**, v. 7, n. 6, p. e38544, 2012.