

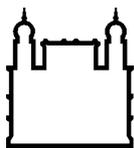
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

**EFEITOS DA COMPETIÇÃO COM *Aedes albopictus* NA
PERFORMANCE DE *Aedes aegypti* E SEU PAPEL NA
DISSEMINAÇÃO DE *Wolbachia pipientis***

SUELLEN DE OLIVEIRA

Rio de Janeiro
Maio de 2015



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

SUELLEN DE OLIVEIRA

Efeitos da competição com *Aedes albopictus* na performance de *Aedes aegypti* e seu papel na disseminação de *Wolbachia pipientis*.

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz
como parte dos requisitos para obtenção do título de
Mestre em Biologia Parasitária

Orientador: Prof. Dr. Rafael Maciel de Freitas

RIO DE JANEIRO

Maio de 2015

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

O48 Oliveira, Suellen de

Efeitos da competição com *Aedes albopictus* na performance de *Aedes aegypti* e seu papel na disseminação de *Wolbachia pipientis* / Suellen de Oliveira. – Rio de Janeiro, 2015.

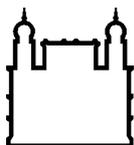
102 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2015.

Bibliografia: f. 79-91

1. *Wolbachia pipientis*. 2. *Aedes aegypti*. 3. *Aedes albopictus*. 4. Competição. I. Título.

CDD 616.91852



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

AUTOR: SUELLEN DE OLIVEIRA

EFEITOS DA COMPETIÇÃO COM *Aedes albopictus* NA PERFORMANCE DE *Aedes aegypti* E NA DISSEMINAÇÃO DE *Wolbachia pipientis*

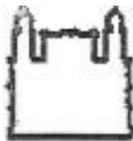
ORIENTADOR: Prof. Dr. Rafael Maciel de Freitas

Aprovada em: 25/05/2015

EXAMINADORES:

Presidente: Prof. Dr. André Luiz Roque (Instituto Oswaldo Cruz - Fundação Oswaldo Cruz)
Prof. Dra. Camila dos Santos de Barros (Instituto de Biologia - Universidade Federal do Rio de Janeiro)
Prof. Dr. Flávio Codeço Coelho (Programa de Computação Científica - Fundação Oswaldo Cruz)
Prof. Dr. Marcelo Gustavo Lorenzo (Centro de Pesquisas René Rachou - Fundação Oswaldo Cruz)
Prof. Dr. Márcio Galvão Pavan (Instituto Oswaldo Cruz - Fundação Oswaldo Cruz)

Rio de Janeiro, 25 de maio de 2015

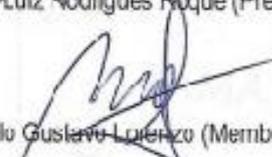


Ministério da Saúde

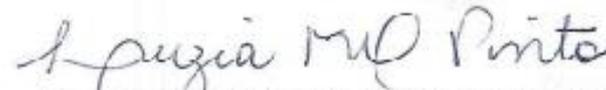
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz

Ata da defesa de dissertação de mestrado em Biologia Parasitária de **Suellen de Oliveira**, sob orientação do Dr. Rafael Maciel de Freitas. Ao vigésimo quinto dia do mês de maio de dois mil e quinze, realizou-se às treze horas, no Auditório Carlos Chagas/Fiocruz, o exame da dissertação de mestrado intitulada "**Potenciais efeitos da competição interespecífica com *Aedes albopictus* na biologia e disseminação de *Aedes aegypti* com *Wolbachia pipiensis***" no programa de Pós-graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências - área de concentração: Imunologia e Patogenia, na linha de pesquisa: Imunologia de Doenças Infecciosas e Parasitárias. A banca examinadora foi constituída pelos Professores: Dr. André Luiz Rodrigues Roque - IOC/FIOCRUZ (Presidente), Dr. Marcelo Gustavo Lorenzo - CPqRR/Fiocruz-MG, Dr. Marcio Galvão Pavan - IOC/FIOCRUZ e como suplentes: Dr^a. Camila dos Santos de Barros - UFRJ/RJ e Dr. Flávio Codeço Coelho - FGV/RJ. Após arguir a candidata e considerando que a mesma demonstrou capacidade no trato do tema escolhido e sistematização da apresentação dos dados, a banca examinadora pronunciou-se pela APROVAÇÃO da defesa da dissertação de mestrado. De acordo com o regulamento do Curso de Pós-Graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, a outorga do título de Mestre em Ciências está condicionada à emissão de documento comprobatório de conclusão do curso. Uma vez encerrado o exame, a vice Coordenadora do Programa, Dr^a. Luzia Maria de Oliveira Pinto, assinou a presente ata tomando ciência da decisão dos membros da banca examinadora. Rio de Janeiro, 25 de maio de 2015.


Dr. André Luiz Rodrigues Roque (Presidente da Banca):


Dr. Marcelo Gustavo Lorenzo (Membro da Banca):


Dr. Marcio Galvão Pavan (Membro da Banca):


Dr^a. Luzia Maria de Oliveira Pinto (Vice Coordenadora do Programa):

Com tempo: Foca-se em Imunologia e patogenia, sua-se ecologia e epidemiologia.
Foca-se em Imunologia de Doenças Infecciosas e parasitárias, sua-se ecologia de parasita, vetores e hospedeiros.

Av. Brasil, 4365 Manguinhos Rio de Janeiro RJ Brasil CEP: 21040-360
Contatos: (21) 2562-1201 / 2562-1299 E-mail: ajendimentcseac@ioc.fiocruz.br Site: www.fiocruz.br


Dr. Rafael Maciel de Freitas
Coordenador de Pós-Graduação
em Biologia Parasitária
FIOCRUZ - SIAPE 1403050

Dedico este trabalho à minha família, pelo apoio incondicional em todos os momentos da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, por ter me dado condições de lutar e conquistar mais um dos meus sonhos: me tornar mestre.

À minha família, pois sem este contínuo apoio, eu não teria conseguido. À minha tia Gracinha, pelo carinho e por ter me acolhido nos meses finais deste trabalho. Aos amigos que compreenderam a minha ausência em tantos momentos especiais e se mantiveram ao meu lado. Ao Felipe, pelo cuidado e incentivo diário.

Ao Rafael Maciel de Freitas, por ter confiado em mim e ter aceitado me orientar. Obrigada por ouvir pacientemente as minhas ideias mais loucas, por ter me atendido prontamente cada vez que bati em sua porta e por ter sido amigo nos momentos difíceis. Tenho imenso orgulho de ter você presente no meu processo de formação.

Aos companheiros do curso de biologia parasitária, especialmente a Letícia, Tati, Amandinha, Aline e Mayara, pelo apoio e amizade. Aprendi muito com cada um de vocês. Após dois anos de trabalho árduo, conseguimos sobreviver e nos tornar mestres!

À toda equipe do Laboratório de Transmissores de Hematozoários, sinto-me honrada pelo privilégio de fazer parte desta equipe. Agradeço imensamente ao Renato Carvalho e Marcelo Celestino, que foram essenciais na execução de grande parte deste trabalho. À Rosilainy Surubi Fernandes, que ao longo destes dois anos foi mais que amiga, foi uma irmã. Não há palavras para agradecê-la. À Laís de Sousa Araújo, Maria Ignez Lima Bersot, Cristiane Vicente, Camila Pereira, Roberto Peres, Gabriel Sylvestre e Glauber Rocha Pereira, por terem contribuído diretamente com a realização deste trabalho. À Andiarria R. da Silva, Esther, Teresa Fernandes Silva do Nascimento, Monique de Albuquerque Motta, Maria Goreti Rosa Freitas, Ricardo Lourenço de Oliveira, Dinair Couto Lima, Marcia Gonçalves de Castro, Maycon Neves, Mariana Rocha David, Stephanie Campos, Rafaella Miranda, Marcelo Quintela Gomes, Nildimar Alves Honório, Mauro Menezes Muniz, Anielly Alves Ferreira, pelo companheirismo e as boas risadas na hora do café.

Ao Instituto de Biologia do Exército e a equipe do Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes Vetores, por terem fornecido o espaço e a infraestrutura necessária para a realização de grande parte deste projeto de pesquisa. Neste sentido agradeço especialmente ao José Bento Pereira Lima e a Cynara Rodvalho, essenciais para construção desta parceria. Aos mosquiteiros Aline Loureiro, Luana Carrara e Paula F. da Cruz, pelo companheirismo;

Raquel Santos, John Caldeira e Ingrid Régis, pela ajuda nos momentos de intenso trabalho. Ao Júlio Cesar, Eraldo Feliciano e Rosane Meirelles, pessoas queridas que me apoiaram em um momento delicado da minha vida pessoal, concomitante com o período mais difícil de execução deste trabalho. Confesso que houve dias que até pensei em desistir, mas estes anjos, acreditaram em mim nos momentos em que eu mesma não acreditava e me deram todo o suporte necessário, por isso eu continuei até o fim. Muitíssimo obrigada!

Aos moradores de Jurujuba, Tubiacanga, Urca e Vila Valqueire, por permitirem a instalação das armadilhas em suas casas, pelo período de um ano, nos acolhendo pacientemente todas as semanas. Foram incontáveis os gestos de carinho, os cafés oferecidos, as conversas e os abraços dos pequeninos.

Aos colaboradores Daniel A. M. Villela, Fernando Braga Stehling Dias, Bruno M. Carvalho e Julia Novaes de Barros Peixoto, por apoiarem este projeto e investirem tempo neste trabalho. Ao meu amigo Thiago, o bibliotecário mais eficiente de todos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro.

Aos professores André Luiz Roque, Camila dos Santos de Barros, Flávio Codeço Coelho, Marcelo Gustavo Lorenzo e Márcio Galvão Pavan, por aceitarem o convite de participação da banca de defesa desta dissertação.

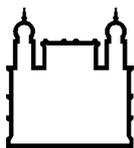
A todos vocês, muitíssimo obrigada. Sozinha eu jamais conseguiria, essa conquista é nossa!

"Se, a princípio, a ideia não é absurda, então não há esperança para ela."
Albert Einstein

"A ciência nunca resolve um problema sem criar pelo menos outros dez".
George Bernard Shaw

"Talvez não tenhamos conseguido fazer o melhor, mas lutamos para que o melhor fosse feito. Não somos o que deveríamos ser, não somos o que iremos ser, mas graças a Deus, não somos o que éramos."

Martin Luther King



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

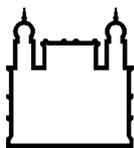
EFEITOS DA COMPETIÇÃO COM *Aedes albopictus* NA PERFORMANCE DE *Aedes aegypti* E SEU PAPEL NA DISSEMINAÇÃO DE *Wolbachia pipientis*

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

Suellen de Oliveira

No âmbito do projeto “Eliminar a Dengue: Desafio Brasil”, fêmeas de *Aedes aegypti* infectadas com uma cepa de *Wolbachia pipientis* (wMel) têm sido liberadas em áreas selecionadas. Estas fêmeas, provavelmente, colocam seus ovos em criadouros onde fêmeas de *Ae. aegypti* selvagem e de *Aedes albopictus* já ovipuseram. Nesse sentido, a invasão da *W.pipientis* em populações naturais depende da aptidão dos mosquitos com a bactéria frente aos nativos que compartilham o mesmo criadouro. Esta dissertação foi subdividida em duas etapas: (a) Monitoramento da densidade populacional e da proporção de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* em quatro bairros, do estado do Rio de Janeiro, através de coletas semanais com auxílio de 25 armadilhas ovitrampas e 30 BGs sentinelas, por área, durante um ano. Tubiacanga foi a área com maior densidade de *Aedes* spp., seguido por Vila Valqueire, Jurujuba e Urca. A proporção de *Ae. aegypti* foi superior à de *Ae. albopictus*, independente da estação do ano ou da armadilha utilizada, nas quatro áreas estudadas. *Ae. albopictus* foi capturado com maior frequência no intradomicílio, sugerindo que esta espécie pode estar se tornando mais associada ao homem. (b) Ensaios de competição larval intra e interespecíficos para estimar o crescimento de cada população com base no índice de performance dos mosquitos (λ'), composto por estimativas de tempo de desenvolvimento, sobrevivência larval, tamanho do adulto e fecundidade. Nas condições testadas, *Ae. albopictus* manteve crescimento populacional positivo mesmo sob altas densidades larvais e baixo recurso per capita, enquanto *Ae. aegypti* selvagem e com wMel tiveram performances inferiores, devido ao longo tempo de desenvolvimento e alta mortalidade larval. Uma vez que *Ae. albopictus* parece ter maior capacidade de concorrência em relação ao *Ae. aegypti*, para garantir o sucesso da invasão da bactéria em campo é preciso levar também em consideração a densidade de *Ae. albopictus* nas áreas de soltura. Locais onde a sua densidade é intensa, maior número de mosquitos *Ae. aegypti* com wMel deverão ser soltos, tornando imprescindível o monitoramento prévio das populações naturais nas áreas de soltura.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

EFFECTS OF COMPETITION WITH *Aedes albopictus* IN PERFORMANCE OF *Aedes aegypti* AND DISSEMINATION OF *Wolbachia pipientis*

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION IN PARASITOLOGY BIOLOGY

Suellen de Oliveira

Under the scope of the project "Eliminate Dengue: Brazil Challenge", *Aedes aegypti* females infected with *Wolbachia pipientis* (wMel) have been released in selected areas from Rio de Janeiro. Released females probably lay their eggs in breeding sites in which wild *Ae. aegypti* and *Aedes albopictus* may have already laid their own eggs. Within this context, *W. pipientis* invasion in natural populations depends on the fitness of mosquitoes with bacteria in comparison the wild *Ae. aegypti* that share the same breeding site. This dissertation was subdivided on two stages: (a) Monitoring population density and proportion of *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus* in four neighborhoods, of Rio de Janeiro state, through weekly collections, using 25 ovitraps and 30 BGs sentinels, in four areas during one year each. Tubiacanga was the area with higher density of *Aedes* spp., followed by Vila Valqueire, Jurujuba and Urca. The proportion of *Ae. aegypti* was superior to *Ae. albopictus*, independent of the trap used or season, in the four studied areas. *Ae. albopictus* was more frequently captured in the intradomestic environment, suggesting that this species has become more associated with human dwellings. (B) Intra- and interspecific larval competition assays were undertaken to estimate the population growth of each population based on a composite index of mosquito's performance (λ), which is composed by larval development time, immature survival, adult mosquito size and fecundity. Under the conditions tested, *Ae. albopictus* presented positive population growth even in high larval densities and low per capita resource, while wild and wMelBr *Ae. aegypti* populations had both worse performance. Since *Ae. albopictus* seems to have better fitness than to *Ae. aegypti* population, in order to assure invasion, it is necessary to consider *Ae. albopictus* density in study areas to assure its invasion. Sites in which *Ae. albopictus* density is high, a greater number of *Ae. aegypti* with wMelBr must be released, reinforcing that monitoring natural populations of other mosquitoes besides the "target species" is indispensable.

ÍNDICE

RESUMO	XI
ABSTRACT	XII
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Dengue: aspectos gerais	1
1.2 Os vetores da dengue	6
1.2.1 <i>Aedes aegypti</i>	6
1.2.2 <i>Aedes albopictus</i>	9
1.2.3 Interação entre <i>Ae. aegypti</i> e <i>Ae. albopictus</i>	10
1.3 Vigilância e controle vetorial	11
2 JUSTIFICATIVA	16
3 OBJETIVOS	17
3.1 Objetivo Geral	17
3.2 Objetivos Específicos	17
4 MATERIAL E MÉTODOS	18
4.1 Monitoramento das populações de <i>Ae. albopictus</i> e <i>Ae. aegypti</i>, em campo	18
4.2 Competição intra e interespecífica de <i>Ae. albopictus</i> e <i>Ae. aegypti</i>, com e sem <i>W. pipientis</i>	24
5 RESULTADOS	30
5.1 Monitoramento das populações de <i>Ae. albopictus</i> e <i>Ae. aegypti</i>, em campo	30
5.1.1 Dados meteorológicos	30
5.1.2 Padrão de positividade das ovitrampas	31
5.1.3 Padrão temporal do número médio de ovos de <i>Aedes</i> spp.	32
5.1.4 Proporção de <i>Ae. aegypti</i> em relação a <i>Ae. albopictus</i>	34
5.2 Competição intra e interespecífica de <i>Ae. albopictus</i> e <i>Ae. aegypti</i>, com e sem <i>W. pipientis</i>	37
5.2.1 Sobrevivência dos imaturos	37
5.2.2 Tempo de desenvolvimento	38

5.2.3	Tamanho das asas dos adultos.....	41
5.2.4	Proporção de machos e fêmeas	41
5.2.5	Índice de performance (λ').....	41
5.2.6	Efeito da oferta alimentar/per capita sobre o λ' de <i>Ae. aegypti</i> com wMel ...	45
5.2.7	Simulação do efeito da competição por recursos, em condições com diferentes densidades populacionais, no índice de performance das espécies competidoras.....	46
6	DISCUSSÃO	48
6.1	Monitoramento das populações de <i>Ae. albopictus</i> e <i>Ae. aegypti</i>	49
6.2	Competição intra e interespecífica de <i>Ae. albopictus</i> e <i>Ae. aegypti</i>, com e sem <i>W. pipientis</i>	53
7	CONCLUSÕES	59
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
10	ANEXOS	73
ANEXO A -	Localização das armadilhas ovitrampas e BGs sentinelas nas áreas de estudo	74
ANEXO B -	Detecção da cepa wmel de <i>W. pipientis</i>	78

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1- Distribuição dos casos de dengue no mundo.....	1
Figura 2- Modelo da partícula do vírus dengue.....	2
Figura 3- Ciclos de transmissão do vírus dengue, seus principais vetores e hospedeiros.....	3
Figura 4- Distribuição dos sorotipos virais no território brasileiro.....	5
Figura 5- Mosquito <i>Ae. aegypti</i>	6
Figura 6- Distribuição de casos de febre Chikungunya, no Brasil, no período de 2014 a janeiro de 2015.....	7
Figura 7- Ciclo do mosquito <i>A.aegypti</i>	8
Figura 8- Mosquito <i>Ae. albopictus</i>	9
Figura 9- Locais de atuação do projeto Eliminar a Dengue – Desafio Brasil.....	15
Figura 10- Ovitampa.....	18
Figura 11- Desenho ilustrativo com as diferenças mais importantes entre as larvas de <i>Ae. albopictus</i> e <i>Ae. aegypti</i>	19
Figura 12- Armadilha BG Sentinela.....	20
Figura 13- Características morfológicas de fêmeas adultas de <i>Ae. albopictus</i> e <i>Ae. aegypti</i>	21
Figura 14- Áreas de estudo: Jurujuba, Tubiacanga, Urca e Vila Valqueire.....	22
Figura 15- Tenda sobre estantes contendo os recipientes plásticos utilizados no experimento de competição e estação meteorológica instalada no local.....	24
Figura 16- Método de criação dos insetos submetidos a condições de competição intra e inter-específica.....	26
Figura 17- Dados das estações meteorológicas do Forte de Copacabana e Vila Militar: temperatura (mínima, média e máxima), umidade e pluviosidade.....	30
Figura 18- Índice de positividade das ovitrampas entre agosto/2013 a agosto/2014.....	31
Figura 19- Índice de densidade de ovos.....	32
Figura 20- Índice de densidade de ovos, por estação do ano, nas áreas de estudo.....	33

Figura 21- Proporção de <i>Ae. aegypti</i> em relação a <i>Ae. albopictus</i> , coletados com auxílio das ovitrampas.....	35
Figura 22- Proporção de <i>Ae. aegypti</i> em relação a <i>Ae. albopictus</i> , coletados com auxílio das BGs sentinelas.....	35
Figura 23- Proporção de <i>Ae. aegypti</i> em relação a <i>Ae. albopictus</i> , coletados com auxílio das ovitrampas e BGs sentinelas, por estação do ano.....	36
Figura 24- Sobrevivência de <i>Ae. aegypti</i> sem wMel, <i>Ae aegypti</i> com wMel e <i>Ae. albopictus</i> obtidos nos diferentes tratamentos de competição intra e interespecífica.....	38
Figura 25- Tempo de desenvolvimento de <i>Ae. aegypti</i> sem wMel, <i>Ae aegypti</i> com wMel e <i>Ae. albopictus</i> obtidos nos diferentes tratamentos de competição intra e interespecífica....	40
Figura 26- Tamanho das asas de <i>Ae. aegypti</i> sem wMelBr, <i>Ae aegypti</i> com wMel e <i>Ae. albopictus</i> obtidos nos diferentes tratamentos de competição intra e interespecífica.....	42
Figura 27- Proporção de machos e fêmeas de <i>Ae. aegypti</i> sem wMel, <i>Ae aegypti</i> com wMel e <i>Ae. albopictus</i> obtidos nos diferentes tratamentos de competição intra e interespecífica.....	43
Figura 28- Índice de performance (λ') de <i>Ae. aegypti</i> sem wMel, <i>Ae aegypti</i> com wMel e <i>Ae. albopictus</i> obtidos nos diferentes tratamentos de competição intra e interespecífica....	44
Figura 29- Efeito da oferta alimentar/per capita sobre o λ' de <i>Ae. aegypti</i> com wMel, sob competição com <i>Ae. aegypti</i> sem wMel, <i>Ae. aegypti</i> com wMel e <i>Ae. albopictus</i> , respectivamente.....	45
Figura 30- Simulação do efeito da competição por recursos, em condições com diferentes densidades populacionais, no índice de performance das espécies competidoras.....	47

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Resumo temporal e espacial da detecção dos sorotipos virais de dengue no Brasil.....	4
Quadro 2- Sítio-alvo e modo de ação dos inseticidas neurotóxicos utilizados para o controle vetorial.....	12

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Características gerais das áreas de estudo.....	23
Tabela 2- Condições experimentais do estudo de competição larval realizado, em semi campo.....	25
Tabela 3- Dados obtidos com a regressão não linear, usados na simulação de competição entre os grupos estudados.....	29
Tabela 4- Valores médios dos índices de positividade de ovitrampa, índice de densidade de ovos e total de ovos, por área.....	32
Tabela 5- Índice de densidade de ovos, por estação do ano, nas áreas de estudo.....	33
Tabela 6- Total de mosquitos que sobreviveram até a fase adulta, em cada um dos grupos, diante das diferentes condições analisadas.....	39
Tabela 7- Densidades de cada uma das populações competidoras observadas na simulação.....	46
Tabela 8- Limite de densidade populacional das espécies competidoras onde os índices de performance passam a valores $< 1,0$	46

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

IDO - Índice de Densidade de Ovos

IPO - Índice de Positividade das Ovitampas

PCR- Reação em Cadeia da Polimerase

RNA - Ácido Ribonucléico

TD - Tempo de Desenvolvimento

1 INTRODUÇÃO

1.1 Dengue: aspectos gerais

A dengue é uma arbovirose transmitida através da picada de mosquitos do gênero *Aedes* spp infectados com vírus DENV. Sua incidência pode ser influenciada por fatores que atuam direta ou indiretamente sobre algum dos seus três componentes: o agente etiológico (vírus dengue), mosquitos vetores (algumas espécies podem apresentar papel secundário e geograficamente restrito) e hospedeiros vertebrados (seres humanos).

A doença ocorre principalmente em áreas tropicais e subtropicais do planeta, onde o vetor encontra-se amplamente distribuído, e cerca de 2,5 bilhões de pessoas encontram-se potencialmente expostas à infecção (OMS, 2014). Atualmente, estima-se que haja 390 milhões de infecções por ano, sendo a dengue considerada um dos agravos de maior prevalência em todo o mundo (Fig. 1) (Bhatt *et al.*, 2013).

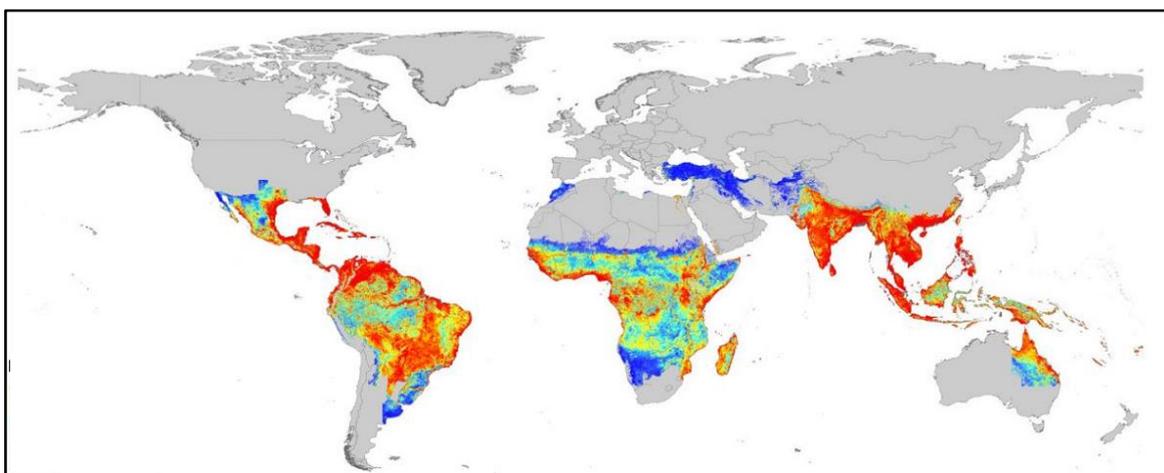


Figura 1- Mapa de risco de transmissão de dengue no mundo: as áreas em vermelho e em azul representam as áreas mais e menos suscetíveis, respectivamente; as áreas cinzas representam áreas não endêmicas. **Fonte:** Simmons, 2012.

Sua alta incidência tem origem multifatorial, alguns aspectos sociais influenciam diretamente na dinâmica de transmissão, principalmente aqueles relacionados a pobreza e condições de vida das populações atingidas. Isso inclui baixo investimento, fornecimento de água e sistema de coleta de lixo irregulares ou mesmo inexistentes. A educação ambiental e em saúde quase sempre é insatisfatória, além do rápido processo de urbanização que frequentemente ocorre sem planejamento, expandindo os problemas existentes. Ademais, os programas de controle da dengue muitas vezes apresentam baixa eficiência no médio/longo prazo, pois frequentemente se limitam a detecção e redução da população do vetor durante surtos epidêmicos. Marzochi (1994) elaborou um modelo ecológico básico da dengue que

correlaciona alguns destes fatores sociais com outros biológicos. No entanto, parece que os esforços se esgotam nas discussões, pois poucas medidas de controle são adotadas em larga escala e de modo regular, suficiente para provocar mudanças significativas deste panorama.

Fatores ecológicos também apresentam forte influência no aumento da incidência de dengue, pois agem diretamente sobre seus vetores. Por exemplo, fatores bióticos como nutrição, densidade larval, competição, predação e parasitismo, e fatores abióticos tais quais pluviosidade, temperatura e características físico-químicas da água, estão relacionados com o número e tamanho dos adultos que vão emergir de um determinado criadouro (Beserra *et al*, 2006)

O agente etiológico da dengue é um vírus envelopado de RNA fita simples e positiva, pertencente ao gênero *Flavivirus* e a família Flaviviridae (Fig. 2). São classicamente conhecidos quatro sorotipos: DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4; estes possuem genótipos com homologia de 60-80% entre si, embora sejam antigenicamente distintos (Forattini, 2002; Yang, 2003; Gould e Solomon, 2008; OMS, 2013a). Logo, um indivíduo infectado com o vírus dengue, após cessar a infecção, apresenta imunidade por toda sua vida ao sorotipo com o qual foi infectado. No entanto, a imunidade cruzada com os demais sorotipos do vírus dengue é apenas parcial e temporária (OMS, 2013b). A introdução de um novo sorotipo viral, em uma população humana suscetível, pode acarretar uma epidemia, se a densidade vetorial for alta. Recentemente, um novo sorotipo foi identificado em áreas isoladas da ilha de Bornéu, Malásia (DENV-5). Embora sua origem não seja clara, a análise filogenética revelou que o novo sorotipo é geneticamente semelhante aos demais, sugerindo, assim, uma origem ancestral comum (Mustafa, 2014).

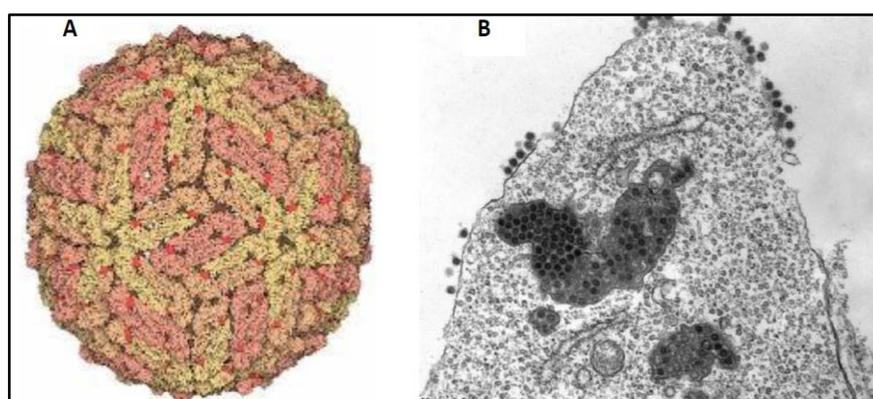


Figura 2- **A:** Modelo da partícula do vírus dengue; **B:** Imagem de microscopia eletrônica do vírus DENV no interior de em célula de mosquito. **Fonte:** www.combatedengue.com.br e Barth, 2000.

O vírus dengue tem sido mantido em dois ciclos de transmissão distintos nos aspectos evolutivos e ecológicos: o ciclo silvestre e o ciclo urbano, também conhecido como humano (Fig. 3). O ciclo silvestre envolve primatas não humanos e espécies de *Aedes* arbóreos, sendo

registrado na África e na Ásia. O ciclo urbano envolve o mosquito doméstico *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) e em algumas situações o peridoméstico *Aedes albopictus* (Skuse, 1894) e pode ser encontrado em uma variedade de ambientes ao longo dos trópicos e subtropicais. Neste ciclo, os seres humanos são os únicos hospedeiros e reservatórios (Gubler, 1998; Marcondes e Taul, 2011; Vasilakis *et al.*, 2012).

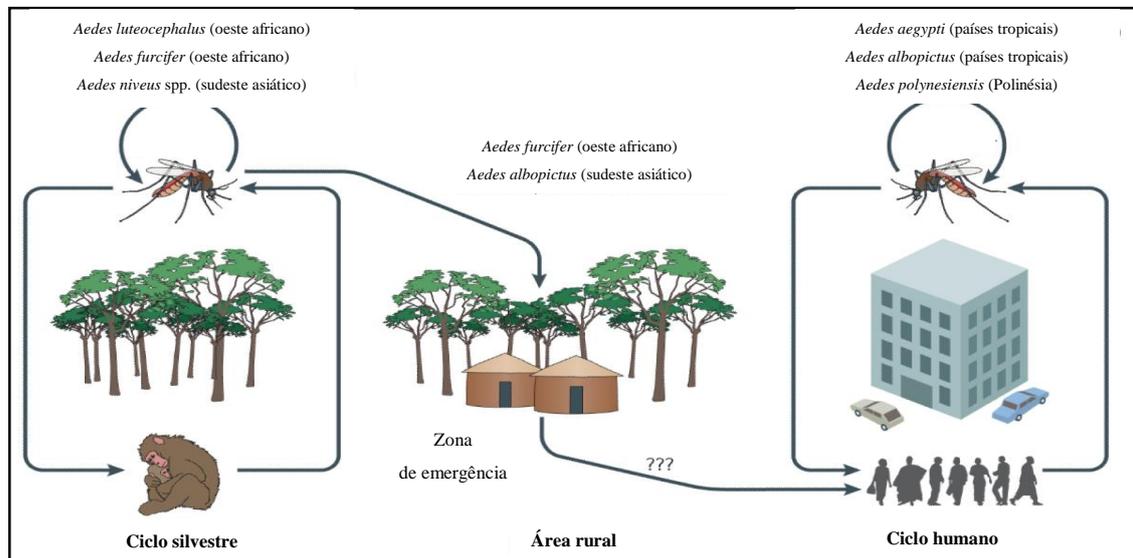


Figura 3- Ciclos de transmissão do vírus dengue, seus principais vetores e hospedeiros. **Fonte:** Vasilakis *et al.*, 2012.

Acredita-se que cada um dos diferentes sorotipos do vírus dengue tenha surgido de modo independente, a partir de vírus silvestres ancestrais, e tenha entrado no ciclo urbano há cerca de 100 a 1500 anos atrás (Wang, 2000). Esse processo teria ocorrido junto com o estabelecimento de populações urbanas na Ásia, em densidade suficiente para suportar um ciclo de transmissão humana contínua (Vasilakis *et al.*, 2007). Mais recentemente, a propagação global da dengue tem dado origem a genótipos endêmicos distintos dentro de cada sorotipo (Chen e Vasilakis, 2011).

O primeiro registro de uma doença clinicamente compatível com a dengue em humanos encontra-se em uma enciclopédia chinesa, publicada em 265-420 aC. A distribuição da doença ampliou-se com o passar do tempo, sendo que no final do século XVII já ocorriam surtos com sintomas muito similares a dengue em regiões da Ásia, África e América do Norte (Gubler 1998). Somente no século XX, foi sugerido o papel dos mosquitos na transmissão da doença (Graham, 1903). Graham acreditava que *Culex quinquefasciatus* era o vetor, embora alguns de seus estudos sobre a transmissão apontava a possibilidade de *Stegomyia fasciata* (atual *Aedes aegypti*) também estar envolvido. Tal fato só foi esclarecido três anos depois por Bancroft (1906) e confirmado por Cleland *et al.* (1919) e Chandler e Rice (1923). A natureza do agente etiológico da dengue foi definida inicialmente como um organismo ultramicroscópico, assim como o causador da febre amarela (Ashburn e Craig,

1907). O vírus foi isolado de humanos, pela primeira vez, durante a Segunda Guerra Mundial (Sabin, 1952) – sorotipos 1 e 2; e em 1960, Hammon *et al.* Isolaram os sorotipos 3 e 4. Atualmente, no Brasil, circulam os quatro sorotipos virais (Fig. 4), sendo estes introduzidos no país, em momentos distintos, como mostra o quadro abaixo:

Quadro 1- Resumo temporal e espacial da detecção dos sorotipos virais de dengue no Brasil

Sorotipos	Ano de introdução	Localidade	Ano de reintrodução*	Localidade
1	1982	Boa Vista	1986	Rio de Janeiro
2	1990	Rio de Janeiro	-//-	-//-
3	2001	Rio de Janeiro	-//-	-//-
4	1982	Boa Vista	2010	Boa Vista

* Entende-se por reintrodução, a detecção de um determinado sorotipo após um período considerado erradicado ou não detectado. Dados extraídos de: Barreto e Teixeira, 2008; Temporão *et al.*, 2011.

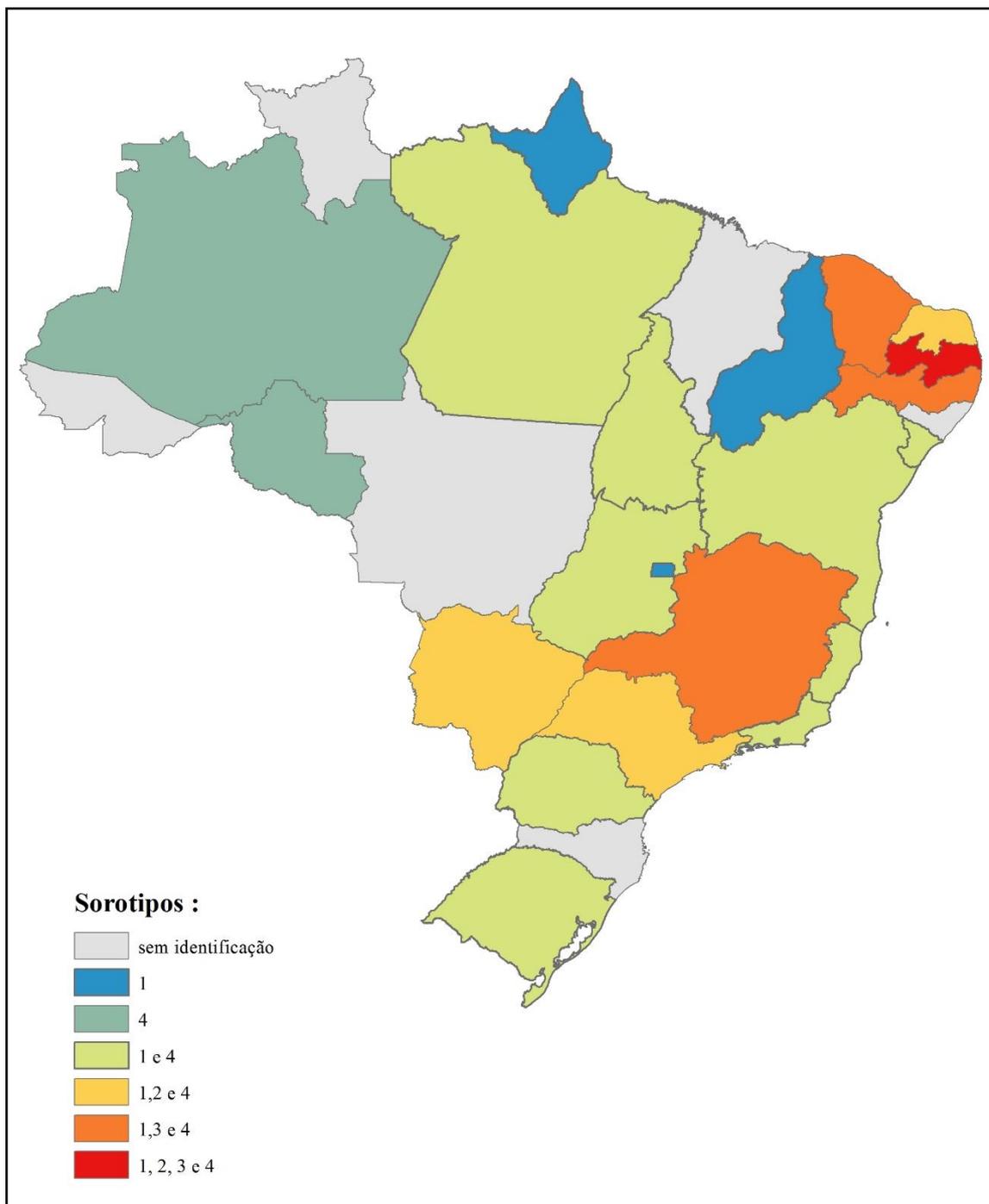


Figura 4- Distribuição dos sorotipos virais no território brasileiro. Dados extraídos de Secretaria de Vigilância em Saúde, 2014.

1.2 Os vetores da dengue

Os mosquitos do gênero *Aedes* spp. pertencem à subfamília Culicinae da família Culicidae (Consoli e Lourenço-de-Oliveira, 1994). Algumas espécies desse gênero transmitem o vírus dengue em áreas específicas, por exemplo: *Ae. polynesiensis* Marks, 1954, *Ae. scutellaris* (Walker, 1858) e *Ae. pseudoscutellaris* (Theobald, 1910) transmitem o vírus nas ilhas do Pacífico e da Nova Guiné; por outro lado, *Ae. niveus* (Eichwald, 1837) transmite o patógeno apenas nas Filipinas (Rosen *et al.*, 1954; Vasilakis *et al.*, 2012). Em âmbito mundial, *Ae. aegypti* é considerado vetor primário, enquanto que o *Ae. albopictus* pode desempenhar relevante papel na transmissão em algumas localidades específicas, tradicionalmente no Sudeste Asiático (Gubler 1998).

1.2.1 *Aedes aegypti*

O mosquito *Ae. aegypti* (Fig. 5) é o único vetor do vírus dengue e febre amarela urbana no Brasil (Consoli e Lourenço-de-Oliveira, 1994). Este ainda pode estar envolvido com os recentes casos de chikungunya, visto que as populações brasileiras possuem alta competência vetorial para os diferentes genótipos testados (Vega-Rúa *et al.* 2014).

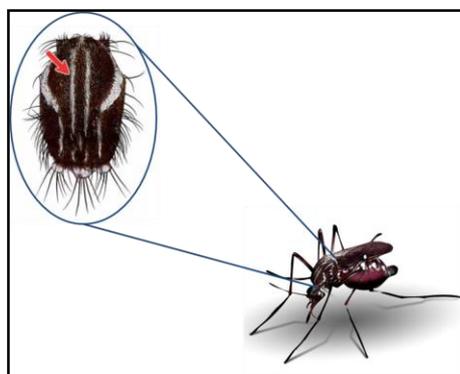


Figura 5- Mosquito *Ae. aegypti*. O inseto possui o corpo rajado de preto e branco, com escamas branco-prateadas que formam uma lira no mesonoto. **Fonte:** Adaptação de Rueda, 2004 e <http://www.fiocruz.br/ccs/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?inford=1375esid=9>

O vírus, que chegou ao Caribe no final do ano passado, já provoca epidemias em diversos estados brasileiros, com mais de 2.926 casos confirmados, sendo 2.832 casos autóctones, segundo o Ministério da Saúde (Fig. 6). Nos Estados Unidos, estes mosquitos já foram encontrados naturalmente infectados com o vírus West Nile, recentemente isolado no Brasil (Centers for Disease Control, 2013; 2014). Sua importância vetorial está amplamente relacionada à sua elevada endofilia, antropofilia e susceptibilidade a estes vírus (Consoli e Lourenço-de-Oliveira, 1994; Braga e Valle, 2007b).

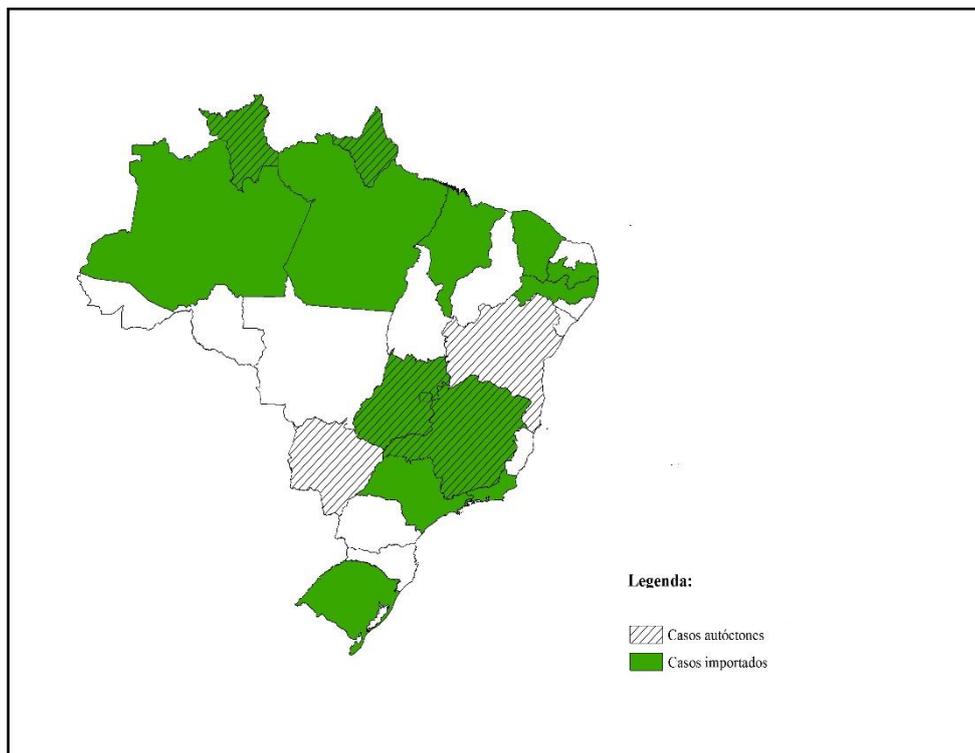


Figura 6- Distribuição de casos de febre chikungunya, no Brasil, no período de 2014 a janeiro de 2015. Dados extraídos do boletim epidemiológico 46 (5), 2015.

De modo geral, as fêmeas de culicídeos se infectam com o vírus dengue ao realizar o repasto sanguíneo, em hospedeiro infectado durante o período de viremia. O sangue é essencial para o desenvolvimento de seus ovariolos e subsequente maturação dos ovos (Clements 1992). As partículas virais são ingeridas junto com o sangue do hospedeiro vertebrado infectado, durante a hematofagia. O período de incubação extrínseco ¹do vírus no mosquito varia entre 12 a 14 dias. Durante este período, o vírus dengue infecta as células do epitélio do intestino médio do mosquito, se replica e posteriormente, se dissemina na hemolinfa, alcançando as glândulas salivares, onde se replicará e permanecerá até ser inoculado em um hospedeiro vertebrado. Os mosquitos também podem infectar-se através da transmissão transovariana (vertical) e venérea (horizontal). A transmissão vertical ocorre quando o vírus infecta o óvulo ou ovo e a progênie nasce infectada, ao passo que na transmissão venérea horizontal o macho infecta a fêmea através do líquido seminal durante a cópula (Yang, 2003; Lourenço-de-Oliveira, 2005). Contudo, ainda restam maiores evidências que apoiem o papel desses meios de transmissão na manutenção dos vírus dengue na natureza.

¹ Período, em dias, que o vírus ingerido leva para se disseminar no corpo do inseto e alcançar as glândulas salivares.

A cópula ocorre durante o voo, em geral entre um e três dias após a emergência do adulto. Uma única inseminação é o suficiente para fecundar todos os ovos que uma fêmea pode vir a produzir ao longo de sua vida, pois os espermatozoides são armazenados numa estrutura conhecida como espermateca. Uma fêmea pode se alimentar por diversas vezes entre as desovas. A hematofagia ocorre preferencialmente durante o amanhecer ou pouco antes do crepúsculo vespertino. Seus ovos são postos preferencialmente em recipientes artificiais que acumulem água limpa, isto é, com pouca matéria orgânica e baixa turbidez, sendo depositados individualmente, próximo à lâmina d'água, em um microambiente com alta umidade. Podem permanecer viáveis durante longos períodos de dessecação, característica que facilita sua dispersão passiva e contribui para a rápida elevação da densidade populacional da espécie no início da estação chuvosa. Após a eclosão, as larvas se alimentam de detritos orgânicos, bactérias, fungos e protozoários existentes na água dos criadouros e se desenvolvem, passando por quatro ínstares (ou estádios) até chegar ao estágio de pupa (Fig. 7). A pupa não se alimenta e é nesta fase que ocorre a metamorfose para a forma adulta. O período entre a eclosão dos ovos até o surgimento do adulto tem duração média entre 7-14 dias, sendo este diretamente influenciado pela disponibilidade de recursos, temperatura, competição inter e intra-específica. O desenvolvimento de insetos holometábolos confere uma vantagem ecológica e evolutiva. Isto porque os estágios imaturos destes insetos são aquáticos e, desta forma, não competem por hábitat e nicho ecológico com as formas adultas, que são aladas (Christophers, 1960; Consoli e Lourenço-de-Oliveira, 1994; Braks *et al.*, 2004; Lourenço-de-Oliveira, 2005; Rey, 2008).

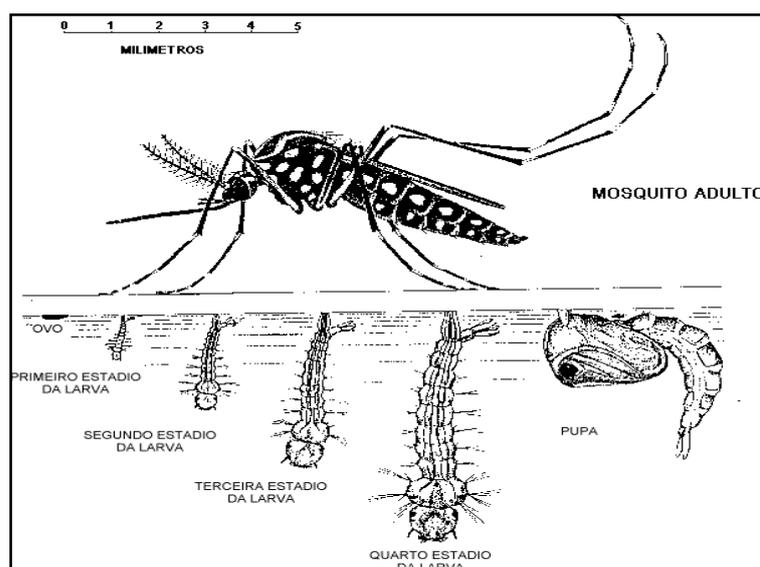


Figura 7- Ciclo do mosquito *A.aegypti*. **Fonte:** <http://www.dengue.org.br/>

Embora seja considerada uma espécie cosmopolita, amplamente distribuída no Brasil, trata-se de uma espécie exótica, de origem africana, tendo provavelmente chegado ao Brasil junto com o tráfico de escravos (Consoli e Lourenço-de-Oliveira, 1994; Natal, 2002; Camargo, 2008; Rey, 2008). Erradicado no final dos anos 1950, em virtude dos inúmeros casos de febre amarela em áreas urbanas, foi reintroduzido no Brasil, por pelo menos duas vezes, a partir de países próximos, na década de 1970 (Monteiro *et al.*, 2014). Desde então, embora haja intensas tentativas de reduzir as populações desta espécie, elas se mantiveram estáveis até os dias atuais.

1.2.2 *Aedes albopictus*

O mosquito *Ae. albopictus* (Fig. 8) é originário da Ásia, onde é considerado vetor de dengue e encefalite japonesa. Foi introduzido na Europa, África e América através do comércio internacional de pneus usados, sendo encontrado pela primeira vez no Brasil em 1986. No Brasil, ainda não foi incriminado como vetor da dengue, embora apresente alta competência vetorial para esta arbovirose em ensaios de laboratório (Lourenço-de-Oliveira *et al.*, 2003). Sua distribuição está associada à presença humana, no entanto, diferente do *Ae. aegypti*, é comumente encontrado no peridomicílio, plantações e zona de mata, além de ser mais tolerante a baixas temperaturas. Utiliza recipientes artificiais e naturais (internódios de bambu, buracos em árvore e cascas de frutas) como criadouros (Consoli e Lourenço-de-Oliveira, 1994; WRBU, 2012).

Ae. albopictus atua na transmissão do vírus dengue em áreas rurais, suburbanas e urbanas da Ásia e de chikungunya, na Ásia, África, Europa e América. Contudo, também foi encontrado infectado na natureza com os vírus responsáveis pela febre do oeste do Nilo, encefalomielite equina oriental e encefalite japonesa. Além disso, pode transmitir o parasita causador da dirofilariose canina (Consoli e Lourenço-de-Oliveira, 1994).

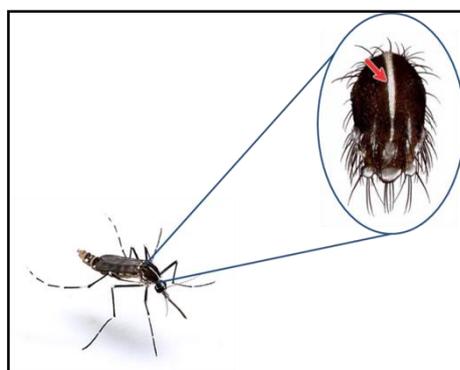


Figura 8- Mosquito *Ae. albopictus*. Este mosquito pode ser facilmente diferenciado do *Ae. aegypti* pela faixa branca dorsal no mesonoto. **Fonte:** Adaptação de Rueda, 2004 e <http://murall.com.br/chikunguya-da-africa-o-que-e-isso/>

1.2.3 Interação entre *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*

Os efeitos da competição interespecífica, sobre os indivíduos, podem afetar a dinâmica populacional das espécies envolvidas, influenciando a distribuição, a abundância e a evolução destas espécies (Townsend *et al.*, 2007). Indivíduos de algumas espécies podem sofrer uma redução da fecundidade, sobrevivência ou crescimento, como resultado da exploração de recursos ou interferência por indivíduos de outras espécies.

Muitos estudos de competição interespecífica têm sido realizados com espécies de mosquitos responsáveis pela transmissão de patógenos para o homem, como as espécies de mosquitos *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*, vetores de diversas arboviroses. Estas espécies têm se dispersado pelo mundo, e basicamente, esta invasão biológica apresenta três estágios: chegada, estabelecimento e dispersão (Lounibos, 2002). Tais interações podem beneficiar ou prejudicar determinada espécie de mosquito, e isso varia de acordo com o conjunto de fatores bióticos e abióticos ali presentes. Por exemplo, em algumas localidades, a abundância de *Ae. albopictus* foi reduzida em áreas urbanas, mas não em áreas rurais após o estabelecimento de *Ae. aegypti* (Rudnick e Hammon, 1960; Gilotra *et al.*, 1967; Chan *et al.* 1971; Ho *et al.*, 1973 *apud* Braks, 2004; Hawley, 1988 *apud* Braks, 2004).

A maioria dos estudos têm demonstrado diminuição das populações de *Ae. aegypti* em presença de *Ae. albopictus*. Nos EUA, o declínio da abundância e o desaparecimento de *Ae. aegypti* em associação com o aparecimento de *Ae. albopictus* foi bem documentado. Mecanismos propostos para explicar a rápida redução do vetor *Ae. aegypti* incluem (a) esterilidade devido ao acasalamento interespecífico com *Ae. albopictus* (Nasci *et al.*, 1989); (b) mortalidade diferencial causada por infecção por *Ascogregarina taiwanensis*, um parasita introduzido no país pelo *Ae. albopictus* (Munstermann e Wesson, 1990; Craig, 1993); (c) inibição da eclosão dos ovos de *Ae. aegypti* por larvas de *Ae. albopictus* (Edgerly *et al.*, 1993); e (d) superioridade de *Ae. albopictus* na competição larval por recursos (Juliano, 1998).

No município de Letícia (Amazonas, Colômbia), localizada na tríplice fronteira entre Brasil, Colômbia e Peru, observou-se o contrário do que ocorreu nos EUA. Após a introdução de *Ae. aegypti* em 2009, *Ae. albopictus* mostrou um comportamento menos sazonal do que *Ae. aegypti*. Constatou-se também uma importante redução dos criadouros positivos e dos índices de infestação. Além disso, suas populações foram deslocadas para periferia da área urbana deste município (Carvajal, 2013).

A mensuração do efeito da competição interespecífica pode ser complexa, visto que diferentes fatores podem influenciar diretamente e/ou indiretamente essa relação ecológica.

Por exemplo, estudos envolvendo as espécies *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*, em laboratório, usando uma dieta rica em proteína revelaram *Ae. aegypti* (Black *et al.*, 1989, Ho *et al.*, 1989) como competidor superior. Por outro lado, ao utilizar uma dieta rica em folhas, *Ae. albopictus* teve melhor desempenho nos ambientes competitivos (Barrera, 1996). Sendo assim, é necessário ter cautela na elaboração de desenhos experimentais e na análise de dados referentes à estudos de competição interespecífica.

1.3 Vigilância e controle vetorial

Uma vez que não existem vacinas ou medicamentos profiláticos para reduzir a transmissão da dengue, o controle do mosquito *Ae. aegypti* representa a única alternativa para mitigar surtos epidêmicos. O controle do inseto vetor visa reduzir as populações do mosquito a níveis que não representem riscos para a saúde pública, isto é, busca manter a densidade baixa o suficiente para evitar a ocorrência de surtos epidêmicos de dengue. Sendo assim, em 2002 o Ministério da Saúde apresentou o Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD), e entre os objetivos do programa, destacam-se a redução da infestação de *Ae. aegypti*, dos casos de dengue e da letalidade por febre hemorrágica da dengue (FUNASA, 2002).

Um dos componentes do PNCD é a vigilância epidemiológica da dengue, que visa reduzir o número de casos e a ocorrência de epidemias por meio da detecção precoce da circulação viral e adoção de medidas para interromper a transmissão. A vigilância entomológica se baseia no monitoramento dos índices de infestação por *Ae. aegypti* para subsidiar a execução das ações apropriadas de eliminação dos criadouros de mosquitos. O combate ao vetor visa a manutenção de índices de infestação inferiores a 1%, o que pode ser feito, majoritariamente, por procedimentos mecânicos, biológicos e/ou químicos (FUNASA, 2002; Whitehead *et al.*, 2007).

- Controle mecânico: O controle mecânico consiste na eliminação, proteção (vedação) ou destinação adequada de criadouros potenciais (FUNASA, 2001). No entanto, para que o controle mecânico seja realmente efetivo, é necessário um intenso esforço em campo, o que é dependente da motivação e habilidade de agentes de saúde ou da mobilização da população e deve ser feito em uma periodicidade curta, de modo a impedir o aparecimento de mosquitos adultos. Em 2011, o Instituto Oswaldo Cruz e a Secretaria de Estado de Saúde do Rio de Janeiro lançaram a campanha “10 Minutos Contra a Dengue”. O projeto foi inspirado em uma estratégia de controle adotada em Cingapura, onde o pico de epidemia foi interrompido no país (Buratini *et al.*, 2008). A estratégia se baseia na mobilização da população em uma ação semanal, de apenas 10 minutos, para identificação e limpeza dos principais criadouros

do *Ae. aegypti* dentro do seu próprio domicílio. Coletivamente, com uma grande adesão de moradores, seria possível mitigar a infestação de bairros e até cidades, reduzindo o risco de transmissão da dengue (IOC, 2013). Essa iniciativa foi adotada no Estado do Rio de Janeiro e cerca de metade dos municípios do Estado apresentaram significativa redução na infestação por *Ae. aegypti* (Mário Sérgio Ribeiro, dados não publicados).

- Controle químico: O controle químico consiste na utilização de substâncias de origem orgânica ou inorgânica, com a finalidade de eliminar ou reduzir determinada população de insetos. Entretanto, o uso intenso de inseticidas resultou na seleção de alelos de resistência em populações naturais do vetor, inviabilizando a sua eficácia em longo prazo (Martins *et al.*, 2009). Os principais inseticidas tradicionalmente empregados nos programas de controle estão agrupados em quatro classes: piretróides, organoclorados, organofosforados e carbamatos (Braga e Valle, 2007). Todos estes compostos têm como sítios-alvo diferentes moléculas do sistema nervoso central do inseto (Quadro 2). A transmissão nervosa, em insetos expostos a esses compostos, por diferentes mecanismos é exacerbada, o que acarreta contrações rápidas e repetitivas na musculatura, provocando paralisia e morte (Beaty e Marquardt, 1996; Hemingway e Ranson, 2000; OMS, 2006).

Quadro 2- Sítio-alvo e modo de ação dos inseticidas neurotóxicos utilizados para o controle vetorial

Grupo químico		Sítio-alvo	Modo de ação
Piretróides		Canais de Sódio	Modulação do canal de sódio
Organoclorados	Difenil-alifático		
		Ciclodienos	Receptor GABA
Organofosforados		Acetilcolinesterase	Inibição direta do neurotransmissor
Carbamatos			

- Controle biológico: O controle biológico é baseado na utilização de organismos que afetam as populações de mosquitos através de competição, predação e/ou parasitismo de larvas ou formas aladas. Neste sentido, patógenos como *Bacillus thuringiensis* var *12aploides12s*, *Bacillus sphaericus*, peixes larvófagos como *Gambusia affinis* e *Poecilia* spp., e larvas do mosquito *Toxorhynchites* têm sido utilizados em algumas regiões do Brasil (Teixeira *et al.*, 1999; Alles *et al.*, 2009/2010).

O controle biológico é frequentemente citado como uma ferramenta ambientalmente aceitável, no entanto a produção, manutenção e distribuição destes organismos a uma larga

escala é muitas vezes considerado impraticável. Sendo assim, o controle químico e o mecânico são as estratégias que mais têm sido utilizadas no âmbito governamental, contudo, com tantas dificuldades logísticas e operacionais, é evidente que estas estratégias são insustentáveis a médio e longo prazo.

Desta maneira, o desenvolvimento de novas estratégias de controle da dengue deve ser encorajado. Uma nova abordagem para o controle da dengue foi recentemente proposta e consiste na utilização de um simbionte intracelular herdado maternalmente, a bactéria *Wolbachia pipientis* (Hertig, 1936). Cerca de 60-70% das espécies de insetos estão naturalmente infectadas com esta bactéria, entre coleópteros, dípteros e lepidópteros (Werren *et al.*, 2008, Oliveira *et al.*, 2015), mas essa bactéria nunca foi encontrada em populações silvestres de *Ae. aegypti*. Observações iniciais mostraram que moscas da espécie *Drosophila melanogaster* (Meigen, 1830) apresentavam redução em sua longevidade quando estavam infectadas com esta bactéria (Min e Benzer, 1997). Dessa maneira, buscou-se a inoculação desta bactéria em *Ae. aegypti*, através da técnica de micro-injeção embrionária. Se a longevidade dos mosquitos fosse diminuída, um número menor de insetos sobreviveria ao período de incubação extrínseco do vírus dengue, reduzindo a transmissão (McMeniman *et al.*, 2009; Yeap *et al.*, 2011). Contudo, a competência vetorial de fêmeas de *Ae. aegypti* ao vírus dengue foi fortemente influenciada pela presença da *W. pipientis*. Descobriu-se que a bactéria bloqueava o vírus dengue, chikungunya e *Plasmodium gallinaceum* (agente etiológico da malária das aves) nos mosquitos, enquanto aqueles livres da bactéria apresentaram grande competência vetorial a estes patógenos (Moreira *et al.* 2009).

Além do bloqueio do vírus, a bactéria *W. pipientis* é capaz de influenciar a biologia reprodutiva do inseto (Min e Benzer, 1997). Quando apenas o macho está infectado, a bactéria induz uma incompatibilidade citoplasmática entre os gametas, que resulta na eliminação dos cromossomos paternos, e formação de embriões haploides e inviáveis (Werren *et al.* 2008). No entanto, sempre quando a fêmea apresenta *W. pipientis* há presença maciça da bactéria na prole dos insetos, independente do macho possuir ou não a bactéria. Desta maneira, a bactéria é capaz de invadir rapidamente populações naturais de *Ae. aegypti*, como já demonstrado na Austrália, em cerca de apenas 10 semanas após a soltura de mosquitos infectos com *W. pipientis* (Hoffmann *et al.*, 2011; Walker, 2011). Cerca de 24 meses após a soltura em Cairns, os mosquitos das duas áreas piloto ainda encontravam-se com *W. pipientis*, bloqueando a disseminação do vírus dengue nos mosquitos destas localidades (Frentiu *et al.*, 2014).

Essa estratégia possui amplas diferenças em comparação com outros métodos alternativos atuais, como o uso de mosquitos transgênicos, uma vez que não visa erradicar o *Ae. aegypti*, mas eliminar a dengue. Além disso, trata-se de um método (a) seguro, já que não há transferência da bactéria para outras espécies (Popovici *et al.*, 2010), (b) autossustentável Frentiu *et al.*, 2014, pois não há necessidade de múltiplas liberações, (c) natural, uma vez que a bactéria está amplamente presente nos insetos (Oliveira *et al.*, 2015) e (d) sem fins lucrativos, o que garante a execução de um projeto de pesquisa sem interesses comerciais.

Baseado nisso, foi criado o Programa Eliminar a Dengue Brasil, numa associação entre a Fundação Oswaldo Cruz e Universidade Monash, da Austrália. Pretende-se utilizar a bactéria endossimbionte *W. pipientis* para bloquear a transmissão do vírus dengue em áreas endêmicas do Rio de Janeiro. Atualmente, esta estratégia está sendo empregada em países como Austrália, Indonésia, Vietnã, Colômbia e Brasil, cada qual com seu estágio de desenvolvimento (Maciel-de-Freitas *et al.*, 2012).

O sucesso deste programa requer um equilíbrio entre a eficiência no bloqueio da transmissão de dengue por *W. pipientis* e o custo para o *fitness*, de modo a permitir a manutenção de mosquitos infectados em longo prazo na população de campo. Até o momento, duas cepas originárias de *D. melanogaster* foram inseridas em *Ae. aegypti*, estas cepas são conhecidas como wMelPop e wMel. Estas cepas diferem significativamente no que diz respeito ao bloqueio do vírus dengue e ao impacto no *fitness* dos mosquitos, em muito por apresentarem densidade e distribuição distintas nos tecidos dos insetos (Walker *et al.*, 2011). A wMelPop se concentra nas glândulas salivares, túbulos de Malpigh, corpo gorduroso e ovários dos mosquitos. Embora bloqueie quase que integralmente o vírus dengue, o vetor tem longevidade reduzida e os seus ovos não são resistentes à dessecação. Por outro lado, a wMel encontra-se difundida apenas nos ovários e glândulas salivares do vetor, sem nenhum impacto significativo no *fitness* dos insetos, porém apresenta apenas bloqueio parcial, com cerca de 20-30% de vazamento (Walker *et al.* 2011).

No Brasil, a Fundação Oswaldo Cruz desenvolve estudos em quatro bairros desde 2012: Tubiacanga (na Ilha do Governador), Urca e Vila Valqueire, no Rio de Janeiro, e Jurujuba, em Niterói (Fig. 9). Os estudos de campo com a liberação programada de mosquitos *Aedes aegypti* com *W. pipientis* (cepa Wmel) foram iniciados em Tubiacanga em setembro de 2014.



Figura 9- Locais de atuação do projeto Eliminar a Dengue – Desafio Brasil

Após soltura, estes mosquitos com *W. pipientis* interagem com os mosquitos selvagens presentes nas áreas selecionadas. No Rio de Janeiro, em especial no ambiente suburbano, é comum encontrar *Ae. albopictus* (Skuse, 1894) em simpatria com *Ae. aegypti*, muitas vezes tendo larvas das duas espécies co-existindo em um único criadouro (Braks *et al.* 2004). O mosquito *Ae. albopictus* tem se mostrado um competidor superior em relação a *Ae. aegypti* (Braks *et al.* 2004). De um modo geral, em ambientes muito competitivos, os mosquitos *Ae. aegypti* apresentam maior mortalidade e tempo de desenvolvimento entre L1-pupa, e o adulto possui menor tamanho e longevidade (Braks *et al.* 2004, Santos, 2012). Quando liberados, as fêmeas de *Ae. aegypti* com *Wolbachia* depositam seus ovos em criadouros que já podem ter larvas de *Ae. aegypti* sem *Wolbachia* ou então de *Ae. albopictus*. Desta maneira, torna-se fundamental investigar o custo que a competição intraespecífica com *Ae. aegypti* sem a bactéria ou interespecífica com *Ae. albopictus* podem gerar nos mosquitos que estão sendo soltos com *W. pipientis*.

2 JUSTIFICATIVA

Com o desenvolvimento do projeto Eliminar a Dengue no Brasil, estão sendo liberados mosquitos *Ae. aegypti* com *W. pipientis*, em uma das áreas selecionadas pela equipe do projeto. Estes mosquitos interagem com os mosquitos selvagens em Tubiacanga, o que também acontecerá nas demais áreas onde ocorrerão as próximas solturas. Destes, o *Ae. albopictus* pode, inclusive, co-existir nos mesmos criadouros que *Ae. aegypti*. Estudos anteriores mostram que quando em competição interespecífica com *Ae. albopictus*, larvas de *Ae. aegypti* apresentam maior mortalidade e requerem mais tempo para alcançar a fase adulta, enquanto os mosquitos adultos têm menor tamanho e menor longevidade (Braks *et al.* 2004). Ademais, esses efeitos são denso-dependentes, ou seja, quanto maior a competição, maior o impacto na biologia de *Ae. aegypti*. Assim, buscamos quantificar o efeito de *Ae. albopictus*, em diferentes densidades, em alguns aspectos da biologia de *Ae. aegypti* com e sem *W. pipientis*. Com isso, poderemos usar essa informação em modelos que prevejam a disseminação da *W. pipientis* nas diferentes áreas do projeto, e, possivelmente, desenvolver um desenho de liberação racional, que considere esses achados.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Investigar o efeito que a competição interespecífica com *Ae. albopictus* pode ter na biologia de *Ae. aegypti*, infectados ou não com a cepa wMel de *W. pipientis*, e qual a consequência disso para a disseminação da bactéria em campo.

3.2 Objetivos Específicos

Monitorar as populações de *Ae. albopictus* e *Ae. aegypti*, durante um ano, nas quatro localidades do estado do Rio de Janeiro em que se planeja realizar a soltura de *Ae. aegypti* com *W. pipientis*, a fim de conhecer a sazonalidade da razão *Ae. aegypti*: *Ae. albopictus*.

Verificar o efeito da competição interespecífica com *Ae. albopictus* em aspectos da biologia do *Ae. aegypti* tais como: sobrevivência e tempo de desenvolvimento dos imaturos, tamanho de asa dos adultos, proporção de machos e fêmeas e índice de performance.

Simular o impacto que diferentes níveis de infestação de *Ae. albopictus* pode ter na disseminação de *W. pipientis* nestas áreas.

4 METODOLOGIA

4.1 Monitoramento das populações de *Ae. albopictus* e *Ae. aegypti*, em campo

O monitoramento da densidade populacional de *Aedes* spp. foi realizado mediante a coleta semanal de ovos, com auxílio de armadilhas do tipo ovitrampa (Fig. 10), no período de agosto de 2013 a agosto de 2014, perfazendo um total de 52 semanas ininterruptas. A ovitrampa (Fay e Perry, 1965; Fay e Eliason, 1966), constitui-se de um recipiente plástico arredondado e de cor preta, com uma palheta de compensado de Eucatex fixada na borda do vaso com um clip de metal. A palheta é imersa em água e devido a rugosidade e a umidade, as fêmeas de *Aedes* spp. depositam ali os seus ovos, não sendo necessário a utilização de nenhum atrativo químico na água. De modo geral, as armadilhas foram instaladas no peridomicílio. A inspeção das ovitrampas foi realizada semanalmente, quando então, as palhetas eram recolhidas, encaminhadas para o laboratório e substituídas por outras.

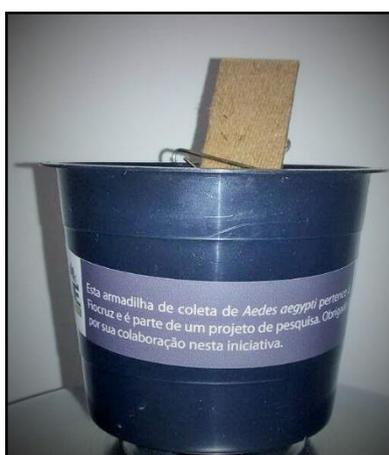


Figura 10- Ovitrapa.

No laboratório, as palhetas foram colocadas para secar, por no mínimo três dias, tempo necessário para a embriogênese dos ovos (Farnesi, 2009). Com auxílio de microscópio estereoscópio, os ovos eram contabilizados, um a um. Posteriormente, cada palheta era colocada separadamente em um copo contendo água e comida (ração para peixe da marca TetraMim®), em seguida, as larvas eram identificadas com base na chave dicotômica de Consoli e Loureço-de-Oliveira (1994) (Fig. 11).

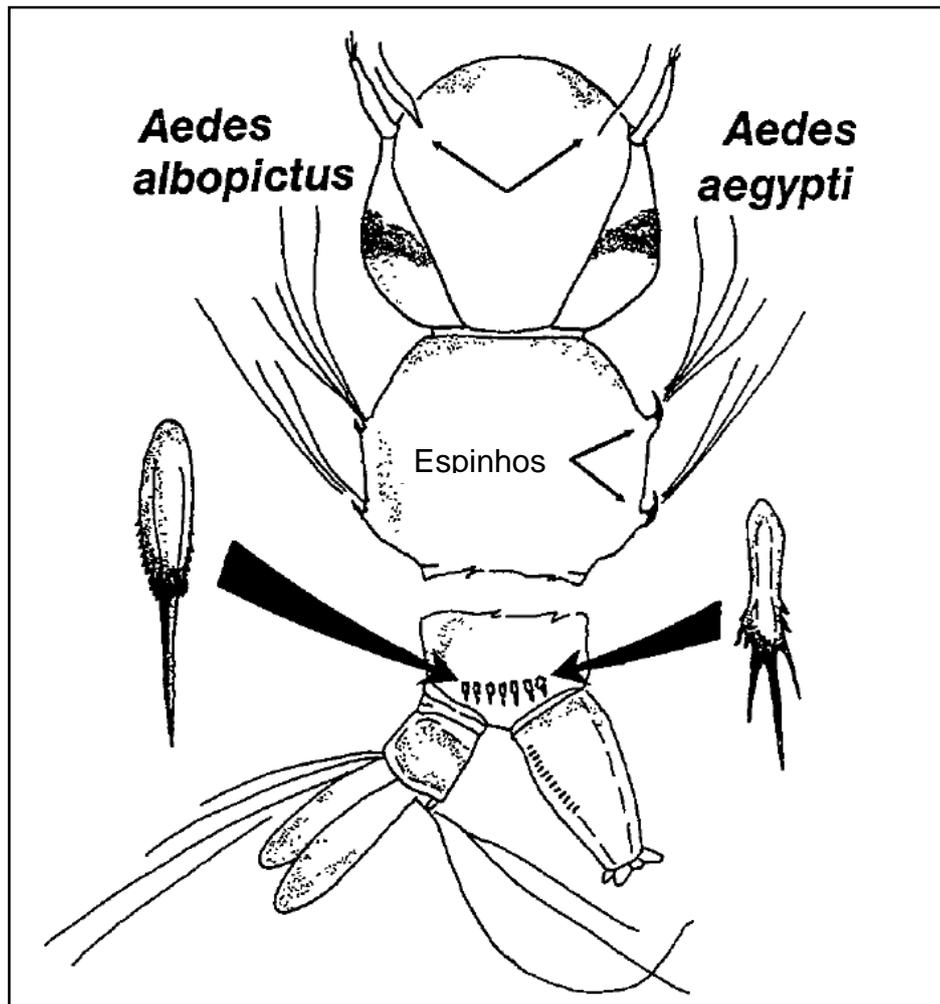


Figura 11- Desenho ilustrativo com as diferenças mais importantes entre as larvas de *Ae. albopictus* e *Ae. aegypti*. Fonte: Estrada-Franco e Craig, 1995.

Adicionalmente, dados coletados com auxílio de armadilhas BGs sentinelas (Fig. 12), utilizadas no mesmo período, foram analisados. As armadilhas BGs sentinelas, devido sobretudo a forma, a cor e à presença de substâncias químicas semelhantes àquelas presentes na pele humana - como ácido lático, amônia e ácido capróico, atraem fêmeas de mosquitos adultos em busca de alimentação sanguínea, eventualmente machos também são capturados. Ao aproximarem-se da armadilha, os insetos são sugados para o seu interior, por meio de uma pequena ventoinha e ficam isolados em um saco coletor, sem chance de retornar ao ambiente (Kröckel *et al.*, 2006; Maciel-de-Freitas *et al.*, 2006). Estas armadilhas foram instaladas majoritariamente no intradomicílio. Os sacos coletores eram trocados semanalmente e encaminhados para o laboratório, para identificação dos insetos, segundo chave dicotômica de Consoli e Loureço-de-Oliveira (1994) (Fig. 13).



Figura 12- Armadilha BG Sentinela. As setas indicam o fluxo de ar, as amarelas, a entrada de ar e as vermelhas, a saída.

Foram instaladas 25 ovitrampas e 30 BGs sentinelas em cada uma das áreas de estudo (Fig. 14). As características gerais destas áreas encontram-se na Tabela 1. As armadilhas foram georreferenciadas de acordo com os endereços das residências. As coordenadas foram calculadas em graus decimais, projeção UTM, fuso 23 sul e Datum SAD69. Os mapas com a distribuição das armadilhas encontram-se no Anexo 1. Dados climáticos das estações meteorológicas próximas às áreas de coletas, foram fornecidos pelo Instituto Nacional de Meteorologia.

Foram calculados os índices de positividade (número de armadilhas com ovos / número de armadilhas analisadas), de densidade de ovos (número de ovos / número de armadilhas analisadas) e a proporção de *Ae. aegypti* em relação a *Ae. albopictus* (número de larvas de *Ae. aegypti*/ número de larvas de *Ae. aegypti* + número de *Ae. albopictus*), sendo este último também utilizado para análise dos dados obtidos através das coletas realizadas com auxílio das BGs sentinelas.

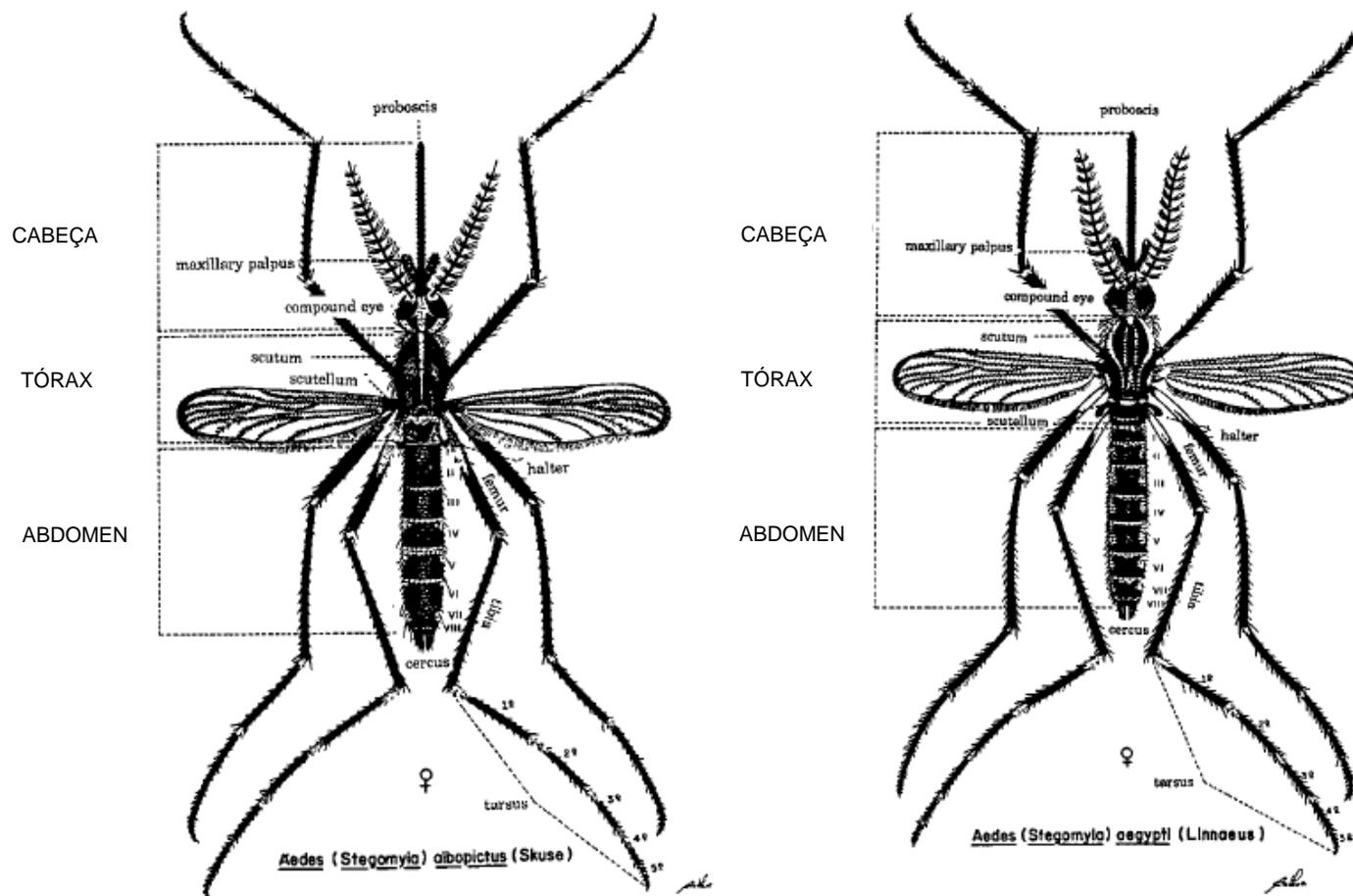


Figura 13- Características morfológicas de fêmeas adultas de *Ae. albopictus* e *Ae. aegypti*. Fonte: Estrada-Franco e Craig, 1995. No *Ae. albopictus* a esquerda, pode-se ver a faixa longitudinal, branco prateada no escutelo, enquanto a direita, o desenho em forma de lira no *Ae. aegypti*.

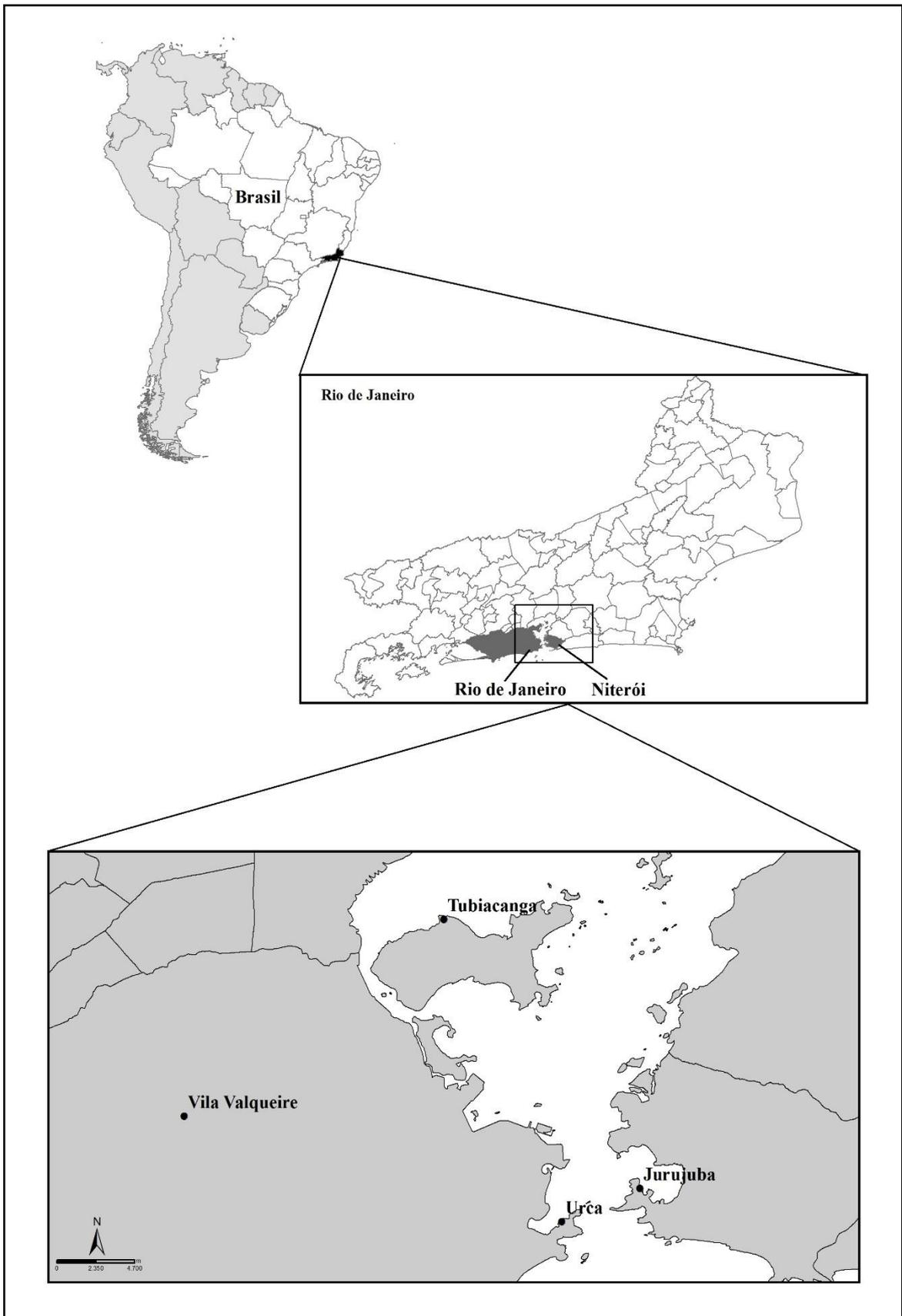


Figura 14- Áreas de estudo: Jurujuba, Tubiacanga, Urca e Vila Valqueire.

Tabela 1- Características gerais das áreas de estudo

Características:	Áreas de estudo:			
	Jurujuba	Tubiacanga	Vila Valqueire	Urca
Ambiente circundado	Baía de Guanabara	Baía de Guanabara	Floresta secundária	Baía de Guanabara
Área (hectare)	3.515	1.461	19.185	13.695
Habitantes	1.196	2.425	1.423	3.212
Densidade humana (Habitantes/hectare)	340,2	165,98	74,17	234,54
Descrição socioeconômica	Classe baixa	Classe média baixa	Classe média	Classe média alta
Pavimentação das ruas	Parcialmente	Parcialmente	Sim	Sim
Coleta de lixo	Não	Sim	Sim	Sim
Canalização de água	Não	Alguns	Sim	Sim
Reservatórios externos de água	Sim	Sim	Sim	Não
Hábitats comum dos mosquitos	Tanques de água e tambores de metal	Tanques de água e tambores de metal	Tanques e baldes de água	Ralos domésticos e potes plásticos abandonados

4.2 Competição intra e interespecífica de *Ae. albopictus* e *Ae. aegypti*, com e sem *W. pipientis*

Os experimentos de competição larval foram realizados em condições de semi-campo (Fig. 15), no Instituto de Biologia do Exército, sujeitos as influências de alterações climáticas, tais como umidade e temperatura do ar, além da pluviosidade. Tais condições foram registradas continuamente, por meio de uma estação meteorológica (Instrumtemp, modelo ITWH 1080) instalada no local.



Figura 15- Tenda sobre estantes contendo os recipientes plásticos telados, utilizados no experimento de competição e estação meteorológica instalada no local.

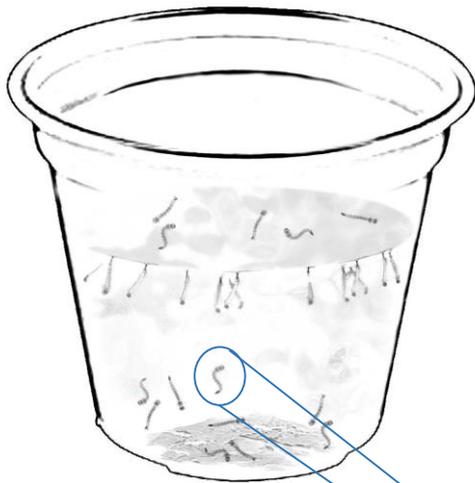
Foram utilizadas larvas de *Ae. aegypti* com wMel (F19), *Ae. aegypti* sem wMel (F1) e *Ae. albopictus* (F1 e F2). As gerações parentais (F0) de *Ae. aegypti* sem *W. pipientis* e *Ae. albopictus* foram obtidas em Jurujuba, Tubiacanga, Urca e Vila Valqueire através da coleta de ovos por meio de ovitrampas. Após triagem, as larvas das quatro áreas estudadas, foram inseridas no mesmo recipiente, sendo separadas apenas segundo sua espécie. Posteriormente, as pupas eram colocadas em gaiolas, possibilitando o cruzamento entre os adultos provenientes das diferentes áreas monitoradas. A linhagem de *Ae. aegypti* com *W. pipientis* (cepa wMel), proveniente da Austrália foi submetida a oito gerações de cruzamentos com mosquitos coletados em diferentes bairros do estado do Rio de Janeiro. A cada geração, 250 fêmeas com *W. pipientis* foram criadas junto a 50 machos locais. Desta maneira, *W. pipientis* foi inserida em mosquitos com o *background* genético brasileiro (Yeap *et al.*, 2011). Os três grupos foram submetidos a densidades, proporções entre as espécies, e níveis de alimentação distintos, como verificados na tabela a seguir (Tabela 2):

Tabela 2- Condições experimentais do estudo de competição larval, realizado em semi-campo

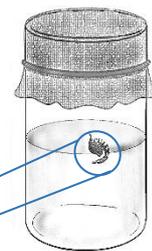
Tratamentos	<i>Ae. aegypti</i> selvagem	<i>Ae. aegypti</i> com wMel	<i>Ae. albopictus</i>
1	20	0	0
2	40	0	0
3	60	0	0
4	0	20	0
5	0	40	0
6	0	60	0
7	0	0	20
8	0	0	40
9	0	0	60
10	20	0	20
11	30	0	30
12	20	0	40
13	40	0	20
14	0	20	20
15	0	30	30
16	0	20	40
17	0	40	20
22	20	20	0
23	30	30	0
24	20	40	0
25	40	20	0

Cada tratamento foi composto por quatro réplicas com 0,50g de folhas de abacate e Chitosan² (SIGMA) em igual proporção como fonte alimentar (dieta rica), e, quatro réplicas contendo apenas 0,25g dos mesmos recursos (dieta pobre) (Braks *et al.*, 2004). Independente do tratamento, todos insetos foram criados de acordo com o esquema a seguir (Fig. 16).

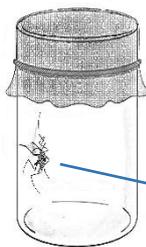
² Polissacarídeo proveniente do exoesqueleto de crustáceos preparado pela desacetilação alcalina da quitina obtida a partir da casca de camarão (*Pandalus borealis*). A quitina é fabricada industrialmente por esmagamento de cascas de camarão, em seguida, lavados com ácidos para remover o material inorgânico e proteico. A quitina purificada é desacetilada para obtenção do quitosano por tratamento com uma base forte tal como hidróxido de sódio. O quitosano resultante pode ser ainda purificado por preparação de soluções de ácido seguido por neutralização e precipitação.



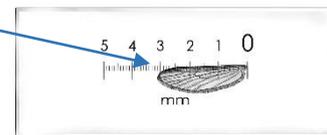
Larvas de primeiro estágio, de cada combinação mencionada na Tabela 2, foram contadas e transferidas para recipientes plásticos de cor preta, contendo 400 ml de água potável e a quantidade de recursos alimentares apropriada. O desenvolvimento dos imaturos foi monitorado diariamente.



As pupas, recém formadas, foram transferidas, individualmente, para pequenos potes telados.



Após a emergência, a água foi removida do recipiente, e os adultos ali permaneceram até o momento da mensuração de uma de suas asas.



Uma das asas de cada mosquito foi removida e mensurada, com auxílio de lâmina milimetrada e microscópio estereoscópico.

Figura 16- Método de criação dos insetos submetidos a condições de competição intra e interespecífica.

Os indivíduos dos tratamentos 18 a 21, pupas mortas e adultos, foram conduzidos a ensaios moleculares para detecção de *W. pipientis*. A detecção da bactéria foi realizada através do Taqman multiplex por reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real, com base no protocolo estabelecido pela Universidade de Monash. Este protocolo utiliza dois conjuntos de *primers*, um para amplificar o gene Rps17 de *Ae. aegypti* e outro para amplificar um gene WD0513 da cepa wMel de *W. pipientis*. A amplificação de cada gene é então detectada por sondas marcadas com os fluoróforos FAM (*Ae. aegypti*) e Cy5 (wMel). A metodologia encontra-se detalhada no Anexo 2. Ao longo do experimento, foram observados os seguintes aspectos biológicos:

Sobrevivência dos imaturos: Ao dividir o número total de mosquitos adultos resultantes pelo número total de larvas iniciais em cada réplica/tratamento, foi possível estimar o efeito que a competição intra ou interespecífica teve sobre a sobrevivência dos imaturos.

Tempo de desenvolvimento: Compreende o período entre o dia em que ocorreu a eclosão das larvas até o dia em que a última pupa do experimento foi formada, por réplica/tratamento.

Tamanho dos adultos: O tamanho do corpo dos adultos foi estimado através da mensuração de uma das asas. Para isso, uma das asas, de cada um dos adultos, foi removida e mensurada com auxílio de lâmina milimétrica Carl Zeiss, sob microscópio estereoscópico.

Proporção de machos e fêmeas: Após emergência, o sexo de cada mosquito foi verificado, de modo a permitir a quantificação da proporção de machos e fêmeas presentes em cada um dos experimentos.

Índice de Performance: Um importante parâmetro na ecologia de populações é o índice de performance (λ') ou capacidade finita de crescimento. Para calculá-lo foram utilizados os valores de alguns aspectos biológicos observados, tais como sobrevivência dos imaturos, tempo de desenvolvimento e tamanho dos adultos das coortes dos mosquitos, para cada réplica. A estimativa utilizada ($\lambda' = \exp(r')$), foi adaptada por Juliano (1998) a partir da equação estabelecida por Livdahl e Sugihara (1984), utilizando r' como medida de crescimento populacional. De acordo com esse parâmetro, valores de $r' > 1,0$ representam o crescimento de uma determinada população, $r' = 1,0$ estabilidade e $r' < 1,0$ decréscimo populacional.

$$r' = \frac{\ln \frac{1}{N_0} \sum_x A_x f(\bar{w}_x)}{D + \frac{\sum_x x A_x f(\bar{w}_x)}{\sum_x A_x f(\bar{w}_x)}}$$

Onde:

- N_0 é o número inicial de fêmeas de uma coorte, assumindo ser 50% das larvas adicionadas, visto que a razão sexual nas espécies aqui estudadas geralmente é de 1:1 (Gilchrist e Haldane, 1947 *apud* Clements, 1992; Ross *et al.*, 2014)
- A_x é o número de fêmeas adultas no dia x .
- ω_x é a média do tamanho da asa das fêmeas no dia x .
- $f(\omega_x)$ é uma função que correlaciona a fecundidade com o tamanho da asa das fêmeas, seguindo equações abaixo, propostas para *Ae. aegypti* (Briegel, 1990) e (Lounibos *et al.* 2002), respectivamente:

$$f(\omega_x) = 2.50 \omega_x - 8.616$$

$$r^2 = 0.875, N = 206, P < 0.001$$

Considerando ω_x como o cubo do comprimento da asa, em milímetro, no dia x .

$$f(\omega_x) = 78.02 \omega_x - 121.240$$

$$r^2 = 0.713, N = 91, P < 0.001$$

Considerando ω_x como o comprimento da asa, em milímetro, no dia x .

- D é o tempo requerido (em dias) para que uma fêmea recém eclodida possa acasalar, realizar o repasto sanguíneo e ovipor. Assume-se que D é igual ao número de dias em que uma fêmea leva para chegar a fase adulta mais quatro, referente a duração do ciclo gonotrófico (Pant e Yasuno, 1973).

Os valores do índice λ' foram utilizados para compor um modelo com o objetivo de simular o impacto que diferentes níveis de infestação de *Ae. aegypti* sem wMel e *Ae. albopictus* podem ter na performance de *Ae. aegypti* com wMel, em campo, e consequentemente, na sua disseminação. Para isso, foram feitas três regressões não linear relacionando o índice λ' para cada uma das três populações: *Ae. aegypti* sem wMel, *Ae. albopictus* e *Ae. aegypti* com wMel, com o número (n) de indivíduos de cada coorte em competição, de acordo com o seguinte modelo: $\log(\lambda') \sim naeg + nalbo + nwmel$

Com a análise, é possível verificar o quanto o aumento de cada uma das populações competidoras afeta o índice de performance. Os valores obtidos nas regressões são apresentados na tabela abaixo (Tabela 3). Uma vez obtidos os coeficientes das regressões, torna-se possível simular competição entre as três populações. A simulação foi realizada em colaboração com Daniel Antunes Maciel Villela do Programa de Computação Científica da Fundação Oswaldo Cruz.

Tabela 3- Dados obtidos com a regressão não linear, usados na simulação de competição entre os grupos estudados

Regressão para:	Intercepto	Coeficientes		
		naeg	nalbo	nwmel
<i>Ae. aegypti</i>	0.191876685	-0.002864357	-0.00276201	-0.00284936
<i>Ae. albopictus</i>	0.259901789	-0.002974583	-0.003110085	-0.00239111
<i>Ae. aegypti</i> + wMel	0.189163953	-0.001850427	-0.002145199	-0.00256273

5 RESULTADOS

5.1 Monitoramento das populações de *Ae. albopictus* e *Ae. aegypti*, em campo

5.1.1 Dados meteorológicos

Os dados de temperatura mínima, média e máxima, assim como umidade e temperatura foram obtidos das estações meteorológicas próximas às áreas de estudo: Forte de Copacabana, próximo a Jurujuba e Urca; Vila Militar, próximo a Tubiacanga e Vila Valqueire.

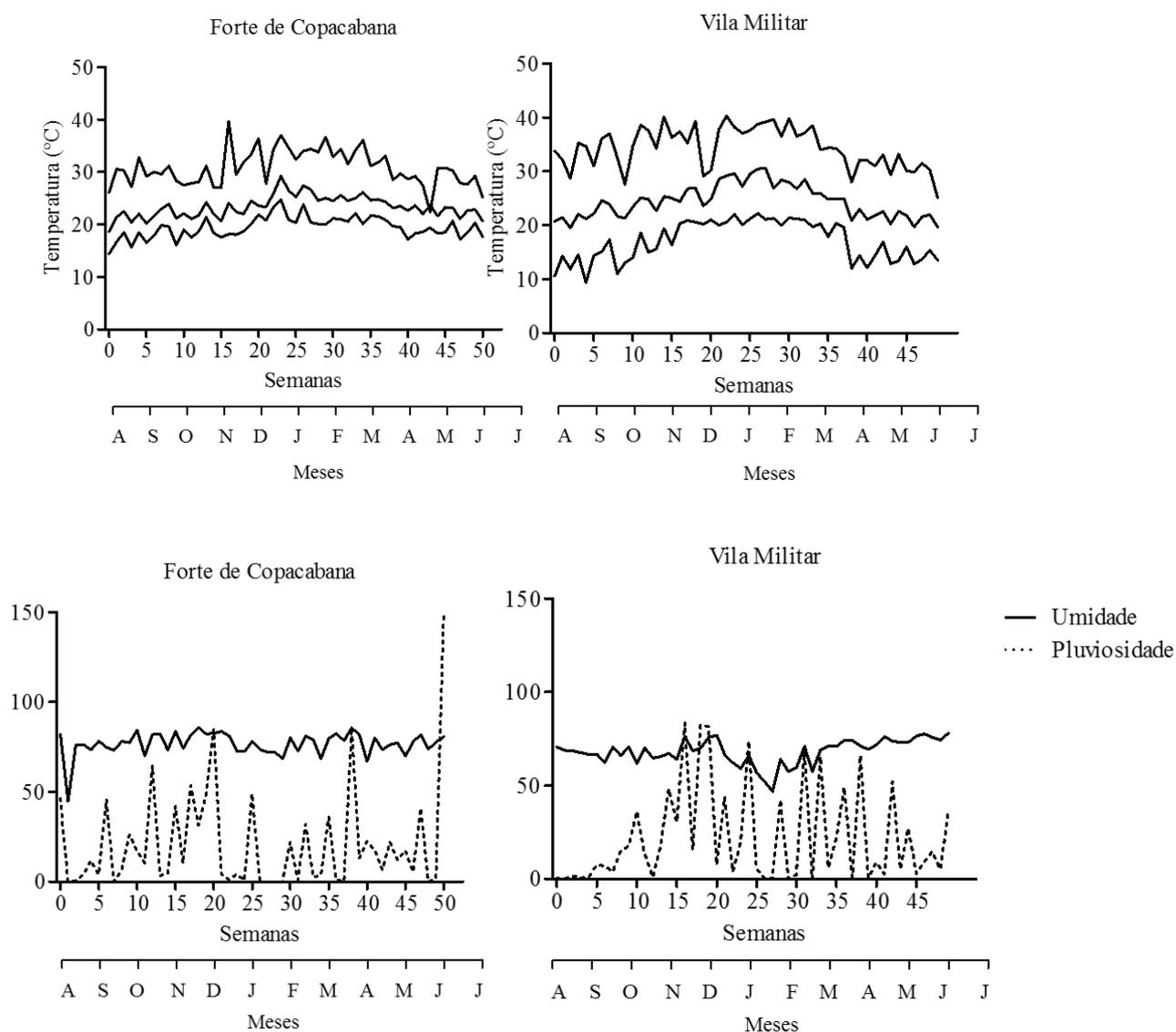


Figura 17- Dados das estações meteorológicas do Forte de Copacabana e Vila Militar: temperatura (mínima, média e máxima), umidade e pluviosidade.

5.1.2 Padrão de positividade das ovitrampas

O padrão de positividade das ovitrampas foi similar nas quatro áreas monitoradas (Fig. 18). Inicialmente o IPO foi baixo, porém após o primeiro mês houve um aumento exponencial que se estabilizou com a chegada do verão, alcançando, em todas as localidades, índices superiores a 80% por longos períodos. Entretanto, a amplitude variou entre as áreas, Urca e Vila Valqueire apresentaram os índices de positividade médios mais baixos (77,5% e 79,9%, respectivamente) em comparação com Jurujuba e Tubiacanga, cujos índices foram de 87,8%.

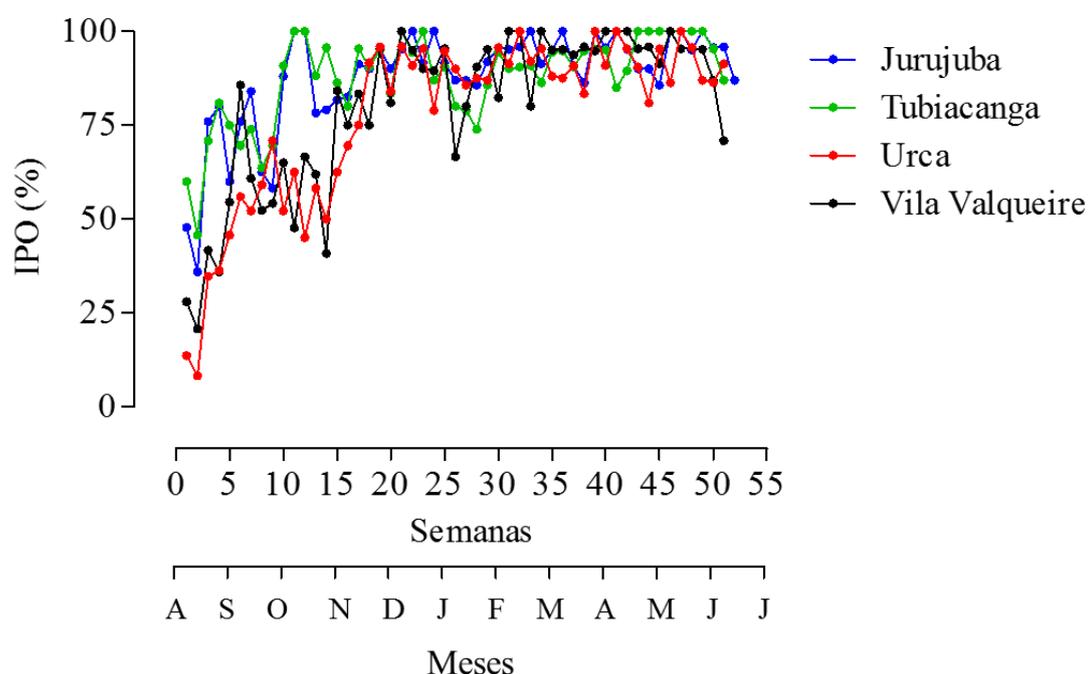


Figura 18- Índice de positividade das ovitrampas entre agosto/2013 a agosto/2014. Estações: Semanas 0 a 7: inverno; 8 a 20: primavera; 21 a 33: verão; 34 a 45: outono; 46 a 52: inverno.

5.1.3 Padrão temporal do número médio de ovos de *Aedes* spp.

Ao longo das cinquenta e duas semanas de monitoramento, foram coletados 623.242 ovos de *Aedes* spp., sendo 225.059 em Tubiacanga, 167.188 em Vila Valqueire, 127.078 em Jurujuba e 103.917 na Urca (Tabela 4). O índice de densidade (Fig. 19) de ovos variou ao longo do tempo, aumentando consideravelmente no outono (Fig. 20 e Tabela 5). O aumento da densidade relativa de mosquitos pode estar relacionado a maior disponibilidade de criadouros devido a maior ocorrência de chuvas nesse período.

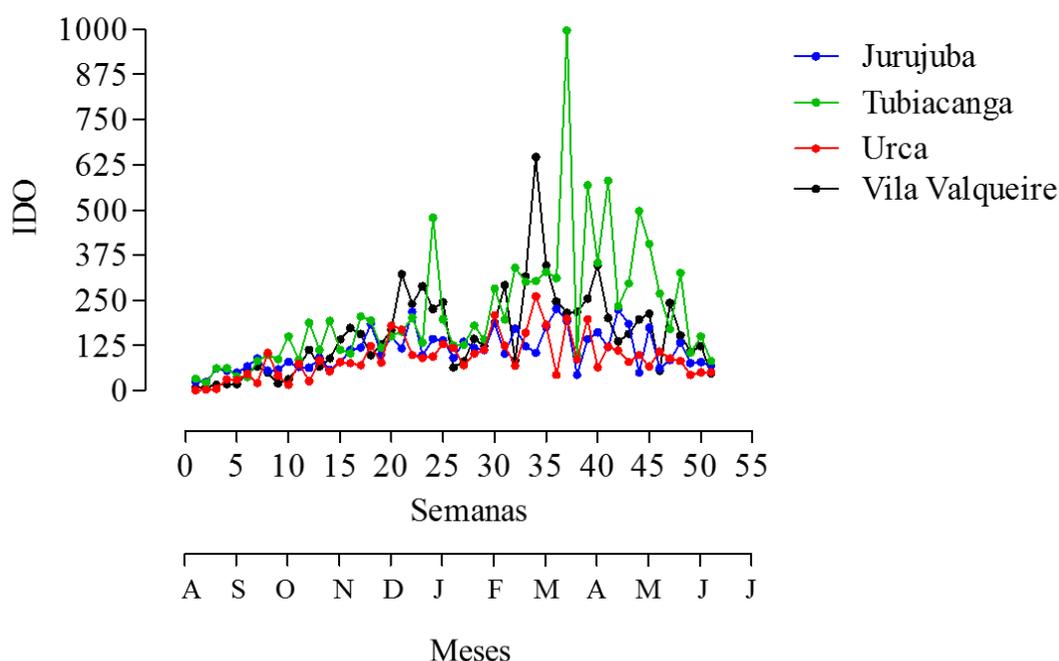


Figura 19- Índice de densidade de ovos. Estações: Semanas 0 a 7: inverno; 8 a 20: primavera; 21 a 33: verão; 34 a 45: outono; 46 a 52: inverno.

Tabela 4- Valores médios dos índices de positividade de ovitrampa, índice de densidade de ovos e total de ovos, por área.

Áreas de estudo	IPO	IDO	Total de ovos
Jurujuba	87.84	111.01	127078
Tubiacanga	87.82	217.51	225059
Urca	77.53	90.91	103917
Vila Valqueire	79.92	157.41	167188

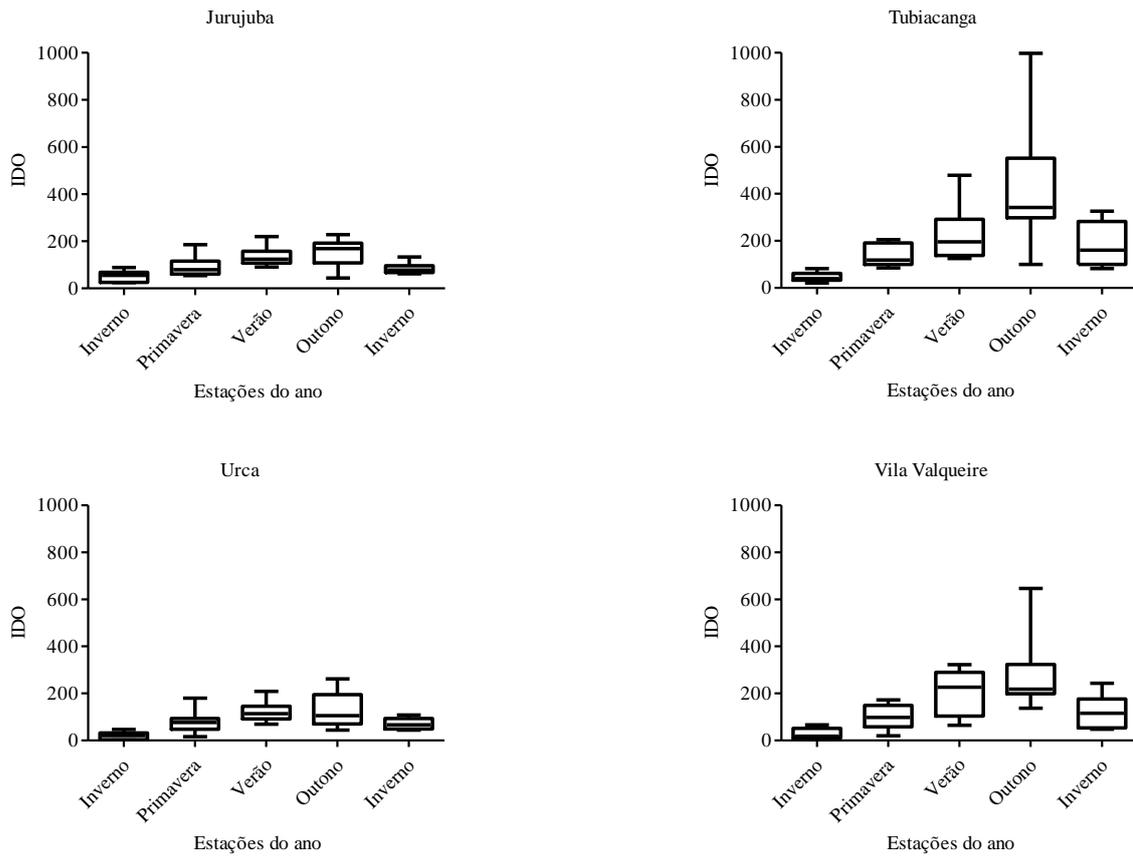


Figura 20- Índice de densidade de ovos, por estação do ano, nas áreas de estudo.

Tabela 5- Índice de densidade de ovos, por estação do ano, nas áreas de estudo

Área de estudo	Estações do ano			
	Inverno	Primavera	Verão	Outono
Jurujuba	67,48	93,72	135,26	150,58
Tubiacanga	110,84	138,50	220,90	414,97
Urca	43,34	77,47	119,24	126,29
Vila Valqueire	70,80	100,40	201,35	265,36

5.1.4 Proporção de *Ae. aegypti* em relação a *Ae. albopictus*

A densidade de *Ae. albopictus* foi consideravelmente menor em relação a de *Ae. aegypti*. O gráfico a seguir (Fig. 21) mostra a proporção de *Ae. aegypti* em relação *Ae. albopictus*, coletados com auxílio das ovitrampas, onde declives acentuados representam grandes quantidades de *Ae. albopictus*. Nota-se que entre dezembro e março foram coletados apenas *Ae. aegypti*, tendo a sua proporção chegado a 1 (100%). Por outro lado, as coletas realizadas com BGs sentinelas mostram, no mesmo período, que mosquitos da espécie *Ae. albopictus* foram coletados continuamente, durante as 52 semanas de coletas, embora a proporção seja sempre inferior a 0,15 (15%) (Fig. 22 e 23).

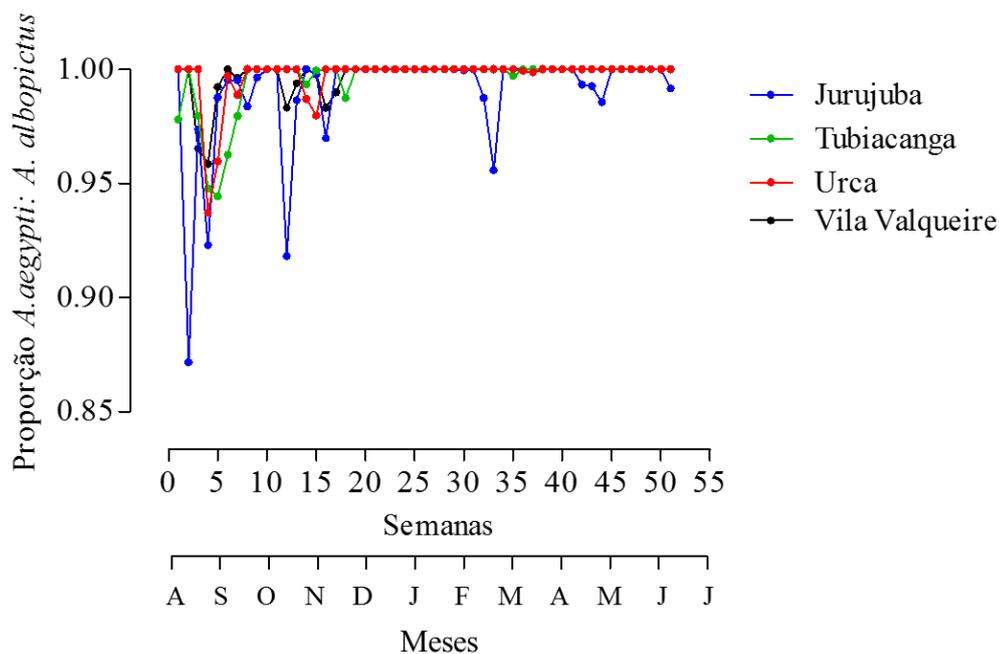


Figura 21- Proporção de *Ae. aegypti* em relação a *Ae. albopictus*, coletados com auxílio das ovitrampas. Estações: Semanas 0 a 7: inverno; 8 a 20: primavera; 21 a 33: verão; 34 a 45: outono; 46 a 52: inverno.

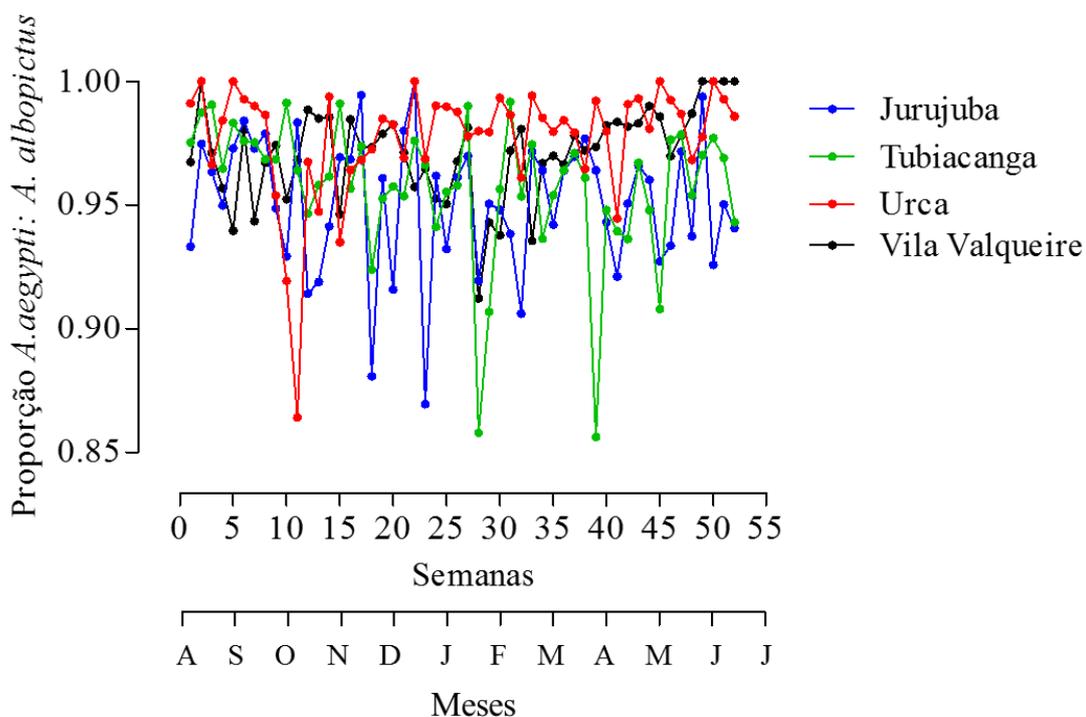


Figura 22- Proporção de *Ae. aegypti* em relação a *Ae. albopictus*, coletados com auxílio das BGs sentinelas. Estações: Semanas 0 a 7: inverno; 8 a 20: primavera; 21 a 33: verão; 34 a 45: outono; 46 a 52: inverno.

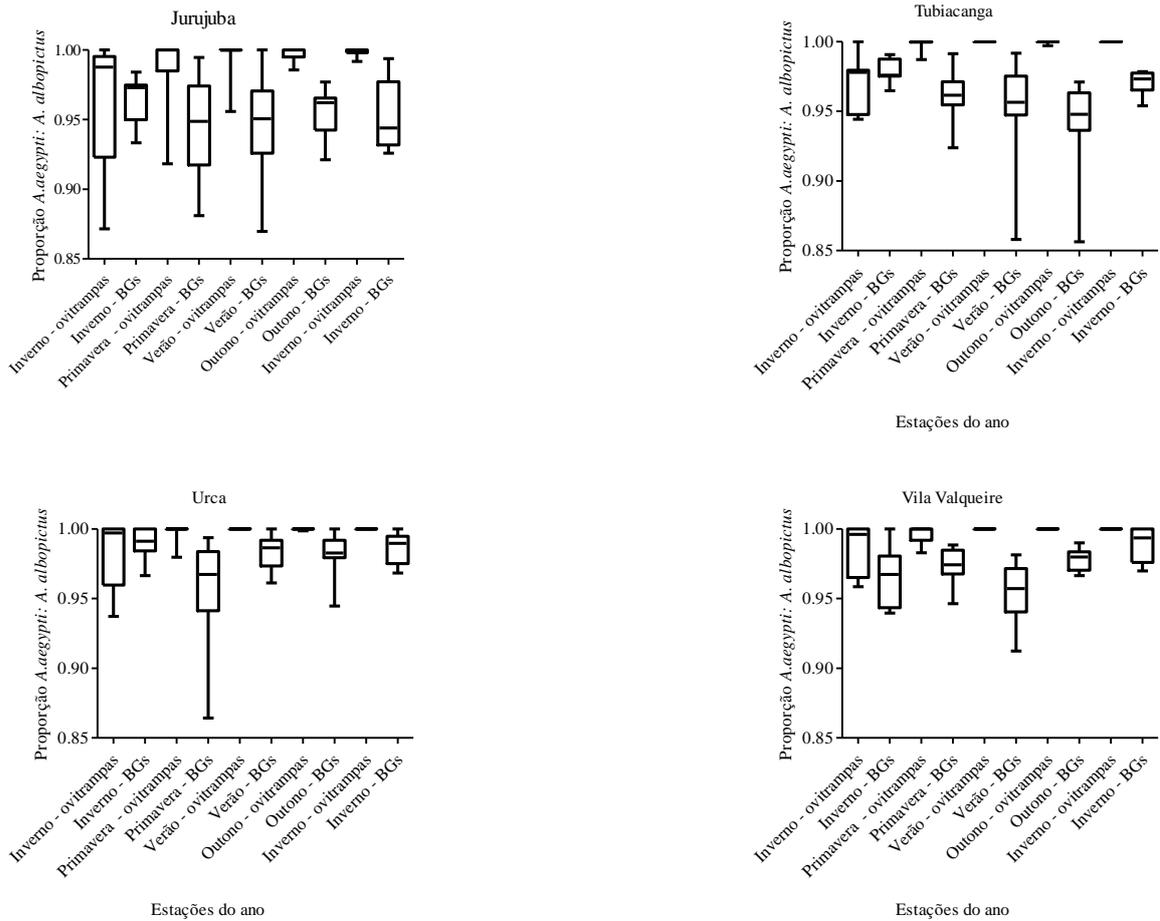


Figura 23- Proporção de *Ae. aegypti* em relação a *Ae. albopictus*, coletados com auxílio das ovitrampas e BGs sentinelas, por estação do ano.

5.2 Competição intra e interespecífica de *Ae. albopictus* e *Ae. aegypti*, com e sem *W. pipientis*

5.2.1 Sobrevivência dos imaturos

Nos grupos estudados, a sobrevivência tende a ser menor nas condições com oferta alimentar reduzida (0,25g) (Fig. 24). Sobre a competição exclusivamente intraespecífica, a sobrevivência é inversamente proporcional a densidade larval. Em todas as densidades estudadas a sobrevivência de *Ae. albopictus* é superior a de *Ae. aegypti*. O declive da curva de sobrevivência de *Ae. aegypti*, com e sem wMel, é muito acentuado entre os tratamentos com 20 e 40 larvas, decaindo mais de 50%. Com *Ae. albopictus*, o aumento de 20 para 40 larvas praticamente não afeta a sobrevivência, esta sofre redução apenas na condição com maior densidade (60 larvas).

Nas condições de competição interespecífica, a sobrevivência de *Ae. albopictus* é consideravelmente maior do que a *Ae. aegypti* sem wMel, tendo sua sobrevivência sempre igual ou maior que 50% comparado a valores quase sempre abaixo de 30%. *Ae. aegypti* com wMel também tem a sua sobrevivência muito inferior a *Ae. albopictus*, embora esta seja sutilmente maior que *Ae. aegypti* sem wMel. De modo geral, nas condições de competição entre *Ae. aegypti* sem e com wMel, a sobrevivência nos insetos com a bactéria é um pouco maior.

5.2.2 Tempo de desenvolvimento

De modo geral, o tempo de desenvolvimento (TD) tende a ser maior nos tratamentos com 0,25g de comida (Tabela 6 e Fig. 25). Sob condições de competição intraespecífica, o aumento da densidade larval está diretamente relacionado com o aumento do TD. *Ae. aegypti*, sem e com wMel têm um aumento significativo do TD nas condições com mais de 20 larvas. Contudo, *Ae. albopictus* só tem o seu TD consideravelmente ampliado na condição com 60 larvas, evidenciando que esta espécie é mais tolerante a ambientes competitivos. Entre os grupos estudados, *Ae. aegypti* sem wMel apresenta o maior TD, na condição com maior densidade, este têm duração média de 57,17 e 47,99 dias nos tratamentos com 0,25g e 0,50g, respectivamente; seguido de *Ae. aegypti* com wMel, com 49,02 e 43,99 dias; e *Ae. albopictus* com 40,94 e 35,38 dias. Sob competição interespecífica, *Ae. aegypti* sem wMel tende a ter o TD maior que *Ae. aegypti* com wMel. *Ae. albopictus* tem o TD inferior a *Ae. aegypti* sem e com wMel.

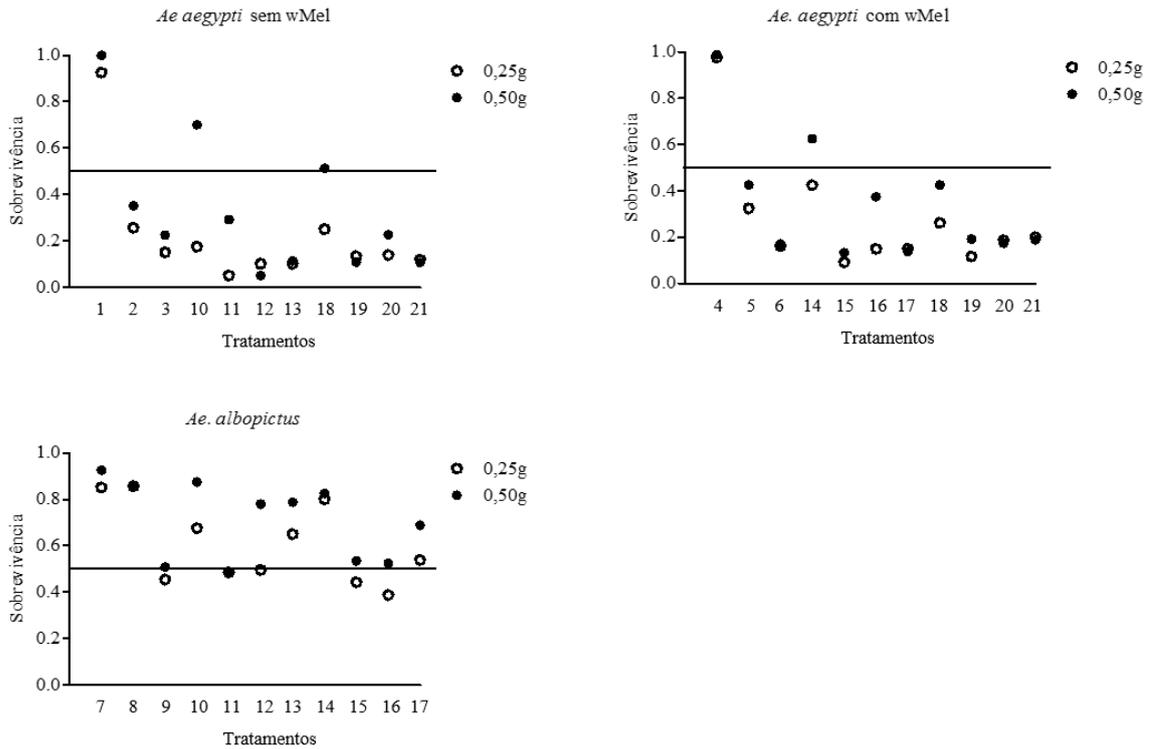


Figura 24- Sobrevivência de *Ae. aegypti* sem wMel, *Ae. aegypti* com wMel e *Ae. albopictus* obtidos nos diferentes tratamentos de competição intra e interespecífica³ (média de 4 experimentos). Para cada um dos gráficos, os diferentes tratamentos são indicados com um código composto por três números, em que o primeiro número representa a densidade inicial de *Ae. aegypti* sem wMel, o segundo de *Ae. aegypti* com wMel e o terceiro de *Ae. albopictus*. A seguir estão representadas as composições dos vinte e um tratamentos de cada gráfico acima: 1) 20-0-0, 2) 40-0-0, 3) 60-0-0, 4) 0-20-0, 5) 0-40-0, 6) 0-60-0, 7) 0-0-20, 8) 0-0-40, 9) 0-0-60, 10) 20-0-20, 11) 30-0-30, 12) 20-0-40, 13) 40-0-20, 14) 0-20-20, 15) 0-30-30, 16) 0-20-40, 17) 0-40-20, 18) 20-20-0, 19) 30-30-0, 20) 20-40-0, 21) 40-20-0.

³ Para a leitura da seção resultados, considere a competição entre *A. aegypti* sem wMel e *A. aegypti* com wMel como interespecífica, embora se trate apenas de linhagens diferentes.

Tabela 6- Número* de mosquitos que sobreviveram até a fase adulta, em cada um dos grupos, diante das diferentes condições analisadas

0.25g											
<i>Ae. aegypti</i> sem wMel				<i>Ae. aegypti</i> com wMel				<i>Ae. albopictus</i>			
Tratamentos	Total	Média	Desvio padrão	Tratamentos	Total	Média	Desvio padrão	Tratamentos	Total	Média	Desvio padrão
1	79.0	19.8	0.4	4	81.0	20.3	1.6	7	68.0	17.0	2.5
2	41.0	10.3	2.7	5	52.0	13.0	3.5	8	137.0	34.3	4.9
3	36.0	9.0	1.9	6	39.0	9.8	2.2	9	109.0	27.3	10.9
10	14.0	3.5	1.1	14	34.0	8.5	4.0	10	54.0	13.5	2.9
11	6.0	1.5	0.5	15	11.0	2.8	1.5	11	58.0	14.5	2.3
12	8.0	2.0	1.2	16	12.0	3.0	1.2	12	70.0	17.5	3.0
13	16.0	4.0	0.7	17	24.0	6.0	2.1	13	52.0	13.0	2.1
18	20.0	5.0	2.7	18	21.0	5.3	1.9	14	64.0	16.0	1.2
19	16.0	4.0	0.7	19	14.0	3.5	1.1	15	53.0	13.3	2.9
20	11.0	2.8	1.5	20	28.0	7.0	1.6	16	62.0	15.5	4.4
21	19.0	4.8	0.8	21	16.0	4.0	2.1	17	43.0	10.8	2.6

0.50g											
<i>Ae. aegypti</i> sem wMel				<i>Ae. aegypti</i> com wMel				<i>Ae. albopictus</i>			
Tratamentos	Total	Média	Desvio padrão	Tratamentos	Total	Média	Desvio padrão	Tratamentos	Total	Média	Desvio padrão
1	80.0	20.0	0.0	4	79.0	19.8	0.4	7	74.0	18.5	22.2
2	56.0	14.0	5.5	5	68.0	17.0	8.9	8	137.0	34.3	41.6
3	54.0	13.5	2.1	6	41.0	10.3	2.2	9	103.0	25.8	31.7
4	56.0	14.0	4.1	14	50.0	12.5	2.6	10	70.0	17.5	21.1
5	35.0	8.8	8.8	15	16.0	4.0	2.4	11	58.0	14.5	17.6
6	4.0	1.0	0.7	16	30.0	7.5	6.1	12	97.0	24.3	29.9
7	18.0	4.5	2.2	17	22.0	5.5	3.0	13	63.0	15.8	19.2
8	41.0	10.3	4.7	18	34.0	8.5	3.4	14	66.0	16.5	20.0
9	13.0	3.3	0.8	19	23.0	5.8	0.8	15	64.0	16.0	19.3
10	9.0	4.5	1.5	20	14.0	7.0	3.0	16	84.0	21.0	25.5
11	17.0	4.3	3.1	21	15.0	3.8	2.0	17	55.0	13.8	16.5

*O número total foi obtido a partir do somatório das quatro réplicas de cada tratamento.

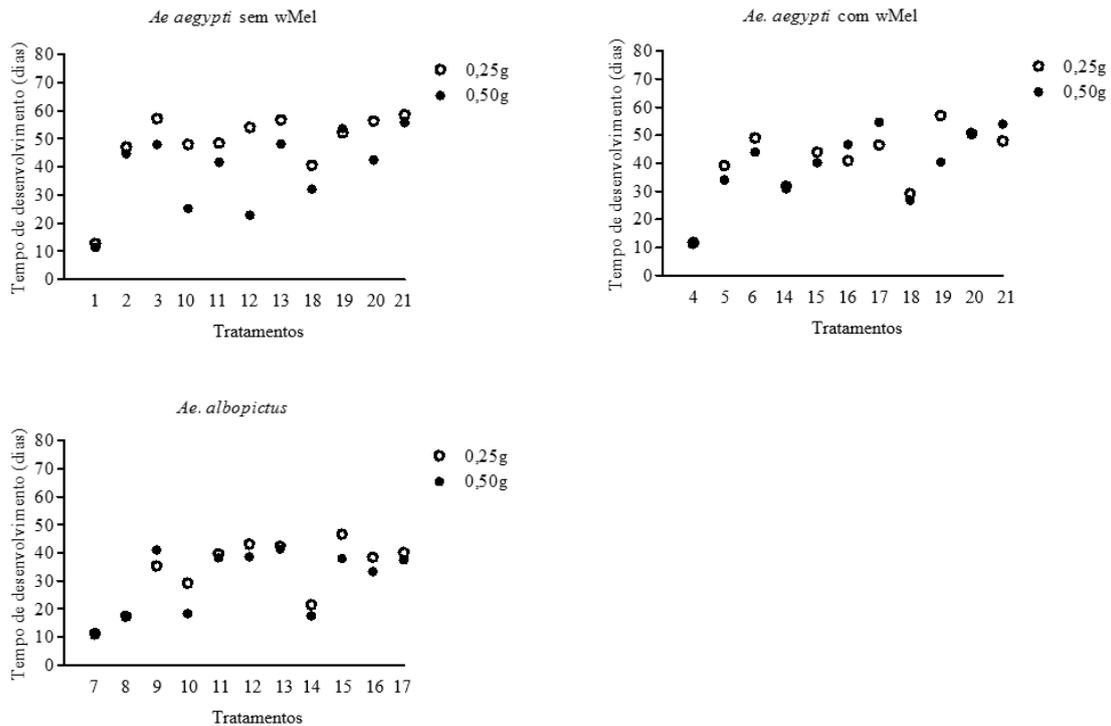


Figura 25- Tempo de desenvolvimento de *Ae. aegypti* sem wMel, *Ae. aegypti* com wMel e *Ae. albopictus* obtidos nos diferentes tratamentos de competição intra e interespecífica (média de 4 experimentos). Para cada um dos gráficos, os diferentes tratamentos são indicados com um código composto por três números, em que o primeiro número representa a densidade inicial de *Ae. aegypti* sem wMel, o segundo de *Ae. aegypti* com wMel e o terceiro de *Ae. albopictus*. A seguir estão representadas as composições dos vinte e um tratamentos de cada gráfico acima: 1) 20-0-0, 2) 40-0-0, 3) 60-0-0, 4) 0-20-0, 5) 0-40-0, 6) 0-60-0, 7) 0-0-20, 8) 0-0-40, 9) 0-0-60, 10) 20-0-20, 11) 30-0-30, 12) 20-0-40, 13) 40-0-20, 14) 0-20-20, 15) 0-30-30, 16) 0-20-40, 17) 0-40-20, 18) 20-20-0, 19) 30-30-0, 20) 20-40-0, 21) 40-20-0.

5.2.3 Tamanho das asas dos adultos

Em todos os tratamentos, com 0,25g e 0,50g, o tamanho das asas das fêmeas foi maior que o dos machos, como esperado (Fig. 26). Nas condições de competição intraespecífica, o tamanho das asas é inversamente proporcional a densidade larval. Em situações de competição entre *Ae. aegypti* sem ou com wMel, os insetos maiores foram aqueles que possuem a bactéria, apesar disso, ambos foram maiores que *Ae. albopictus*.

5.2.4 Proporção de machos e fêmeas adultos

A tabela 6, apresenta o número de insetos que conseguiram sobreviver até a fase adulta. O sexo destes insetos foi verificado e assim pode-se calcular a proporção de machos e fêmeas, para cada condição estudada (Fig 27). Nota-se que *Ae. aegypti* sem wMel sofreu maior distorção na proporção sexual, seguido por *Ae. aegypti* com wMel e *Ae. albopictus*. Além disso, aparentemente, há maior distorção nas condições de competição interespecífica.

5.2.5 Índice de performance (λ')

Sob condições de competição exclusivamente intraespecífica, os índices λ' para *Ae. aegypti* sem e com wMel sofrem redução de 1,2 para 1,0 ao dobrar a densidade larval (tratamento 2). Por outro lado, o índice λ' para *Ae. albopictus* só é reduzido, de modo semelhante, quando a densidade larval é triplicada (tratamento 3) (Fig. 28). Apesar disso, todos os grupos estudados, sob competição intraespecífica, conseguiram conservar o índice λ' acima de 1, o que significa que poderiam se manter com sucesso no ambiente.

De modo geral, nos tratamentos com situações de competição interespecífica, o índice de λ' para *Ae. albopictus* foi maior que *Ae. aegypti* sem e com wMel, mantendo-se sempre superior a 1. *Ae. aegypti* com wMel teve o índice de λ' sutilmente maior que *Ae. aegypti* sem wMel.

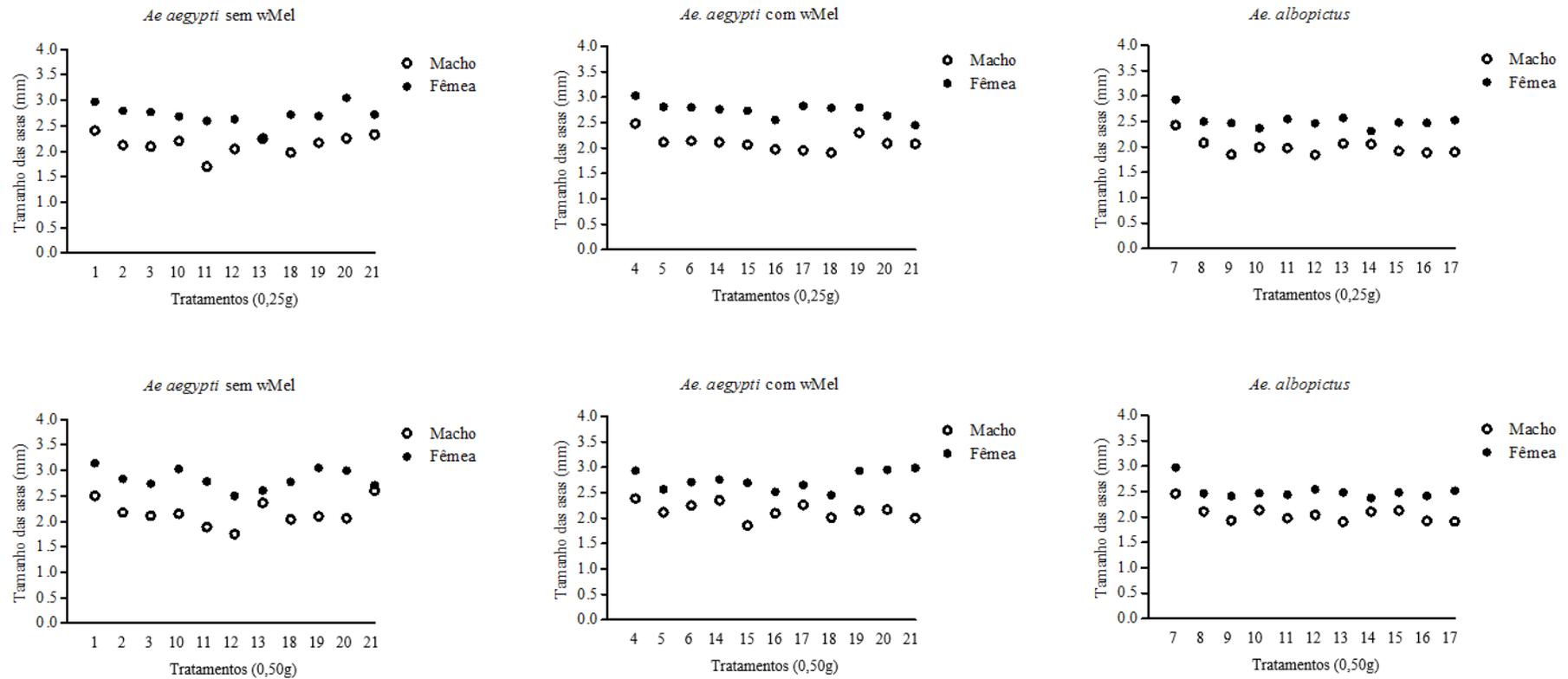


Figura 26- Tamanho das asas de *Ae. aegypti* sem wMelBr, *Ae. aegypti* com wMel e *Ae. albopictus* obtidos nos diferentes tratamentos de competição intra e interespecífica (média de 4 experimentos). Para cada um dos gráficos, os diferentes tratamentos são indicados com um código composto por três números, em que o primeiro número representa a densidade inicial de *Ae. aegypti* sem wMel, o segundo de *Ae. aegypti* com wMel e o terceiro de *Ae. albopictus*. A seguir estão representadas as composições dos vinte e um tratamentos de cada gráfico acima: 1) 20-0-0, 2) 40-0-0, 3) 60-0-0, 4) 0-20-0, 5) 0-40-0, 6) 0-60-0, 7) 0-0-20, 8) 0-0-40, 9) 0-0-60, 10) 20-0-20, 11) 30-0-30, 12) 20-0-40, 13) 40-0-20, 14) 0-20-20, 15) 0-30-30, 16) 0-20-40, 17) 0-40-20, 18) 20-20-0, 19) 30-30-0, 20) 20-40-0, 21) 40-20-0.

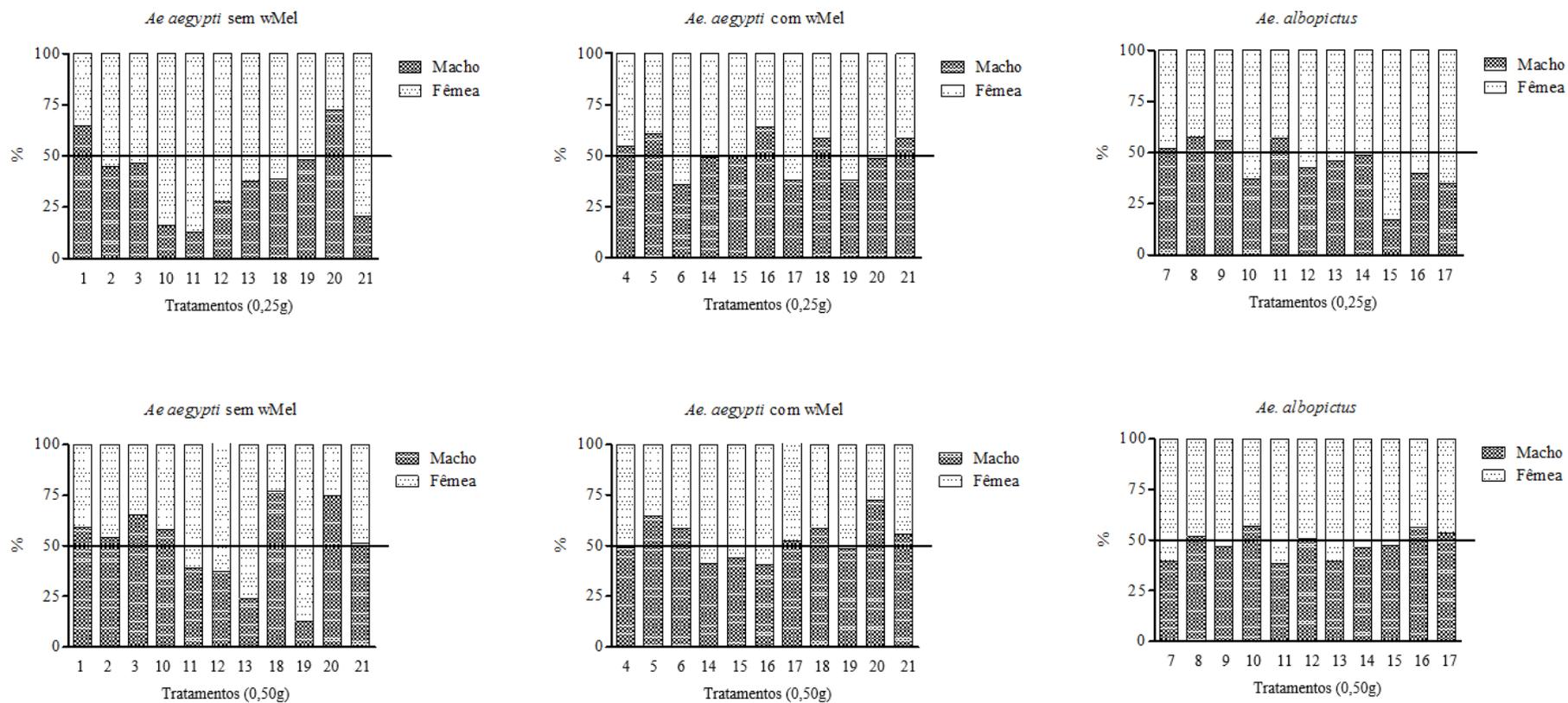


Figura 27- Proporção de machos e fêmeas de *Ae. aegypti* sem wMel, *Ae. aegypti* com wMel e *Ae. albopictus* obtidos nos diferentes tratamentos de competição intra e interespecífica (média de 4 experimentos). Para cada um dos gráficos, os diferentes tratamentos são indicados com um código composto por três números, em que o primeiro número representa a densidade inicial de *Ae. aegypti* sem wMel, o segundo de *Ae. aegypti* com wMel e o terceiro de *Ae. albopictus*. A seguir estão representadas as composições dos vinte e um tratamentos de cada gráfico acima: 1) 20-0-0, 2) 40-0-0, 3) 60-0-0, 4) 0-20-0, 5) 0-40-0, 6) 0-60-0, 7) 0-0-20, 8) 0-0-40, 9) 0-0-60, 10) 20-0-20, 11) 30-0-30, 12) 20-0-40, 13) 40-0-20, 14) 0-20-20, 15) 0-30-30, 16) 0-20-40, 17) 0-40-20, 18) 20-20-0, 19) 30-30-0, 20) 20-40-0, 21) 40-20-0.

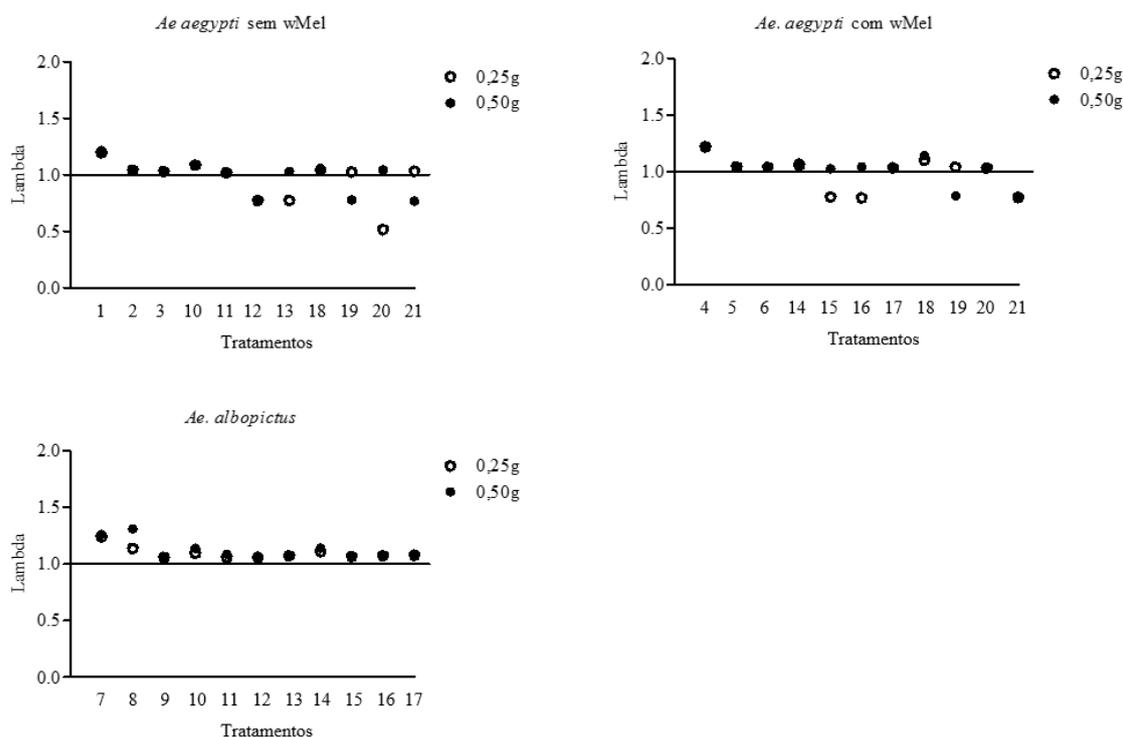


Figura 28- Índice de performance (λ') de *Ae. aegypti* sem wMel, *Ae. aegypti* com wMel e *Ae. albopictus* obtidos nos diferentes tratamentos de competição intra e interespecífica (média de 4 experimentos). Para cada um dos gráficos, os diferentes tratamentos são indicados com um código composto por três números, em que o primeiro número representa a densidade inicial de *Ae. aegypti* sem wMel, o segundo de *Ae. aegypti* com wMel e o terceiro de *Ae. albopictus*. A seguir estão representadas as composições dos vinte e um tratamentos de cada gráfico acima: 1) 20-0-0, 2) 40-0-0, 3) 60-0-0, 4) 0-20-0, 5) 0-40-0, 6) 0-60-0, 7) 0-0-20, 8) 0-0-40, 9) 0-0-60, 10) 20-0-20, 11) 30-0-30, 12) 20-0-40, 13) 40-0-20, 14) 0-20-20, 15) 0-30-30, 16) 0-20-40, 17) 0-40-20, 18) 20-20-0, 19) 30-30-0, 20) 20-40-0, 21) 40-20-0.

5.2.6 Efeito da oferta alimentar/per capita sobre o λ' de *Ae. aegypti* com wMel

O gráfico abaixo (Fig. 29) mostra o efeito da quantidade de comida por larva sobre o índice λ' de *Ae. aegypti* com wMel. Nota-se que *Ae. aegypti* com wMel, sob competição exclusivamente intraespecífica, tem o índice de performance superior àqueles observados nas condições interespecíficas. Os índices λ' de *Ae. aegypti* com wMel são sutilmente superiores na presença de *Ae. aegypti* sem wMel, quando comparados aos que estão na presença de *Ae. albopictus*, ressaltando sua superioridade competitiva diante dos mosquitos *Ae. aegypti* selvagem e inferioridade diante de *Ae. albopictus*.

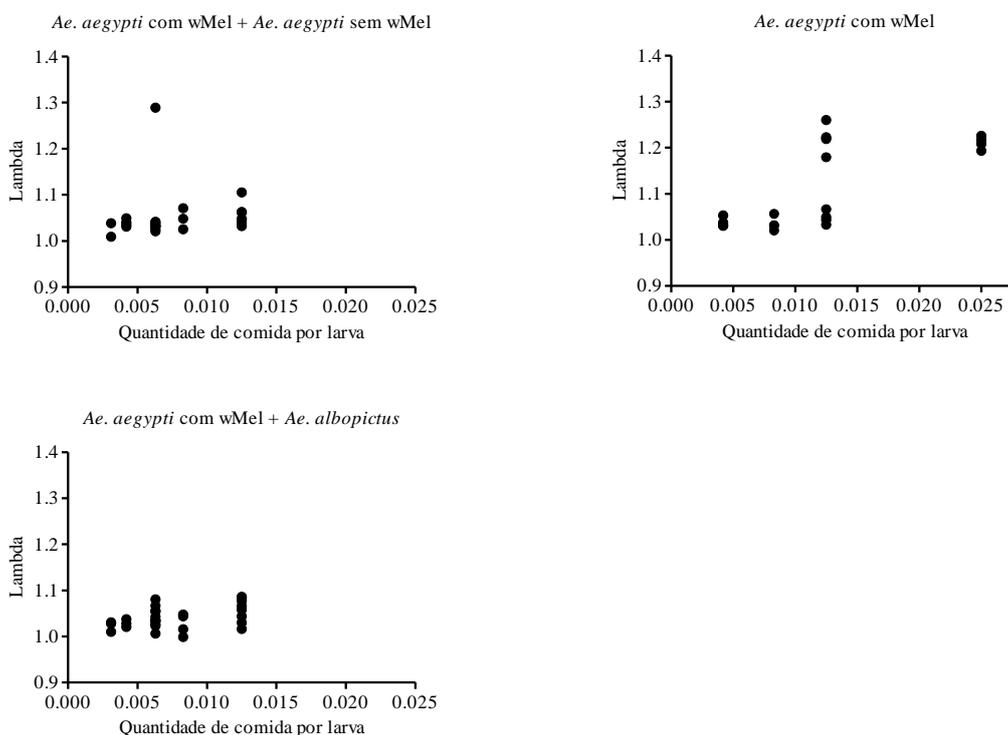


Figura 29- Efeito da oferta alimentar/per capita sobre o λ' de *Ae. aegypti* com wMel, sob competição com *Ae. aegypti* sem wMel, *Ae. aegypti* com wMel e *Ae. albopictus*, respectivamente.

5.2.7 Simulação do efeito da competição por recursos, em condições com diferentes densidades populacionais, no índice de performance das espécies competidoras

A simulação realizada em colaboração com a equipe do PROCC encontra-se disponível online e pode ser consultada, gratuitamente, no link a seguir: <https://dvillela.shinyapps.io/rescomp/>. Nesta página, é possível alterar os valores das densidades populacionais das espécies competidoras e verificar como as diferentes situações de competição podem impactar o índice λ' . Aqui, selecionamos um dos resultados obtidos com o modelo matemático (Fig. 30), onde os índices λ' de cada população (1) variam em função das densidades das populações competidoras (2) (Tabela 7). Pode-se observar que cada uma das espécies analisadas suporta a competição com um número de indivíduos distintos em sua população, antes que o índice λ' seja inferior a 1, o que representa o decréscimo de sua população. A partir das densidades exibidas na Tabela 8, os índices de performance são inferiores a 1, nota-se que *Ae. albopictus* foi a espécie que suportou a maior densidade antes do seu índice decair, mostrando novamente que é a espécie mais tolerante à ambientes intensamente competitivos.

Tabela 7- Densidades de cada uma das populações competidoras observadas na simulação

População (1) de:	Competindo com a população (2) de:		
	<i>Ae. aegypti</i>	<i>Ae. albopictus</i>	<i>Ae. aegypti</i> + wMel
<i>Ae. aegypti</i>	0 - 100	20	20
<i>Ae. albopictus</i>	20	0 - 100	20
<i>Ae. aegypti</i> + wMel	20	20	0 - 100

Tabela 8- Limite de densidade populacional das espécies competidoras onde os índices de performance passam a valores $< 1,0$

Desempenho da população de:	Competindo com a população de:		
	<i>Ae. aegypti</i>	<i>Ae. albopictus</i>	<i>Ae. aegypti</i> + wMel
<i>Ae. aegypti</i>	28	29	28
<i>Ae. albopictus</i>	51	50	58
<i>Ae. aegypti</i> + wMel	52	48	43

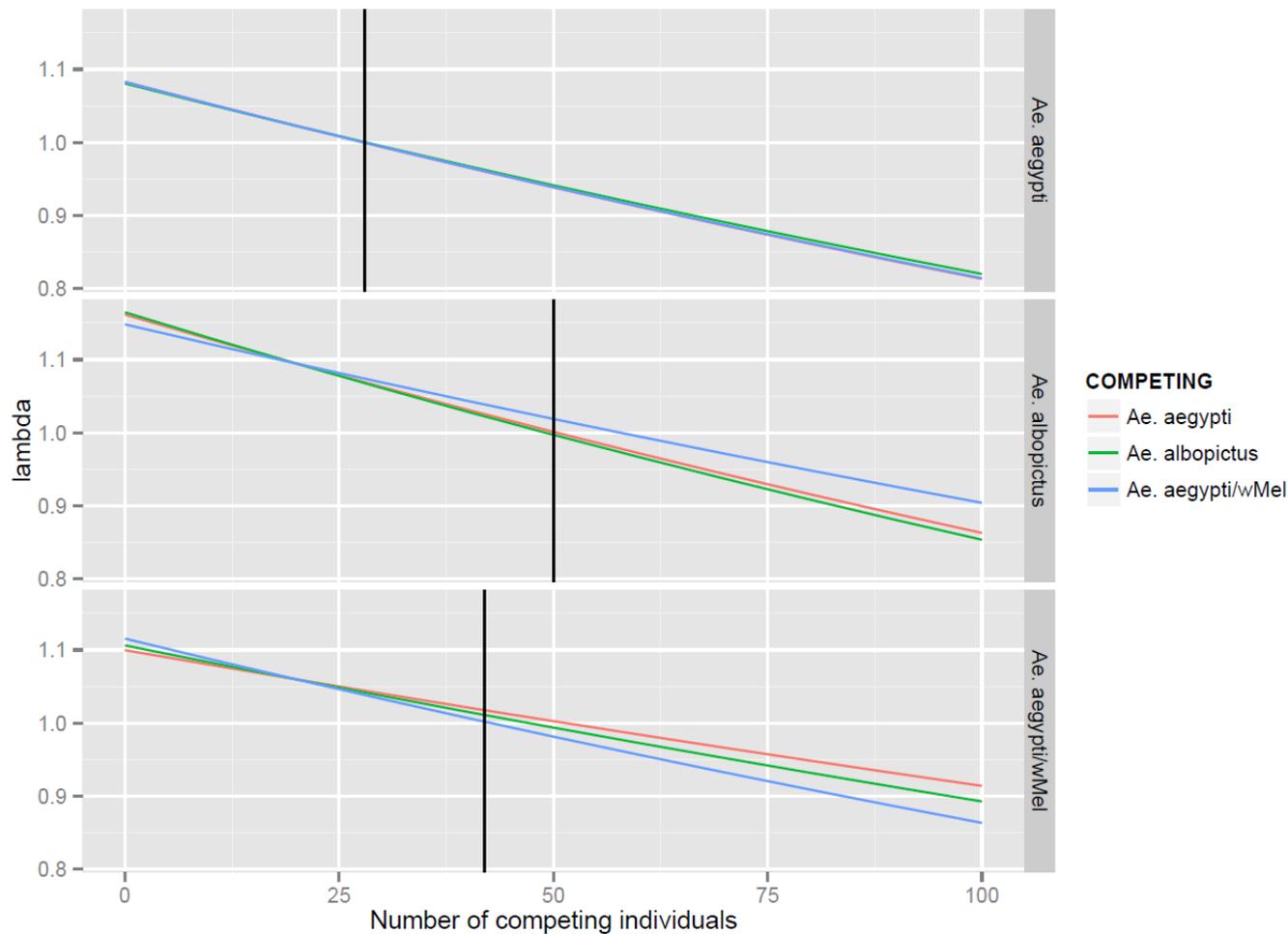


Figura 30- Simulação do efeito da competição por recursos, em condições com diferentes densidades populacionais, no índice de performance das espécies competidoras. No eixo y, encontram-se o índice lambda para cada espécie competidora 1, citada nas barras cinzas a direita deste mesmo eixo. No eixo x, o número de indivíduos das espécies competidoras 2 (*Ae. aegypti* sem wMel [2a], *Ae. albopictus* [2b] e *Ae. aegypti* com wMel [2c]), diferenciadas pelas cores presentes na legenda ao lado direito. Para cada curva, de cada um dos três gráficos, temos cada uma das espécies competidoras 2, variando de 0 a 100 e as demais com 20 indivíduos. As linhas verticais destacam os pontos onde os índices λ' são iguais a 1.

6 DISCUSSÃO

Esta dissertação foi subdividida em duas etapas: (a) Monitoramento da densidade populacional e da proporção de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* em Jurujuba, Tubiacanga, Urca e Vila Valqueire, áreas previamente escolhidas pelo projeto “Eliminar a Dengue: Desafio Brasil” para soltura dos mosquitos *Ae. aegypti* com wMel; e (b) ensaios de competição larval intra e interespecíficos para estimar o crescimento de cada população com base no índice de performance dos mosquitos (λ'), composto por estimativas de tempo de desenvolvimento, sobrevivência larval, tamanho do adulto e fecundidade. O objetivo inicial do monitoramento era conhecer as reais proporções de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* visando a calibração das densidades destas espécies nos ensaios de competição. Contudo, surpreendentemente, as densidades populacionais de *Ae. albopictus* foram extremamente reduzidas nas áreas estudadas. Apesar disso, em outras áreas da cidade do Rio de Janeiro as proporções de *Ae. albopictus* são consideravelmente maiores que as proporções aqui observadas (Dados da SMS-RJ, não publicados). Sendo assim, optou-se por não utilizar os valores coletados no período de monitoramento e simular a competição com valores de densidades já utilizadas em outros trabalhos (Braks *et al.*, 2004; Juliano, 1998).

6.1 Monitoramento das populações de *Ae. albopictus* e *Ae. aegypti*, em campo

O monitoramento das populações de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* foi majoritariamente realizado através das ovitrampas monitoradas semanalmente por um período de um ano. Estas armadilhas não são utilizadas nos programas de vigilância entomológica, contudo têm demonstrado ser um método mais sensível que as técnicas classicamente utilizadas, como a pesquisa larvária usada para calcular os Índices de Breteau e de Infestação Predial (Reiter *et al.*, 1991; Rawlins *et al.*, 1998; Braga *et al.*, 2000). Além de constituir um método econômico e operacionalmente viável. Por isso, têm sido frequentemente utilizadas para monitorar as populações de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* (Sivanathan, 2006; Ríos-Velásquez *et al.*, 2007; Costa *et al.*, 2008; Honório *et al.*, 2009a; Moreira, 2013). Todavia, para que os índices de positividade e densidade de ovos possam ser considerados indicadores de risco de transmissão da dengue é necessário remover a lacuna que há entre estes índices e a estimativa da densidade da população adulta do vetor (Gomes, 1998; Focks, 2003). Tal lacuna se deve, principalmente, ao fato de 95,8% das fêmeas grávidas de *Aedes* sp. distribuírem os seus ovos em mais de um criadouro, um fenômeno conhecido como oviposição em saltos (Abreu, 2010).

Através das armadilhas ovitrampas foi possível coletar 623.242 ovos de *Aedes* spp. nas quatro áreas de estudo, ao longo do período de um ano. A partir dos ovos coletados, os índices de positividade, densidade e a proporção de *Ae. aegypti* em relação ao *Ae. albopictus* foram calculados. A positividade média variou entre 77,5% e 87,8% entre as áreas de estudo, contudo apresentou constantemente o mesmo padrão sazonal. Os IPO foram inicialmente reduzidos, provavelmente, devido ao período frio e seco que caracteriza o inverno. No início da primavera, com o aumento da temperatura e da pluviosidade, os IPO aumentaram significativamente; oscilaram discretamente durante o verão, de acordo com as variações pluviométricas; aumentaram sutilmente no outono e começaram a declinar no início do segundo inverno. Estudos anteriores também verificaram o padrão sazonal, caracterizado pelo aumento na proporção de armadilhas positivas nos períodos com temperatura e pluviosidade elevada e redução nos períodos frios e secos (Micieli e Campos, 2003; Vezzani *et al.*, 2004; Costa *et al.*, 2008; Honório *et al.*, 2009a; Moreira, 2013).

A densidade vetorial foi heterogênea entre as áreas monitoradas: 36,11% dos ovos foram coletados em Tubiacanga, 26,82% em Vila Valqueire, 20,38% em Jurujuba e 16,67% na Urca. A quantidade de mosquitos foi inversamente proporcional a densidade humana, visto que as áreas com menor número de ovos coletados foram aquelas onde há maior número de habitantes por hectare. Apesar disso, o abastecimento de água irregular e a

presença de reservatórios externos de água podem ter contribuído para o aumento da densidade vetorial em algumas áreas (Tauil, 2001).

Alguns estudos apontaram o verão como período de maior densidade de *Aedes* sp (Avendanha, 2006; Moreira, 2013). No presente estudo, o número de ovos coletados no outono superou o do verão, assim como observado por Serpa *et al.* (2006) e Micieli e Campos (2003). Provavelmente isso se deve a diferença dos níveis pluviométricos entre o verão e outono, visto que o verão de 2013 foi atipicamente seco e os fatores abióticos como precipitação e temperatura possuem influência significativa nos índices gerados pelas ovitrampas (Moreira, 2013; Honório *et al.* (2009b).

Após eclosão, criação e identificação das larvas, foi possível verificar que, em todas as áreas monitoradas, o número de *Ae. aegypti* foi superior a 99%. Estudos anteriores também verificaram maior proporção de *Ae. aegypti* em relação ao *Ae. albopictus* (Passos *et al.*, 2003; Lima-Camara *et al.*, 2006; Serpa *et al.*, 2006; Silva *et al.*, 2006; Silvanathan, 2006; Ríos-Velásquez *et al.*, 2007; Dibo *et al.*, 2008; Oliveira e Biazoto, 2012). O número reduzido de *Ae. albopictus* pode ser reflexo de sua baixa densidade populacional e/ou do seu maior ecletismo em depositar os seus ovos em diferentes tipos de criadouros, naturais e artificiais, no ambiente urbano, quando comparado ao *Ae. aegypti* (Reiter e Sprenger, 1987; Gomes e Marques, 1998; Consoli e Lourenço-de-Oliveira, 1994; Estrada-Franco e Craig Jr 1995, Chiaravalloti-Neto *et al.*, 1996; Forattini *et al.*, 1998a e b; Honório e Lourenço-de-Oliveira, 2001; Silva *et al.*, 2006; Paupy *et al.*, 2009; Oliveira e Biazoto, 2012). Além disso, dentro do número total de ovos depositados nas ovitrampas, é possível que a mortalidade dos embriões seja diferenciada entre as duas espécies, sendo a viabilidade dos ovos de *Ae. albopictus* inferior a de *Ae. aegypti* (Leandro, 2012), tanto na estação seca quanto na chuvosa, no laboratório ou no campo (O'Neal e Juliano, 2013).

Durante o período do verão praticamente nenhum *Ae. albopictus* foi identificado nas áreas de estudo a partir do material coletado pelas ovitrampas. Resultados semelhantes foram verificados por Juliano *et al.* (2002), Serpa *et al.* (2006) e Honório *et al.* (2009a). Serpa *et al.* (2006) observaram uma correlação significativa da pluviosidade e da temperatura máxima com a densidade deste vetor, que mostrou ser extremamente sensível aos fatores ambientais. Nos estudos de Juliano *et al.* (2002) foi verificado a redução de ovos de *Ae. albopictus* no período seco comparado com o período chuvoso, além da preferência desta espécie por criadouros em locais sombreados, oposto ao verificado por *Ae. aegypti*, que inclusive aumentou sua densidade em períodos mais quentes e secos. Ademais, mostraram que a mortalidade dos embriões de *Ae. albopictus* é dependente da temperatura e umidade, onde umidades baixas e temperaturas altas provocam o aumento da taxa de mortalidade, o

que não ocorreu com *Ae. aegypti*. Talvez seja por isso, que as fêmeas grávidas, desta espécie, depositam com maior frequência os seus ovos em locais sombreados (Neves e Silva, 1989; Honório e Lourenço-de-Oliveira, 2001). Vargas (2012) verificou que o tempo para completar o desenvolvimento embrionário e para adquirir a resistência a dessecação de *Ae. albopictus* é superior ao de *Ae. aegypti*. Portanto, a baixa frequência de *Ae. albopictus* possivelmente seja justificada, em parte, pela menor resistência de seus ovos à dessecação, como verificado por Mogi *et al.* (1996). Estes dados sugerem que os períodos secos podem causar desproporcionalmente maior mortalidade de ovos *Ae. albopictus*, comparativamente a ovos de *Ae. aegypti*. Logo, climas quentes e secos podem favorecer *Ae. aegypti* e reduzir os impactos da competição com *Ae. albopictus* via mortalidade diferencial de ovos de *Ae. albopictus*, possibilitando a coexistência dessas espécies em certos locais.

No mesmo período em que foi realizado o monitoramento com auxílio das ovitrampas, coletas de fêmeas adultas também foram realizadas com o auxílio de armadilhas BGs sentinelas. Surpreendentemente, durante algumas semanas, a proporção de *Ae. albopictus* coletados com as BGs sentinelas foi superior àquela observada com as ovitrampas, embora não tenha ultrapassado 15% dos espécimes coletados. Contudo a proporção anual foi semelhante as ovitrampas, com mais de 99% de *Ae. aegypti*. Importante ressaltar que as BGs foram majoritariamente instaladas no intradomicílio enquanto as ovitrampas encontravam-se no peridomicílio.

O registro da maior frequência de *Ae. albopictus* no intradomicílio, comparada ao do peridomicílio, se opõe ao que padrão observado por outros estudos (Chiaravalloti-Neto *et al.*, 1996; Gomes, 2005; Lima-Camara *et al.*, 2006). De modo geral, acredita-se que *Ae. albopictus* foi essencialmente uma espécie selvagem que procriava e alimentava-se nas margens das florestas, passando a adaptar-se inicialmente ao peridomicílio dos imóveis, principalmente nos espaços suburbanos com menor alteração antrópica e maior cobertura vegetal. Recentemente, este mosquito tem se disseminado para espaços urbanos, inclusive para o ambiente intradomiciliar. Esse gradativo processo de urbanização do *Ae. albopictus* pode estar relacionado à intensa ação antrópica sobre os meios naturais, que podem reduzir a disponibilidade de fontes para os repastos sanguíneos, e/ou com a construção de residências mais próximas ao ambiente natural do vetor. Algumas coletas realizadas em Jurujuba e Vila Valqueire, no mesmo período deste estudo, detectaram abundância de *Ae. albopictus* em criadouros artificiais e naturais, em áreas com maior cobertura vegetal (Stéphanie Silva Campos e de Monique Albuquerque Mota, dados não publicados). Sendo assim, é provável que nas áreas de estudo, *Ae. albopictus* ainda encontre potenciais

criadouros nas áreas com maior cobertura vegetal mas se desloque, ocasionalmente, em busca de fonte alimentar, o que permitiu a captura pelas BGs sentinelas.

O processo de urbanização do *Ae. albopictus* e o fato dele se tornar cada vez mais antropofílico, pode elevar os riscos de transmissão de certas doenças às populações humanas (Dieng *et al.*, 2010). Populações brasileiras de *Ae. albopictus* e de outros países americanos, sob condições experimentais, têm demonstrado ser altamente competentes para se infectar e transmitir dengue, febre amarela e chikungunya (Mitchell *et al.*, 1987; Miller *et al.*, 1989; Lourenço-de-Oliveira *et al.*, 2013; Vega-Rúa *et al.*, 2014), além de outros 19 arbovírus (Moore e Mitchel, 1997) e patógenos como *Dirofilaria immitis* e *Dirofilaria repens* (Cancrini *et al.*, 2003; Gratz, 2004). Neste sentido, é necessário expandir as estratégias de controle vetorial, de modo a incluir o mosquito *Ae. albopictus* nos programas de monitoramento sistemático das populações de vetores e nas estratégias de controle da dengue e chikungunya, permitindo uma rápida e eficiente intervenção no sentido de conter a ocorrência de possíveis surtos destas doenças.

A eficiência da nova estratégia de controle da dengue baseado na utilização da bactéria *Wolbachia pipientis* (cepa wMel) para bloquear a transmissão do vírus da dengue pelo mosquito *Ae. aegypti*, depende consideravelmente da etapa de substituição da população original de *Ae. aegypti* pela população com wMel. A competição de *Ae. aegypti* com wMel com outras espécies já presentes no ambiente pode dificultar esta etapa. Contudo, nas áreas estudadas, é provável que as populações de *Ae. albopictus* não interfiram neste processo devido a sua baixa densidade nestes locais.

6.2 Competição intra e interespecífica de *Ae. albopictus* e *Ae. aegypti*, com e sem *W. pipientis*

No âmbito do projeto “Eliminar a Dengue: Desafio Brasil, fêmeas de *Ae. aegypti* com wMel têm sido liberadas em áreas previamente monitoradas por equipes do projeto. Estas fêmeas, provavelmente, colocam seus ovos em criadouros onde fêmeas de *Ae. aegypti* selvagem e de outras espécies, como *Ae. albopictus*, já ovipuseram. Desta maneira, a invasão de *Wolbachia pipientis* em populações naturais depende da aptidão dos mosquitos com a bactéria diante dos competidores que compartilham o mesmo criadouro. Sendo assim, compreender o impacto da competição entre estas espécies no *fitness* de *Ae. aegypti* com wMel é essencial para delimitar um método de soltura racional e eficaz, baseado nas densidades populacionais das espécies competidoras de cada área, para que a invasão da bactéria em populações naturais seja bem sucedida.

Neste trabalho, realizamos ensaios de competição larval intra e interespecífica para estimar o crescimento da população com base em um índice composto de desempenho populacional (λ') em 21 tratamentos, com quatro repetições cada, variando a quantidade de recursos alimentares (0,25g e 0,50g): *Ae. aegypti* sem wMel: *Ae. aegypti* com wMel: *Ae. albopictus* - 20:0:0, 40:0:0, 60:0:0, 0:20:0, 0:40:0, 0:60:0, 0:0:20, 0:0:40, 0:0:60, 20:20:0, 30:30:0, 20:40:0, 40:20:0, 20:0:20, 30:0:30, 20:0:40, 40:0:20, 00:20:20, 00:30:30, 00:20:40, 00:40:20.

De modo geral, a comparação dos índices de performance das populações estudadas permite determinar a espécie com maior potencial competitivo (Juliano, 1998; Braks *et al.*, 2004). Nas condições testadas, *Ae. albopictus* foi claramente o competidor superior sobre *Ae. aegypti* sem e com wMel, mantendo crescimento populacional positivo mesmo sob altas densidades larvais e baixo recurso per capita, assim como observado por Braks *et al.* (2004) e Juliano (1998). Barrera (1996), Daugherty *et al.* (2000), Beilhe *et al.* (2013) e O’Neal e Juliano (2013) também avaliaram a competição entre estas espécies e obtiveram resultados semelhantes. Juliano (2010) comparou resultados de inúmeros trabalhos em uma meta análise e reiterou a vantagem competitiva de *Ae. albopictus* sobre *Ae. aegypti*. Também foi demonstrado que *Ae. albopictus* também é um competidor superior em relação à *Ae. japonicus* (O’Donnell, 2009) e *Culex pipiens* (Costanzo *et al.*, 2005). Tais dados reforçam a necessidade de se manter o olhar sob a densidade de *Ae. albopictus* para maximizar as chances de êxito na liberação de *Ae. aegypti* com wMel.

O índice de performance estimado para *Ae. aegypti*, sob competição com *Ae. albopictus*, foi mais severamente reduzido nas condições de escassez de recursos devido

aumento da densidade larval. Na presença de wMel, apenas as condições de maior densidade, com número de larvas igual (0:30:30) ou inferior (0:20:40) a de *Ae. albopictus* provocaram decréscimo populacional. Na ausência de wMel, mesmo com o dobro de larvas de *Ae. aegypti* em relação a *Ae. albopictus*, o índice λ' foi menor que 1. Nos tratamentos criados para avaliar a competição entre *Ae. aegypti* com wMel e *Ae. aegypti* selvagem, os mosquitos com a bactéria também foram sutilmente superiores àqueles sem wMel, mesmo não considerando incompatibilidade citoplasmática dos mosquitos com a bactéria (Werren *et al.* 2008).

O crescimento de populações de *Ae. aegypti* nos criadouros pode ser limitado pela competição por recursos alimentares (Southwood *et al.*, 1972). Deste modo, a oferta alimentar limitada em todas as condições estudadas, associada à competição, podem ter contribuído para a alta mortalidade, além de prolongar o tempo de desenvolvimento, como também foi verificado por Tun-Lin *et al.* (2000). Em todos os tratamentos estudados a sobrevivência de *Ae. albopictus* foi superior a de *Ae. aegypti* selvagem e com wMel, sendo esta sempre reduzida nas condições com menor oferta alimentar, assim como reportado por Braks *et al.* (2004) e Juliano (1998). A sobrevivência de *Ae. aegypti* com wMel foi superior a de *Ae. aegypti* selvagem, assim como observado por Ross *et al.* (2014).

As larvas de mosquitos estão sujeitas às variações da temperatura ambiente, principalmente aquelas que vivem em pequenas coleções de água (Neven, 2000; Forattini, 2002). De acordo com Beserra *et al.* (2009b), com base no tempo de desenvolvimento, na viabilidade dos imaturos e na fecundidade dos adultos de *Ae. aegypti*, tais temperaturas encontram-se na faixa “favorável” ao vetor (entre 22°C e 32°C). Neste estudo, a temperatura variou entre 15,3°C a 37,4°C, atingindo a média de 23,2°C. Possivelmente, a temperatura intensificou a mortalidade provocada pela escassez de recursos, nas situações de intensa competição, resultando em baixa sobrevivência, em quase todas as condições testadas para a espécie.

O estresse fisiológico em estágios juvenis produz efeitos negativos que podem transitar para a fase adulta (Breux, 2012). A escassez de recursos alimentares na fase de larva, além de prolongar o desenvolvimento e também aumentar a mortalidade dos mosquitos (Oliveira, 2013) também reduz o tamanho do adulto, a fecundidade, a longevidade, o período pré alimentação e as respostas imunológicas; aumenta a taxa de discordância gonotrófica e de dispersão (Mori, 1979; Beaty e Marquardt, 1996; Mogi, 1981 *apud* Cermak, 1998; Telang *et al.*, 2012; Breux 2012). Estudos também sugerem que mosquitos expostos a estresse alimentar podem ser mais suscetíveis à infecção viral, visto que tal condição interfere no processo imunológico do inseto (Nasci e Mitchell, 1994;

Breaux, 2012). Sendo assim, a nutrição adequada é essencial para o desenvolvimento de adultos com melhor *fitness*. Por tudo isso, ao oferecer maior quantidade de comida (0,5g), esperava-se obter resultados significativamente melhores à condição de escassez (0,25g). No entanto, os resultados para ambas condições foram muito semelhantes, sugerindo que o efeito da competição larval pode ser resultado de múltiplos fatores.

Yee *et al.*, 2004 sugerem que a sobrevivência, em condições de competição interespecífica, pode variar devido a diferença na eficácia com que as larvas exploram os recursos alimentares. Eles verificaram que *Ae. albopictus* gasta significativamente mais tempo associado com superfícies foliares, onde bactérias e fungos proliferam, do que *Ae. aegypti*, o que pode contribuir para a vantagem competitiva de *Ae. albopictus* em ambientes em que as folhas são o recurso predominante. Além disso, Juliano (1998) sugere que protozoários do gênero *Ascogregarina* podem influenciar na competição entre estas espécies, favorecendo *Ae. albopictus* em situações de campo. Outra possível causa para a sobrevivência diferenciada entre as espécies é a possibilidade de haver níveis distintos de tolerância aos compostos químicos oriundos da decomposição dos substratos oferecidos como fontes nutricionais ou das excretas das larvas (Carpenter, 1982; David *et al.*, 2000).

Neste trabalho, sob condições de competição entre coortes diferentes, *Ae. albopictus* se desenvolveu mais rápido que *Ae. aegypti*, como verificado por Leandro (2012). Diferentemente do que foi observado por Ross *et al.*, (2014), *Ae. aegypti* se desenvolveu mais rápido na presença de wMel. Isso pode indicar uma vantagem competitiva de *Ae. albopictus* em relação à *Ae. aegypti*, e dos mosquitos infectados com wMel sobre os selvagens, visto que o desenvolvimento mais rápido aumenta as chances destes mosquitos atingirem o peso crítico durante o estágio larval e conseqüentemente aumenta a sobrevivência da coorte (Davidowitz *et al.*, 2003). A redução no tempo de desenvolvimento também aumenta a probabilidade de sobrevivência em criadouros temporários e diminui o tempo de exposição à predação durante o estágio imaturo, pois até mesmo larvas do mesmo gênero, em estádios diferentes e em condição de estresse, podem realizar predação (Suh e Dobson, 2013).

A dieta pode ter refletido no longo tempo de desenvolvimento observado. Daugherty *et al.* (2000), por exemplo, verificaram que a adição de carcaças de invertebrados nos criadouros pode influenciar o tempo de desenvolvimento, a massa corporal das fêmeas, a sobrevivência e o índice λ' de ambas as espécies estudadas. Na ausência das carcaças, a sobrevivência foi igual a zero, demonstrando a sua importância para o crescimento populacional de *Aedes*. Neste estudo, substituímos as carcaças de invertebrados por polissacarídeos sintéticos a fim de maximizar o *fitness* dos mosquitos. Além disso, foram

adicionadas folhas de abacate oriundas da serapilheira. No entanto, é possível que a quantidade de comida tenha sido muito reduzida o que refletiu em todos os aspectos biológicos analisados.

O tamanho corporal das fêmeas é um fator utilizado para determinação do índice de performance, que pode ser estimado a partir do tamanho das asas. Embora o tamanho corporal dos machos não seja utilizado para calcular o índice λ , as asas dos machos também foram mensuradas e apresentaram o mesmo padrão de resposta das fêmeas às situações testadas. É importante ressaltar que além da quantidade de comida ingerida, outros fatores, como a temperatura, podem influenciar diretamente sobre o tamanho corporal dos mosquitos. Oliveira (2013) dosou a quantidade de proteínas de *Ae. aegypti* para estimar a massa corporal de cada inseto, visto que tais fatores estão diretamente relacionados (Briegel e Timmermann, 2001). Então, verificou que insetos criados a 22°C e a 26°C são menores que aqueles criados a 31°C. Tun-Lin *et al.* (2000), Briegel e Timmermann (2001) também verificaram que larvas de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* criadas sob altas temperaturas e sem estresse alimentar se tornam adultos grandes. Tal fato está relacionado ao aumento da absorção de alimentos e conversão em biomassa provocada pela temperatura elevada (Rashed e Mulla, 1989; Padmanabha *et al.* 2011). Já os adultos oriundos da criação a 22°C foram significativamente maiores que aqueles criados a 26°C, visto que, como demonstrado por Padmanabha *et al.* (2011), em temperaturas mais baixas, o ganho de peso no início do desenvolvimento produz um considerável aumento líquido nas reservas de energia, como resultado de um reduzido gasto metabólico. Por outro lado, outros estudos demonstraram que a redução do tempo de desenvolvimento, provocado pelo aumento da temperatura, produziu mosquitos menores (Muturi *et al.*, 2011; Polson *et al.*, 2012).

Em experimentos realizados em condições de campo, tais como o de Juliano (1998), reportado por Lounibos *et al.* (2002) e Braks *et al.* (2004), *Ae. albopictus* também foi o competidor superior em temperaturas médias de 24,8°C e 27,4°C, respectivamente. Lounibos *et al.* (2002) analisaram os efeitos da competição entre *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* submetidos a 24°C e 30°C, onde ambas espécies apresentaram significativo aumento do índice λ' a 30°C. Contudo o aumento proporcional de λ' foi praticamente idêntico entre estas espécies. Além disso, Juliano (1998) não observou correlações significativas do índice λ' com a temperatura. Logo, a temperatura pode influenciar certos parâmetros utilizados para calcular o índice λ , de modo a aumentá-lo ou reduzi-lo, contudo não há evidência para reversão das habilidades competitivas mediante alterações climáticas, como já foi relatado para *Ae. aegypti* e *Ae. notoscriptus* (Russel, 1986 *apud* Braks, 2004).

Em todas as condições testadas, o tamanho das asas das fêmeas foi maior que o dos machos, como esperado para as espécies estudadas. De modo geral, nas condições de competição intraespecífica, o tamanho das asas foi inversamente proporcional a densidade larval, como verificado por Braks *et al.* (2004). Em situações de competição entre *Ae. aegypti* selvagem e com wMel, os insetos maiores foram aqueles que possuem a bactéria, assim como verificado por Ross *et al.* (2014). Isso pode representar uma vantagem significativa, visto que no gênero *Aedes*, maior tamanho corporal tem sido associado a um melhor *fitness*, como por exemplo, maior resistência ao jejum (Ziegler, 1996); elevada sobrevivência (Nasci, 1986; Briegel e Timmermann, 2001), ao sucesso no encontro do hospedeiro (Packer e Corbet, 1989), eficiência na realização do repasto sanguíneo (Nasci, 1986; Ziegler, 1996) e maior fecundidade (Packer e Corbet, 1989; Lyimo e Takken, 1993; Blackmore e Lord, 2000; Ziegler, 1996). Tais fatores podem facilitar a disseminação de wMel em campo. Além disso, o tamanho reduzido de *Ae. albopictus*, em situações competitivas, pode ter um significado epidemiológico importante, visto que mosquitos menores são capazes de consumir mais partículas virais (Nasci e Mitchell, 1994) e de realizar o repasto sanguíneo com maior frequência (Scott *et al.*, 2000). Vale ressaltar, que o tamanho dos mosquitos mensurados neste e em outros trabalhos, pode, de certo modo, subestimar o tamanho dos insetos encontrados na natureza. Juliano (1998) pesou mosquitos coletados em cemitérios na Flórida e verificou que estes eram frequentemente maiores do que àqueles oriundos de condições experimentais competitivas semelhantes à utilizadas neste trabalho, sugerindo que a concorrência na natureza pode não ser tão intensa como a que foi simulada.

Embora a razão sexual em Culicíneos geralmente seja de 1:1 (Gilchrist e Haldane, 1947 *apud* Clements, 1992; Ross *et al.*, 2014), as populações de mosquitos já são conhecidas por apresentarem desvio desta razão quando criados sob condições de grande competição (Haramis, 1984; Frank *et al.*, 1985 *apud* Cemak 1998; Nasci, 1988; Hawley, 1985 *apud* Cemak 1998; Beserra, 2009a, Oliveira, 2013). No presente estudo, também foram verificadas diferenças na proporção de machos e fêmeas, para todas espécies analisadas. *Ae. aegypti* selvagem sofreu maior distorção na proporção sexual, seguido por *Ae. aegypti* com wMel e *Ae. albopictus*, tais distorções podem ser consequência da alta mortalidade. Câmara (2013) também observou diferença na razão sexual *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*, com maior produção de machos no outono, primavera e verão.

No presente estudo, não foi verificado se as populações dos mosquitos *Ae. albopictus* estavam naturalmente infectadas com *Wolbachia* pois a presença da bactéria não altera o *fitness* desta espécie (Gavotte *et al.*, 2009). Também não analisamos a longevidade dos mosquitos adultos, contudo dados indicam que efeitos negativos durante o desenvolvimento

larval, capazes de provocar aumento do tempo de desenvolvimento e diminuição do comprimento da asa como adultos, estão diretamente associados com a redução na longevidade, principalmente para competidores inferiores como *Ae. aegypti* (Reiskind e Lounibos, 2009).

Resultados obtidos a partir da simulação dos efeitos da competição por recursos entre coortes de diferentes tamanhos sobre o índice de performance das populações competidores corroboram com os demais resultados previamente discutidos. *Ae. albopictus* demonstrou suportar condições de competição mais intensas que as demais coortes antes de que seu crescimento populacional declinasse.

Embora os mosquitos *Ae. aegypti* com a bactéria possuam vantagens competitivas sobre aqueles que não possuem, variações espaço-temporais da densidade de *Ae. aegypti* selvagens e de *Ae. albopictus* podem afetar a invasão de *Wolbachia pipientis*, pois podem provocar impactos significativo no *fitness* mediante situações altamente competitivas. Além disso, *Ae. albopictus* mostrou ter capacidade de concorrência superior em relação ao *Ae. aegypti*. Logo, para garantir o sucesso da coorte infectada e conseqüentemente a invasão da bactéria em campo, é preciso levar em consideração a densidade de *Ae. albopictus* nas áreas de soltura. Locais onde a sua densidade é intensa, maior número de mosquitos *Ae. aegypti* com wMel deverão ser soltos, tornando imprescindível o monitoramento prévio das populações naturais nas áreas de soltura.

É preciso estar atento a possibilidade de populações simpátricas de *Ae. albopictus* assumirem o papel de vetores primários de arboviroses, como dengue, chikungunya e febre amarela, mediante o aumento da densidade vetorial nas áreas de soltura de *Ae. aegypti* com wMel. Alto *et al.* (2008) demonstrou que altos níveis de competição podem aumentar a suscetibilidade de *Ae. albopictus* para o vírus Denv 2, assim como seu potencial de transmissão. Logo, o aumento da capacidade vetorial de *Ae. albopictus*, pode ter profundos impactos na epidemiologia de arboviroses nas áreas do projeto “Eliminate Dengue”, uma vez que pode ocorrer a substituição de um vetor competente por outro igualmente competente.

7 CONCLUSÕES

- O índice de positividade das ovitrampas apresenta um padrão sazonal caracterizado pelo aumento na proporção de armadilhas positivas nos períodos com temperatura e pluviosidade elevada e redução nos períodos frios e secos. Em nosso estudo, o outono, foi a estação com maior positividade de ovitrampas e densidade de ovos de *Aedes* spp, provavelmente devido ao maior nível pluviométrico.
- A densidade vetorial é heterogênea nas áreas monitoradas: Tubiacanga é área de maior densidade, seguido por Vila Valqueire, Jurujuba e Urca.
- Durante os doze meses de estudo, a proporção de *Ae. aegypti* foi maior que a de *Ae. albopictus*, em todas as áreas monitoradas. Sendo assim, é provável que nestas áreas as populações de *Ae. albopictus* não interfiram no processo de invasão de *Wolbachia pipientis*
- Embora a abundancia de *Ae. albopictus* tenha sido baixa em todo período de estudo, a sua densidade foi ainda mais reduzida no período seco (verão), indicando que provavelmente esta espécie apresenta maior sensibilidade aos fatores ambientais. Neste sentido, é possível que os períodos secos sejam os mais adequados para a soltura dos mosquitos *Ae. aegypti* com wMel.
- A proporção de *Ae. albopictus* no intradomicílio foi maior que no peridomicílio, sugerindo que esta espécie tem se tornado mais antropofílica.
- Sob situações competitivas, *Ae. albopictus* tem menor tempo de desenvolvimento e maior sobrevivência que *Ae. aegypti* (selvagem e com wMel), mantendo crescimento populacional positivo mesmo sob altas densidades larvais e baixo recurso per capita.
- A presença da bactéria parece conferir uma vantagem competitiva a espécie *Ae. aegypti* que se desenvolve mais rápido, tem maior tamanho de asa e melhor performance na presença de wMel, mesmo não considerando incompatibilidade citoplasmática.
- Para garantir o sucesso da coorte infectada e conseqüentemente a invasão da bactéria em campo, é preciso levar em consideração a densidade de *Ae. albopictus* nas áreas de soltura. Em locais onde a sua densidade é intensa, maior número de mosquitos *Ae. aegypti* com wMel deverão ser soltos, tornando imprescindível o monitoramento prévio das populações naturais nas áreas de soltura.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abreu FVS. Estudo do comportamento de “oviposição em saltos” por fêmeas de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) em diferentes densidades de criadouros e a influência da armadilha MosquiTRAP® na redução de ovos e criadouros positivos [Dissertação]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais; 2010.
- Alles GC, Hübner M, Fiuza LM. Toxicologia de *Bacillus thuringiensis* às pragas urbanas e vetores. *Biotechnol Cienc Desenvol*. 2009/2010; (38): 44-6.
- Alto BW, Lounibos LP, Mores CN, Reiskind MH. Larval competition alters susceptibility of adult *Aedes* mosquitoes to dengue infection. *Proc. R. Soc. B*. 2008; 275: 463-71.
- Ashburn PM, Craig CF. Experimental investigations regarding the etiology of dengue fever. *J Infect Dis*. 1907; 4: 440-75
- Avendanha JS. Monitoramento vetorial e do vírus dengue em Belo Horizonte, Minas Gerais [Dissertação]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais; 2006.
- Bancroft TL. On the aetiology of dengue fever. *Aust Med Gaz*. 1906; 25: 17-8.
- Barrera R. 1996. Competition and resistance to starvation in larvae of containerinhabiting *Aedes* mosquitoes. *Ecol. Entomol*. 21:117-27.
- Barreto ML, Teixeira MG. Dengue no Brasil: situação epidemiológica e contribuições para uma agenda de pesquisa. *Estud av*. 2008; 22 (64): 53-72.
- Beaty BJ, Marquardt WC. The biology of disease vectors. Colorado: University of Colorado Press; 1996.
- Beilhe LB, Delatte H, Juliano SA, Fontenille D, Quilici S. Ecological interactions in *Aedes* species on Reunion Island. *Medical and Veterinary Entomology*. 2013; 27: 387-97.
- Beserra B, Castro-Júnior FP, Santos W, Santos TS, Fernandes CRM. Biologia e exigências térmicas de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) provenientes de quatro regiões bioclimáticas da Paraíba. *Neotrop. Entomol*. 2006; 35(6): 853-860.
- Beserra EB, Fernandes CRM, Ribeiro OS. Relação entre Densidade Larval e Ciclo de Vida, Tamanho e Fecundidade de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) em Laboratório. *Neotrop Entomol*. 2009a; 38(6): 847-52.
- Beserra EB, Fernandes CRM, Silva SAO, Silva LA, Santos JW. Efeitos da temperatura no ciclo de vida, exigências térmicas e estimativas do número de gerações anuais de *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). *Iheringia, Sér. Zool*. 2009b; 99(2): 142-8.
- Bhatt S, PW Gething, OJ Brady, JP Messina, AW Farlow, CL Moyes, et al. The global distribution and burden of dengue. *Nature*. 2013; 496: 504-7.

- Blackmore MS, Lord, CC. The relationship between size and fecundity in *Aedes albopictus*. J of Vector Ecol. 2000; 25 (2): 212-7.
- Black WC, Rai KS, Turco BJ, Arroyo DC. 1989. Laboratory study of competition between United States strains of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* 26: 260-71.
- Braga IA, Gomes AC, Nelson M, Mello RCG, Bergamaschi DP, Souza JMP. Comparação entre pesquisa larvária e armadilha de oviposição, para detecção de *Aedes aegypti*. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2000; 33(4):347-53.
- Braga IA, Valle D. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. *Epidemiol Serv Saúde.* 2007; 16: 279-93.
- Breaux JA. Larval food stress influences adult immunity in *Aedes aegypti*. Entomological Society Annual Meeting; 2012 Jun 3-6; North Central Branch.
- Briegel H, Knüsel I, Timmermann SE. *Aedes aegypti*: size, reserves, survival, and flight potential. *J Vector Ecol.* 2001; 26(1): 21-31.
- Briegel H. Metabolic relationship between female body size, reserves and fecundity of *Aedes aegypti*. *J Insect Physiol.* 1990. 36: 165-172.
- Braks MAH, Honório NA, Lounibos LP, Lourenço-De-Oliveira R, Juliano AS. Interspecific Competition Between Two Invasive Species of Container Mosquitoes, *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae), in Brazil. 2004. *Ann Entomol Soc Am.* 97(1):130-139.
- Burattini MN, Chen M, Chow A, Coutinho FAB, Goh KT, Lopez LF, Ma S, Massad E. Modelling the control strategies against dengue in Singapore. *Epidemiol. Infect.* 2008; 136: 309-19.
- Câmara DCP. Produtividade de pupas e quantificação experimental da competição interespecífica entre os vetores do dengue *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) em condições naturais, no Rio de Janeiro [Dissertação]. Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz; 2013.
- Camargo EP. Doenças Tropicais. *Estud av.* 2008; 22(64): 95-110.
- Cancrini G, Romi R, Gabrielli S, Toma L, Di Paolo M, Scaramozzino P. (2003), First finding of *Dirofilaria repens* in a natural population of *Aedes albopictus*. *Med vet entomol.* 2003; 17: 448-51.
- Carpenter S. Stemflow chemistry: effects on population dynamics of detritivorous mosquitoes in tree-hole ecosystems. *Oecologia.* 1982; 53(1):1-6.
- Carvajal, JJ. Variação espacial e temporal dos vetores do Dengue *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse, 1894) e *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) na área urbana

do município de Letícia, (Amazonas-Colômbia) e sua associação com a transmissão do Dengue na tríplice fronteira Amazônica (Colômbia-Brasil-Peru). [Dissertação]. Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz; 2013.

Cemak PM. *Aedes aegypti* population dynamics: the effects of food availability and experimentally induced mortality of late instar larvae. [Thesis of the Master of Science]. Canada: Faculty of Graduate Studies and Research; 1998.

Centers for Disease Control and Prevention. Mosquito species in which West Nile virus has been detected, United States, 1999- 2013. [acessado em: 05 de ago 2013]. Disponível em: <http://www.cdc.gov/westnile/resources/pdfs/Mosquito%20Species%201999-2012.pdf>

Centers for Disease Control and Prevention. Global Alert and Response: West Nile virus - Brazil. 2014. [acessado em: 15 de dez 2014]. <http://www.who.int/csr/don/15-december-2014-wnv/en/>

Chandler AC, Rice L. Observations on the etiology of dengue fever. Am J Trop Med. 1923; 3: 233-62.

Chan KL, Chan YC, Ho BC. *Aedes aegypti* (L.) and *Aedes albopictus* (Skuse) in Singapore City. 4. Competition between species. Bull WHO. 1971; 44 (5): 643-649.

Chen R, Vasilakis N. Dengue - Quo tu et quo vadis? Viruses. 2011; 3: 1562-1608.

Chiaravalloti-Neto F, Costa AIP, Soares MRD, Scandar SAS, Junior RPC. Descrição da colonização de *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) na Região de São José Do Rio Preto, SP, 1991-1994. Rev Soc Bras Med Trop. 1996; 29(6): 543-8.

Christophers SR. *Aedes aegypti*. The yellow fever mosquito. Its life history, bionomics and structure. London: Cambridge University Press; 1960.

Cleland JB, Bradley B, McDonald W. Further experiments in the etiology of dengue fever. J Hyg. 1919; 18: 217-54.

Clements NA. Mosquitoes: life cycle, biology, disease transmission. Larval nutrition, excretion and respiration. In: The biology of mosquitoes. London: Chapman e Hall; 1992.

Consoli RAGB, Lourenço-de-Oliveira R. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Rio de Janeiro: Fiocruz; 1994.

Costa FS, Silva JJ, Souza CM, Mendes J. Dinâmica populacional de *Aedes aegypti* (L) em área urbana de alta incidência de dengue. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 2008; 41(3):309-12

- Costa FS, Silva JJ, Souza CM, Mendes J. Population dynamics of *Aedes aegypti* (L) in an urban area with high incidence of dengue. *Ver Soc Bras Med Trop*. 2008; 41(3): 309-12.
- Costanzo KS, Mormann K, Juliano SA. Asymmetrical Competition and Patterns of abundance of *Aedes albopictus* and *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *J med entomol*. 2005; 42(4):559-70.
- Craig, G.B., 1993. The diaspora of the Asian tiger mosquito. In: McKnight, B.N. (Ed.), *Biological Pollution: The Control and Impact of Invasive Exotic Species*. Indiana Academic of Science, Indianapolis.
- Daugherty MP, Alto BW, Juliano AS. Invertebrate carcasses as a resource for competing *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *J med entomol*. 2000; 37(3): 364-72.
- David JP, Rey D, Cuany A, Amichot M, Meyran JC. Comparative ability to detoxify alder leaf litter in field larval mosquito collections. *Arch Insect Biochem Physiol*. 2000; 44:143-50.
- Davidowitz G, D'Amico LJ, Nijhout HF. Critical weight in the development of insect body size. *Evol Dev*. 2003; 5:2, 188-97.
- Dibo MR, Chierotti AP, Ferrari MS, Mendonça AL, Neto FC. Study of the relationship between *Aedes (Stegomyia) aegypti* egg and adult densities, dengue fever and climate in Mirassol, state of São Paulo, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2008; 103(6): 554-560.
- Dieng H, Saifur RGM, Hassan AA, Salmah MRC, Boots M, Satho T *et al*. Indoor-breeding of *Aedes albopictus* in northern peninsular Malaysia and its potential epidemiological implications. *PLoS ONE*. 2010; 5(7): e11790.
- Estrada-Franco JG, Craig GB. Biology, disease relationships and control of *Aedes albopictus*. Technical paper, nº2. Washington: Pan American Health Organization; 1995.
- Farnesi LC, Martins AJ, Valle D, Rezende GL. Embryonic development of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): influence of different constant temperatures. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009; 104(1): 124-6.
- Fay RW, Eliason DAA. Preferred oviposition site as a surveillance method for *Aedes aegypti*. *Mosqu. News*. 1966; 26 (4): 531-5.
- Fay RW, Perry AS. Laboratory studies of ovipositional preferences of *Aedes aegypti*. *Mosq. News*. 1965; 25 (3): 276-81.

- Focks DA. UNICEF/UNDP/WORLD BANK/WHO. Special programme for Research and Training in Tropical Disease (TDR): A review of entomological sampling methods and indicators for dengue vectors. TDR/IDE/Den/03.1 Florida: Infectious Disease Analysis; 2003.
- Forattini OP. Culicidologia médica: identificação, biologia, epidemiologia. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo; 2002. 2 v.
- Forattini OP, Marques GRAM, Brito M, Sallum MAM. brief communication an unusual ground larval habitat of *Aedes albopictus*. Rev Inst Med trop. 1998a; 40(2).
- Forattini OP, Marques GRAM, Kajitani I, Brito M, Sallum MAM. Significado epidemiológico de *Aedes albopictus* em bromélias. Rev. Saúde Pública. 1998b; 32(2): 186-8.
- Frentiu FD, Zakir T, Walker T, Popovici J, Pyke AT, van den Hurk A, *et al.* Limited dengue virus replication in field-collected *Aedes aegypti* mosquitoes infected with *Wolbachia*. PLoS Negl Trop Dis. 2014; 8(2).
- FUNASA - Fundação Nacional de Saúde. Controle de vetores - procedimentos de segurança. Brasília: Ministério da Saúde- Fundação Nacional de Saúde; 2001.
- FUNASA - Fundação Nacional de Saúde. Programa nacional de controle da dengue (PNCD). Brasília: Ministério da Saúde- Fundação Nacional de Saúde; 2002.
- Gavotte L, Mercer DR, Vandyke R, Mains JW, Dobson SL. *Wolbachia* Infection and Resource Competition Effects on Immature *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). J Med Entomol. 2009; 46(3): 451-9.
- Gilotra SK, Rozeboom LE, Bhattacharya NC. Observation on possible competitive displacement between populations of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* Skuse in Calcutta. Bull WHO. 1967; 37: 437-46.
- Gomes AC, Marques GRAM. Encontro de criadouro natural de *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse), estado de São Paulo, Brasil. Rev Saúde públ. 1988; 22(3): 245.
- Gomes AC. Medidas dos níveis de infestação urbana para *Aedes (Stegomyia) aegypti* e *Aedes (Stegomyia) albopictus* em programa de Vigilância entomológica. IESUS. 1998; 7(3): 49-57.
- Gomes AC, Souza JMP, Bergamaschi DP, Santos JLF, Andrade VR, Leite OF, Rangel O, Souza SSL, Guimarães NSN, Lima VLC. Atividade antropofílica de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* em área sob controle e vigilância. Rev Saúde Pública. 2005; 39(2): 206-10.
- Gould EA, Solomon T. Pathogenic flaviviruses. Lancet. 2008; 371: 500-09.

- Graham H. The dengue: a study of its pathology and mode of propagation. *J Trop Med.* 1903; 6: 209-14.
- Gratz NG. Critical review of the vector status of *Aedes albopictus*. *Med Vet Entomol.* 2004; 18: 215-27.
- Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev.* 1998; 11(3): 480-96.
- Hammon WM, Rudnick A and Sather. Viruses associated with epidemic hemorrhagic fevers of the Philippines and Thailand. *Science.* 1960; 131:1102-03.
- Haramis LD. *Aedes triseriatus*: a comparison of density in tree roles vs. discarded tires. *Mosquito News.* 1984; 44 (4): 485-9.
- Hemingway J; Ranson H. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. *Annu Rev Entomol.* 2000; 45: 371-91.
- Ho BG, Ewert A, Chew LM. Interspecific competition among *Aedes aegypti*, *Ae. albopictus* and *Ae. triseriatus* (Diptera: Culicidae): larval development in mixed cultures. *J. Med. Entomol.* 1989; 26: 615-23.
- Hoffmann AA, Montgomery BL, Popovici J, Iturbe-Ormaetxe I, Johnson PH, Muzzi F, *et al.* Successful establishment of *Wolbachia* in *Aedes* populations to suppress dengue transmission. *Nature.* 2011; 476: 454-7.
- Honório NA, Castro MG, Barros FSM, Magalhães MAFM, Sabroza PC. The spatial distribution of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in a transition zone, Rio de Janeiro, Brazil. *Cad. Saúde Pública.* 2009; 25(6):1203-14.
- Honório NA, Codeço CT, Alves FC, Magalhães MA, Lourenço-de-Oliveira R. Temporal distribution of *Aedes aegypti* in different districts of Rio de Janeiro, Brazil, measured by two types of traps. *J Med Entomol.* 2009b; 46(5):1001-14.
- Honório NA, Lourenço-de-Oliveira R. Frequência de larvas e pupas de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* em armadilhas, Brasil. *Rev Saúde Pública.* 2001; 35(4):385-91.
- IOC - Instituto Oswaldo Cruz [acessado em: 18 de out 2013]. Disponível em: <http://www.ioc.fiocruz.br/dengue/textos/10minutos.html>
- Juliano SA. Coexistence, exclusion, or neutrality? A meta analysis of competition between *Aedes albopictus* and resident mosquitoes. *Isr J Ecol Evol.* 2010; 56: 325-51.
- Juliano SA, O'Meara GF, Morrill JR, Cutwa MM. Desiccation and thermal tolerance of eggs and the coexistence of competing mosquitoes. *Oecologia.* 2002; 130(3): 458-69.
- Juliano SA. Species introduction and replacement among mosquitoes: interspecific resource competition or apparent competition? *Ecology.* 1998; 79 (1): 255-68.

- Kröckel U, Rose A, Eiras A, Geier M. New tools for surveillance of adult *Aedes aegypti*: comparison of trap catches with human landing collection in an urban environment. J Am Mosq Control Assoc. 2006.
- Leandro RS. Competição e dispersão de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) e *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse, 1894) (Diptera: Culicidae) em áreas de ocorrência no município de João Pessoa [Dissertação]. Campina Grande: Universidade Estadual da Paraíba; 2012.
- Lima-Camara TN, Honório NA, Lourenço-de-Oliveira R. Frequência e distribuição espacial de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* (Diptera, Culicidae) no Rio de Janeiro, Brasil. Cad. Saúde Pública. 2006; 22(10):2079-84.
- Livdahl TP, Sugihara G. Non-linear interactions of populations and the importance of estimating per capita rates of change. J. Anim. Ecol. 1984; 53: 573-80
- Lounibos LP. 2002. Invasions by insect vectors of human disease. Annu. Rev. Entomol. 47:233-66.
- Lounibos LP, Suárez S, Menéndez Z, Nishimura N, Escher RL, O'Connell SM, Rey JR. Does temperature affect the outcome of larval competition between *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*? J Vector Ecol. 2002; 27 (1): 86-95.
- Lourenço-de-Oliveira R. Principais insetos vetores e mecanismos de transmissão das doenças infecciosas e parasitárias. In: Coura JR. Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005.
- Lourenço-de-Oliveira R, Vazeille M, Filippis AMB, Failloux AB. Large genetic differentiation and low variation in vector competence for dengue and yellow fever viruses of *Aedes albopictus* from Brazil, the United States, and the Cayman islands. Am. J. Trop. Med. Hyg, 2003; 69(1): 105-14.
- Lourenço-de-Oliveira R, Vega Rúa A, Vezzani D, Willat G, Vazeille M, Mousson L, Failloux AB. *Aedes aegypti* from temperate regions of South America are highly competent to transmit dengue virus. BMC Infectious Diseases. 2013; 13:610.
- Lyimo E, Takken W. Effects of adult body size on fecundity and the pregravid rate of *Anopheles gambiae* females in Tanzania. Med Vet Entomol. 1993; 7(4): 328-32.
- Maciel-de-Freitas R, Aguiar R, Bruno RV, Guimarães MC, Lourenço-de-Oliveira R, Sorgine MHF, et al. Why do we need alternative tools to control mosquito-borne diseases in Latin America? Mem Inst Oswaldo Cruz. 2012; 107(6): 828-29.
- Maciel-de-Freitas R, Eiras AE, Lourenço-de-Oliveira R. Field evaluation of effectiveness of the BG-Sentinel, a new trap for capturing adult *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). Mem Inst Oswaldo Cruz. 2006; 101: 321-325.

- Marcondes CB, Tauil PL. Dengue silvestre: devemos nos preocupar? Rev Soc Bras Med Trop. 2011; 44(2): 263-4.
- Martins AJ, Lima JB, Peixoto AA, Valle D. Frequency of Val1016Ile mutation in the voltage-gated sodium channel gene of *Aedes aegypti* Brazilian populations. Trop Med Int Health. 2009; 14(11):1351-5.
- Marzochi KBF. Dengue in Brazil - situation, transmission and control - a proposal for ecological control. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 1994; 89(2): 235-45.
- McMeniman CJ, Lane RV, Cass BN, Fong AW, Sidhu M, Wang YF, *et al.* Stable introduction of a life-shortening *Wolbachia* infection into the mosquito *Aedes aegypti*. Science. 2009; 323: 141-4.
- Mieli MV, Campos RE. Oviposition activity and seasonal pattern of a population of *Aedes (Stegomyia) aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) in subtropical Argentina. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2003; 98(5): 659-63.
- Miller BR, Mitchell CJ, Ballinger ME. Replication, tissue tropisms and transmission of yellow fever virus in *Aedes albopictus*. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1989; 83(2):252-5.
- Min KT, Benzer S. *Wolbachia*, normally a symbiont of *Drosophila*, can be virulent, causing degeneration and early death. Proc Natl Acad Sci U.S.A. 1997; 94: 10792-6.
- Mitchell CJ, Miller BR, Gubler DJ. Vector competence of *Aedes albopictus* from Houston, Texas, for dengue serotypes 1 to 4, yellow fever and Ross River viruses. J Am Mosq Control Assoc. 1987; 3(3):460-5.
- Mogi M, Miyagi I, Abadi K, Syafruddin. Inter- and Intraspecific Variation in Resistance to desiccation by adult *Aedes (Stegomyia)* spp. (Diptera: Culicidae) from Indonesia. J. Med. Entomol. 1996; 33(1): 53-57.
- Monteiro FA, Shama R, Martins AJ, Gloria-Soria A, Brown JE, Powell JR. Genetic Diversity of Brazilian *Aedes aegypti*: Patterns following an Eradication Program. PLoS Negl Trop Dis. 2014; 8 (9).
- Moore CG, Mitchell CJ. *Aedes albopictus* in the United States: ten-year presence and public health implications. Emerg infect dis. 1997; 3 (3): 329-34.
- Moreira LA, Moreira LA, Iturbe-Ormaetxe I, Jeffery JA, Lu G, Pyke AT, *et al.* A *Wolbachia* Symbiont in *Aedes aegypti* Limits Infection with Dengue, Chikungunya, and *Plasmodium*. Cell. 2009; 24: 1268-78.
- Moreira PRS. Análise da distribuição espacial e temporal do *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) em uma área de transição no Rio de Janeiro [Dissertação]. Rio de Janeiro: Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca; 2013.

- Mori A. Effects of larval density and nutrition on some attributes of immature and adult *Aedes albopictus*. Trop Med. 1979; 21: 85-103.
- Munstermann LE, Wesson DM. First record of *Ascogregarina taiwanensis* (Apicomplexa: Leucudinidae) in North American *Aedes albopictus*. J. Am. Mosq. Control Assoc. 1990; 6:235-43.
- Mustafa MS, Rasotgi V, Jain S, Gupta V. Discovery of fifth serotype of dengue virus (DENV-5): A new public health dilemma in dengue control. Med J Armed Forces India. 2014; 71(1): 67-70.
- Muturi EJ, Alto BW. Larval environmental temperature and insecticide exposure alter *Aedes aegypti* competence for arboviruses. Vector Borne Zoonotic Dis. 2011; 11(8): 1157-63.
- Nasci RS. Biology of *Aedes triseriatus* (Diptera: Culicidae) developing in tires in Louisiana. Jour Med Entomol. 1988. 25(5): 402-5.
- Nasci RS, Hare CG, Willis FS. Interspecific mating between Louisiana strains of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* in the field and the laboratory. J. Am. Mosq. Control Assoc. 1989; 5:416-21.
- Nasci RS, Mitchell CJ. Larval diet, adult size, and susceptibility of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) to infection with Ross River virus. J Med Entomol. 1994; 31(1): 123-6.
- Nasci R. The size of emerging and host seeking *Aedes aegypti* and the relationship of size to blood feeding success in the field. J Am Mosq Control Assoc. 1986; 2 (1): 61-62.
- Natal D. Bioecologia do *Aedes aegypti*. Biológico. 2002; 64: 205-7.
- Neven LG. Physiological responses of insects to heat. Postharv. Biol. Technol. 2000; 21: 103-11.
- Neves DP, Silva RF. Aspectos da biologia do *Aedes albopictus* (Skuse, 1894) (Diptera: Culicidae), a nível de campo. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 1989; 84 (supl IV): 403-4.
- O'Donnell DL. Ecology and population differentiation of the asian tiger mosquito, *Aedes albopictus* [Dissertação]. Washington: Georgetown University; 2009.
- Oliveira CD, Gonçalves DS, Baton LA, Shimabukuro PH, Carvalho FD, Moreira LA. Broader prevalence of Wolbachia in insects including potential human disease vectors. Bull Entomol Res. 2015; 16:1-11.
- Oliveira ES, Biazoto CDS. Distribuição de criadouros de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) e *Aedes albopictus* (Skuse, 1894) (Díptera: Culicidae), no município de Assis Chateaubriand, PR, BRASIL. Biosci J. 2012; 28(6):1051-60.

- Oliveira S. Influência da oferta alimentar e da temperatura no desenvolvimento e na atividade das enzimas detoxificantes de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) [Monografia]. São Gonçalo: Universidade do Estado do Rio de Janeiro; 2013.
- OMS - Organização Mundial da Saúde. Dengue control. [acessado em: 12 de setembro de 2014]. Disponível em: <http://www.who.int/denguecontrol/en/>
- OMS - Organização Mundial da Saúde. Health Topics: Dengue. [acessado em: 27 de maio 2011]. Disponível em: <http://www.who.int/topics/dengue/en/>
- OMS - Organização Mundial da Saúde. Pesticides and their application for the control for vector and pests of public health importance. 6. ed. Editora Genebra; 2006.
- OMS - Organização Mundial da Saúde. WHO Technical Advisory Group on Dengue Vaccines in Late Stage Development. Further information at. 2013. [acessado em: 29 de setembro 2013]. Disponível em: http://www.who.int/vaccine_research/committees/dengue_tag/en/index.html.
- O'Neal PA, Juliano SA. Seasonal variation in competition and coexistence of *Aedes* mosquitoes: stabilizing effects of egg mortality or equalizing effects of resources? *J anim ecol.* 2013; 82, 256-65.
- Packer MJ, Corbet, PS. Size variation and reproductive success of female *Aedes punctor* (Diptera: Culicidae). *Ecol Entomol.* 1989; 14 (3): 297-309.
- Padmanabha H, Bolker B, Lord CC, Rubio C, Lounibos LP. Food availability alters the effects of larval temperature on *Aedes aegypti* growth. *J. Med. Entomol.* 2011; 48(5): 974-84.
- Pant CP, Yasuno M. Field studies on the gonotrophic cycle of *Aedes aegypti* in Bangkok, Thailand. *J Med Entomol.* 1973; 10: 219-23.
- Passos RA, Marques GRAM, Voltolini JC, Condino MLF. Dominância de *Aedes aegypti* sobre *Aedes albopictus* no litoral sudeste do Brasil. *Rev Saúde Pública.* 2003; 37(6):729-34.
- Paupy C, Delatte H, Bagny L, Corbel V, Fontenille D. *Aedes albopictus*, an arbovirus vector: From the darkness to the light. *Microbes infect.* 2009; 11: 1177-85.
- Polson KA, Brogdon WG, Rawlins SC. Impact of environmental temperatures on resistance to organophosphate insecticides in *Aedes aegypti* from Trinidad. *Rev Panam Salud Publica.* 2012; 32(1): 1-8.
- Popovici J, Moreira LA, Poinsignon A, Iturbe-Ormaetxe I, McNaughton D, O'Neill SL. Assessing key safety concerns of a *Wolbachia*-based strategy to control dengue transmission by *Aedes* mosquitoes. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2010; 105(8): 957-64.

- Rashed SS, MS Mulla. Factors influencing ingestion of particulate materials by mosquito larvae (Diptera, Culicidae). *J Med Entomol.* 1989; 26: 210-16.
- Rawlins SC, Martinez R, Wiltshire, Legall GA. Comparison of surveillance systems for the dengue vector *Aedes aegypti* in Port of Spain, Trinidad. *J Am Mosq Control Assoc.* 1998; 14:131-6.
- Reiskind MH, Lounibos LP. Effects of intraspecific larval competition on adult longevity in the mosquitoes *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *Med Vet Entomol.* 2009; 23(1): 62-8.
- Reiter P, Amador MA, Colon N. Enhancement of the CDC ovitrap with hay infusions for daily monitoring of *Aedes aegypti* populations. *J Am Mosq Control Assoc.* 1991; 7:52-55.
- Reiter P, Sprenger D. The used tire trade: a mechanism for the worldwide dispersal of container breeding mosquitoes. *Journal, of the American Mosquito Control Association.* 1987; 3 (3): 494- 501.
- Rey L. Bases da Parasitologia Médica. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.
- Ríos-Velásquez CM, Codeço CT, Honório NA, Sabroza PS, Moresco M, Cunha ICL *et al.* Distribution of dengue vectors in neighborhoods with diferente urbanization types of Manaus, state of Amazonas, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2007; 102(5): 617-623.
- Rosen L, Rozeboom LE, Sweet BH, Sabin AB. The transmission of dengue by *Aedes polynesiensis* marks. *Am J Trop Med Hyg.* 1954; 3(5): 877-82.
- Ross PA, Endersby NM, Yeap HL, Hoffmann AA. Larval competition extends developmental time and decreases adult size of wMelPop *Wolbachia*-infected *Aedes aegypti*. *Am J Trop Med Hyg.* 2014; 91(1):198-205.
- Rueda LM. Pictorial keys for the identification of mosquitoes (Diptera: Culicidae) associated with dengue virus transmission. *Zootaxa.* 2004; 589: 1-60.
- Rudnick A, Hammon WM. Newly recognized *Aedes aegypti* problems in Manila and Bangkok. *Mosq News.* 1960; 20 (3): 247-9.
- Sabin AB. Research on dengue during World War II. *Am J Trop Med Hyg.* 1952; 1 (1): 30-50.
- Santos LMB. Efeito da competição intra-específica na longevidade e sobrevivência de *Aedes aegypti* [Monografia]. São Gonçalo: Universidade do Estado do Rio de Janeiro; 2012.
- Scott TW, Amerasinghe PH, Morrison AC, Lorenz LH, Clark GG, Strickman D, *et al.* Longitudinal studies of *Aedes aegypti* in Thailand and Puerto Rico: blood-feeding frequency. *J Med Entomol.* 2000; 37(1): 89-101.

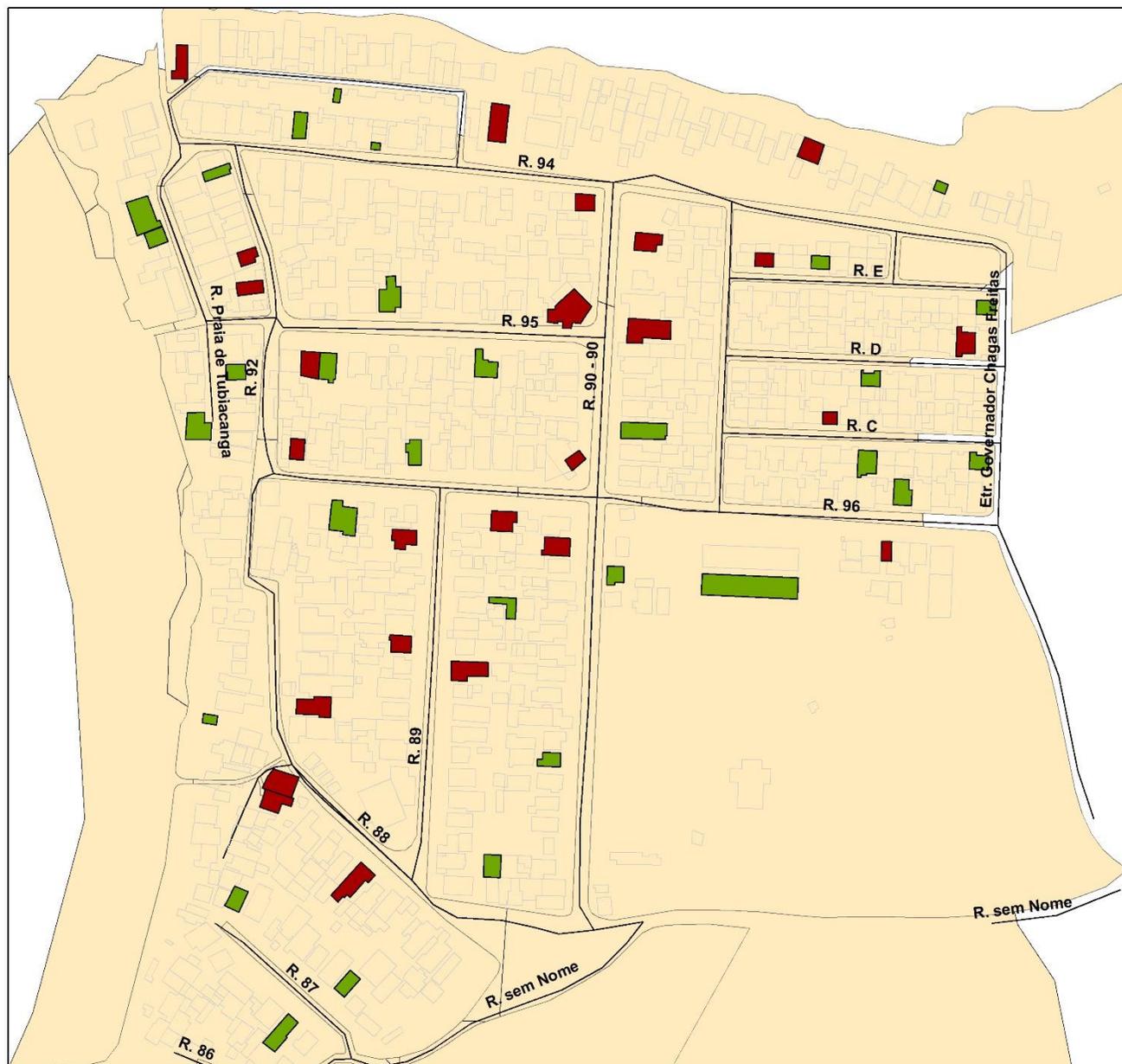
- Secretaria de Vigilância em Saúde (Ministério da Saúde). Monitoramento dos casos de dengue até a Semana Epidemiológica (SE) 41 e febre de chikungunya até a SE 42 de 2014. Boletim epidemiológico. 2014; 45(26).
- Serpa LLN, Costa KVRM, Voltolini JC, Kakitani I. Variação sazonal de *Aedesmaegypti* e *Aedes albopictus* no município de Potim, São Paulo. Rev Saúde Pública. 2006.
- Silvanathan MM. The ecology and biology of *Aedes aegypti* (L.) and *Aedes albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae) and the resistance status of *Aedes albopictus* (field strain) against organophosphates in Penang, Malaysia [Dissertação]. Malaysia: Malaysia University of Science; 2006.
- Silva VC, Scherer PO, Falcão SS, Alencar J, Cunha SP, Rodrigues IM, Pinheiro NL. Diversidade de criadouros e tipos de imóveis frequentados por *Aedes albopictus* e *Aedes aegypti*. Rev Saúde Pública. 2006; 40(6):1106-11.
- Southwood TRE, Murdie G, Yasuno M, Tonn RJ, Reader PM. Studies on the life budget of *Aedes aegypti* in Wat Samphaya, Bangkok, Thailand. Bull. Bull World Health Organ. 1972; 46: 211-26.
- Suh E, Dobson SL. Reduced competitiveness of *Wolbachia* infected *Aedes aegypti* larvae in intra- and inter-specific immature interactions. J Invertebr Pathol. 2013 October; 114(2): 173-7.
- Tauil PL. Urbanização e ecologia do dengue. Cad. Saúde Pública. 2001; 17(Suppl):99-102.
- Teixeira GM, Barreto ML, Guerra Z. Epidemiologia e Medidas de Prevenção do Dengue. Informe Epidemiológico do SUS 1999, 8(4): 5-33.
- Telang A, Qayum AA, Parker A, Sacchetta BR, Byrnes GR. Larval nutritional stress affects vector immune traits in adult yellow fever mosquito *Aedes aegypti* (*Stegomyia aegypti*). Med Vet Entomol. 2012; 26(3): 271-81.
- Temporão JG, Penna GO, Carmo EH, Coelho GE, Socorro R, Azevedo S, Nunes MR, et al. Dengue virus serotype 4, Roraima State, Brazil. Emerg Infect Dis. 2011; 17:938-40.
- Townsend CR, Begon M, Harper JL. Essentials of ecology. 2 ed. 2007. Blackwell Publishing.
- Tun-Lin W, Burkot, TR, Kay BH. Effects of temperature and larval diet on development rates and survival of dengue vector *Aedes aegypti* in north Queensland, Australia. Med Vet Entomol. 2000; 14: 31-7.
- Vargas HCM. Avaliação da aquisição da resistência à dessecação embrionária em diferentes mosquitos vetores [Monografia]. São Gonçalo: Universidade do Estado do Rio de Janeiro; 2012.

- Vasilakis N, Cardoso J, Hanley KA, Holmes EC, Weaver SC. Fever from the forest: prospects for the continued emergence of sylvatic dengue virus and its impact on public health. *Nat Rev Microbiol.* 2012; 9(7): 532-41.
- Vasilakis N, Holmes EC, Fokam EB, Faye O, Diallo M, Sall AA, Weaver SC. Evolutionary Processes among Sylvatic Dengue Type 2 Viruses. *J Virol.* 2007; 81(17): 9591-5.
- Vega-Rúa A, Zouache K, Girod R, Failloux AB, Lourenço-de-Oliveira R. High Level of Vector competence of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from ten american countries as a crucial factor in the spread of chikungunya virus. *J Virol.* 2014; 88(11): 6294-306.
- Vezzani D, Velázquez SM, Schweigmann N. Seasonal pattern of abundance of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Buenos Aires City, Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2004; 99(4): 351-6.
- Walker T, Johnson PH, Moreira LA, Iturbe-Ormaetxe I, McMeniman CJ, Leong YS, *et al.* The wMel *Wolbachia* strain blocks dengue and invades caged *Aedes aegypti* populations. *Nature.* 2011; 476(7361): 450-3.
- Wang E, Ni H, Xu R, Barrett AD, Watowich SJ, Gubler DJ, Weaver SC. Evolutionary relationships of endemic/epidemic and sylvatic dengue viruses. *J Virol.* 2000; 74(7): 3227-34.
- Werren JH, Baldo L, Clark ME. *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology. *Nat Rev Microbiol.* 2008; 6: 741-51.
- Whitehead SS, Blaney JE, Durbin AP, Murphy BR. Prospects for dengue virus vaccine. *Nat Rev Microbiol.* 2007; 5: 518-28.
- WRBU - Walter Reed Biosystematics Unit. *Aedes*. [acesso em 14 de ago 2012]. Disponível em: <http://www.wrbu.org/generapages/aedes.htm>.
- Yang HM. Epidemiologia da Transmissão da Dengue. *TEMA Tend Mat Apl Comput.* 2003; 4(3): 387-396.
- Yeap HL, Mee P, Walker T, Weeks AR, O'Neill SL, Johnson P, *et al.* Dynamics of the 'popcorn' *Wolbachia* infection in *Aedes aegypti* in an outbred background. *Genetics.* 2011; 187: 583-95.
- Yee DA, Kesavaraju B, Juliano SA. Interspecific differences in feeding behavior and survival under food-limited conditions for larval *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Ann Entomol Soc Am.* 2004; 97(4): 720-28.
- Ziegler R. Energy Metabolism In: Beaty BJ, Marquardt WC. *The biology of disease vectors.* Colorado: University Press of Colorado; 1996.

ANEXOS

Anexo A: Localização das armadilhas ovitrampas e BGs sentinelas nas áreas de estudo

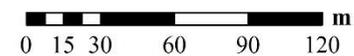




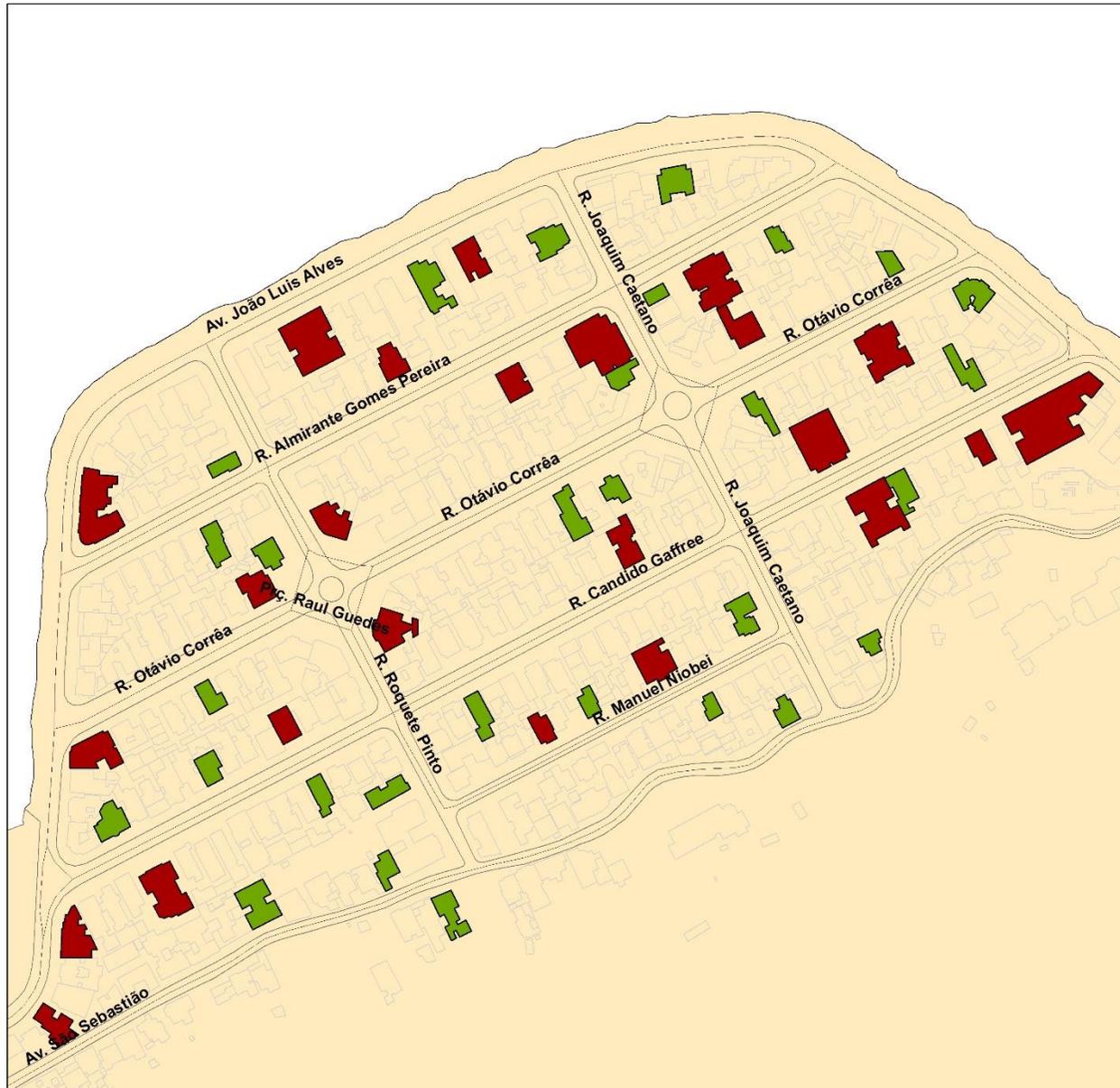
TUBIACANGA

LEGENDA:

- BGs Sentinelas
- Ovitrampas



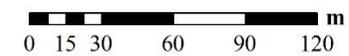
Fonte: Instituto Pereira Passos (2000)
 Organização: Suellen de Oliveira e Bruno M. Carvalho (2013)



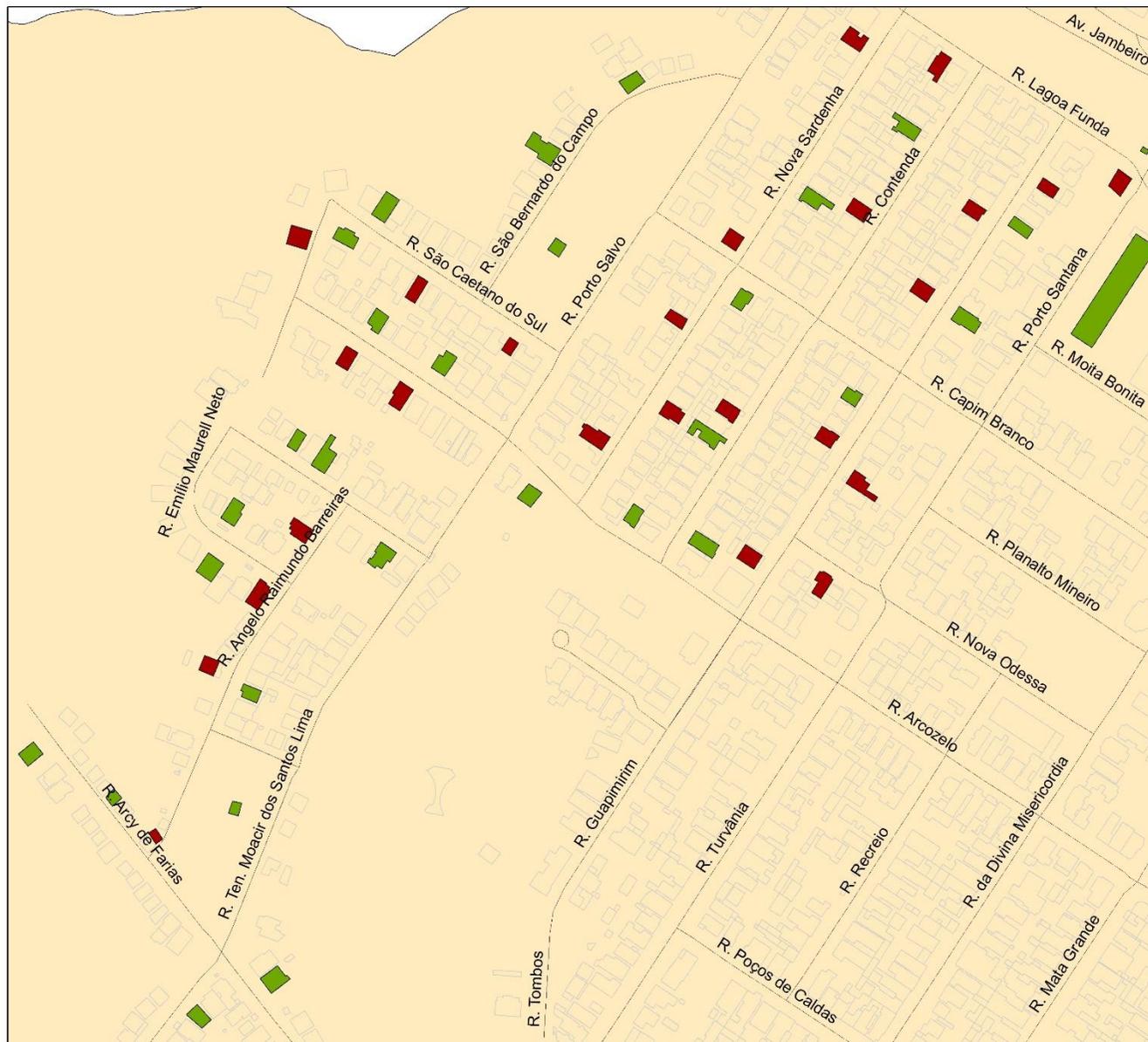
URCA

LEGENDA:

- BGs Sentinelas
- Ovitrampas



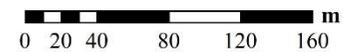
Fonte: Instituto Pereira Passos (2000)
 Organização: Suellen de Oliveira e Bruno M. Carvalho (2013)



VILA VALQUEIRE

LEGENDA:

- BGs Sentinelas
- Ovitrampas



Fonte: Instituto Pereira Passos (2000)
 Organização: Suellen de Oliveira e Bruno M. Carvalho (2013)

Anexo B: Screening da cepa wMel de *W. pipientis*

Reagentes

Squash buffer

0.485g TRIS base MW 121.14

0.149g EDTA MW 372.24

1.169g NaCl MW 58.44

Quantidade para 400 mL de água. Ajustar o pH para 8,3 e autoclavar.

Proteinase K

Proteinase K QIAGEN 10 mL (Cat#:19133) -15mg/mL estoque

Taqman Universal PCR Master Mix

Roche Cat#4304437

Placas Multiwell

- Para extração de DNA: placas de 96 poços (Hard-Shell PCR Plates 96 well WHT/CLR) Cat# HSP9601 – BioRad. 50 unidades.

- Strips of 8 caps. (PCR tube strips Domed 8-cap strips. Cat# TCS0801 – BioRad). 130 unidades.

- Placa para qPCR (ViiA7): MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate with barcode. Applied Biosystem Cat#4306737. 20 unidades.

- Selante das placas de qPCR: MicroAmp Optical Adhesive Film. Applied Biosystem Cat#4311971. 100 unidades.

Primers e sequências das sondas

Ae. aegypti (proteína ribossomal do gene RPS17)

Rps17_FW: 5'-TCCGTGGTATCTCCATCAAGCT-3'

Rps17_RV: 5'-CACTTCCGGCACGTAGTTGTC-3'

Rps17_TaqM_Sonda: 5'-/56-

FAM/CAGGAGGAGGAACGTGAGCGCAG/BHQ_1/3'

wMel (gene WD0513, específico para wMel e não presente em wMelPop-CLA)

TM513_F: 5'-CAAATTGCTCTTGTCCTGTGG-3'

TM513_R: 5'-GGGTGTTAAGCAGAGTTACGG-3'

TM513_TaqM_sonda:

5'/Cy5/TGAAATGGAAAAATTGGCGAGGTGTAGG/3IAbRQSp/3'

Kit de extração DNeasy

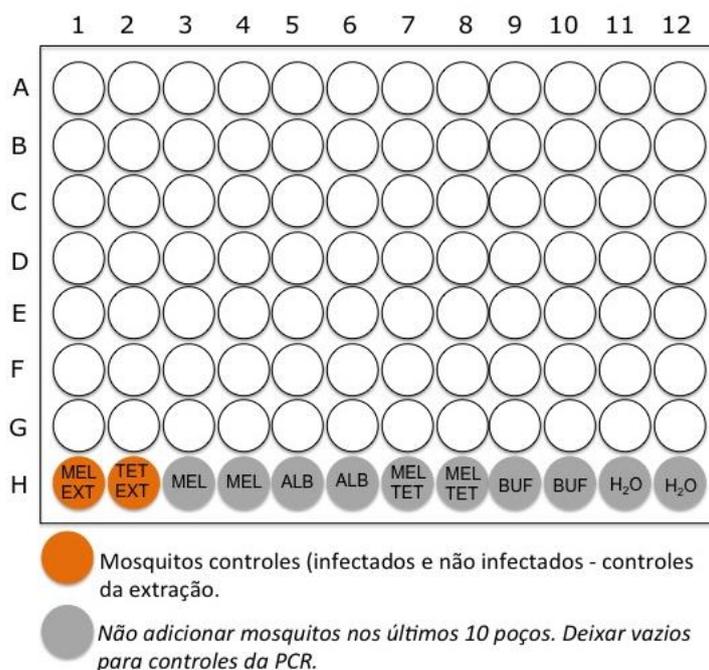
DNeasy Blood and Tissue kit (250) QIAGEN #69506

Distribuição dos mosquitos na placa

Para remoção do álcool, cada mosquito foi lavado em água tipo I e secos em papel absorvente, sendo colocados individualmente em um dos poços da placa. Após manuseio de cada mosquito analisado, a pinça foi lavada com solução de hipoclorito e em água tipo I, em seguida foi seca com papel absorvente.

Controles

Para cada placa, dois mosquitos foram utilizados como controle da extração (poços H1 e H2 da placa, com e sem wMel, respectivamente). Os últimos dez poços de cada placa permaneceram vazios, pois eram destinados aos controles da PCR.



Modelo usado para preencher uma placa de 96 poços. Cada placa inclui 2 controles da extração de DNA e 10 controles da PCR. Controles: um mosquito da linhagem wMEL, um mosquito da linhagem wMEL-TET, duplicata de DNA da linhagem wMEL extraído com kit comercial (qiagen), duplicata

de DNA de *Ae. albopictus* extraído com kit comercial (qiagen), duplicata de DNA da linhagem wMEL-TET extraído com kit comercial (qiagen), duplicata do *squash buffer*, duplicata de água ultra pura.

Extração de DNA

Nas placas foram adicionados 50uL de *squash buffer*, 62,5 µl proteinase K, e uma pérola de vidro estéril em cada poço. Após isso, a placa foi selada com *strips* de plástico e colocada no agitador Beadbeater (Biospec Products) por 90 segundos, para completa maceração. Posteriormente, cada uma das placas foi centrifugada (3000 rpm; 5 min, RT), para retirar o líquido da tampa. Em seguida, cada placa foi transferida para um termociclador Eppendorf (ciclos de incubação: 56°C, 5 min; 98 °C 15 min; e então resfriada a 14 °C). Após este ciclo o DNA encontrava-se extraído. O DNA foi diluído 10x com água para injeção que serviu de *template* para as corridas de qPCR. Após extração, a placa, devidamente identificada, pode ser mantida em geladeira por até 3 dias para a realização da qPCR.

Ensaio com Taqman

Preparação do Master mix (do dia do experimento)

Alíquotas de *primers* (10 µM), sondas (10 µM) e água em quantidade suficiente para 1 placa, foram retiradas do freezer, descongeladas e centrifugadas. As sondas foram mantidas, cuidadosamente, longe da luminosidade, sendo armazenados em tubos envolvidos com papel alumínio e homogeneizadas apenas por inversão do tubo. Em uma banheira autoclavada, o master mix foi preparado, seguindo a listagem abaixo com a quantidade de cada componente:

	Quantidade por poço:
Taqman	7,5 µL
10 µM Fwd/Rev Rps17	0,375 µL
10 µM Rps17_TaqM_Probe-FAM	0,15 µL
10 µM Fwd/Rev TM513	0,45 µL
10 µM 513_TaqM_Probe-Cy5	0,45 µL
H2O	3,25 µL
DNA (adicionado por último)	2 µL

Em cada placa de qPCR de 96 poços, incluindo os controles da PCR, 13 µL de master mix foi adicionado.

Amplificação e detecção

Foram adicionados 2 µL do DNA nos poços apropriados. Em seguida, 2 µL dos controles da PCR foram adicionados e então a placa foi coberta com selante adesivo específico. Tais placas foram centrifugadas por 2 minutos a 1500g, protegidas da luz. Posteriormente foram submetidas a PCR, seguindo as etapas de pré-incubação, amplificação e resfriamento.

Pré-incubação	1 ciclo	50°C	2 min
		95°C	10 min
Amplificação	40 ciclos	95°C	15seg
		60°C	1 min
Resfriamento			

Análise

Primeiramente, para cada PCR, foi verificado se toda a extração e todos os controles estavam corretos, só então a análise dos resultados foi feita observando a amplificação das amostras com os valores de Ct em “Amplification Plot” e as curvas de fluorescência dos dois genes utilizados em “Multicomponent Plot”. Em caso de amplificação duvidosa no gene RPS17, os resultados foram comparados com o controle de *Ae. albopictus* e os controles de *Ae. aegypti*.

Protocolo de extração de DNA usando kit (controles da PCR)

Procedimento: usando homogeneizador elétrico ou pistilo manual

- 1- Coloque até 50mg de mosquito em um microtubo de 1,5mL (*pool* de 5 mosquitos)
- 2- Adicione 180 µL de PBS e homogeneíze as amostras usando *beatbeater*, ou com pistilo manual.
- 3- Adicione 20 µL de proteinase K e 200 µL do Buffer AL (sem álcool adicionado). Agite no vortex e incube a 56°C por 20 minutos.
- 4- Adicione 200 µL de álcool absoluto nas amostras e agite em vortex.

5- Pipete a mistura da etapa 4 (incluindo o precipitado) na coluna do kit acoplada em um tubo de 2mL (fornecido pelo kit). Centrifugue em velocidade superior a 6000 x g (8000rpm) por 1 minuto. Descarte o líquido e o tubo.

6- Coloque a coluna em outro tubo de 2mL (fornecido pelo kit) e adicione 500 µL do Buffer AW1, centrifugue por 1 minuto a 6000 x g (8000rpm). Descarte o líquido e o tubo.

7- Coloque a coluna em outro tubo de 2mL (fornecido pelo kit) e adicionar 500 µL do Buffer AW2, centrifugue por 3 minuto a 20000 x g (14 000rpm) para secar a membrana da coluna. Descarte o líquido e o tubo.

8- Coloque a coluna em um microtubo limpo de 1,5 ou 2mL (não fornecido pelo fabricante) e pipete 200 µL do Buffer AE diretamente na membrana da coluna. Incube a temperatura ambiente por 1 minuto e centrifugue por 1 minuto a 6000 x g (8000 rpm).

