

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO AGGEU MAGALHÃES  
Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde

Diego Felipe Araujo Diniz

AVALIAÇÃO DA DIAPAUSA E QUIESCÊNCIA EM POPULAÇÕES NATURAIS  
DE *Aedes aegypti* E *Aedes albopictus*

RECIFE

2018

Diego Felipe Araujo Diniz

AVALIAÇÃO DA DIAPAUSA E QUIESCÊNCIA EM POPULAÇÕES NATURAIS  
DE *Aedes aegypti* E *Aedes albopictus*

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em  
Biotecnologia e Biotecnologia em Saúde do Instituto  
Aggeu Magalhães da Fundação Oswaldo Cruz, para  
obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Eco-biologia de patógenos,  
vetores e hospedeiros.

Orientadora: Dra. Constância Flávia Junqueira Ayres Lopes

Coorientadora: Dra. Maria Alice Varjal de Melo Santos

RECIFE

2018

**Catálogo na fonte: Biblioteca do Instituto Aggeu Magalhães**

---

D585a     Diniz, Diego Felipe Araujo  
          Avaliação da diapausa e quiescência em populações  
          naturais de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* / Diego  
          Felipe Araujo Diniz. Recife: [s.n.], 2018  
          115 p. : il., graf., tab.; 30 cm

          Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia em  
          Saúde) - Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo  
          Cruz

          Orientadora: Constância Flávia Junqueira Ayres  
          Lopes; Coorientadora: Maria Alice Varjal de Melo Santos

          1. *Aedes* - crescimento e desenvolvimento. 2. *Aedes* –  
          metabolismo. 3. Desenvolvimento Embrionário. 4.  
          Diapausa de Inseto. I. Lopes, Constância Flávia Junqueira  
          Ayres. II. Santos, Maria Alice Varjal de Melo. III. Título.

---

CDU 616.9

Diego Felipe Araujo Diniz

AVALIAÇÃO DA DIAPAUSA E QUIESCÊNCIA EM POPULAÇÕES NATURAIS

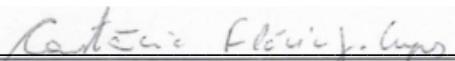
DE *Aedes aegypti* E *Aedes albopictus*

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em  
Biotecnologia e Biotecnologia em Saúde do Instituto  
Aggeu Magalhães da Fundação Oswaldo Cruz, para  
obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Eco-biologia de patógenos,  
vetores e hospedeiros.

Data de aprovação: 29/03/2018

BANCA EXAMINADORA



---

Dra. Constância Flávia Junqueira Ayres Lopes (Orientadora)  
Departamento de Entomologia/IAM/FIOCRUZ



---

Dra. Cláudia Maria Fontes de Oliveira (Titular Interno)  
Departamento de Entomologia/IAM/FIOCRUZ



---

Dr. Gabriel da Luz Wallau (Titular Interno)  
Departamento de Entomologia/IAM/FIOCRUZ



---

Dr. Walter Fabrício Silva Martins (Titular Externo)  
Departamento de Biologia/UEPB



---

Dra. Claudia Rohde (Titular Externo)  
Núcleo de Biologia/CAV-UFPE

*Dedico à minha esposa Klécia Cybelle e minha filha Sarah Raquel*

## AGRADECIMENTOS

Acima de tudo, a Deus que tem me proporcionado força e determinação para completar mais uma etapa da minha vida acadêmica.

Às minhas orientadoras Dra. Constância Ayres e Dra. Alice Varjal que através da orientação das mesmas como estudante de iniciação científica pude dar meus primeiros passos na ciência. Agradeço pelos anos de aprendizado, lapidação das minhas ideias, convívio e principalmente por seus valiosos ensinamentos que me fizeram amadurecer como pesquisador.

À Dra. Tatiany Romão que me introduziu no mundo da Biologia Molecular, ensinando-me com muita dedicação, paciência e atenção. Sua colaboração contribui significativamente no enriquecimento do meu trabalho. Agradeço por sua orientação na construção dos *Primers* associados à diapausa, foi um passo fundamental para o início dos meus experimentos. Agradeço também por sua gentileza e amizade, sem ela muitas coisas desta pesquisa não teriam sido possíveis. Taty, muito obrigado!

Ao Dr. Danilo de Carvalho que me ajudou consideravelmente no processo de padronização da extração de RNA, utilizando ovos de mosquito, visto que até o momento nenhum grupo de pesquisa nacional possuía um protocolo direcionado para tal objetivo. Além disso, agradeço por sua participação na condução dos experimentos de expressão diferencial com a PCR em tempo real.

À doutoranda Morgana Xavier que me ajudou na realização dos experimentos relacionados à quantificação de reservas energéticas. Sem ela com certeza, eu demandaria muito mais tempo na realização deste teste. Também sou grato por sua observação muitas vezes em minhas populações criadas no insetário. Além disso, agradeço também por sua amizade e apoio em todos os momentos que eu precisei.

À Dra. Christina Peixoto e sua aluna de doutorado Maria Eduarda que colaboraram em meu estudo quanto às fotos de microscopia óptica dos ovos de *Aedes* clarificados.

À Dra Cláudia Fontes que aceitou o convite para ser minha parecerista, além das contribuições e incentivo que ela tem me proporcionado desde minha graduação.

À atual Banca Examinadora por aceitar nosso convite.

À Dra. Maria Helena (Chica) e Dra. Cleide Albuquerque que fizeram considerações muito importantes durante a qualificação do meu projeto de tese. Todas as recomendações foram muito válidas e aplicáveis no aperfeiçoamento do meu trabalho.

A Elisângela Dias (Eli) e ao estudante de mestrado Carlos Mendonça que me ajudaram no processo de alimentação sanguínea das gaiolas das diferentes populações de mosquitos através dos camundongos. Agradeço a Carlos também por sua contribuição na montagem do *blackout* dentro do infectório. Sem ele, com certeza eu teria demorado bastante tempo para cumprir essa tarefa que foi imprescindível para o pontapé inicial dos meus experimentos. Agradeço também pelo suporte técnico de ambos e a amizade.

À doutoranda e tecnóloga do Departamento de Entomologia Mônica Crespo pelo suporte que sempre me ofereceu em meio às suas inúmeras atividades. Agradeço, pois através de seu intermédio muitas questões burocráticas foram solucionadas, como a disponibilidade dos camundongos pelo biotério do Instituto Aggeu Magalhães, a liberação do infectório para realização dos testes de indução da diapausa e todas as solicitações que precisei. Mônica, muito obrigado!

À doutoranda Luciana Oliva e Dra. Cleide Albuquerque que aceitaram o desafio de redigir conosco o artigo de revisão sobre quiescência e diapausa. Sem dúvida essa experiência contribuiu significativamente para meu crescimento crítico e intelectual.

Ao funcionário Kleiton de Araújo que é Supervisor Técnico de Manutenção (SATEC) que me ajudou na infraestrutura do infectório, adaptando-o em um ambiente propício para realização dos testes de indução fotoperiódica com a montagem de umidificador e regulação adequada do timer regulador de luz. Kleiton, muito obrigado, sem você meu experimento-base não teria sido executado.

À doutoranda Nathaly Nascimento que no início dos meus experimentos também esclareceu muitas dúvidas práticas na execução dos testes de Biologia Molecular e que fizeram completa diferença em minha execução.

À Dra. Alessandra Albuquerque e Msc. Tatiana Araújo que me forneceram os *primers* de actina-1 que foram utilizados para amplificar o gene utilizado como controle endógeno deste estudo. Agradeço à Dra. Alessandra também sempre pelo suporte que me concedeu, principalmente na eletroforese e esclarecimento das minhas dúvidas. Alê, muito obrigado!

A Elisama Helvecio por sua amizade, por todas as suas sugestões e conselhos direcionadas ao meu estudo, por suas recomendações quanto aos testes de Biologia Molecular e especialmente pela experiência de compartilhar comigo o projeto na Universidade Jean Piaget em Cabo Verde coordenado pela Dra. Constância Ayres e pela Dra. Lara Ferrero Gomez que foi um momento de muito amadurecimento e capacitação profissional.

Ao Dr. Marcelo Paiva por suas sugestões e pelo suporte que nos concede, representando muitas vezes a minha orientadora Constância Ayres sempre que precisei.

À Dra. Duschinka Guedes que também sempre esclareceu minhas dúvidas sempre que eu necessitei e pela paciência de compartilhar comigo o infectório, pois muitas vezes precisei utilizar o espaço que foi destinado à pesquisa que estava sob sua responsabilidade. Obrigado!

À Dra. Ana Paula de Araújo que sempre esteve disposta a me ajudar desde a graduação, momento que me ensinou com muito profissionalismo tudo que tem feito diferença em minha formação hoje. Paulinha, muito obrigado!

À técnica do insetário Ana Lúcia por sua disponibilidade de sempre me fornecer as amostras de ovos, pupas ou mosquitos quando precisei. Ana obrigado por sua gentileza e amizade.

À técnica do insetário Conceição que sempre foi muito gentil e prestativa para comigo. Sempre me ajudou em tudo que eu precisei e, muitas vezes, pôde executar algumas das minhas atividades com excelência, Ceça, muito obrigado!

A todos profissionais do Departamento de Entomologia do Instituto Aggeu Magalhães que contribuíram de forma direta ou indireta no meu trabalho.

À minha mãe que sempre foi um suporte na minha vida educacional e acadêmica, sem ela, com certeza, eu não teria chegado nem no meio da minha trajetória.

À minha esposa Klécia que aceitou o desafio de casar-se com um estudante de doutorado recém-ingresso. Agradeço pela compreensão, paciência em muitos finais de semana e feriados que estive ausente trabalhando. Agradeço pelo apoio e por ela sempre estar cuidando muito bem de mim.

À Pós-graduação que me propiciou disciplinas excelentes que aperfeiçoaram meu senso crítico dentro de muitas abordagens e isso contribuiu na execução do meu estudo.

À Secretaria Acadêmica (SEAC), em especial a Semente, Janice e Dete que sempre me deram suporte em tudo que precisei.

À professora Dra. Paloma Medeiros da UFPE, pelo seu incentivo em todos os momentos, por sua amizade e confiança de me aceitar no estágio a docência das disciplinas de Histologia e Embriologia do CB-UFPE.

Aos Professores e pesquisadores que me convidaram para ser membro titular/suplente de bancas examinadoras de seus respectivos alunos de graduação. Com certeza isso contribuiu no meu amadurecimento e aprendizado como profissional. Agradeço a confiança de todos.

À doutoranda Suzane Alves e Dra. Rosângela Barbosa que gentilmente me forneceram amostras de ovos de *Aedes albopictus* de Pernambuco, oriundos de São Lourenço da Mata.

À Dra. Norma Machado da UFSC que através do DIVE-SC nos enviou amostras de *Aedes aegypti* provenientes de Santa Catarina.

Ao grupo de Pesquisas da Universidade Jean Piaget e o grupo de Pesquisas da Suíça que mantêm parcerias consolidadas com o Departamento de Entomologia do IAM que nos forneceram amostras de ovos de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*, respectivamente.

A Clara Sidônia (Clarinha), secretária do Departamento de Entomologia, por sua gentileza, boa vontade e constante ajuda em tudo que nós precisamos. Clarinha, muito obrigado!

À CAPES pelo suporte financeiro.

E por último e não menos importante à minha família e amigos que sempre torceram por meu crescimento profissional. A todos, muito obrigado!

“Não sei se a vida é curta ou longa para nós,  
mas sei que nada do que vivemos tem sentido, se não tocarmos o coração das pessoas”

**Cora Coralina**

DINIZ, Diego Felipe Araujo. **Avaliação da Diapausa e Quiescência em Populações Naturais de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus***. 2018. Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2018.

## RESUMO

Embriões de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* podem persistir dormentes no ambiente muito tempo, através da diapausa e/ou quiescência. Tais mecanismos foram investigados neste estudo utilizando populações de *Ae. aegypti* de Santa Catarina-Brasil e Praia-Cabo Verde; e de *Ae. albopictus* de Pernambuco-Brasil e Ticino-Suíça. Pupas fêmeas destas populações foram submetidas à mudança fotoperiódica e baixa temperatura para induzir à diapausa e os ovos ao estresse hídrico para induzir à quiescência. Parâmetros biológicos como embriogênese, incidência da diapausa (ID), eclosão larvária, potencial reprodutivo, tempo de emergência e reservas lipídicas foram analisados. Além disso, foi avaliada por qRT-PCR a expressão diferencial de cinco genes associados à diapausa - Pepck, IGF, Catepsina, Transferrina e Lipase. Os resultados confirmaram que *Ae. aegypti* não entra em diapausa. A taxa de embriogênese foi acima de 90% para todas as populações. Os únicos grupos induzidos que entraram em diapausa foram *Ae. albopictus* Ticino e Pernambuco, com respectivas ID de 90% e 33%. Praia e Pernambuco tiveram uma redução considerável na fecundidade, possivelmente associada à exposição às condições de estresse para diapausa. Por outro lado, a fertilidade não foi alterada em nenhum grupo estudado. A emergência dos induzidos durou até sete dias e o controle três dias. Em todos os grupos induzidos, foi identificada maior quantidade de lipídeos, sobretudo nas populações de *Ae. albopictus*. Todos os genes foram diferencialmente expressos nas populações induzidas à diapausa em relação ao controle. No entanto, apenas a Lipase e o IGF foram associados à diapausa. Nosso estudo demonstrou alta variação genética nas populações para estes traços, associados ao sucesso evolutivo das duas espécies, e traz informações que poderão ser utilizadas no desenvolvimento de novas ferramentas para o controle vetorial de *Aedes* spp.

**Palavras-chave:** Genética. Desenvolvimento embrionário. Metabolismo. Diapausa de Inseto.

DINIZ, Diego Felipe Araujo. **Evaluation of Diapause and Quiescence in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* Field Populations.** 2018. Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Aggeu Magalhães Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Recife, 2018.

## ABSTRACT

Embryos of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* can remain for a long time in the environment due to their ability to become dormant through diapause or quiescence. These mechanisms were investigated using mosquito populations from *Aedes aegypti* - Brazil and Cape Verde; and *Ae. albopictus* from Brazil and Ticino. Female pupae of the populations were submitted to photoperiodic change and low temperature to induce diapause, whereas the eggs were submitted to water stress to induce quiescence. Biological parameters involved with embryonic dormancy - embryogenesis, diapause incidence (DI), larval hatching, reproductive potential, emergency time and, lipid reserve were analyzed. In addition, the differential expression profile of five diapause-associated genes - Pepck, IGF, Cathepsin, Transferrin and Lipase was assessed through qRT-PCR. The results confirmed that *Ae. aegypti* does not go into diapause. The embryogenesis rate was above 90% in all populations. The only induced groups that entered in diapause were Ticino and Pernambuco, with respective DI of 90% and 33%. Praia (*Ae. aegypti*) and Pernambuco (*Ae. albopictus*) had a considerable reduction in fecundity, possibly caused by the exposure to stress conditions. On the other hand, the fertility was not altered in any studied group. The emergency time of the induced groups lasted up until seven days, whereas in the control ones were three days. In all the induced groups a large amount of lipids was identified, especially in the *Ae. albopictus* populations. All genes were differentially expressed in diapause-induced populations compared to the control. However, only lipase and IGF were associated with diapause. Our study also demonstrated high genetic variation in the populations for these traits associated with the evolutionary success of both species and could bring useful information in the development of new tools for vector control.

**Key words:** Genetics. Embryonic development. Metabolism. Insect Diapause.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Distribuição global de <i>Aedes aegypti</i>	23
<b>Figura 2</b> – Distribuição global de <i>Aedes albopictus</i>	24
<b>Figura 3</b> – Diferenças externas entre os mosquitos <i>Aedes aegypti</i> e <i>Aedes albopictus</i> ..	24
<b>Figura 4</b> – Ciclo de vida dos mosquitos <i>Aedes sp.</i>	25
<b>Figura 5</b> – Microscopia eletrônica evidenciando diferenças externas entre os ovos dos mosquitos <i>Aedes aegypti</i> (1a-e) e <i>Aedes albopictus</i> (2a-e)	27
<b>Figura 6</b> – Membranas extra-embriônicas e embrião dos mosquitos <i>Aedes sp.</i>	27
<b>Figura 7</b> - Fluxograma esquemático da formação das principais estruturas na embriologia de mosquitos	29
<b>Figura 8</b> – Fluxograma esquemático da indução e reversão da diapausa embrionária em mosquitos.	36
<b>Figura 9</b> – Fluxograma esquemático da indução e reversão da quiescência em ovos de mosquitos.	43
<b>Figura 10</b> – Armadilha de oviposição (ovitrampa) para coleta de ovos de <i>Aedes sp.</i> nas diferentes áreas analisadas neste estudo	60
<b>Figura 11</b> - Instalações do insetário do IAM/Fiocruz-PE para o estabelecimento e manutenção de populações naturais de <i>Aedes sp</i>	61
<b>Figura 12</b> - Representação do processo de alimentação sanguínea das fêmeas de <i>Aedes sp.</i> em camundongos <i>Mus musculus</i> .	62
<b>Figura 13</b> – Clarificação de ovos de <i>Aedes sp.</i> para verificação da embriogênese	63
<b>Figura 14</b> – Microscopia óptica do embrião de mosquitos de <i>Aedes sp.</i> após clarificação dos ovos	71
<b>Figura 15</b> – Visualização dos ovos não embrionados de mosquitos <i>Aedes sp.</i>	71
<b>Figura 16</b> – Eletroforese da amplificação dos fragmentos referentes aos genes associados à diapausa e controle endógeno em amostras de ovos, larvas e mosquitos <i>Ae. aegypti</i> e <i>Ae. albopictus</i>	77

## LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1** – Fecundidade das fêmeas de mosquitos *Ae. aegypti* e *Ae albopictus* dos grupos controle e induzidos à diapausa provenientes das diferentes áreas estudadas. 72
- Gráfico 2** – Curva-padrão para quantificar lipídeos das populações estudadas 75
- Gráfico 3** – Quantificação de lipídeos em ovos de *Aedes sp.* das populações estudadas 75
- Gráfico 4** – Quantificação de lipídeos de fêmeas de *Aedes sp.* das populações estudadas. 76
- Gráfico 5** – Análise de expressão diferencial de genes relacionados à diapausa em ovos das populações de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* por qRT-PCR. 78

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1</b> – Diapausa embrionária em diferentes espécies de mosquitos.	38
<b>Quadro 2</b> - Diapausa larvária em diferentes espécies de mosquitos.	39
<b>Quadro 3</b> - Diapausa reprodutiva em fêmeas de diferentes espécies de mosquitos.	41
<b>Quadro 4</b> – quiescência em embriões de diferentes espécies de mosquitos	45
<b>Quadro 5</b> – Funções dos genes selecionados com a diapausa embrionária em populações de <i>Aedes sp.</i>	66

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1-</b> Incidência da diapausa, taxa de embriogênese e taxa de eclosão em ovos das populações de <i>Ae. aegypti</i> e <i>Ae. albopictus</i> induzidas e não induzidas à diapausa.	70
<b>Tabela 2-</b> Tempo de Emergência de fêmeas induzidas e não induzidas à diapausa das populações estudadas	73

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>Ae.</i>	<i>Aedes</i>
<i>An.</i>	<i>Anopheles</i>
<b>CHIKV</b>	Vírus Chikungunya
<b>CHS</b>	Gene quitina sintase
<i>Cx.</i>	<i>Culex</i>
<b>CV</b>	Cabo Verde
<b>CT</b>	Ciclo threshold
<b>DENV</b>	Vírus Dengue
<b>DI</b>	Diapause incidence
<b>E</b>	Taxa de embriogênese
<b>FAS / FAU</b>	Febre Amarela Silvestre / Febre Amarela Urbana
<b>FIOCRUZ</b>	Fundação Oswaldo Cruz
<b>IAM</b>	Instituto Aggeu Magalhães
<b>FUNASA</b>	Fundação Nacional de Saúde
<b>H</b>	Taxa de eclosão larvária
<b>HJ</b>	Hormônio Juvenil
<b>ID</b>	Incidência de diapausa
<b>Kb</b>	Quilobase
<b>L</b>	Leste
<b>L<sub>(1,2,3,4)</sub></b>	Larvas de primeiro, segundo, terceiro e quarto estágio
<b>N</b>	Norte
<b>O</b>	Oeste
<b>PNCD</b>	Programa Nacional de Controle da Dengue
<b>PE</b>	Pernambuco
<b>PR</b>	Praia
<b>PCR</b>	Reação em cadeia da Polimerase
<b>RT</b>	Transcrição Reversa
<b>q</b>	Quantitativa
<b>QTL</b>	Quantitative trait locus
<b>S</b>	Sul
<b>SC</b>	Santa Catarina

<b>SDC</b>	Segmentações do corpo
<b>T-S</b>	Ticino-Suíça
<b>UEPB</b>	Universidade Estadual da Paraíba
<b>UFPE</b>	Universidade Federal de Pernambuco
<b>YFV</b>	Yellow Fever Virus
<b>Wy</b>	<i>Wyeomyia</i>

## LISTA DE SÍMBOLOS

®	Marca registrada
©	Copyright (direitos autorais)
mg	Miligramas
°C	Graus celsius
μL	Microlitros
Δt	Intervalo de tempo
=	Sinal matemático de igualdade
+	Sinal matemático de soma
__ ou /	Sinal matemático de divisão
U	Quantidade de molécula em determinado volume
mM	Milimolar
nm	Nanômetros
ng	Nanogramas
TM	Trade Mark (Marca comercial)
h	horas
n°	número

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	21
<b>2 MARCO TEÓRICO CONCEITUAL</b>	23
<b>2.1 Bioecologia de <i>Aedes aegypti</i> Linnaeus, 1762 e <i>Aedes albopictus</i> (Skuse, 1894)</b>	23
<b>2.2 Características gerais de ovos dos mosquitos <i>Aedes sp.</i></b>	26
<b>2.3 Embriogênese de mosquitos <i>Aedes sp.</i></b>	28
<b>2.4 Dormência embrionária em <i>Aedes sp.</i></b>	31
2.4.1 Diapausa	32
2.4.1.1 <i>Diapausa embrionária</i>	36
2.4.1.2 <i>Diapausa em estádios larvais</i>	37
2.4.1.3 <i>Diapausa em adultos</i>	39
2.4.2 Quiescência	42
<b>2.5 Eclosão larvária</b>	49
<b>2.6 Importância epidemiológica de <i>Aedes aegypti</i> e <i>Aedes albopictus</i></b>	50
2.6.1 <i>Aedes aegypti</i>	50
2.6.2 <i>Aedes albopictus</i>	52
<b>2.7 Controle populacional de <i>Aedes sp.</i></b>	53
<b>3 JUSTIFICATIVA</b>	55
<b>4 PERGUNTA CONDUTORA</b>	56
<b>5 HIPÓTESE</b>	57
<b>6 OBJETIVOS</b>	58
<b>6.1 Objetivo Geral</b>	58
<b>6.2 Objetivos Específicos</b>	58
<b>7 MATERIAIS E MÉTODOS</b>	59
<b>7.1 Coleta das populações de <i>Ae. aegypti</i> e <i>Ae. albopictus</i></b>	59
7.1.1 <i>Aedes aegypti</i>	59
7.1.2 <i>Aedes albopictus</i>	59
<b>7.2 Estabelecimento e manutenção das populações</b>	60
<b>7.3 Indução do processo de diapausa e quiescência em ovos de <i>Aedes sp</i></b>	61
<b>7.4 Embriogênese, incidência da diapausa e taxa de eclosão larvária das populações</b>	62

<b>7.5 Potencial reprodutivo das fêmeas induzidas e não induzidas à diapausa</b>	63
<b>7.6 Tempo de Emergência das fêmeas induzidas e não induzidas à diapausa</b>	63
<b>7.7 Quantificação das reservas lipídicas de embriões (ovos) e fêmeas induzidos e não induzidos à diapausa</b>	64
7.7.1 Curva padrão de reserva lipídica	64
7.7.2 Preparação dos homogenatos, extração e quantificação das reservas lipídicas	64
<b>7.8 Análise da amplificação de transcritos dos genes relacionados à diapausa</b>	65
7.8.1 Extração de RNA	65
7.8.2 Transcrição Reversa e PCR	66
<b>7.9 Análise da expressão diferencial de transcritos de genes relacionados à diapausa por qRT-PCR</b>	67
<b>7.10 Desenho experimental e análises estatísticas</b>	68
<b>8 RESULTADOS</b>	69
<b>8.1 Embriogênese, incidência da diapausa e taxa de eclosão larvária das populações</b>	69
<b>8.2 Potencial reprodutivo das fêmeas induzidas e não induzidas à diapausa</b>	71
<b>8.3 Tempo de Emergência das fêmeas induzidas e não induzidas à diapausa</b>	72
<b>8.4 Quantificação das reservas lipídicas dos embriões e fêmeas induzidos e não induzidos à diapausa</b>	74
<b>8.5 RT-PCR dos genes relacionados a diapausa embrionária</b>	74
<b>8.6 Análise de expressão diferencial de genes relacionados à diapausa por qRT-PCR</b>	74
<b>9 DISCUSSÃO</b>	79
<b>10 CONCLUSÕES</b>	85
<b>REFERÊNCIAS</b>	86
<b>APÊNDICE A – Sequências dos <i>primers</i> utilizados para amplificação de genes associados à diapausa</b>	99
<b>APÊNDICE B – Protocolo para utilização de camundongos</b>	101
<b>APÊNDICE C – Artigo de revisão publicado (2017)</b>	102

## 1 INTRODUÇÃO

*Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* são mosquitos amplamente distribuídos no mundo. Estes apresentam características bioecológicas específicas, dependendo da área geográfica na qual estão inseridos. Essas espécies possuem grande importância médica, apresentando competência vetorial para diversos vírus como da Febre Amarela (YFV), Dengue (DENV), Chikungunya (CHIKV) e Zika (ZIKV). Embora atualmente haja vacinas para imunizar populações humanas contra febre amarela e dengue, o controle vetorial continua sendo a medida mais efetiva para prevenir surtos epidêmicos destas doenças.

Entre as ações empregadas no Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD) para reduzir a densidade populacional das espécies supracitadas, destaca-se o controle com inseticidas químicos e/ou biológicos, destinados à eliminação das formas jovens (larvas e pupas) nos criadouros ou das formas adultas do mosquito. Os ovos de *Aedes* spp., como por exemplo, do mosquito *Ae. aegypti*, não são sensíveis à maioria dos inseticidas convencionais utilizados em campo, e podem permanecer viáveis por tempo prolongado mesmo na ausência de água, persistindo nos ambientes e áreas tratadas. Essas características somadas ao comportamento de oviposição em saltos (*skip oviposition*) das fêmeas, isto é, a distribuição de grupos de ovos de um mesmo ciclo gonadotrófico em criadouros diferentes, são de extrema importância, pois representam características que contribuem para permanência e dispersão da espécie. Tais adaptações dos mosquitos dificultam a efetividade das ações de controle vetorial.

A dormência embrionária é o processo fisiológico que confere viabilidade prolongada nos indivíduos diante de condições abióticas adversas. Existem duas modalidades de dormência embrionária em mosquitos: a diapausa e a quiescência. Essas características biológicas são fenômenos distintos, embora apresentem o mesmo efeito – a não eclosão larvária. Estes traços são independentes e podem ocorrer ao mesmo tempo numa mesma espécie.

A quiescência é caracterizada pelo retardo do metabolismo, resultante do impacto direto de condições ambientais adversas. O processo se dá quando o embrião (*pharate larvae*) já formado no ovo recebe a influência de um estímulo externo, como por exemplo, a diminuição brusca da umidade no meio ou intenso aumento da temperatura, os quais sinalizam condições desfavoráveis no ambiente que impossibilitam o processo de eclosão da larva. Neste caso, o embrião mesmo dormente é sensível ao estímulo de eclosão quando há normalização abiótica, cujo contato com a água induz a rápida eclosão larvária. A diapausa,

por outro lado, é geneticamente programada, um processo bem mais complexo. Esta característica está possivelmente associada ao contexto de história de vida das espécies oriundas de localidades que apresentam condições desfavoráveis marcadas sazonalmente. A principal diferença entre quiescência e diapausa é que nesta última o embrião formado permanece dormente e refratário aos estímulos ambientais e conseqüentemente não ocorre eclosão larvária ainda que sejam dadas condições ótimas de sobrevivência. Desta forma, é preciso que antes o processo seja finalizado a nível molecular para que os indivíduos dormentes respondam novamente às sinalizações do meio.

A quiescência está presente tanto em *Ae. aegypti* quanto em *Ae. albopictus*, no entanto, a literatura tem reportado que a diapausa não se manifesta em *Ae. aegypti*, embora não haja até o momento estudos que comprovem a não existência do fenômeno experimentalmente. Já o mosquito *Ae. albopictus* é um modelo excelente para o estudo da diapausa, pois existem populações bem adaptadas tanto em áreas temperadas como em áreas tropicais. Isso permite comparar, a expressão de genes envolvidos neste processo em diferentes populações naturais. Os principais genes que têm sido reportados como protagonistas do processo diapáusico são aqueles que expressam produtos envolvidos com funções metabólicas basais do mosquito e a expressão diferencial destes genes em condições de estresse pode gerar um custo energético para as populações naturais.

Assim, considerando a grande importância da diapausa em ovos, no sucesso evolutivo e ecológico das espécies de *Aedes*, este trabalho teve como propósito identificar em populações naturais de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* o perfil de expressão de alguns genes associados à diapausa e o possível custo biológico resultante da mudança metabólica dos mosquitos em consequência da indução à diapausa.

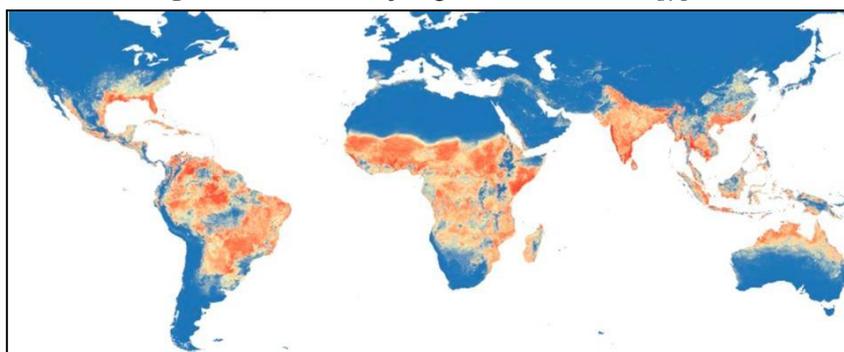
## 2 MARCO TEÓRICO CONCEITUAL

### 2.1 Bioecologia de *Aedes aegypti* Linnaeus, 1762 e *Aedes albopictus* (Skuse, 1894)

Os mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* pertencem à família Culicidae, são morfologicamente caracterizados como mosquitos de médio porte, coloração escura, com escamas brancas ou branco-prateadas, distribuídas no corpo e nas patas (FORATTINI, 1962).

*Ae. aegypti*, popularmente referido como “mosquito da dengue”, é originário da África, entretanto se dispersou rapidamente para outros países das regiões tropical e subtropical (KRAEMER et al., 2015), sendo hoje, considerada uma espécie cosmopolita (Figura 1). No Brasil, *Ae. aegypti* está presente desde o período colonial, e na década de 1930 já ocupava uma considerável área do território nacional e atualmente pode ser encontrado em todos os estados brasileiros (BRASIL, 2003; CONSOLI; LOURENÇO DE OLIVEIRA, 1994). *Ae. aegypti* está bem adaptado às áreas urbanas, em locais próximos ao domicílio humano, onde consegue dar continuidade ao seu ciclo biológico de forma bem sucedida. Uma das características importantes a nível taxonômico, que distingue o mosquito *Ae. aegypti* de outros do gênero *Aedes* é que suas escamas torácicas formam um desenho em forma de lira (FORATTINI, 1962).

**Figura 1** – Distribuição global de *Aedes aegypti*.



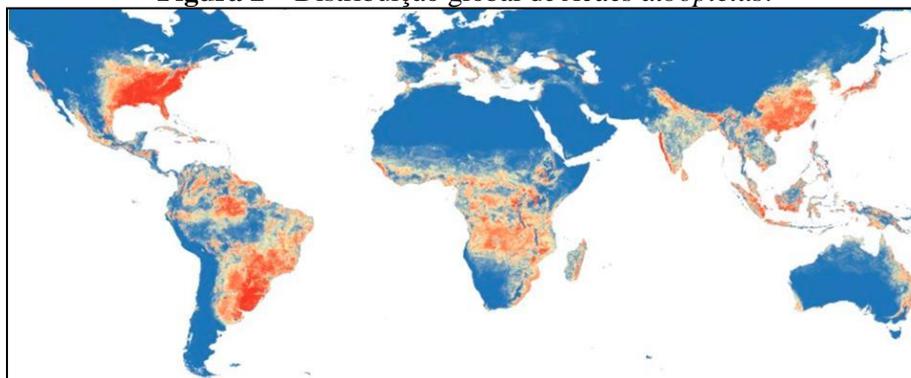
**Fonte:** Kraemer et al. (2015)

**Nota:** a cor vermelha no mapa representa os locais onde o mosquito foi identificado.

*Ae. albopictus*, popularmente conhecido como “tigre asiático”, é um mosquito originário de florestas tropicais do sudeste asiático considerado uma espécie silvestre e com potencial invasor maior do que *Ae. aegypti* que, por sua vez, predomina em áreas urbanas (LOUNIBOS; ESCHER; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 2003). *Ae. albopictus*, nas três últimas décadas, se expandiu consideravelmente para diversos países (Figura 2) nas Américas

(da Argentina aos Estados Unidos), na África Central (Nigéria, Camarões, Guiné Equatorial e Gabão), na Europa (Itália, Suíça e outros), em ilhas nos oceanos Pacífico e Índico e no continente australiano (PESSOA et al., 2013). No Brasil, foi identificado em 1986 no estado do Rio de Janeiro (BRASIL, 2001) e os únicos estados que até o ano de 2008 não tinham registros de *Ae. albopictus* eram: Acre, Amapá, Piauí e Sergipe (PESSOA et al., 2013). Muitos aspectos da sua biologia são semelhantes aos do mosquito *Ae. aegypti*, havendo algumas particularidades na morfologia externa (Figura 3) e no comportamento que os diferenciam. *Ae. albopictus* apresenta uma maior plasticidade adaptativa porque ocorre naturalmente e de maneira bem sucedida tanto em áreas de clima temperado, como tropical (KNUDSEN, 1995).

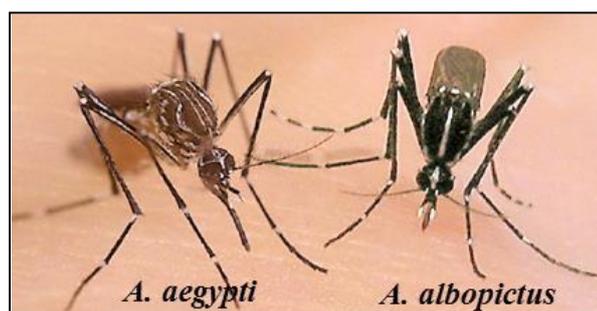
**Figura 2** – Distribuição global de *Aedes albopictus*.



**Fonte:** Kraemer et al. (2015)

**Nota:** a cor vermelha no mapa representa os locais onde o mosquito foi identificado.

**Figura 3** - Diferenças externas entre os mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*.

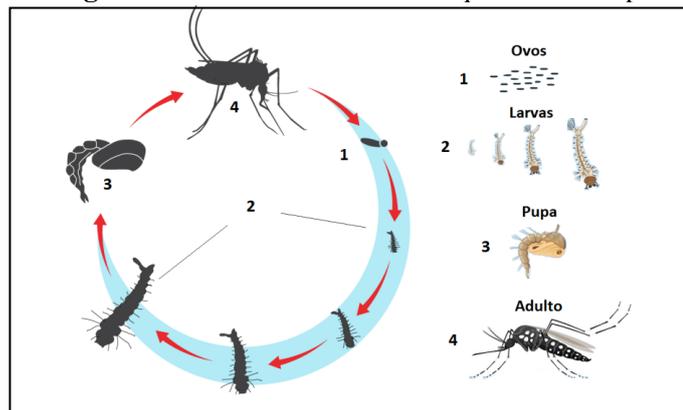


**Fonte:** Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz (2010)

Mosquitos se desenvolvem por meio da holometabolia, isto é, metamorfose completa (Figura 4), apresentando um ciclo de vida pré-imaginal até a fase adulta variando de 10 a 30 dias, composto pelas fases de ovo, larva, pupa e adulto (BESERRA et al., 2009; FORATTINI, 1962). A fêmea de *Ae. aegypti* se alimenta, preferencialmente, de sangue humano, sendo, portanto altamente antropofílica enquanto *Ae. albopictus* é predominantemente zoofílica. São

espécies diurnas cujos picos de atividade hematofágica acontecem durante os crepúsculos matutinos e vespertinos (CONSOLI; LOURENÇO DE OLIVEIRA, 1994). A fêmea pode realizar diversos repastos sanguíneos para produzir ovos do mesmo ciclo gonadotrófico, embora levem de 48 a 72 horas para digerir a alimentação. Este processo é fundamental para o desenvolvimento e maturação dos ovócitos e subsequente produção dos ovos (CLEMENTS, 1992).

**Figura 4** – Ciclo de vida dos mosquitos *Aedes* sp.



Fonte: Oliveira (2018).

As fêmeas depositam os ovos nas paredes internas de diferentes locais/estruturas/recipientes preenchidos com água, pouco acima da linha de contato com a água. Estes locais de oviposição onde ocorre o desenvolvimento das fases imaturas (larvas e pupas) são denominados de criadouros (FORATTINI, 1962). Os criadouros podem ser naturais (bromélias, tronco oco de árvores, bambus, cascas de frutas e axilas das folhas) ou artificiais como pneus abandonados, vasos de plantas, calhas, garrafas, reservatórios de água potável (caixas d'água, tonéis, tanques e cisternas), e quaisquer resíduos sólidos capazes de acumular água. Uma característica comum a muitos deles é a sua transitoriedade de permanência funcional nos ambientes, e, portanto, são denominados criadouros temporários, com exceção dos já referidos reservatórios de água potável (FORATTINI, 1962).

O comportamento de oviposição tem início quando a fêmea identifica um ou mais criadouros propícios no ambiente e distribui em grupos os ovos, maturados em um mesmo ciclo gonadotrófico, depositando-os individualmente em mais de um criadouro, comportamento conhecido como oviposição em saltos (REITER, P.; GUBLER, 1997). O desenvolvimento do embrião dura de dois a três dias, dependendo das condições de temperatura e umidade do meio (CONSOLI; LOURENÇO DE OLIVEIRA, 1994).

Em condições adversas, estes ovos podem entrar em dormência e permanecerem viáveis no ambiente por um período superior a um ano (SILVA; SILVA, 1999). Este

comportamento é de considerável importância para o controle desta espécie, uma vez que, representam seu principal mecanismo de permanência e dispersão no ambiente (CONSOLI; LOURENÇO DE OLIVEIRA, 1994; CROVELLO; HACKER, 1972; DINIZ et al., 2017).

O contato direto ou mesmo indireto com a água gera o estímulo que sinaliza a condição favorável para a eclosão das larvas. No ambiente aquático, as larvas se alimentam de partículas em suspensão na água, por filtração. O desenvolvimento larvário está compreendido por quatro estádios sucessivos de crescimento (L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub>, L<sub>3</sub> e L<sub>4</sub>), caracterizado pela muda do exoesqueleto (ecdise) (CONSOLI; LOURENÇO DE OLIVEIRA, 1994).

## 2.2 Características gerais de ovos dos mosquitos *Aedes sp.*

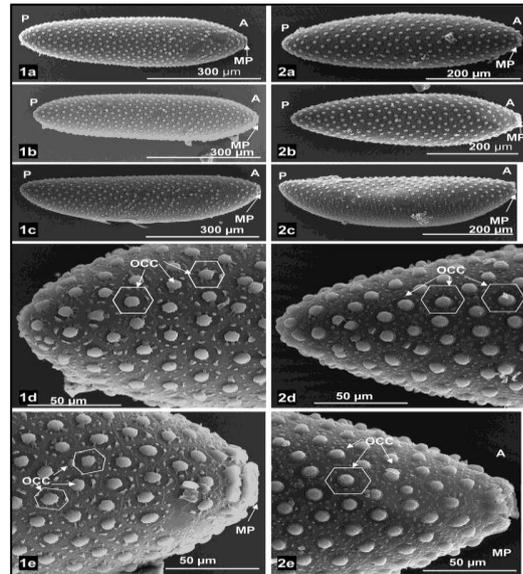
Os ovos de *Aedes sp.* são externamente alongados, de simetria bilateral, enegrecidos, ligeiramente achatados e afunilados em direção a extremidade micropilar. Além disso, os ovos apresentam no exocóron estruturas (manchas brancas), que servem para fixá-los no substrato durante a oviposição (CHRISTOPHERS, 1960). Há algumas peculiaridades externas na superfície dos ovos dos mosquitos *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* (Figura 5), visualizadas em microscopia eletrônica de varredura, que os diferenciam e separam estes mosquitos a nível de espécie (LINLEY, 1989; SUMAN et al., 2011).

Os ovos de *Aedes sp.* internamente (abaixo da casca) têm caracteres gerais (Figura 6) comuns aos ovos de outros insetos (FORATTINI, 1962; CLEMENTS, 1992). Antes da fertilização do óvulo, há resquícios de células rodeadas por um revestimento, denominado córion, formado a partir do epitélio folicular dessa célula germinativa. O córion apresenta uma camada externa, denominada exocóron e uma camada interna, o endocóron, que juntos formam a casca do ovo. O exocóron é uma membrana delicada, incolor e ligeiramente transparente, é facilmente danificada quando o ovo é recém-posto. Já o endocóron é uma membrana densa e mais resistente, a qual é responsável pela morfologia e a rigidez do ovo (CHRISTOPHERS, 1960).

Dentro do endocóron e em torno do embrião há outra membrana hialina muito fina, denominada serosa a qual vai secretar a cutícula serosa, que por sua vez vai ser a terceira membrana extra-embrionária (CLEMENTS, 1992), estrutura que promove resistência à dessecação, ou seja, impede que a haja perda de água do embrião para o meio (REZENDE et al., 2008). Essa membrana extra-embrionária possui em sua composição quitina e lipídeos que promovem a impermeabilização do ovo, protegendo o embrião de perdas de componentes internos e, conseqüentemente, proporcionando uma viabilidade prolongada (JACOBS et al.,

2013). Quando os ovos são depositados no ambiente, são permeáveis à água, que é absorvida, fazendo esses aumentarem seu volume antes de desenvolverem uma casca escura e rígida, ainda durante a embriogênese (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; JACOBS et al., 2013).

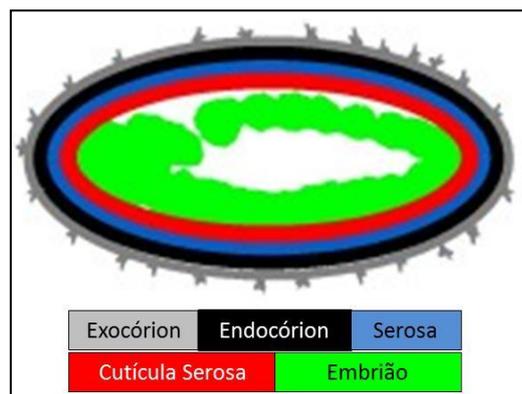
**Figura 5** – Microscopia eletrônica evidenciando diferenças externas no exocórior de ovos dos mosquitos *Aedes aegypti* (1a-e) e *Aedes albopictus* (2a-e).



**Fonte:** Suman et al. (2011)

**Nota:** As figuras **a**, **b**, **c** mostram as superfícies dorsal, ventral e lateral dos ovos, respectivamente. As figuras **d** e **e** mostram a região posterior e anterior da superfície ventral dos ovos, respectivamente. **A** = extremidade anterior; **P** = extremidade posterior **OCC** = célula coriônica externa; **MP** = micrópila.

**Figura 6** – Membranas extra-embriônicas e embrião dos mosquitos *Aedes* sp.



**Fonte:** O autor, adaptado de Rezende et al. (2008).

No entanto, é muito importante destacar que quando os ovos são depositados no ambiente é necessário que haja umidade suficiente em um período de pelo menos 24 horas para que a embriogênese seja de fato concluída. É provável que a resistência ao estresse hídrico

ocorra devido à impermeabilização promovida pelas membranas extra-embrionárias do ovo 24 horas após a oviposição (CHRISTOPHERS, 1960).

### 2.3 Embriogênese de mosquitos

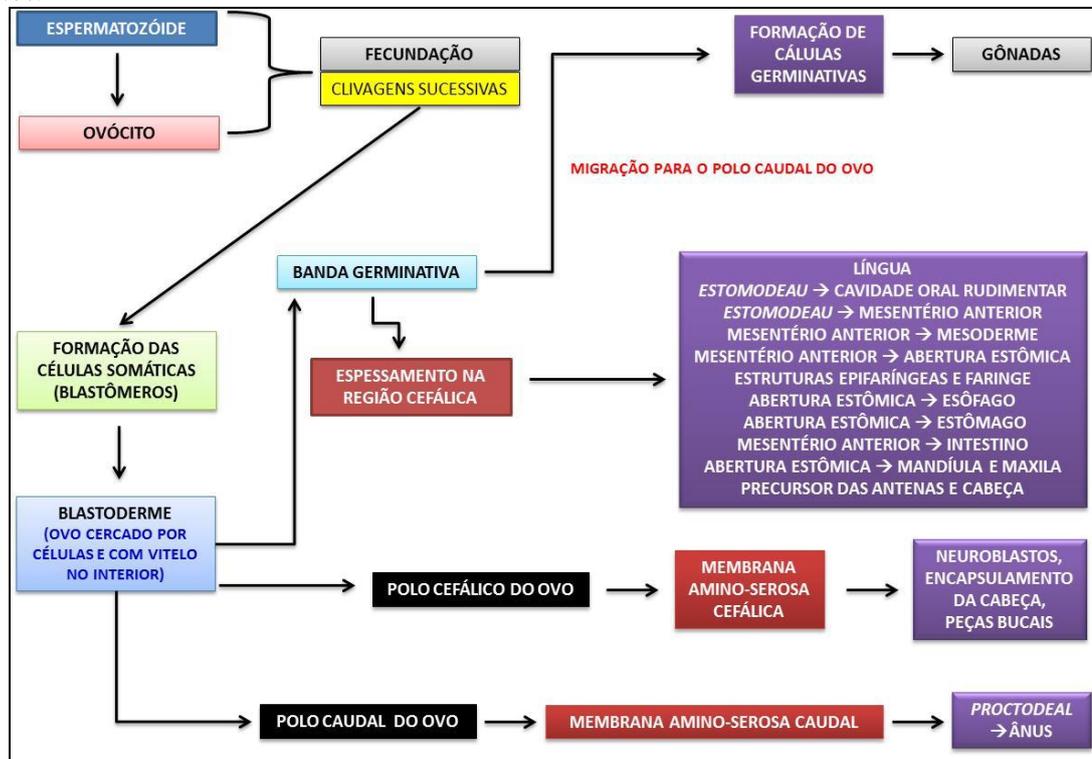
A embriogênese, no contexto dos artrópodes, pode ser definida como o conjunto de mudanças no desenvolvimento do indivíduo (no interior do ovo) que ocorrem a partir da fecundação do ovócito até a eclosão da larva ou da ninfa (CHRISTOPHERS, 1960).

O desenvolvimento embrionário é muito influenciado pela temperatura e umidade do meio em que o ovo foi depositado. Cada etapa deste processo foi baseada inicialmente em estudos embriogênicos do organismo modelo *Culex molestus*. Estudos posteriores foram realizados com a mosca *Drosophila melanogaster* (FONSECA; GOMES; ARAÚJO, 2012). Os ovos de *Culex* sp. são postos agrupadamente (*egg-raft*) quase de forma simultânea e apresentam um revestimento pouco transparente que possibilita visualizar estruturas como os ocelos. Estes ovos também são permeáveis a fixadores que permitem estudar diferentes momentos da embriologia do mosquito (CHRISTOPHERS, 1945). Existem várias razões pelas quais os ovos de *Ae. aegypti* não são os mais adequados para análise do desenvolvimento embrionário, a saber: a quitina que reveste os ovos é bastante opaca e possui inúmeras ornamentações na superfície (LINLEY, 1989; MATHEW; RAT, 1975); somado ao fato de que ovos de um mesmo ciclo gonadotrófico são depositados em momentos diferentes, e por isso, o período de incubação e o início do desenvolvimento embrionário variam consideravelmente entre os ovos, dificultando a análise comparativa da embriogênese entre eles (CHRISTOPHERS, 1960). Na figura 7, o fluxograma evidencia de forma sequencial, a formação dos principais elementos que compõe a base da embriogênese que ocorre em mosquitos.

A embriogênese em artrópodes em geral é dividida em diversos eventos: 1) fertilização, 2) clivagem, 3) formação da blastoderme, 4) formação das membranas extra-embrionárias, 5) formação do embrião propriamente dito e 6) organogênese (FONSECA; GOMES; ARAÚJO, 2012). Durante a cópula, os machos transferem seus espermatozóides para as fêmeas e estes, por sua vez, ficam armazenados em estruturas denominadas espermatecas, onde permanecem até a fecundação. No aparelho reprodutor feminino, os ovócitos são produzidos nos ovariolos e quando maduros são desprendidos e deslocados por um canal lateral denominado oviduto até chegar em uma estrutura chamada bolsa copulatória (CLEMENTS, 1992). Exatamente nesta área, os espermatozóides são liberados das espermatecas e penetram no ovócito através

da micrópila, fecundando-o e formando o ovo propriamente dito. Nesse estágio, o ovo está pronto para ser depositado no ambiente (CLEMETS, 1992).

**Figura 7** – Fluxograma esquemático da formação das principais estruturas na embriologia de mosquitos.



**Fonte:** O autor, baseando-se em Christophers (1960)

**Nota:** Todas as etapas da embriogênese, após a fecundação e a partir das clivagens sucessivas ocorrem no ovo dos mosquitos quando estes já estão depositado no ambiente, isto é, fora do corpo da fêmea.

O processo de embriogênese propriamente dito ocorre no sítio de oviposição (criadouro) e pode ser finalizado, em condições abióticas normais (temperatura e umidade), no período de até 72 horas. Insetos holometábolos possuem em geral ovos menores e uma embriogênese mais rápida (DAVIS; PATEL, 2002). Por outro lado, em condições ambientais desfavoráveis, o desenvolvimento embrionário pode ser retardado (CONSOLI; LOURENÇO DE OLIVEIRA, 1994). Uma vez que o processo de fusão dos núcleos do espermatozoide e ovócito seja bem sucedido, iniciam-se rápidas divisões sucessivas do material genético (8-12 minutos) dentro do ovo. A partir do zigoto, há uma diferenciação de dois tipos de células: as células germinativas que formarão as futuras células reprodutoras do mosquito; e as células somáticas (blastômeros) que originarão todos os tecidos do indivíduo em geral (LITTLE et al., 2011). As primeiras clivagens são superficiais, pois ocorrem apenas divisões nucleares (cariocinese), sem a citocinese (divisão celular) (FONSECA; GOMES; ARAÚJO, 2012). No final de quatro horas, estes núcleos estarão presentes tanto na camada superficial (periférica)

quanto na região vitelínica (interna). Neste momento haverá, aproximadamente, 2000 núcleos (ROONWALL, 1936).

Após o 10º ciclo de divisão celular (6 horas), os núcleos começam a migrar para região periférica do ovo. Esse estágio é caracterizado pela formação da blastoderme sincicial em que os núcleos estão todos agrupados (FONSECA; GOMES; ARAÚJO, 2012) e toda superfície do ovo está uniformemente coberta por núcleos grandes e globulares, sem membranas. A transformação da blastoderme sincicial em blastoderme celular ocorre durante o 14º ciclo mitótico, quando há uma diferenciação e as membranas plasmáticas migram para o interior do ovo, isolando cada núcleo. Nesse momento, a blastoderme é estruturada nesse momento por células organizadas na periferia e essa conformação é denominada de disco da blastoderme, enquanto que o interior (centro) permanece preenchido com grânulos de vitelo (CHRISTOPHERS, 1960). A blastoderme celular, considerada um epitélio primário, fica logo abaixo da membrana vitelínica (FOE; ALBERTS, 1983). Esta camada uniforme de células da blastoderme se espessa ventralmente para formar uma estrutura denominada banda germinativa (10h), que é precursora do embrião.

Desta mesma camada de células da blastoderme, ocorre a diferenciação de duas membranas extra-embrionárias, o âmnio e a serosa, ao mesmo tempo que o embrião também vai se formando. Como procede em outros insetos, estes envelopes são originários de dobramentos oriundos dos polos da banda germinativa e posteriormente estendem-se sobre todo embrião (FONSECA; GOMES; ARAÚJO, 2012).

Durante os eventos de clivagem, a própria banda germinativa vai se espessando e tornando-se diferenciada, formando as primeiras estruturas do embrião (BUTT, 1934). Um aspecto muito importante deste contexto da morfogênese é o processo de segmentação do corpo do embrião (DAVIS; PATEL, 2002). Onze segmentos mais ou menos desenvolvidos podem ser identificados. Destes, os três primeiros são segmentos torácicos e os outros oito, são segmentos abdominais. O oitavo segmento abdominal mais tarde torna-se consideravelmente mais espesso e eventualmente forma o sifão respiratório rudimentar, presente na larva. O pequeno segmento terminal torna-se o segmento anal. Na etapa em que a segmentação ocupa cerca 1/3 médio do ovo, há uma redução considerável do vitelo. O papel deste vitelo é fundamental no processo de organogênese (CHRISTOPHERS, 1960).

A organogênese é o estágio de desenvolvimento que ocorrerá no embrião, e a diferenciação destas estruturas geradas se dá partir da blastoderme em órgãos que desempenharão funções específicas no futuro indivíduo. Uma característica notável do embrião nos estágios mais avançados de desenvolvimento são os ocelos, perceptíveis até pela

superfície clarificada do ovo (POELCHAU et al., 2014). Estes aparecem pela primeira vez, indicado por seu pigmento, cerca de 36 horas e, mais tarde, tornam-se plenamente desenvolvidos como ocelos da larva de primeiro estágio ( $L_1$ ). Outras características do desenvolvimento tardio são os detalhes estruturais e o desenvolvimento de cerdas associadas com as peças bucais e do corpo em geral. Após 54 horas de desenvolvimento embrionário, a larva embrionária (*pharate larvae*) dentro do ovo está pronta (em condições normais) para receber o estímulo de eclosão e romper ativamente o mesmo através de uma estrutura denominada *egg-breaker* e conhecida informalmente como dente quitinoso da cabeça (MARCONDES, 2011).

## 2.4 Dormência embrionária em mosquitos

A dormência é um fenômeno fisiológico definido como estado de interrupção do desenvolvimento ou supressão da atividade metabólica em um organismo (MARTINS; LEWINSOHN; BARBEIROS, 2000). A dormência pode ocorrer tanto em plantas, quanto nos animais, e especificamente nos insetos, pode se manifestar na fase embrionária (*pharate larvae*), em imaturos (larvas e pupas) e no estágio adulto (GORDON; HEADRICK, 2001). Este fenômeno pode ser desencadeado por sinais climáticos, destacando principalmente, o fotoperíodo para insetos de clima temperado e a umidade relativa para insetos de clima tropical (DINIZ et al., 2017).

Essa característica adaptativa tem a finalidade de promover sobrevivência dos indivíduos de uma população natural durante e após períodos de condições ambientais severas e isso é conhecido na literatura como desenvolvimento heterodinâmico (DANKS, 1987). O termo dormência foi descrito pela primeira vez em 1869 pelo pesquisador francês *Duclaux*, estudando ovos do bicho-da-seda (*Bombyx mori*) e conceituou o fenômeno simplesmente como um estágio de inatividade causado por baixas temperaturas (DANKS, 1987; DUCLAUX, 1869). A dormência é classificada em duas categorias que são a diapausa e a quiescência, conforme o estudo de revisão bibliográfica que aborda definições e terminologias sobre dormência em insetos de Danks (1987). Os termos diapausa e quiescência foram, por muito tempo, reportados como sinônimos na literatura (CHOI et al., 2013; CHRISTOPHERS, 1960; CONSOLI; LOURENÇO DE OLIVEIRA, 1994; LUZ et al., 2008; SILVA; SILVA, 1999; SILVA et al., 1998; SOARES-PINHEIRO et al., 2016), no entanto, são estratégias de sobrevivência que provém de vias de sinalização distintas, embora tenham a mesma finalidade: garantir a sobrevivência durante e após a adversidade do meio.

A diapausa e a quiescência são bem caracterizadas em diferentes estágios do ciclo de vida de mosquitos. Na fase embrionária, por exemplo, ambas as estratégias promovem o mesmo efeito, a inibição da eclosão larvária. Por outro lado, nas fases larvária e adulta, apenas a diapausa pode se manifestar, conferindo estágio de dormência em mosquitos (CLEMENTS; KERKUT, 1963).

#### 2.4.1 Diapausa

A diapausa é uma estratégia de sobrevivência sazonal (cíclica) bastante estudada em trabalhos científicos. A etimologia da palavra provém do grego *diapausis* (pausa), derivado do verbo *diapauein* que significa parar ou reduzir uma atividade em um momento de constante ação (WEBSTER, 2000). Biologicamente, Tauber et al. (1986) definem de maneira completa o fenômeno diapausa como o estado dinâmico de baixa atividade metabólica, geneticamente determinado, mediado por neuro-hormônios que influenciam fenotipicamente os indivíduos em uma morfogênese reduzida; bloqueio da reprodução e da metamorfose; e o aumento da tolerância a condições ambientais extremas (TAUBER; TAUBER; MASAKI, 1986). Esse fenômeno está relacionado a diversos aspectos como a biogeografia, interações ecológicas espécie-específicas, história de vida e fisiologia de muitos insetos (DENLINGER; ARMBRUSTER, 2014).

A diapausa é uma característica biológica que faz parte da história de vida de muitas espécies de mosquitos, pois proporciona um mecanismo para superar estações desfavoráveis, tanto em zonas tropicais como temperadas. Este traço pode ter evoluído, muitas vezes, independentemente dentro da família Culicidae, uma vez que, o fenômeno pode surgir em diversos estágios de desenvolvimento de diferentes espécies (DENLINGER; ARMBRUSTER, 2014).

Muitos aspectos da diapausa são críticos para o entendimento da dinâmica do ciclo de transmissão de doenças por meio de mosquitos *Aedes*. Na espécie *Ae. albopictus*, essa estratégia de sobrevivência contribui na manutenção, estabelecimento, expansão e dispersão das populações naturais em campo, após o término de uma estação severa para o desenvolvimento destes indivíduos (DENLINGER; ARMBRUSTER, 2014). O processo de diapausa é encerrado como consequência do bloqueio da dormência e posteriormente da reativação do desenvolvimento por fatores externos (VINOGRADOVA, 2007).

As espécies de mosquitos que apresentam diapausa provavelmente possuem tal informação codificada em seu genoma. O principal estímulo para a indução da diapausa em

populações naturais de mosquitos é a mudança de fotoperíodo (dias curtos e noites longas) e a diminuição gradativa da temperatura no ambiente (POELCHAU et al., 2011). Dentre as diversas espécies de mosquitos que são influenciadas por fotoperíodo como sinalizador da diapausa estão *Aedes albopictus*, *Aedes atropalpus*, *Aedes sollicitans*, *Aedes taeniorhynchus*, *Culex pipiens* e *Culex restuans* (ANDERSON, 1968; ELDRIDGE, 1968; ELDRIDGE; JOHNSON; BAILEY, 1976; PARKER, 1985, 1988; PUMPUNI, KNEPLER J, 1992).

A preparação da diapausa ocorre em mosquitos quando pupas e adultos fêmeas, que são considerados estágios determinantes para tal característica biológica, são estimulados ao ficarem expostos às mudanças sazonais que ocorrem normalmente durante períodos de transição entre a estação favorável e a próxima estação desafiadora (MORI; ODA; WADA, 1981a; POELCHAU et al., 2011; WANG, 1966). Sendo assim, fêmeas induzidas preparam sua prole para a diapausa e esta manifestará as características de baixo metabolismo em alguma fase do ciclo de vida durante a estação mais fria. Logo, essa adaptação ecológica é imprescindível para coordenar o crescimento, desenvolvimento e a reprodução de espécies de mosquitos em zonas temperadas (DENLINGER; ARMBRUSTER, 2014).

O fenômeno de diapausa é caracterizado por três etapas eco-fisiológicas (KOŠTÁL, 2006). A primeira é a fase de preparação da diapausa ou pré-diapausa, que corresponde ao estágio sensitivo em que o inseto é exposto por um ou por combinações de sinais ambientais (*token-stimuli*) que disparam e desencadeiam o fenômeno na estação seguinte em sua prole (MARTINS; LEWINSOHN; BARBEIROS, 2000; POELCHAU et al., 2011). Em algumas espécies, esta fase é propícia para o armazenamento de reservas energéticas (lipídios, proteínas e carboidratos) que serão utilizados para manutenção basal do inseto durante a dormência e para a retomada do desenvolvimento após a cessação do processo. Além disso, é possível observar mudanças morfofisiológicas, bioquímicas e comportamentais nos indivíduos (DENLINGER, 2002; DENLINGER; ARMBRUSTER, 2014; KOŠTÁL, 2006; MARTINS; LEWINSOHN; BARBEIROS, 2000). Isso ocorre porque algumas espécies de mosquitos durante a pré-diapausa estendem o tempo de desenvolvimento de um estágio específico do ciclo de vida com o propósito de aumentar a exposição ao estímulo, sendo esse um evento favorável para garantir o fenótipo de dormência para a prole (DENLINGER; ARMBRUSTER, 2014).

Mosquitos fêmeas de *Cx. pipiens* programados para diapausa adulta, apresentam uma fase larval maior, resultando em pupas e adultos que são maiores, os quais armazenam mais lipídeos do que os seus homólogos não diapáusicos (ZHANG; DENLINGER, 2011). Na mesma espécie, ainda é observado que o teor de gordura das fêmeas destinadas à diapausa

continua a aumentar consideravelmente durante a semana pós-emergência dos adultos, atingindo o dobro do nível observado em fêmeas não diapáusicas (SIM; DENLINGER, 2008). Ao nível molecular, esse aumento de reserva energética é acompanhado por um aumento da expressão de genes associados com a síntese de reservas de lipídeos (ROBICH; DENLINGER, 2005). Em relação à *Ae. albopictus*, ovos em diapausa são maiores e contêm mais lipídeos totais do que os ovos não diapáusicos, isto devido a um aumento na expressão de genes envolvidos no armazenamento de lipídios durante a pré-diapausa (REYNOLDS et al., 2013).

A programação da diapausa implica na captação da informação fotoperiódica pelo sistema nervoso central (SNC) da fêmea e depois disto ocorre uma cascata de eventos bioquímicos, culminando na transferência de um determinante molecular da diapausa que promove o estado de dormência para seus embriões (DENLINGER; ARMBRUSTER, 2014). Dessa forma, faz sentido supor que genes do relógio biológico (*clock genes*) estejam envolvidos na regulação de ritmos circadianos, e conseqüentemente, na resposta sazonal por meio de uma percepção de quanto dura o dia e a noite (GOTO; SHIGA; NUMATA, 2010; KOŠTÁL, 2011). Os principais *clock genes* envolvidos em mosquitos, não necessariamente relacionados à diapausa, foram caracterizados em *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus*, *Anopheles gambiae*, *Culex quinquefasciatus* e *Wyeomyia smithii* (GENTILE et al., 2009; MATHIAS et al., 2005; PARKER, 1988; PTITSYN et al., 2011; RUND et al., 2012; SUMMA et al., 2012).

A diapausa propriamente dita se refere ao tempo real quando o desenvolvimento é interrompido ou significativamente retardado e o inseto não responde aos sinais do ambiente (DENLINGER; ARMBRUSTER, 2014). Esta etapa pode ser dividida em três subfases: 1) etapa de resposta – início do processo quando ocorre a parada do desenvolvimento em um estágio específico do inseto; 2) etapa de desencadeamento – o fenômeno é continuado e controlado pela influência de fatores endógenos ou exógenos; 3) finalização – momento em que os indivíduos têm a sinalização para retomar as atividades metabólicas normais (MARTINS; LEWINSOHN; BARBEIROS, 2000).

Durante a diapausa diferentes mudanças endógenas podem ser observadas e isso depende de cada espécie de mosquito investigada. Em embriões de *Ae. albopictus*, larvas de *Wy. smithii* e adultos de *Cx. pipiens*, por exemplo, há uma menor degradação lipídica e maior tolerância à dessecação e às baixas temperaturas (BENOIT; DENLINGER, 2007; EVANS; BRUST, 1972; HANSON; CRAIG, 1995; POELCHAU et al., 2011; RINEHART et al., 2007; SOTA; MOGI, 1992).

Ao nível molecular, alguns componentes genéticos que mediam essas características fisiológicas de adaptação já foram reportados em estudos prévios. Em *Ae. albopictus*, a resistência à dessecação, promovida pela diapausa, é resultante do aumento da superfície externa do ovo, apresentando um maior teor de hidrocarbonetos e isto é propiciado por uma superexpressão de genes como as diferentes classes de lipases envolvidas no anabolismo e catabolismo de lipídeos. No entanto, os mecanismos moleculares responsáveis pela tolerância ao frio nesta espécie não foram determinados até o momento (URBANSKI et al., 2010). Já no caso do mosquito *Cx. pipens*, a elevada tolerância à dessecação durante a diapausa é devido principalmente ao aumento da camada de hidrocarbonetos na superfície cuticular do corpo dos indivíduos adultos e uma maior produção de trealose que contribui tanto para tolerar o frio quanto a dessecação (BENOIT; DENLINGER, 2007). Em contrapartida, os eventos moleculares que promovem os efeitos da diapausa nos mosquitos *Wy. smithii* ainda permanecem desconhecidos (DENLINGER; ARMBRUSTER, 2014).

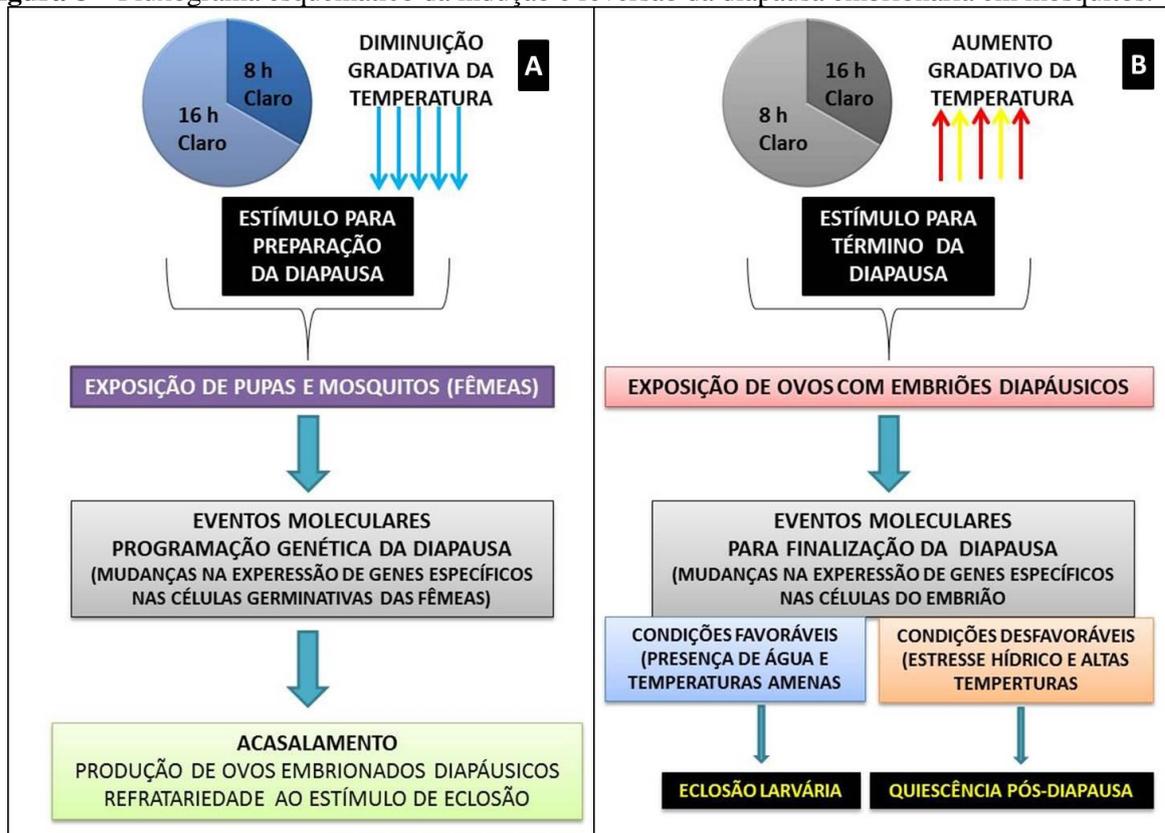
A última fase denominada de pós-diapausa é caracterizada pela reativação total do metabolismo e desenvolvimento do inseto (KOŠTÁL, 2006; POELCHAU et al., 2011). Embora o fotoperíodo seja amplamente utilizado como estímulo ambiental para a entrada da diapausa, este é menos usado para sinalizar o término da mesma. Contudo, existem exceções como no exemplo do mosquito *Wy. smithii*, que uma nova mudança fotoperiódica faz cessar a diapausa (BRADSHAW; LOUNIBOS, 1972; DENLINGER; ARMBRUSTER, 2014). Em relação ao mosquito *Ae. albopictus*, o término da diapausa nos ovos pode ser sinalizado pela combinação da mudança fotoperiódica com o aumento da temperatura (LACOUR et al., 2015). Um aspecto relevante, além da pós-diapausa, é o fenômeno denominado *quiescência pós-diapausa* (Figura 8), presente inclusive na espécie *Ae. albopictus* (LACOUR et al., 2015; POELCHAU et al., 2013). Este processo é considerado uma fase fenotipicamente indistinguível em relação à diapausa.

Na pós-diapausa o inseto ainda está no estado de dormência, a sua taxa metabólica continua a ser baixa, e muitos dos mesmos genes associados à diapausa continuam a ser expressos. Dessa forma, é possível que a diapausa e quiescência tenham muitos componentes moleculares em comum, embora os componentes de programação iniciais sejam exclusivos para diapausa (POELCHAU et al., 2013). Fisiologicamente, a única diferença é que em estado quiescente o inseto é plenamente sensível para responder aos sinais ambientais a que estão submetidos, o que não ocorre na diapausa (DENLINGER; ARMBRUSTER, 2014).

A diapausa pode ocorrer em diferentes fases do ciclo de vida dos mosquitos, isto é, no embrião (dentro do ovo), nos estádios larvais e na fase adulta. Até o momento não há registros

de diapausa na fase de pupa. Esse tipo de dormência em uma espécie tende a ocorrer em apenas um estágio específico do ciclo de vida (DENLINGER; ARMBRUSTER, 2014; MARTINS; LEWINSOHN; BARBEIROS, 2000; VINOGRADOVA, 2007). No entanto, em algumas espécies, a diapausa pode ocorrer em mais de uma fase, mais precisamente entre os estágios embrionário e larvário (ABDEL-RAHMAN; ADHAM, 1983; GALLAWAY, 1985; JORDAN; BRADSHAW, 1978; MATHIAS et al., 2005; SIMS; MUNSTERMANN, 1983).

**Figura 8** – Fluxograma esquemático da indução e reversão da diapausa embrionária em mosquitos.



**Nota:** A) Processo de indução à diapausa pela exposição de pupas e mosquitos fêmeas ao estresse fotoperiódico e diminuição gradativa da temperatura. B) Reversão da diapausa pela normalização das condições ambientais.

#### 2.4.1.1 Diapausa embrionária

Esse tipo de dormência é mais frequente e ocorre no embrião do mosquito, denominado *pharate larvae*. Usando como referência o mosquito *Ae. albopictus*, organismo modelo para estudo da diapausa, o embrião já está formado completamente dentro do ovo, no entanto, há uma depressão metabólica do desenvolvimento pós-embrionário devido à uma programação genética ao ponto que a larva é incapaz de responder qualquer sinalização abiótica, isto é, a larva é refratária ao estímulo de eclosão (MORI; ODA; WADA, 1981;

POELCHAU et al., 2014; WANG, 1966). Embriões em estado diapáusico são mais tolerantes à dessecação e tendem a apresentar um maior conteúdo de lipídeos totais (REYNOLDS et al., 2013; SOTA; MOGI, 1992; URBANSKI; ARUDA; ARMBRUSTER, 2010).

Uma superexpressão de transcritos de ecdisteroides observada, por meio da análise do transcriptoma de oócitos maduros, provavelmente regula a diapausa embrionária em *Ae. albopictus* e em outros mosquitos (POELCHAU et al., 2011; 2013b). Os gêneros de mosquitos que apresentam diapausa embrionária são os seguintes: *Aedes*; *Anopheles*; *Psorophora*; e *Ochlerotatus* (DENLINGER; ARMBRUSTER, 2014; VINOGRADOVA, 2007), e as principais respectivas espécies reportadas na literatura estão evidenciadas no Quadro 1.

#### 2.4.1.2 Diapausa em estádios larvais

Esse processo fisiológico é conhecido na literatura como *síndrome da dipausa larval*, que tem como principal característica em mosquitos, o prolongamento do terceiro ou quarto ínstar. Geralmente, a indução da diapausa em larvas é sinalizada diretamente pela queda gradativa da temperatura no meio e retoma as atividades metabólicas normais rapidamente em resposta da normalização da mesma em campo, embora a mudança fotoperiódica também tenha seu papel na indução (VINOGRADOVA, 2007). Em relação ao comportamento, as larvas são caracterizadas por uma atividade locomotora e alimentar reduzidas, conseqüentemente, isso promove um maior acúmulo de reservas corporais que propicia a elas maior tolerância ao frio (VINOGRADOVA, 2007).

Em condições normais, a progressão do desenvolvimento dos estádios larvais ocorre bioquimicamente através da liberação periódica do hormônio esteróide ecdisona pela glândula prototorácica do inseto, que culmina nas mudas. Quando as larvas estão em condição de diapausa, há uma falha na liberação da ecdisona e, portanto, não há passagem de um estágio para o outro (DENLINGER; ARMBRUSTER, 2014). Até o momento, não existem estudos moleculares que expliquem a base hormonal da diapausa larvária em mosquitos, embora em alguns foi reportada a ausência de ecdisona como a causa principal da diapausa larvária em outros insetos e provavelmente em mosquitos deve ocorrer o mesmo evento (DENLINGER; YOCUM; RINEHART, 2012). Em algumas espécies de mosquitos já foram observadas esse tipo de dormência e estas estão apontadas no Quadro 2.

**Quadro 1** – Diapausa embrionária em diferentes espécies de mosquitos.

<b>Gêneros</b>	<b>Espécies</b>	<b>Referências</b>
	<i>Aedes albopictus</i>	Mori et al. (1981)
	<i>Aedes atropalpus</i>	Anderson (1968)
	<i>Aedes campestris</i>	Tauthong and Brust (1977)
	<i>Aedes canadenses</i>	Pinger and Eldrige (1977)
	<i>Aedes caspius</i>	Abdel-Rahman and Adham (1983)
	<i>Aedes dorsalis</i>	Telford (1958)
	<i>Aedes fitchii</i>	Horsfall (1958)
	<i>Aedes geniculatus</i>	Sims and Munstermann (1953)
	<i>Aedes hendersonii</i>	Gallaway (1985)
	<i>Aedes hexodontus</i>	Beckel (1958)
<b>Aedes</b>	<i>Aedes impiges</i>	Corbet and Danks (1975)
	<i>Aedes japonicus</i>	Andreadis et al. (2001)
	<i>Aedes mariaae</i>	Coluzzi et al. (1975)
	<i>Aedes nigripes</i>	Corbet and Danks (1975)
	<i>Aedes nigromaculis</i>	Telford (1958)
	<i>Aedes sierrensis</i>	Jordan and Bradshaw (1978)
	<i>Aedes sticticus</i>	Parker (1988)
	<i>Aedes taeniorhynchus</i>	Parker (1985)
	<i>Aedes triseriatus</i>	Kappus and Venard (1967)
	<i>Aedes vexans</i>	Wilson and Horsfall (1970)
<b>Anopheles</b>	<i>Anopheles walkeri</i>	Hurlbut (1938)
<b>Psorophora</b>	<i>Psorophora ferox</i>	Pinger and Eldrige (1977)
	<i>Ochlerotatus dorsalis</i>	Telford (1958)
	<i>Ochlerotatus nigromaculis</i>	Telford (1958)
	<i>Ochlerotatus hexodontus</i>	Beckel (1958)
<b>Ochlerotatus</b>	<i>Ochlerotatus flavescens</i>	Khelevin, (1959)
	<i>Ochlerotatus triseriatus</i>	Vinogradova (1969)
	<i>Ochlerotatus togoi</i>	Vinogradova (1969)

**Fonte:** Diniz et al. (2017).

**Quadro 2** - Diapausa larvária em diferentes espécies de mosquitos.

<b>Gêneros</b>	<b>Espécies</b>	<b>Referências*</b>
	<i>Aedes caspius</i>	Abdel-Rahman and Adham (1983)
	<i>Aedes geniculatus</i>	Sims and Munstermann (1983)
<b><i>Aedes</i></b>	<i>Aedes hendersonii</i>	Gallaway (1985)
	<i>Aedes sierrensis</i>	Jordan and Bradshaw (1978)
	<i>Aedes togoi</i>	Sota (1994)
	<i>Aedes triseriatus</i>	Kappus and Venard (1967)
	<i>Anopheles barberi</i>	Baker (1935)
<b><i>Anopheles</i></b>	<i>Anopheles plumbeus</i>	Bradshaw and Holzapfel (1991)
	<i>Anopheles pulcherrimus</i>	Vinogradova (1960)
<b><i>Armigeres</i></b>	<i>Armigeres subalbatus</i>	Zhang et al. (1992)
<b><i>Culiseta</i></b>	<i>Culiseta melanura</i>	Burbutis and Lake (1956)
	<i>Orthopodomyia alba</i>	Baker (1936)
<b><i>Orthopodomyia</i></b>	<i>Orthopodomyia puchripalpis</i>	Tate (1932)
	<i>Orthopodomyia signifera</i>	Bradshaw (1973)
<b><i>Toxorhynchites</i></b>	<i>Toxorhynchites rutilus</i>	Bradshaw and Holzapfel (1977)
<b><i>Wyeomyia</i></b>	<i>Wyeomyia smithii</i>	Bradshaw and Lounibos (1977)

**Fonte:** Diniz et al. (2017).

**Nota:** \*As referências supracitadas estão listadas no Apêndice C.

#### 2.4.1.3 Diapausa em adultos

A diapausa no estágio adulto dos mosquitos envolve um conjunto de características importantes como: a) a interrupção do desenvolvimento gonadal, b) redução da avidez, c) fototaxia negativa e d) alterações metabólicas totais que levam à acumulação progressiva de gordura corporal. Mosquitos podem entrar em diapausa em inúmeros habitats, a saber: cavernas; cavidades do solo; tocas; locais onde armazenam vegetais; galpões vazios; porões; catacumbas, etc (VINOGRADOVA, 2007). Em fêmeas adultas, existe uma dormência denominada de *diapausa reprodutiva* na qual ocorre um prolongamento da imaturidade sexual, uma vez que, não há uma diferenciação completa dos folículos ovarianos e também por isso há retardo na ação de realizar o repasto sanguíneo (CLEMENTS, 1992; CONSOLI; LOURENÇO DE OLIVEIRA, 1994; VINOGRADOVA, 2007).

A maioria dos estudos com diapausa em mosquitos na fase adulta foi realizada com a espécie *Cx. pipens*, que é considerada um organismo modelo para inúmeros estudos de natureza genética (DENLINGER; ARMBRUSTER, 2014). Em condições normais, após a emergência da forma alada, fisiologicamente há a síntese e liberação do hormônio juvenil (HJ) que promove o crescimento dos folículos ovarianos em três dias e, logo após isso, a fêmea já está preparada para realizar a alimentação sanguínea a qual contribuirá na maturação dos oócitos. Por outro lado, as fêmeas programadas para o estado diapáusico não liberam o HJ imediatamente após a emergência e os folículos ovarianos permanecem atrofiados e, ao mesmo tempo, a fêmea não se sente atraída para realizar o repasto sanguíneo (READIO; CHEN; MEOLA, 1999). Experimentos com fêmeas diapáusicas de *Cx. pipens* tratadas com HJ mostraram estímulo ao crescimento dos ovários, confirmando a importância da inibição deste hormônio no desencadeamento da diapausa em mosquitos adultos (SIM; DENLINGER, 2008; SPIELMAN, 1974). Os gêneros de mosquitos que apresentam diapausa na fase adulta são *Anopheles* e *Culex* e as respectivas espécies reportadas na literatura foram listadas no Quadro 3.

A maioria dos estudos publicados até o momento que avaliaram a base genética da diapausa em mosquitos concentra-se em duas espécies – *Ae. albopictus* e *Cx. pipens*, consideradas espécies modelos para esse tipo de abordagem. Estudos iniciais foram realizados com a mosca *Drosophila melanogaster*, no entanto, essa espécie apesar de ser referência para muitos estudos genéticos basais, não se comportou bem nas investigações de expressão gênica, uma vez que, mostrou muita instabilidade em suas respostas e muitas variações entre indivíduos (EMERSON et al., 2009; SAUNDERS, 2002; SCHMIDT; PAABY; HESCHEL, 2005). A diapausa em *Cx. pipens*, de acordo com experimentos de cruzamentos, mostrou-se regulada de forma poligênica e envolve genes de seus três cromossomos que estão envolvidos em inúmeras vias bioquímicas como na regulação hormonal. A expressão desses genes possui um efeito pleiotrópico, isto é, o produto de um gene influencia na regulação da expressão de outro, isso foi bem caracterizado, utilizando ensaios de QTL (MORI, A; ROMERO-SEVERSON, J; SEVERSON, 2007; WILTON; SMITH, 1985).

Um estudo mais específico com esta espécie, utilizando a técnica SSH (*suppressive subtractive hybridization*) para determinar a expressão diferencial de genes diapáusicos demonstrou que principalmente componentes metabólicos apresentavam alterações (ROBICH et al., 2007). Dentre os genes superexpressos foi evidenciado o gene de tolerância ao estresse, que codifica para a proteína de choque térmico (Hsp70), a qual atua como chaperonas e impede dobramento de proteínas anormais resultantes de adversidades ambientais como

dessecação e frio (FEDER et al., 1992). Além deste, genes com funções metabólicas são superexpressos em *Cx. pipiens* em diapausa, como por exemplo, os genes que codificam para a malato desidrogenase mitocondrial (MDH), a desidrogenase metilmalonato-semialdeído e citocromo oxidase (CO). Esses genes podem estar envolvidos em eventos metabólicos específicos associados à diapausa, implicados também no aumento da tolerância ao frio. Genes relacionados com o citoesqueleto também são superexpressos, durante o processo de preparação da diapausa. Dentre os genes subexpressos foram evidenciados: genes ribossomais - S3A, rpS6, e rpS24, envolvidos com a regulação gênica (início da tradução) que inibem ou reduzem a expressão de alguns outros genes de metabolismo (ROBICH et al., 2007).

**Quadro 3** - Diapausa reprodutiva em fêmeas de diferentes espécies de mosquitos.

<b>Gêneros</b>	<b>Espécies</b>	<b>Referências*</b>
<b>Anopheles</b>	<i>Anopheles atroparvus</i>	Vinogradova (1960)
	<i>Anopheles earlei</i>	Hudson (1978)
	<i>Anopheles freeborni</i>	Depner and Harwood (1966)
	<i>Anopheles superpictus</i>	Vinogradova EB. 1960.
	<i>Anopheles gambiae</i>	Lehmann et al. (2010)
	<i>Anopheles hyrakanus</i>	Vinogradova (1960)
	<i>Anopheles maculipennis</i>	Vinogradova (1960)
	<i>Anopheles messeae</i>	Vinogradova (1960)
	<i>Anopheles punctipennis</i>	Washino and Bailey (1970)
	<i>Anopheles sacharovi</i>	Vinogradova (1969)
<b>Culex</b>	<i>Culex bitaeniorhynchus</i>	Vinogradova (1969)
	<i>Culex apicalis</i>	Vinogradova (1969)
	<i>Culex modestus</i>	Vinogradova (1969)
	<i>Culex pipiens</i>	Spielman and Wong (1973)
	<i>Culex restuans</i>	Eldridge et al. (1976)
	<i>Culex tarsalis</i>	Harwood and Halfhill (1964)
	<i>Culex tritaeniorhynchus</i>	Kawai (1969)
<b>Culiseta</b>	<i>Culiseta alaskanensis</i>	Frohne (1954)
	<i>Culiseta impatiens</i>	Frohne (1953)
	<i>Culiseta inornata</i>	Hudson (1977)

**Fonte:** Diniz et al. (2017).

**Nota:** \*As referências supracitadas estão listadas no Apêndice C.

A informação mais vasta sobre as mudanças de expressão gênica associada com diapausa em mosquitos é baseada em estudos recentes de sequenciamento de alta eficiência (RNA-Seq) que examinaram o transcriptoma de *Ae. albopictus* em diferentes estágios

(DENLINGER; ARMBRUSTER, 2014; POELCHAU et al., 2001, 2013a, 2013b). Os primeiros estudos de expressão diferencial de transcritos foram realizados em células germinativas dos ovários das fêmeas deste mosquito (oócitos) e posteriormente foi investigada a base molecular no embrião, utilizando os ovos.

O estudo de Poelchau et al. (2011), executando o sequenciamento do transcriptoma de oócitos de fêmeas diapáusicas de *Ae. albopictus* e outro mais recente da mesma natureza e do mesmo grupo, Poelchau et al. (2013a), utilizando desta vez, embriões diapáusicos de fêmeas de *Ae. albopictus* revelaram superexpressão em genes envolvidos em diferentes processos biológicos, dentre eles, o gene *inhibitor of growth protein (ing1)*, que codifica a proteína inibidora de crescimento envolvida com a interrupção do ciclo de divisão celular; o gene *receptor for activated C kinase (rack1)* que codifica um receptor para proteína quinase C, possivelmente envolvida na sinalização do hormônio ecdisona, que desempenha um papel central no controle endócrino da diapausa por promover altos níveis de ecdisteróides necessários à indução e manutenção do processo; o gene *phosphoenolpyruvate carboxykinase (pepck)*, cujo produto participa da via glicogênica para a mudança do metabolismo aeróbico para o anaeróbico e, por fim, o gene *G-protein coupled receptor (GPCR)* o qual confere aos indivíduos um fenótipo de maior resistência ao estresse ambiental (DENLINGER, 2002; DENLINGER; LEE, 1997; LIN; SEROUDE; BENZER, 1998b; POELCHAU et al., 2013a, 2011; RAGLAND; DENLINGER; HAHN, 2010).

#### 2.4.2 Quiescência

A quiescência é um tipo de dormência sazonal, caracterizada pelo retardo do metabolismo, resultante do impacto direto de condições ambientais adversas (Figura 9), como por exemplo, redução de umidade e elevação nas temperaturas (CHRISTOPHERS, 1960; CLEMENTS, 1992; HAND; PODRABSKY, 2000; JULIANO et al., 2002). Muitas vezes, esta característica adaptativa é confundida com a diapausa, sobretudo quando se refere à dormência embrionária. No entanto, a quiescência é uma característica biológica menos complexa que não depende de controle endógeno para sua sinalização. Os estímulos que desencadeiam a quiescência são denominados de alterações acíclicas do meio (MARTINS; LEWINSOHN; BARBEIROS, 2000). A quiescência ainda difere da diapausa por não ser um evento antecipadamente programado, nem hormonalmente controlado, e uma vez cessado o estímulo que induz o processo, as atividades fisiológicas tendem a ser retomadas

(DENLINGER; ARMBRUSTER, 2014; LACOUR et al., 2015). Por ser controlada exogenamente, é possível levantar a hipótese de que talvez não seja necessário acionar rapidamente genes, nem sintetizar ou degradar macromoléculas para entrada no estado dormente (HAND; PODRABSKY, 2000).

**Figura 9** – Fluxograma esquemático da indução e reversão da quiescência em ovos de mosquitos.



**Fonte:** O autor.

**Nota:** Quando as fêmeas depositam seus ovos no ambiente em condições ambientais favoráveis, as larvas L<sub>1</sub> estão aptas à eclosão. No entanto, quando os ovos recebem influência de condições adversas no meio, os embriões entram em estado de dormência por meio da quiescência, porém permanecem sensíveis ao estímulo de eclosão (contato com a água).

Em mosquitos, assim como para outros organismos, o termo quiescência se aplica a vários eventos biológicos. Mais comumente estudado na fase de ovo, a quiescência em mosquitos pode ser estimulada em diferentes estágios ou estruturas fisiológicas para que o inseto possa atingir condições favoráveis de sobrevivência. No mosquito *Cx. quinquefasciatus*, por exemplo, os espermatozoides maduros se mantêm em quiescência no trato reprodutivo dos machos, sendo ativados em resposta a sinais químicos específicos (THALER et al., 2013). Nessa espécie, a motilidade é estimulada por substâncias das glândulas acessórias dos machos, sendo possivelmente controlada pela fosforilação de proteínas e níveis de Ca<sup>2+</sup> (THALER et al., 2013). Além disso, nas fêmeas, pode ocorrer o desenvolvimento de dilatações degenerativas no ovário, contendo material granular durante a estação fria e esse constituinte no ovário tem sido considerado um indicativo de quiescência (NELMS et al., 2013; REISEN; MEYER; MILBY, 1986).

Em culicídeos, a quiescência, diferente da diapausa, tem sido registrada particularmente na fase de ovo, refletida exatamente na resistência à dessecação que permite a sobrevivência do embrião em condições áridas. O processo se dá quando o embrião (*pharate*

*larvae*) já formado no ovo recebe a influência de um estímulo externo, como por exemplo, a diminuição brusca da umidade no meio ou variação na temperatura, os quais sinalizam condições desfavoráveis no ambiente, impedindo o processo de eclosão larvária (MARTINS; LEWINSOHN; BARBEIROS, 2000; PEREZ; NORIEGA, 2013) Neste caso, a parada do desenvolvimento se dá de forma temporária e imediatamente reversível, cujo contato com a água induz a rápida eclosão, ou seja, o embrião em quiescência não é refratário ao estímulo de eclosão como ocorre com aqueles em estado de diapausa (ALMEIDA, 2005; GORDON; HEADRICK, 2001; MARTINS; LEWINSOHN; BARBEIROS, 2000; POELCHAU et al., 2013a; VINOGRADOVA, 2007). Como pode ser observado no Quadro 4, os gêneros de mosquitos reportados na literatura que apresentam quiescência são *Aedes*, *Anopheles* e *Culex*.

Frequentemente, a quiescência do ovo é referida como *embryonic desiccation resistance* (EDR) a qual é dependente de vários fatores que vão desde diferenças na composição e estrutura do envoltório dos ovos até variações fisiológicas com redução do metabolismo da larva em seu interior (CHRISTOPHERS, 1960; REZENDE et al., 2008; URBANSKI et al., 2010b; VARGAS et al., 2014). É importante ressaltar que, a capacidade de resistir à dessecação é uma propriedade do ovo e não especificamente do embrião, sendo assim, o termo ERD foi sugerido como sendo o mais apropriado para se referir a quiescência (FARNESI et al., 2015).

As três camadas que formam o envoltório dos ovos dos mosquitos (exocóron, endocóron e cutícula serosa) são particularmente importantes no processo de resistência à dessecação do ovo. As duas primeiras são camadas produzidas ainda no ovário e, portanto, estão presentes desde o momento da postura (CHAPMAN; SIMPSON; DOUGLAS, 2013; CLEMENTS, 1992; FARNESI et al., 2015). A cutícula serosa mais interna, por sua vez, é uma matriz extracelular produzida pela serosa extra-embriônica, no início da embriogênese. Em *Ae. aegypti*, a secreção da cutícula serosa é um processo que ocorre entre 11 e 13 horas após a postura do ovo e, cerca de oito horas após a fertilização em *An. gambiae* (GOLTSEV et al., 2009; REZENDE et al., 2008).

É provável que essa cutícula secreta um material quitinizado sob o córion, camada externa do ovo, impermeabilizando o mesmo e protegendo o embrião da dessecação (FARNESI et al., 2015; REZENDE et al., 2008). Variações na quantidade dos componentes da casca do ovo (*eggshell*) estão associadas com a regulação da perda de água, sendo fundamental na determinação da intensidade da desidratação do ovo. As fêmeas dos mosquitos *Ae. albopictus* de áreas temperadas expostas a dias curtos produzem ovos em diapausa fotoperiódica, contrastando com as populações de regiões tropicais que entram em

quantidade de *fatty acyl coA elongase* no tecido de oócitos maduros responsável pela produção de hidrocarbonos na casca do ovo (URBANSKI et al., 2010).

**Quadro 4**– quiescência em embriões de diferentes espécies de mosquitos.

<b>Gênero</b>	<b>Espécies</b>	<b>Referências*</b>
		Sota; Mogi (1992)
		Silva; Silva (1999)
		Rezende et al. (2008)
		Juliano et al. (2002)
		McMeniman; O'Neill (2010)
	<i>Aedes aegypti</i>	Perez; Noriega (2012)
		Perez; Noriega (2013)
		Vargas et al. (2014)
		Yang (2014)
<b><i>Aedes</i></b>		Diniz et al. (2015)
		Farnesi et al. (2015)
		Sota; Mogi (1992)
		Juliano et al. (2002)
	<i>Aedes albopictus</i>	Urbanski et al. (2010)
		Poelchau et al. (2013a)
	<i>Aedes flavopictus</i>	
	<i>Aedes galloisi</i> ,	Sota; Mogi (1992)
	<i>Aedes riversi</i>	
		Vargas et al. (2014)
	<i>Anopheles aquasalis</i>	Farnesi et al. (2015)
<b><i>Anopheles</i></b>		
	<i>Anopheles gambiae</i>	Goltsev et al. (2009)
		Vargas et al. (2014)
<b><i>Culex</i></b>		
	<i>Culex quinquefasciatus</i>	Farnesi et al. (2015)

**Fonte:** Diniz et al. (2017).

**Nota:** \*As referências supracitadas estão listadas no Apêndice C.

Esses hidrocarbonos regulam a perda de água nos ovos dos insetos enquanto que, a abundância dessa enzima varia nos ovos de populações temperadas de *Ae. albopictus* expostas a dias curtos e longos, e se mantém relativamente constante em populações tropicais

(FARNESI et al., 2015; URBANSKI et al., 2010). Além da quantidade de hidrocarbonos na superfície do ovo, a quantidade de quitina no *eggshell* é outro fator envolvido na resistência do ovo à dessecação em mosquitos como *Cx. quinquefasciatus*, *An. aquasalis* e *Ae. aegypti*. De modo geral, envoltório dos ovos com maiores quantidades de quitina são mais resistentes à dessecação (FARNESI et al., 2015).

A resistência à dessecação dos ovos tem sido um processo mais comumente estudado em mosquitos que utilizam recipientes domésticos como substrato de oviposição, como *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*. Em áreas urbanas, as fêmeas desses mosquitos costumam depositar seus ovos em recipientes com água limpa, priorizando descartáveis, pneus, pratos de plantas e recipientes para armazenamento de água (PINHEIRO; TADEI, 2002; TEIXEIRA; BARRETO; GUERRA, 1999). Por serem postos diretamente na água ou próximo à lâmina d'água, essa fase do desenvolvimento é a mais susceptível à desidratação, particularmente nas primeiras horas de desenvolvimento (CHADEE; CORBET; TALBOT, 1995).

A larva de 1º ínstar que se mantém no interior de ovos quiescentes tem sido denominada de *pharate 1st instar quiescence* (CLEMENTS, 1992; PEREZ; NORIEGA, 2012). O desenvolvimento normal se completa cerca de três dias após a oviposição e a sobrevivência da larva depende do estoque de reserva materna (PEREZ; NORIEGA, 2012). Ao longo do período quiescente, a larva apresenta significativo prolongamento do período de desenvolvimento e redução nas reservas de lipídeos com custos para viabilidade larval e estratégias reprodutivas do indivíduo, com menor fecundidade e fertilidade (PEREZ; NORIEGA, 2013). Larvas em ovos quiescentes de *Ae. aegypti* também têm sua sobrevivência reduzida pela infecção com a linhagem *Wolbachia* (*wMelPop-CLA*) originada de *Drosophila melanogaster* (MCMENIMAN; O'NEILL, 2010).

Ainda pouco estudada, a quiescência dos ovos de mosquitos não tem apresentado um padrão fixo, mostrando-se variável entre espécies, até mesmo em populações da mesma espécie (FARNESI et al., 2015; SOTA; MOGI, 1992; TRPIS, 1972). Nas mesmas condições de falta de umidade, o embrião quiescente de *Cx. quinquefasciatus*, *An. aquasalis* e *Ae. aegypti* podem sobreviver por poucas horas, um dia ou vários meses, respectivamente (FARNESI et al., 2015). Essas diferenças podem ser decorrentes de características inerentes ao ovo de cada espécie, como tamanho, estrutura do exocórrion e endocórrion, variação na quantidade de metabólitos e formação da cutícula serosa (LI; LI, 2006; SCHAFFNER et al., 2014; SOTA; MOGI, 1992; VARGAS et al., 2014).

Em laboratório, populações de *Ae. aegypti* do Brasil mantidas à temperatura de  $28 \pm 1^\circ\text{C}$ , com umidade relativa de  $80 \pm 5\%$  e fotoperíodo de 12h:12h (claro:escuro) apresentaram

um período de viabilidade de até 492 dias, com maiores taxas de eclosão ocorrendo aos três e 121 dias (SILVA; SILVA, 1999). Ao contrário, um padrão elevado (80%) e similar de eclosão das larvas foi registrado por Diniz et al., (2015) em ovos quiescentes de *Ae. aegypti* com até 150 dias de armazenamento. Os autores compararam ovos provenientes de população de laboratório e campo com diferentes perfis de susceptibilidades ao inseticida temephos, mantidos por até 180 dias a 26 °C; fotoperíodo de 12h:12h (claro:escuro) e 50-60% de umidade. A alta viabilidade de ovos quiescentes provenientes de fêmeas resistentes ao inseticida sugere uma elevada contribuição na manutenção de indivíduos resistentes em campo (DINIZ et al., 2015).

Longo período de quiescência não é restrito a *Ae. aegypti*. Na Austrália, ovos quiescentes de *Ae. (finlaya) notoscriptus* permaneceram viáveis por mais de um ano com taxa de eclosão de aproximadamente 9-13%, potencializando sua distribuição para novos locais (FAULL; WILLIAMS, 2015). Espécies que habitam florestas têm se mostrado menos resistentes a variações de umidade. Ovos de *Ae. riversi*, *Ae. galloisi*, *Ae. flavopietus* apresentaram variabilidade de sobrevivência em altas umidades. No entanto, foram menos resistentes do que ovos de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* em variações de baixa umidade. Diferenças intraespecíficas de resistência à dessecação dos ovos também foram observadas entre essas espécies. Por exemplo, linhagens de regiões subtropicais de *Ae. riversi* e *Ae. flavopietus* apresentaram menor viabilidade do que linhagens de áreas temperadas (SOTA; MOGI, 1992). Embora haja um conhecimento acumulado acerca dos mecanismos metabólicos e da biologia molecular da diapausa, muito pouco se sabe sobre esses aspectos em relação à quiescência em mosquitos.

Até o momento, são desconhecidas as rotas metabólicas ou os hormônios associados à quiescência e, apenas o gene Quitina Sintase (CHS) foi descrito na literatura estando relacionado a esse fenômeno em mosquitos. Esse gene promove a síntese de quitina a qual será posteriormente secretada no espaço extracelular do ovo, tendo implicações diretas na formação da cutícula serosa e, conseqüentemente, com a aquisição da resistência à dessecação (GOLTSEV et al., 2009; MERZENDORFER, 2006; REZENDE et al., 2008). Apesar de ter sido primeiramente citado para *An. gambiae* (*AgCHS*), esse gene possui elevada identidade com outras duas espécies de mosquitos – *An. quadrimaculatus* e *Ae. aegypti*. O gene possui duas variantes, sendo apenas o alelo *AgCHS1* envolvido na embriogênese. Em *Ae. aegypti*, por exemplo, o gene tem seu pico de expressão entre 9 e 12h, coincidindo com a aquisição da resistência à dessecação através do recobrimento total do embrião pela cutícula serosa já quitinizada (GOLTSEV et al., 2009; REZENDE et al., 2008).

A resistência dos ovos à dessecação permitiu a disseminação passiva de *Ae. aegypti* de sua região de origem na África para outras partes do mundo e tem possibilitado o aparecimento explosivo de grandes populações ou reinfestações de áreas tratadas em pouco tempo, após a inundação de criadouros submetidos a diferentes períodos de estiagem (CONSOLI; LOURENÇO DE OLIVEIRA, 1994; MEDLOCK et al., 2012; SILVA; SILVA, 1999). Na natureza, a quiescência favorece a sobrevivência quando as condições do habitat são adversas, como em buracos de árvores ou rochas, poças de água temporárias ou onde o nível da água pode ter flutuações abruptas (VINOGRADOVA, 1969). O comércio entre países de pneus usados e, em menor escala, de plantas ornamentais, contribuiu fortemente para entrada e distribuição de mosquitos invasores nas Américas e Europa. Ovos quiescentes presentes nesses recipientes foram exportados da Ásia e África para novas regiões geográficas e, a eclosão subsequente das larvas quando as condições se tornaram favoráveis permitiu o estabelecimento e distribuição de mosquitos invasores nesses continentes (KRAEMER et al., 2015; MEDLOCK et al., 2012).

Na Europa, um aumento considerável na propagação de mosquitos invasivos tem sido observado desde o final da década de 1990, sendo as espécies *Ae. albopictus*, *Ae. aegypti*, *Ae. japonicus*, *Ae. atropalpus* e *Ae. koreicus* já estabelecidas nesse continente (SCHAFFNER et al., 2014). Além do aumento na densidade populacional, *Ae. albopictus* tem ampliado continuamente sua distribuição e, diversas outras espécies de *Aedes* têm sido identificadas em países onde até recentemente não eram reportadas (FLACIO et al. 2015; KRAEMER et al., 2015; MEDLOCK et al., 2012). Recentemente, um grupo de pesquisa da Universidade de Brock detectou a presença de *Ae. aegypti* pela primeira vez no Canadá (GIORDANO, 2016). Todas essas espécies são bem adaptadas ao ambiente urbano, explorando como habitats uma variedade de recipientes que proliferam perto de habitações humanas e, tanto a quiescência quanto a diapausa, podem estar contribuindo para a manutenção destas populações em campo. Além do incômodo da picada, esses mosquitos são potenciais vetores de patógenos que causam doenças tropicais, como a febre amarela, dengue, chikungunya e a zika (SCHAFFNER; MEDLOCK; BORTEL, 2013).

A quiescência de *Ae. aegypti* também pode permitir a sobrevivência de embriões infectados, favorecendo a permanência no ambiente de arbovírus veiculados pelo mesmo (CONSOLI; LOURENÇO DE OLIVEIRA, 1994; ROSEN, 1987; YANG, 2014). Por exemplo, DENV-1 foi detectado e isolado em 8,33% de ovos do mosquito *Ae. aegypti* na Flórida, sugerindo que a manutenção de surtos de dengue entre o ano de 2009 e 2010 em Key West pode ter sido facilitada por transmissão vertical (BUCKNER; ALTO; LOUNIBOS,

2013). A transmissão transovariana do vírus da dengue também foi detectada em ovos de 1,09% de criadouros na Índia. Em tal situação, os ovos dormentes podem ter contribuído para sustentar as epidemias de dengue (ANGEL; ANGEL; JOSHI, 2016). Para Zika, também já foi demonstrada a transmissão transovariana em espécies de *Aedes* (CHUN XIAO et al., 2017).

Embora as implicações da quiescência na ecologia dos mosquitos vetores e na saúde pública sejam bem estabelecidas, seu efeito sobre a fisiologia, comportamento e história de vida são menos conhecidos. As reservas maternas acumuladas nos ovos influenciam diretamente na duração do período de dormência da larva de 1º ínstar em seu interior (CONSOLI; LOURENÇO DE OLIVEIRA, 1994; PEREZ; NORIEGA, 2013). Desse modo, ovos quiescentes tornam-se um importante problema para o controle do vetor, uma vez que, pode contribuir diretamente para manutenção da população de mosquitos em áreas tratadas. Em *Ae. aegyptii*, ovos de uma única postura, com mesma idade e mantidas sob mesmas condições ambientais diferiram quanto à taxa de eclosão dentro do mesmo período de quiescência. Esses resultados indicam que cada fêmea de *Ae. aegyptii* contribui de maneira diferenciada para as várias implicações da quiescência na população desse mosquito. Sota e Mogi (1992) sugerem que variações intraespecíficas na sobrevivência dos ovos seja um caráter hereditário dependente das pressões ambientais (SOTA; MOGI, 1992). Variações no tempo de quiescência dos ovos de *Ae. aegyptii*, assim como taxas de eclosão variadas, podem ser mecanismos que o mosquito utiliza para manter de forma contínua na natureza, apesar de flutuante, populações de adultos em diferentes períodos, dependendo das condições favoráveis ou adversas do ambiente (SILVA; SILVA, 1999).

## 2.5 Eclosão larvária

Os ovos são normalmente depositados e aderidos ao substrato com a superfície ventral. A larva no ovo é posicionada com a sua porção ventral para cima. (CHRISTOPHERS, 1960; CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994). A cabeça ocupa o terço anterior do ovo e quase outro terço na extremidade posterior é ocupado pelo sifão respiratório e segmento anal. A parte intermediária do ovo é ocupada pelos três segmentos torácicos e os segmentos abdominais restantes (CHRISTOPHERS, 1960).

Na região cefálica, existe uma estrutura constituída por uma placa circular fortemente esclerotizada (*egg-breaker*). Há uma hipótese de que quando a larva embrionária dentro do ovo recebe o estímulo de eclosão por meio de seus receptores, há uma rotação da cabeça larvária em um ângulo de aproximadamente 180° e/ou movimentos repetitivos para cima e

para baixo e ainda movimentos característicos da faringe da larva (WEISSMAN-STRUM; KINDLER, 1963). Além disso, acredita-se que antes da eclosão propriamente dita, ocorre a perfuração de todas as membranas extra-embrionárias até a superfície externa do ovo por meio do *egg-breaker* e o processo é concluído pela pressão mecânica e saída exercida pela larva. O primeiro estímulo de eclosão é dado por meio da submersão do ovo em água. Os ovos são impermeáveis à água, mas são permeáveis a gases respiratórios que provavelmente levam informações quanto à umidade do meio. Esse mecanismo de eclosão é potencializado por outras influências como a temperatura, a agitação do meio, a ação de micro-organismos, presença de larvas circulantes e redução do oxigênio dissolvido na água (WEISSMAN-STRUM; KINDLER, 1963). É muito importante evidenciar que existe um mecanismo de controle no gênero *Aedes* que impede a eclosão das larvas de um mesmo ciclo gonadotrófico ao mesmo tempo, quando os ovos são expostos pela primeira vez à água. Isso é provável que ocorra naturalmente para assegurar uma maior taxa de sobrevivência possível, pois se houver adversidades no meio no momento de oviposição, após a finalização da embriogênese, somente uma parte da prole será perdida (VINOGRADOVA, 2007). Por outro lado, outra hipótese é que todas as larvas não eclodem ao mesmo tempo por competição de espaço e alimento. Dessa forma, as primeiras larvas que eclodem se encarregam de sinalizar a não eclosão das demais, uma vez que estas se alimentam de bactérias que estão na superfície dos ovos e que são essenciais no processo de eclosão. Essas bactérias tem o papel de consumir oxigênio e a diminuição da oxigenação é estimulante no processo de eclosão larvária. (LIVDAHL; KOENEKOOP; FUTTERWEIT, 1984).

## **2.6 Importância epidemiológica de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus***

### **2.6.1 *Aedes aegypti***

As fêmeas do mosquito *Ae. aegypti* têm grande destaque em diversos estudos porque estão implicadas nos ciclos da transmissão de diversas arbovirose, entre elas, a febre amarela, dengue, chikungunya, zika e outras que possuem alto potencial de morbidade e/ou mortalidade em humanos (COSTA-VASCONCELOS, 2003; DONALISIO et al., 2017; DONALISIO; FREITAS, 2015). Estes arbovírus se multiplicam nos tecidos dos mosquitos e são transmitidos ao homem pela alimentação da fêmea, devido a seu hábito hematofágico e antropofílico (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994).

Dentre estas arboviroses veiculadas por *Ae. aegypti* no Brasil, a febre amarela foi a primeira a causar grandes impactos à saúde pública. Essa doença é endêmica na África e nas Américas Central e do Sul, sendo causada pelo vírus amarílico, do gênero *Flavivirus*. Sob o ponto de vista epidemiológico a febre amarela apresenta-se sob duas formas, silvestre (FAS) e urbana (FAU) (COSTA-VASCONCELOS, 2003). No Brasil, mosquitos dos gêneros *Haemagogus* são os responsáveis pelo ciclo de transmissão silvestre (DEGALLIER et al., 1993), enquanto que o ciclo urbano, a transmissão ocorre por meio de *Ae. aegypti*. Os últimos casos de FAU tinham sido registrados no Brasil em 1942 (TAUIL, 2010). Entretanto, devido ao aumento do número de casos recentes de febre amarela em macacos, reservatório do vírus no ambiente silvestre e da proximidade destes com o ambiente urbano, onde ocorre alta densidade de *Ae. aegypti*, casos de FAU retornaram a ocorrer na população e isso tem sido preocupante (CAVALCANTE et al., 2017). A melhor forma de prevenir esta doença é imunizando-se através da vacina contra a febre amarela.

*Ae. aegypti* também é o vetor primário da dengue, cuja incidência tem crescido bastante no cenário da saúde pública mundial nos últimos 50 anos (KRAEMER et al., 2015). Segundo dados recentes, estima-se que ocorrem aproximadamente 390 milhões de casos no mundo por ano, sendo, 96 milhões com manifestação clínica (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2017). No Brasil, de acordo com o Boletim Epidemiológico (2017), fornecido pelo Ministério da Saúde, foram registrados em 2017, mais de 200 mil casos da doença. Esta arbovirose possui quatro diferentes sorotipos (DENV- 1, 2, 3 e 4) circulantes no Brasil e em algumas áreas pode haver a circulação de dois ou mais sorotipos simultaneamente, aumentando os riscos de transmissão da doença (MURRAY; QUAM; WILDER-SMITH, 2013). Atualmente, a vacina para esta doença já existe. Embora não esteja disponível para toda a população, está sendo utilizada em locais com alto nível de endemismo (WHITEHEAD et al., 2017).

*Ae. aegypti* também é vetor do vírus causador da febre chikungunya, arbovirose que antes estava restrita à Ásia e África, mas que no ano de 2013 atingiu o Caribe, e expandindo-se até o Brasil, com os primeiros casos reportados em 2014 (NUNES et al., 2015). Embora *Ae. albopictus*, seja o vetor primário do CHIKV, *Ae. aegypti*, tem um papel muito importante na transmissão da chikungunya em muitos países do mundo. A introdução do vírus CHIKV no Brasil tem sido bastante significativa, por ser mais uma arbovirose com potencial de epidemia (HONÓRIO et al., 2015). De acordo com dados do Boletim Epidemiológico, fornecido pelo Ministério da Saúde, no período de 2015-2017, foram registrados mais de 450 mil casos de chikungunya (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO, 2017).

Mais recentemente, foi introduzido no Brasil o vírus causador da febre zika, que também é transmitido por meio do mosquito *Ae. aegypti*. Isto já era relatado há mais de 50 anos no continente africano, causando infecções em humanos. Em 2007, ocorreu uma significativa epidemia do vírus Zika na Ásia, especificamente na Ilha Yap, Micronésia (DUFFY et al., 2009). Em 2013, uma epidemia de grande destaque também foi relatada na Polinésia Francesa (CAO-LORMEAU et al., 2014; IOOS et al., 2014). Em 2015, a doença chegou ao território brasileiro, quando foram identificadas em pacientes com sintomatologia semelhante à dengue (MUSSO et al., 2015; ZANLUCA et al., 2015). Após a confirmação dos primeiros casos, a arbovirose se disseminou consideravelmente pelo país (OLIVEIRA, 2016). Um fator preocupante atrelado ao vírus Zika é a sua relação com a síndrome de *Guillain-Barré*, evidente em casos descritos na Polinésia Francesa e também no Brasil. Além disso, o vírus Zika causa microcefalia em recém-nascidos (MLAKAR et al., 2016) e uma série de quadros clínicos associados, atualmente denominados de síndrome congênita do Zika (POLONIO et al., 2017).

### 2.6.2 *Aedes albopictus*

*Aedes albopictus* é o principal vetor do vírus que transmite a encefalite japonesa na Ásia. É considerado o segundo mosquito do gênero *Aedes* de maior importância médica, pois também é um potencial vetor do vírus Dengue (KNUDSEN, 1995). Pelo fato de que este mosquito se expandiu consideravelmente na Europa e Ásia (Global Invasive Species Database, <http://www.issg.org/database/>) nos últimos anos, aumentou de forma alarmante o risco de transmissão de diferentes arbovírus como Dengue, Chikungunya e Zika nestes continentes (EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL, 2012; GRATZ, 2004; MEDLOCK et al., 2012).

Embora o mosquito *Ae. albopictus* seja um vetor menos eficiente para a transmissão destes arbovírus, em relação ao potencial vetor *Ae. aegypti*, em 2005-2006 foi responsável por grandes epidemias de chikungunya nas ilhas do Oceano Índico e também foi reconhecido como vetor competente para a Dengue e vários outros arbovírus, incluindo Zika (GRARD et al., 2014; GRATZ, 2004). Na Europa, casos autóctones de dengue, promovidos por *Ae. albopictus* foram registrados na França (SUCCO et al., 2016) e na Croácia (GJENERO-MARGAN et al., 2011) durante a última década. Além disso, dois surtos autóctones de chikungunya ocorreram na Itália em 2007 no nordeste da Itália (ANGELINI et al., 2007) e em 2017 no centro da Itália (EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND

CONTROL, 2017). Recentemente também, a espécie *Ae. albopictus* tem sido implicada na epidemia da febre amarela nos anos de 2017-2018 no Brasil. *Ae. albopictus* tem o potencial de atuar como vetor de patógenos zoonóticos (por exemplo, *Dirofilariosis canina* por *Dirofilaria* spp. para humanos (BENEDICT et al., 2007; FARAJI et al., 2014; PAUPY et al., 2009). Além disso, estudos demonstraram que em condições laboratoriais esta espécie é capaz de transmitir vírus associados com 22 tipos de doenças, como por exemplo: Ross River e Febre do Nilo Ocidental (GUBLER et al., 2001; HOLICK et al., 2002).

## 2.7 Controle populacional de *Aedes* sp.

De uma forma ampla, o controle de insetos vetores em saúde pública é realizado com o objetivo de minimizar a densidade populacional de uma espécie-alvo, para reduzir a probabilidade de surtos epidêmicos de uma determinada doença (BRAGA; VALLE, 2007).

O controle de mosquitos *Aedes* sp. tem sido a principal estratégia para prevenir arboviroses e isso tem representado um enorme desafio para os serviços de saúde pública, devido à complexidade e multiplicidade dos fatores envolvidos no processo de transmissão viral e na infestação das áreas por estes vetores. As dificuldades parecem ainda maiores nos países em desenvolvimento, como o Brasil, os quais acumulam frequentemente problemas de infra-estrutura ligados ao saneamento e ao abastecimento de água, aspectos que favorecem o aparecimento e manutenção dos criadouros do mosquito em campo (DONALÍSIO; GLASSER, 2002).

Condições abióticas como temperatura, umidade, precipitação pluviométrica e ocupação do espaço geográfico pela população humana podem influenciar na distribuição de doenças transmitidas por mosquitos, principalmente quando as espécies estão adaptadas aos ambientes urbanos (DONALÍSIO; GLASSER, 2002). Alguns trabalhos têm reportado que o controle efetivo de *Ae. aegypti* não depende apenas de um método isolado, mas da integração de medidas, adequadas à realidade local, que transcendem muitas vezes o setor saúde (BRASIL, 1999). Em geral, os programas empregam inseticidas químicos dirigidos ao controle de duas fases de vida do mosquito: 1) os larvicidas ou os reguladores do desenvolvimento dos insetos, como o temephos, Bti, spinosad, diflubenzuron e piriproxyfen, aplicados diretamente nos criadouros aquáticos, cuja ação se dá por ingestão e/ou contato e 2) os adulticidas, que atuam por contato, podendo ser aplicados por borrifação nas superfícies externas dos criadouros ou em locais de repouso dos mosquitos adultos, essa aplicação é conhecida como tratamento perifocal (BRASIL, 2001).

Os ovos desses mosquitos podem também ser alvos do controle vetorial que consiste em eliminar os possíveis sítios de oviposição da fêmea. Isto inclui medidas relacionadas à melhoria das habitações humanas, ao abastecimento de água, coleta e destinação adequada de resíduos sólidos, limpeza e manutenção de rios, córregos e sistemas sanitários. No caso particular de espécies de mosquitos colonizadoras de criadouros temporários, como *Ae. aegypti*, além das ações já supracitadas a vedação/proteção de depósitos usados para o armazenamento de água se faz necessária para o controle do mosquito (REGIS et al., 2008).

Algumas experiências de campo têm demonstrado o impacto na redução populacional de *Ae. aegypti* através da remoção mecânica de ovos, por meio de armadilhas de oviposição (REGIS et al., 2008, 2013). Tais estudos destacam a importância de controlar esta espécie ainda na fase de ovo, pois este representa a principal forma de permanência e dispersão desta espécie (MELO-SANTOS, 2008). Porém, não é possível conter criadouros que não estão visíveis e estes são denominados micro-criadouros. Além disso, os ovos do gênero *Aedes* não são sensíveis à maioria dos compostos que são administrados em possíveis criadouros dessas espécies. Esta característica é provavelmente resultado da estrutura que reveste externamente o ovo e que o impermeabiliza, denominado exocóxon, como descrito anteriormente. Além disso, as larvas embrionárias (*pharate larvae*) têm a capacidade de permanecer viáveis por longo período de incubação na ausência de água, persistindo nos ambientes secos e em áreas tratadas (DINIZ et al., 2015; SILVA; SILVA, 1999).

### 3 JUSTIFICATIVA

Um dos maiores desafios para os programas de controle de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* é a rápida expansão territorial dessas espécies de mosquito e seu papel na disseminação de arboviroses, como febre amarela, dengue, chikungunya e zika. A dispersão passiva de ovos ou mosquitos adultos, por meio do transporte terrestre, aéreo e aquático é uma realidade facilitada pelas atividades antrópicas, que têm aumentado a complexidade para atingir níveis efetivos e sustentáveis das ações de controle.

Uma das estratégias de sobrevivência destas espécies invasoras é que seus ovos são resistentes à perda de água (dessecação) e, por isso, podem suportar condições ambientais adversas por períodos prolongados. Tal característica se manifesta pela dormência destes ovos, que por sua vez pode ser mediada pela diapausa e/ou quiescência embrionária, processos importantes para o sucesso evolutivo das espécies de *Aedes* em diferentes ambientes, principalmente em criadouros temporários sujeitos a efeitos drásticos da sazonalidade. Diante de controversas conceituais reportadas na literatura surge como importante questão verificar, experimentalmente, o fenômeno da diapausa e sua influência sobre o potencial biótico das espécies *Ae. albopictus* e *Ae. aegypti*, oriundas de diferentes origens geográficas.

Neste contexto, a investigação da expressão dos genes associados à diapausa proposta neste estudo poderá trazer informações úteis ao desenvolvimento de ferramentas inovadoras de controle para espécies de mosquitos, sobretudo as do gênero *Aedes*. O comprometimento desta importante estratégia de sobrevivência pode aumentar a vulnerabilidade dos ovos no ambiente, reduzindo a capacidade de superação de condições adversas e conseqüentemente de dispersão em campo.

#### **4 PERGUNTA CONDUTORA**

Populações naturais de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* induzidas à diapausa embrionária apresentam alterações no perfil de expressão gênica e mudanças em seu potencial biótico?

## **5 HIPÓTESE**

Populações naturais de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* induzidas à diapausa apresentam alterações na expressão de genes de metabolismo e em seu potencial biótico.

## 6 OBJETIVOS

### 6.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos da indução da diapausa embrionária em populações naturais de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* provenientes de diferentes áreas geográficas.

### 6.2 Objetivos específicos

- a) Caracterizar o padrão de embriogênese e de eclosão larvária em populações de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* adaptadas a regiões tropicais e temperadas, após a indução da diapausa;
- b) Verificar experimentalmente se a diapausa ocorre em populações de *Ae. aegypti*;
- c) Verificar o impacto da indução da diapausa sobre o potencial reprodutivo e a emergência de fêmeas nas populações selecionadas;
- d) Comparar as reservas lipídicas dos grupos induzidos e não induzidos à diapausa;
- e) Analisar qualitativamente a expressão de genes associados à diapausa embrionária em *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*;
- f) Investigar a expressão diferencial de genes relacionados à diapausa embrionária nas populações de campo deste estudo por meio de qRT-PCR.

## 7 MATERIAIS E MÉTODOS

### 7.1 Coleta das populações de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*

A coleta das populações naturais de mosquitos das diferentes localidades avaliadas neste estudo foi obtida através de armadilhas de oviposição (ovitrampas) (Figura 10) e ocorreu nos anos de 2014 e 2015. A escolha destas populações foi baseada no fato de que essas áreas são marcadas sazonalmente por temperaturas baixas (áreas subtropical e temperada) e por estação seca (área tropical úmida e semi-árida), descritas a seguir.

#### 7.1.1 *Ae. aegypti*

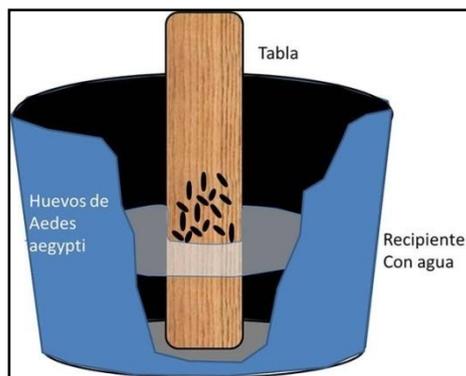
As amostras das populações de *Ae. aegypti* foram provenientes de Santa Catarina/Brasil/América (26° 54' 28" S e 48° 39' 43" O), hemisfério sul, clima subtropical, inverno com baixas temperaturas (média anual – 20 °C), com pequena variação fotoperiódica, e de Praia/Cabo Verde/África (14°55'53"N e 23°30'45" O) hemisfério norte, clima semi-árido, quente (média anual – 26 °C), sem amplitude térmica, sem variação fotoperiódica.

A população de Santa Catarina foi fornecida pelo DIVE-SC (Diretoria de Vigilância Epidemiológica do Estado de Santa Catarina) e de Praia pelo grupo de pesquisas da Universidade Jean Piaget de Cabo Verde.

#### 7.1.2 *Ae. albopictus*

As amostras das populações de *Ae. albopictus* foram provenientes do município de São Lourenço da Mata/Pernambuco/Brasil (08° 00' 08" S e Longitude: 35° 01' 06" O), hemisfério sul, clima tropical, com elevadas temperaturas (média anual – 25 °C), sem amplitude térmica, sem variação fotoperiódica e da Região de Ticino/Suíça/Europa (46°19'54.24"N e 8°48'1.63"L), hemisfério norte, clima temperado, inverno rigoroso (média anual – 20 °C) com baixas temperaturas que podem chegar a -7 °C e alta variação fotoperiódica ao longo do ano. A população de Pernambuco foi fornecida pelo Serviço de Referência para Controle de Culicídeos Vetores (SRCCV) do Departamento de Entomologia do IAM/FIOCRUZ –PE e Ticino-Suíça pelo grupo de pesquisas do *Swiss TPH*.

**Figura 10** - Armadilha de oviposição (ovitampa) utilizada para coletar ovos de *Aedes* sp. nas diferentes áreas analisadas neste estudo.



**Fonte:** Macro News (OVITRAMPA ¿SABES..., 2016).

**Nota:** Ilustração dos componentes de uma ovitampa - o substrato de oviposição para as fêmeas de *Aedes* sp.

## 7.2 Estabelecimento e manutenção das populações

As formas jovens (larvas e pupas) dos mosquitos foram mantidas em recipientes plásticos para criação, contendo água e ração para gatos (Friskies<sup>®</sup>). Ao atingirem a fase de pupas, os insetos foram transferidos para gaiolas de contenção para emergência dos mosquitos (Figura 11). Machos e fêmeas foram alimentados com solução de açúcar a 10%, *ad libitum* e, adicionalmente, às fêmeas foram oferecidos repastos sanguíneos em camundongos *Swiss* (*Mus musculus*) uma vez por semana, para obtenção das progênes (Figura 12). Os animais utilizados para este fim fazem parte do projeto n° 78/2014 intitulado por Protocolo para utilização de camundongos (*Mus musculus*) no repasto sanguíneo de Culicídeos, que fora aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/IAM) em reunião dia 25/09/2015 (Apêndice B). Em cada gaiola de contenção foram colocados papéis-filtro (papelotes) umedecidos com o intuito de servirem como substrato de oviposição para as fêmeas ingurgitadas. Os ovos depositados nos papelotes após 72 horas (quando a embriogênese já está finalizada) foram desidratados à temperatura ambiente e armazenados em recipientes plásticos até a utilização dos mesmos. Todos os insetos foram mantidos em condição padrão no Insetário do IAM/Fiocruz-PE, em sala climatizada a 26 ° C ± 1 ° C e umidade relativa de 80% e fotoperíodo de 16h:8h (claro:escuro).

### 7.3 Indução do processo de diapausa e quiescência em ovos de *Aedes sp.*

A partir do momento em que as larvas das diferentes populações de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* passaram para o estágio de pupas, grupos de aproximadamente 500 indivíduos (250 machos e 250 fêmeas) das diferentes populações de campo foram submetidos ao estresse fotoperiódico, caracterizado por 8h:16h (claro:escuro) e temperatura 21° C. Este procedimento é um estímulo eficaz para induzir a diapausa embrionária. Por outro lado, as fêmeas do grupo controle simplesmente foram mantidas sob o fotoperíodo invertido de 16h:8h (claro:escuro) e temperatura 26 °C.

O primeiro repasto sanguíneo foi ofertado às fêmeas após sete dias da emergência nos dois grupos experimentais (controles e induzidos), além disso, após a oviposição, os ovos permaneceram na condição induzida por mais três dias, para finalizar a embriogênese e logo após, foram transferidos e armazenados para condição - fotoperíodo de 16h:8h (claro:escuro) e temperatura 26 °C. O armazenamento na ausência de água foi estímulo para a indução dos ovos à quiescência em ambos os grupos controles e induzidos à diapausa. Após sete dias, parte destes ovos (50%) foi submetida ao estímulo de eclosão larvária, conforme o estudo de Poelchau (2013a) com a finalidade de promover a fenotipagem da diapausa. Para esse teste foram realizados três experimentos independentes com dez réplicas, os quais foram a base para todas as avaliações subsequentes.

**Figura 11** - Instalações do insetário do IAM/Fiocruz-PE para o estabelecimento e manutenção de populações naturais de *Aedes sp.*



**Fonte:** Diniz (2011)

**Legenda:** A) Recipientes plásticos para a criação das formas aquáticas (larva e pupa) do mosquito; B) Gaiolas de contenção onde foram mantidos os adultos para obtenção das gerações filiais.

**Figura 12** - Representação do processo de alimentação sanguínea das fêmeas de *Aedes* sp. em camundongos *Mus musculus*.



Fonte: O autor

#### 7.4 Embriogênese, incidência da diapausa e taxa de eclosão larvária das populações.

Com o intuito de investigar o percentual de eclosão das larvas nas diferentes populações submetidas ao estresse fotoperiódico e de temperatura, uma parte dos ovos das fêmeas induzidas à diapausa, foi colocada em contato com a água deionizada (MiliQ) sete dias após a postura e observada após 24h para a visualização e contagem das larvas  $L_1$ . As larvas embrionárias não eclodidas (*pharate larvae*) corresponderam àqueles embriões em estado diapáusico ou dotados de alguma falha na embriogênese, neste caso, resultado dos ovos nos papelotes de oviposição antes da finalização da embriogênese.

A presença dos embriões foi identificada por meio da clarificação dos ovos de acordo com a metodologia descrita por Hanson e Craig (1995) e por Trips (1970) com poucas modificações. Os ovos clarificados (Figura 13) foram montados em lâmina/lamínula e examinados em microscópio óptico (Leica DM500) acoplado à uma câmera. As imagens capturadas foram analisadas pelo programa 4.7.4 *image analysis* (AxionCam MRm Zeiss), em uma resolução de 400x. A incidência de diapausa (ID), o potencial embrionário (E) e a taxa de eclosão (H) foram estimados através das seguintes fórmulas, baseadas no estudo de Poelchau (2013a):

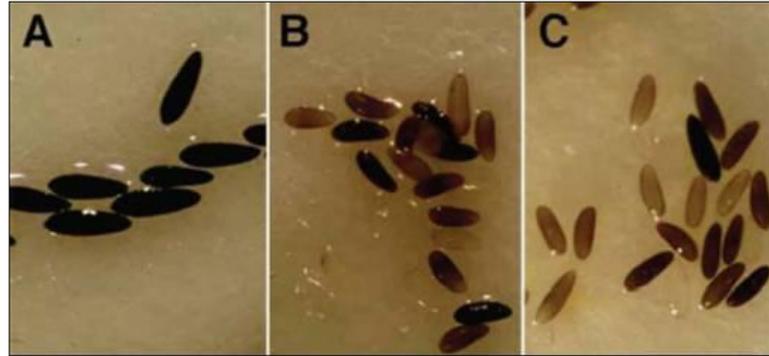
$$ID = \frac{\text{N}^\circ \text{ de ovos embrionados sem eclosão}}{\text{N}^\circ \text{ de } L_1 + \text{N}^\circ \text{ de ovos embrionados sem a eclosão de larvas.}}$$

$$E = \frac{\text{N}^\circ \text{ de } L_1 + \text{N}^\circ \text{ de ovos embrionados sem a eclosão de larvas}}{\text{N}^\circ \text{ total de ovos (embrionados + não embrionados)}}$$

$$H = \frac{\text{N}^\circ \text{ de } L_1}{\text{N}^\circ \text{ total de ovos embrionados}}$$

Os ovos classificados como inférteis, ou seja, aqueles não embrionados, foram excluídos da análise. Para esse teste foram realizados três experimentos independentes cada um havendo dez réplicas.

**Figura 13** - Clarificação de ovos de *Aedes sp.* para verificação da embriogênese.



**Fonte:** McMeniman et al. (2011).

**Nota:** Clarificação de ovos por meio da submersão em hipoclorito a 2% ao longo do tempo: A) 1 min; B) 10 min; C) 30 min. O tempo de clarificação utilizado para a observação do embrião foi de 30-50 minutos.

### 7.5 Potencial reprodutivo das fêmeas induzidas e não induzidas à diapausa

A fecundidade (número total de ovos/fêmea) e a fertilidade (número de larvas somado ao número de ovos embrionados/número total de ovos) foram mensuradas nas quatro populações de campo induzidas à diapausa - 8h:16h (claro:escuro), T = 21 °C e controle - 16h:8h (claro:escuro), T = 26 °C. Os ovos classificados como inférteis também foram excluídos desta análise. Para esse teste foram realizados três experimentos independentes com quinze réplicas.

### 7.6 Tempo de Emergência das fêmeas induzidas e não induzidas à diapausa

Pupas fêmeas com menos de 24 horas foram separadas a partir dos recipientes de criação, condição padrão de desenvolvimento de 16h:8h (claro:escuro), T = 26 °C para formar grupos de 10 indivíduos/copo plástico de 100 mL, com objetivo de observar o tempo de ecdise (muda) para forma adulta em intervalos de 24 horas, tanto para o grupo induzido a diapausa, quanto para o grupo controle. Para esse teste foram realizados três experimentos independentes com cinco réplicas.

## 7.7 Quantificação das reservas lipídicas de embriões (ovos) e fêmeas induzidos de *Aedes* sp.

O conteúdo de lipídeo total foi quantificado em fêmeas recém-emergidas e em *pools* de 200 ovos de todas as populações de campo avaliadas neste estudo, tanto na condição de indução à diapausa quanto no grupo controle. A quantificação foi realizada por meio da técnica colorimétrica modificada de Van Handel e Day (1985), adaptada principalmente para a quantificação de reservas lipídicas em ovos de *Aedes* sp. Para esse teste foram realizados três experimentos independentes com três réplicas.

### 7.7.1 Curva padrão de reserva lipídica

Inicialmente foi feita uma solução de 1:1 de óleo vegetal comercial (*Soya*<sup>®</sup>) e clorofórmio. Em seguida, foram transferidos os volumes de 50, 100, 150, 200 e 400 µL desta solução inicial (triplicatas) para tubos de ensaios de 10 mL. Posteriormente, os tubos foram colocados em bloco aquecedor (100 °C) até evaporar completamente o solvente. Foram adicionados 200 µL de ácido sulfúrico nos tubos e aquecidos por 10 minutos (100 °C). Finalmente, foi adicionado o cromogênio vanilina até completar 5 mL do tubo ainda no bloco aquecedor até a total homogeneização com auxílio de um pequeno bastão de vidro. A coloração da solução resultante (rosea) foi submetida à leitura de 525 nm no espectrofotômetro *Ultrospec<sup>TM</sup> 2100 Pro*. Este procedimento estimou a concentração total de lipídeo presente em cada amostra de óleo.

### 7.7.2 Preparação dos homogenatos, extração e quantificação das reservas lipídicas

Os lipídeos totais das diferentes populações controles e induzidas à diapausa foram mensurados através de *pools* de 200 ovos (embriões) e de fêmeas individualizadas. Estas amostras foram maceradas em 200 µL de sulfato de sódio a 2% para obtenção dos homogenatos, que foram lavados duas vezes com 800 µL de metanol-clorofórmio e centrifugados (3000 rpm) por 1 min. O precipitado foi desprezado e o sobrenadante utilizado para quantificar os lipídeos. Ao sobrenadante foram adicionados 600 µL de água deionizada (MiliQ) para um novo ciclo de centrifugação (3000 rpm - 1 min), que promoveu a separação da fração superior a qual foi desprezada e a inferior foi usada para a análise de lipídeos. A amostra para quantificação de lipídeos foi aquecida a 100 °C para evaporação do solvente, recebendo em seguida 200 µL de ácido sulfúrico. A amostra foi reaquecida por 10 min e

recebeu a adição de vanilina até um volume final de 5 mL. A coloração da amostra resultante foi submetida à leitura de 525 nm no espectrofotômetro *Ultrospec<sup>TM</sup> 2100 Pro*. Este procedimento estimou a concentração total de lipídeos presente em cada amostra das diferentes populações estudadas.

## **7.8 Análise da amplificação de transcritos dos genes relacionados à diapausa por RT-PCR**

A outra parte dos ovos (72h após a oviposição) que restou do experimento descrito no item 7.4 das fêmeas induzidas à diapausa por estresse fotoperiódico e de temperatura, assim como, das fêmeas controle das diferentes populações de campo foi utilizada para extração do RNA total e análise transcricional de alguns genes relacionados à diapausa por meio da RT-PCR. A seleção destes genes foi baseada nos estudos de Poelchau et al. (POELCHAU et al., 2011, 2014). Na tabela do Apêndice A estão descritos as sequências dos *primers* e códigos de acesso de cada gene investigado. Os *primers* foram desenhados através do programa *primer select (Lasergene)* e as sequências utilizadas como referência para a construção dos mesmos foram obtidas a partir do genoma de *Ae. aegypti* depositado no banco de dados *Vectorbase* (<https://www.vectorbase.org/>). Os genes selecionados e suas respectivas funções estão dispostos no Quadro 5 foram os seguintes: pepck, IGF, Catepsina, transferrina, e lipase. Em cada população, os transcritos destes genes foram investigados no embrião (ovo), larvas (estádio L<sub>4</sub>) e fêmeas (recém-emergidas, não alimentadas). Além destes genes, o gene Actina-1 foi utilizado como controle endógeno para todas as amostras observadas. Este experimento foi realizado em três réplicas biológicas independentes e em cada um deles tiveram pelo menos três réplicas.

### **7.8.1 Extração de RNA**

O RNA total de 200 ovos, de uma larva e de um mosquito fêmea de cada população investigada das duas condições controle e induzida, foi extraído através do reagente Trizol<sup>®</sup> (*invitrogen*), a partir de adaptações do protocolo do fabricante. Após a extração, o RNA foi submetido ao tratamento com DNase (Ambion<sup>®</sup>), seguindo as recomendações do fabricante para eliminar possíveis resquícios de DNA contaminante. Todas as amostras foram quantificadas utilizando o espectrofotômetro NanoDrop<sup>®</sup> 2000. A integridade do RNA das amostras foi avaliada através de eletroforese em gel de agarose (1%).

**Quadro 5** – Funções dos genes selecionados com a diapausa embrionária em populações de *Aedes sp.*

Genes	Código de acesso	Abreviação	Função
Catepsina I	[AAEL006389]	CATEP	Degradação do vitelo
Fator de crescimento - Insuline-like ( <i>Imaginal disc growth factor</i> )	[AAEL001965]	IGF-I	Desenvolvimento pré-imaginal
Lipase	[AAEL000268]	LIP	Metabolismo de lipídeos
Transferrina	[AAEL011641]	TRANSF	Resposta imune
Fosfofenolpiruvato Carboxiquinase	[AAEL000080]	PEPCK	Metabolismo de carboidratos
Actina*	[U02933. 1]	ACT-1	Componente celular

**Fonte** : O autor, baseando-se no banco de dados do Vectorbase e NCBI

**Nota**: \*Gene constitutivo utilizado como controle endógeno

### 7.8.2 Transcrição Reversa e PCR

Com o objetivo de avaliar a expressão dos genes associados à diapausa nos grupos estudados, foram feitas reações de transcrição reversa usando o Kit *AMV Cloned* (Invitrogen®), conforme as recomendações do fabricante. Para a reação foram usados os seguintes componentes: 10 µL do RNA (extraído das amostras descritas no item 7.8.1), 1 µL de oligo (dt)<sub>20</sub>, 2 µL de dNTP Mix 10mM. As amostras foram incubadas a 65°C por 5 minutos. Posteriormente foram adicionados 4 µL de tampão de síntese de cDNA 5x, 1 µL de DTT, 1 µL de RNase *out* e 1 µL (15U) da Transcriptase Reversa (Invitrogen®).

A última etapa do processo, que consistiu na síntese do DNA complementar, foi realizada no termociclador BIOMETRA® T3000, utilizando a seguinte programação: 45°C por 60 minutos e 85°C durante 5 minutos. Com o produto da transcrição reversa foram realizadas as reações de PCR. Para a reação foram usados os seguintes componentes: 1-5 µL de cDNA, 0,5 µL de 10mM dNTP Mix, 0,75 µL de 50mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 µL de cada 10mM *primer forward*, 0,5 µL de cada 10mM *primer reverse* que amplificam os fragmentos dos genes relacionados à diapausa, 0,1 µL de Platinum *Taq* DNA Polimerase (2U/µL) (Invitrogen®). Foi estabelecido um controle negativo, com todos os reagentes supracitados, porém sem cDNA, com o objetivo de verificar uma possível contaminação dos reagentes. Cada amostra foi amplificada no termociclador BIOMETRA® programado para uma etapa de desnaturação a 94°C por 2 min, seguido de 34 ciclos a 94°C por 1 minuto, 55°C por 1 min e 72°C por 2 min, e uma etapa final de 72°C (extensão) por 10 min.

### 7.9 Análise da expressão diferencial de transcritos dos genes relacionados à diapausa por qRT-PCR

O perfil transcricional de genes associados com a diapausa (os mesmos descritos no item 7.7) foi investigado em embriões provenientes de fêmeas induzidas à diapausa e do grupo controle. Para esta análise também foram utilizados o RNA total de *pools* de 200 ovos (parte amostral restante do experimento 7.4), seguido de tratamento com a DNase (Ambion®), conforme descrito no item 7.7.1. Para os ensaios de qPCR, utilizou-se 100 ng de RNA total dos *pools* (ovos) em análise em duplicata na placa. Antes de avaliar a expressão dos genes, a concentração do RNA de todas as amostras foi normalizada. Foram utilizados os mesmos *primers* da RT-PCR, neste experimento quantitativo de expressão gênica. O *kit* utilizado para as reações foi o QuantiTect® SYBR Green RT-PCR® (Qiagen), em reações *one-step*, com primeira etapa consistindo em uma reação de transcrição reversa e a segunda de PCR em tempo real. As sequências dos *primers* utilizados foram as mesmas citadas no item 7.7.1. A concentração de todos os *primers* utilizados foi de 0,5µM e a temperatura de anelamento das reações foi padronizada para 55°C.

As reações foram feitas no sistema de PCR em tempo real da *Applied Biosystems* (ABI 7500). A reação de RT-PCR quantitativa foi realizada medindo-se a intensidade de fluorescência do *Sybr-Green I*, na qual todas as amostras puderam ser comparadas. A fluorescência emitida foi captada pelo sistema óptico do termociclador e transmitida para um computador em que o *software* desempenhou a análise final dos dados. A programação da qRT-PCR utilizada foi a seguinte: uma etapa inicial a 50°C por 30 minutos que permitiu a transcrição reversa; outra etapa de 15 minutos a 95°C para ativar a Taq polimerase seguida por 40 ciclos de 94°C por 15 segundos, 54°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos. Controles negativos foram incluídos para detectar possíveis contaminações dos reagentes (sem RNA) e presença de DNA genômico não removido pelo tratamento com DNase (mix sem transcriptase reversa). A expressão diferencial dos transcritos foi realizada através dos valores de CT (*Cycle threshold*) das amostras entre os grupos induzido à diapausa e grupo controle. O método  $\Delta\Delta CT$  foi utilizado para essas análises (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). A reação foi otimizada baseando-se nos seguintes parâmetros: na concentração dos *primers*, curvas de dissociação, tamanho dos fragmentos amplificados e temperaturas de anelamento para cada gene investigado.

### 7.10 Desenho experimental e análises estatísticas

O desenho experimental deste estudo foi completamente randomizado, havendo pelo menos três réplicas em três experimentos independentes. A avaliação comparativa dos dados dos grupos controles e induzidos referentes ao padrão de embriogênese, taxa de eclosão, incidência de diapausa, tempo de emergência, fecundidade, fertilidade e quantificação de reservas lipídicas foi investigada por meio da Análise de Variância (ANOVA) e posteriormente do teste-t. A normalidade dos dados foi determinada usando o teste de *Shapiro-Wilk*. Todas as análises foram realizadas através do *software Statistic 7.1* (nível de significância de 5%). Os dados de detecção e quantificação relacionados à análise de expressão diferencial por qRT-PCR foram coletados e analisados pelo *software ABI* (versão 2.0.4) da *Applied Biosystems*.

## 8 RESULTADOS

### 8.1 Embriogênese, incidência da diapausa e taxa de eclosão larvária

A avaliação da contagem dos ovos antes e após o estímulo de eclosão larvária, dado pela submersão em água, foi possível classificar estes ovos da seguinte forma:

(1) Intactos embrionados com eclosão larvária; (2) Intactos embrionados sem eclosão larvária (2A) larvas dormentes em estado diapáusico ou (2B) larvas mal formadas durante a fase de embriogênese) e (3) Não embrionados .

O conjunto de ovos obtido a partir de fêmeas de todas as populações controle e induzidas à diapausa apresentaram um padrão de embriogênese acima de 90% (Tabela 1). A microscopia óptica evidenciou ovos intactos embrionados após a clarificação dos mesmos (Figuras 14), sendo possível observar os três pontos característicos das larvas embrionárias: dois ocelos (laterais) e um *egg-breaker* (central).

Aproximadamente 1% do conjunto de ovos em todos os grupos avaliados (controles e induzidos) após a clarificação, correspondeu aos ovos não embrionados (por possível falha no processo de fecundação). Estes ovos não foram utilizados nas análises de incidência da diapáusica (ID). Estes ovos apresentaram um formato alongado e sem volume, diferente da morfologia fusiforme esperada para ovos embrionados das espécies avaliadas (Figura 15). Além disso, quando estes ovos não embrionados foram submetidos ao processo de clarificação se dissolveram completamente, não sendo possível nenhuma visualização na microscopia.

Os ovos embrionados após o contato com água deionizada (MiliQ), por 48 horas, mostraram que as amostras de *Ae. aegypti* de Santa Catarina (Brasil) e Praia (Cabo Verde) apresentaram perfil de eclosão de larvas similares aos dos grupos controle, com taxa de eclosão acima de 90% . Esses ovos estavam em estado de quiescência e, portanto sensíveis ao estímulo de eclosão larvária. Por outro lado, as populações de *Ae. albopictus* de Pernambuco (Brasil) e Ticino (Suíça) induzidas à diapausa mostraram, respectivamente, uma taxa de eclosão larvária de 67% e 10%, estatisticamente menor ( $F=784,7$ ,  $gl=7,0$ ,  $p<0,05$ ) do que as dos grupos controle e até mesmo das outras populações de *Ae. aegypti* ( $p<0,05$ ). Consequentemente, as incidências de diapausa de 33% e 90% só foram observadas, respectivamente, para Pernambuco e Ticino que tiveram um valor maior e estatisticamente significativo em relação a todas as populações do grupo controle e as populações induzidas à diapausa de Santa Catarina e Cabo Verde.

**Tabela 1-** Incidência da diapausa, taxa de embriogênese e taxa de eclosão em ovos das populações de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* induzidas e não induzidas à diapausa.

	Grupos/Populações	Incidência de diapausa (ID)	Taxa de embriogênese (E)	Taxa de eclosão (H)
		Média±DP <sup>1</sup>	Média±DP <sup>1</sup>	Média±DP <sup>1</sup>
<b>Controle*</b>	Santa Catarina - Brasil ( <i>Ae.aegypti</i> )	0.042±0.032A	0.9066±0.030A	0.9573±0.039A
	Praia - Cabo Verde ( <i>Ae.aegypti</i> )	0.046±0.041A	0.900±0.0425A	0.9536±0.045A
	Pernambuco - Brasil ( <i>Ae.albopictus</i> )	0.044±0.036A	0.9072±0.0415A	0.9618±0.032A
	Ticino - Suíça ( <i>Ae.albopictus</i> )	0.045±0.032A	0.9087±0.0350A	0.9563±0.051A
<b>Induzidos</b>	Santa Catarina ( <i>Ae.aegypti</i> )*	0.0332±0.043A	0.9585±0.036A	0.9669±0.041A
	Praia - Cabo Verde ( <i>Ae.aegypti</i> )*	0.0535±0.044A	0.9537±0.049A	0.9448±0.033A
	Pernambuco - Brasil ( <i>Ae.albopictus</i> )	0.3278±0.039B	0.9653±0.030A	0.6721±0.041B
	Ticino - Suíça ( <i>Ae.albopictus</i> )	0.8986±0.050C	0.9654±0.049A	0.1012±0.030C

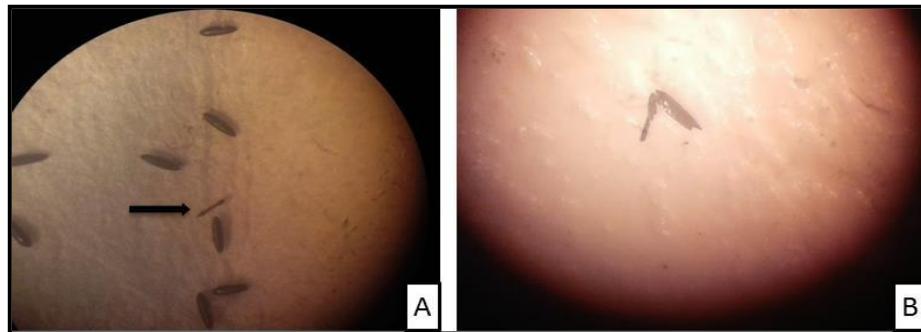
**Fonte:** Do autor.

<sup>1</sup>Médias originais e desvios padrões (±DP). Valores seguidos pela mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo test-t (p<0,05). \*Não houve incidência de diapausa em nenhuma das populações de *Aedes aegypti* induzidas à diapausa, os dados foram registrados como falha na embriogênese.

**Figura 14** – Microscopia óptica do embrião de mosquitos de *Aedes sp* após clarificação dos ovos.

**Fonte:** O autor.

**Legenda:** A) Ovo embrionado de *Aedes sp.* clarificado, mostrando os três pontos característicos da embriogênese - Dois ocelos (O) e Um egg-breaker (EB). B) Ovo de *Aedes sp.* clarificado mostrando as segmentações do corpo (SDC) do embrião.

**Figura 15** – Visualização de ovos não embrionados de mosquitos de *Aedes sp.*

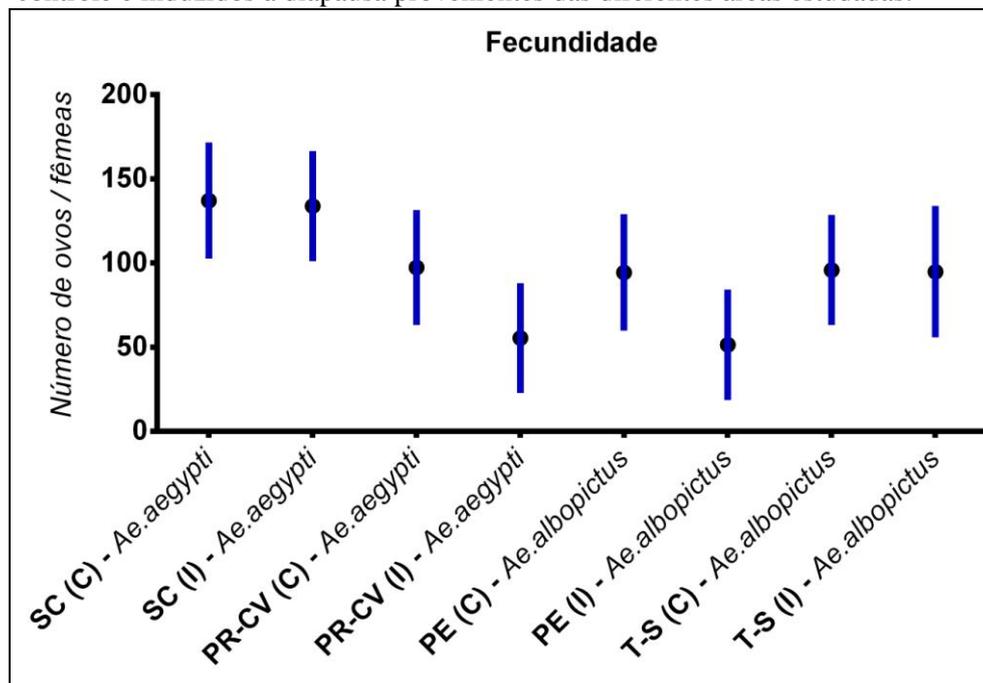
**Fonte:** Do autor.

**Nota:** A) visão geral da diferença conformacional de um ovo de *Aedes sp.* não embrionado (seta preta) em relação aos demais ovos em sua volta. B) outra forma alterada de um ovo não embrionado.

## 8.2 Potencial reprodutivo das fêmeas induzidas e não induzidas à diapausa

A fecundidade das fêmeas das populações do presente estudo foi estimada pelo número médio de ovos de cada grupo. Esses dados estão apresentados no Gráfico 1. As fêmeas induzidas de Praia (*Ae. aegypti*) e Pernambuco (*Ae. albopictus*) apresentaram uma redução significativa no número de ovos que foi de 55,4 e 51,4 ( $F=13,92$ ,  $gl=7,0$ ,  $p<0,05$ ) em relação ao grupo controle que foi de 97,3 e 94,3, respectivamente. Por outro lado, a fertilidade – representada pelo número de larvas L<sub>1</sub> e o número de ovos embrionados sem eclosão larvária foi maior que 90% em todos os grupos estudados.

**Gráfico 1** – Fecundidade das fêmeas de mosquitos *Ae. aegypti* e *Ae albopictus* dos grupos controle e induzidos à diapausa provenientes das diferentes áreas estudadas.



Fonte: O autor.

**Nota:** SC - Santa Catarina (Brasil); PE - Pernambuco (Brasil); PR-CV - Praia (Cabo Verde); T-S Ticino (Suíça), C - grupo controle, I - grupo induzido. Valores representados pelas barras com a mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste-t ( $p < 0,05$ ).

### 8.3 Tempo de Emergência das fêmeas induzidas e não induzidas à diapausa

O tempo para a emergência das fêmeas dos grupos controles e induzidos foi observado durante os seguintes intervalos de tempo:  $\Delta t = 1, 2, 3, 4, 5, 6$  e 7 dias (Tabela 2). Durante as primeiras 24 horas não houve emergência de adultos, como esperado. No período de dois dias, emergiram de 72-76% das fêmeas nos grupos controle e apenas 23% a 34% nos grupos induzidos, revelando uma diferença estatística ( $F=28,91$ ,  $gl=7,0$ ,  $p < 0,05$ ) para este parâmetro. Em até três dias, 100% das fêmeas do grupo controle já haviam passado para a fase adulta, enquanto que no grupo induzido a taxa de emergência variou de 40% a 60%. A comparação entre os grupos induzidos revelou que Santa Catarina e Ticino apresentaram variações similares na frequência de emergência ao longo do tempo similares que foram diferentes do observado ( $p < 0,05$ ) para Praia e Pernambuco. De um modo geral, houve uma diferença de três a quatro dias a mais para a emergência total do grupo de fêmeas induzidas à diapausa comparada ao grupo controle.

**Tabela 2-** Tempo de emergência de fêmeas de *Aedes* sp. induzidas e não induzidas à diapausa das populações estudadas.

Grupo/População	Frequência de emergência ao longo do tempo (Média±DP <sup>1</sup> )						
	$\Delta t = 2$ dias	$\Delta t = 3$ dias	$\Delta t = 4$ dias	$\Delta t = 5$ dias	$\Delta t = 6$ dias	$\Delta t = 7$ dias	
<b>Controle</b>	Santa Catarina - Brasil ( <i>Ae. aegypti</i> )	0.76±0.19A	1.00±0A	NA	NA	NA	NA
	Praia - Cabo Verde ( <i>Ae. aegypti</i> )	0.71±0.18A	1.00±0A	NA	NA	NA	NA
	Pernambuco - Brasil ( <i>Ae. albopictus</i> )	0.72±0.13A	1.00±0A	NA	NA	NA	NA
	Ticino - Suíça ( <i>Ae. albopictus</i> )	0.74±0.20A	1.00±0A	NA	NA	NA	NA
<b>Induzido</b>	Santa Catarina - Brasil ( <i>Ae. aegypti</i> )	0.15±0.15A	0.35±0.13B	0.57±0.12A	0.73±0.13A	0.92±0.09A	1.00
	Praia - Cabo Verde ( <i>Ae. aegypti</i> )	0.27±0.19B	0.50±0.14B	0.76±0.14B	0.92±0.10B	1.00±0A	NA
	Pernambuco - Brasil ( <i>Ae. albopictus</i> )	0.33±0.14B	0.60±0.17B	0.79±0.17B	0.94±0.09B	1.00±0A	NA
	Ticino - Suíça ( <i>Ae. albopictus</i> )	0.20±0.15A,B	0.40±0.13B	0.58±0.14A	0.79±0.11A	0.95±0.07A	1.00

**Fonte:** O autor.**Nota:** <sup>1</sup>Médias originais e desvio padrão (±DP). Valores seguidos pela mesma letra colunas não diferem estatisticamente pelo test-t (p<0,05). NA - não se aplica

#### **8.4 Quantificação das reservas lipídicas dos embriões e fêmeas induzidos e não induzidos à diapausa**

Conforme os dados da curva-padrão (Gráfico 2), pode ser observado que todos os grupos induzidos, embriões (Gráfico 3) e fêmeas (Gráfico 4) apresentaram uma maior quantidade de lipídeos em relação ao grupo controle, embora os valores mais acentuados tenham sido registrados para as populações de *Ae. albopictus* Pernambuco e Ticino. Em relação a quantidade de lipídeos foram encontradas diferenças estatísticas ( $F=5,99$ ;  $gl=7,0$ ,  $p<0,05$ ) entre as seguintes populações: Ticino/Suíça (maior quantificação) e todas as populações do grupo controle, incluindo a população de Santa Catarina induzida; e entre Praia/Cabo Verde controle e induzida e a população de Pernambuco induzida e Santa Catarina controle ( $p<0,05$ ).

#### **8.5 RT-PCR dos genes relacionados à diapausa embrionária**

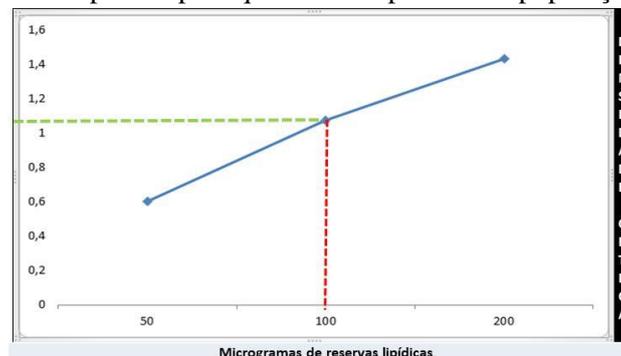
Uma análise qualitativa dos cinco genes investigados neste estudo, relacionados com o efeito da diapausa (Pepck, IGF, Catepsina, Transferrina e Lipase), juntamente com o controle endógeno Actina-1 foram investigados em todas as populações naturais de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* deste estudo por RT-PCR nas fases de embrião (ovo), larva ( $L_4$ ) e adulto fêmea. Os genes associados à diapausa foram expressos apenas no estágio embrionário de todos os grupos (induzidos e controle) com a evidência de uma banda específica (Figura 16), verificada por meio de eletroforese (gel de agarose a 1%). Por outro lado, nas amostras de larvas e mosquitos adultos das respectivas espécies, esses fragmentos não foram detectados. O controle endógeno (actina-1) foi devidamente amplificado e detectado para todos os estágios avaliados.

#### **8.6 Análise de expressão diferencial quantitativa de genes relacionados à diapausa por qRT-PCR**

Todos os genes relacionados à diapausa embrionária foram diferencialmente expressos em todos os grupos induzidos à diapausa (Gráfico 5). Os perfis de expressão gênica das populações de *Ae. aegypti* (Santa Catarina e Praia) foram os mesmos, havendo diferenças em relação ao número de cópias de transcritos registrados, pois todos os genes foram superexpressos, com exceção do gene lipase que foi subexpresso.

Os genes com maior nível de expressão para essas populações na condição induzida foram Pepck: Santa Catarina (11 vezes); Praia (8 vezes) e o gene Catepsina que foi 4 vezes mais expresso em ambas as populações em relação aos respectivos grupos controle. Já as populações de *Ae. albopictus* (Pernambuco e Ticino) não exibiram os mesmos padrões de expressão gênica diferencial. A população de Pernambuco apresentou superexpressão dos genes Pepck e Catepsina, enquanto que a população de Ticino teve os genes: pepck, lipase e transferrina.

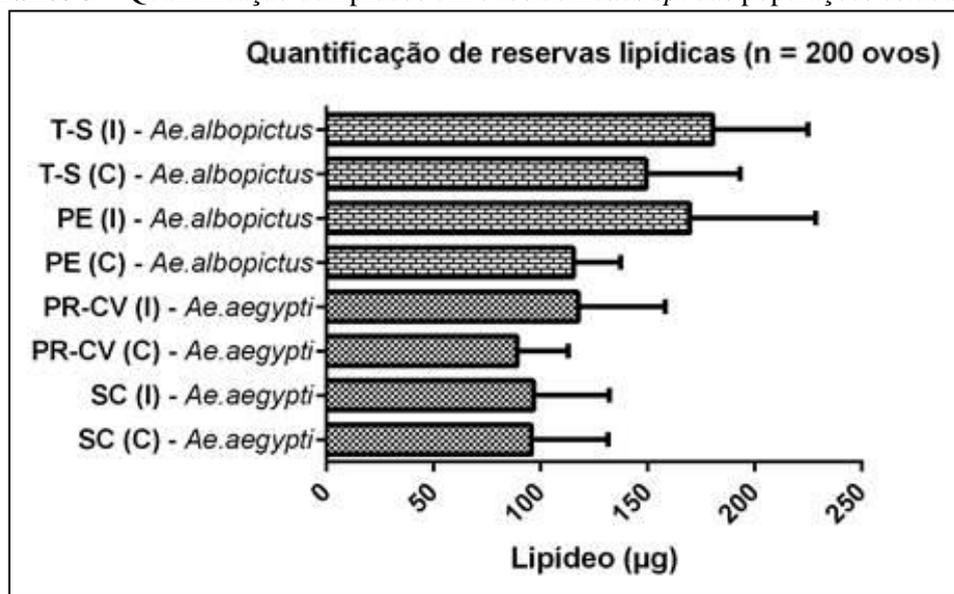
**Gráfico 2** – Curva-padrão para quantificar lipídeos das populações estudadas



**Fonte:** O autor.

**Nota:** Densidade óptica 525nm (linha verde) e a equivalência da quantidade de reservas lipídica em microgramas (linha vermelha). O ponto intermediário da curva (azul) foi usado como referência.

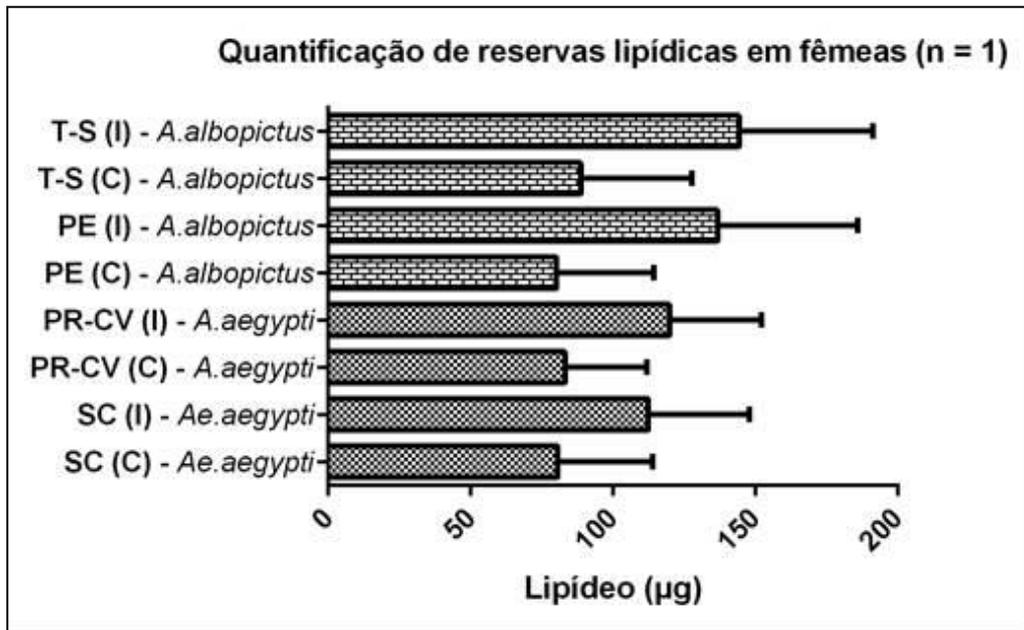
**Gráfico 3** – Quantificação de lipídeos em ovos de *Aedes sp.* das populações estudadas.



**Fonte:** O autor.

SC - Santa Catarina; PE - Pernambuco; PR-CV – Praia (Cabo Verde); T-S Ticino (Suíça), (C) - grupo controle, (I) – grupo induzido. Valores representados pelas barras com a mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste-t ( $p < 0.05$ ).

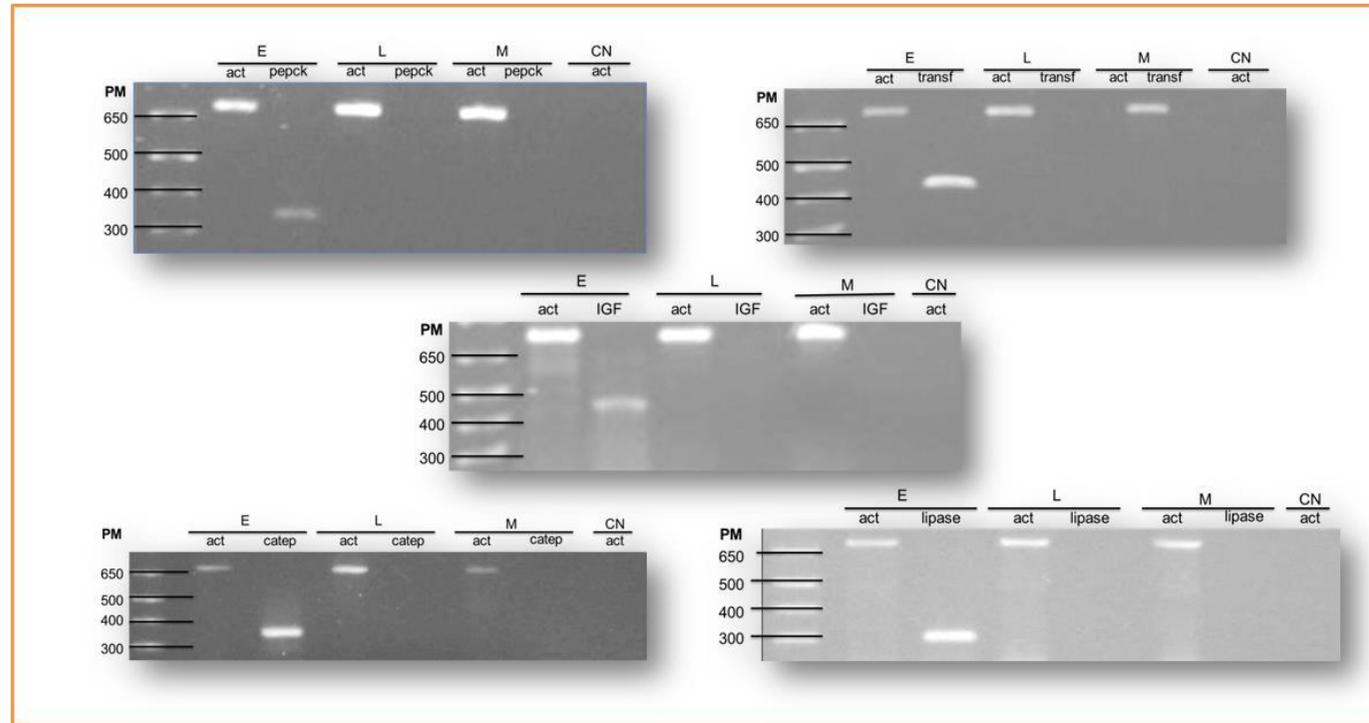
**Gráfico 4** – Quantificação de lipídeos de fêmeas de *Aedes sp.* das populações estudadas.



Fonte: O autor.

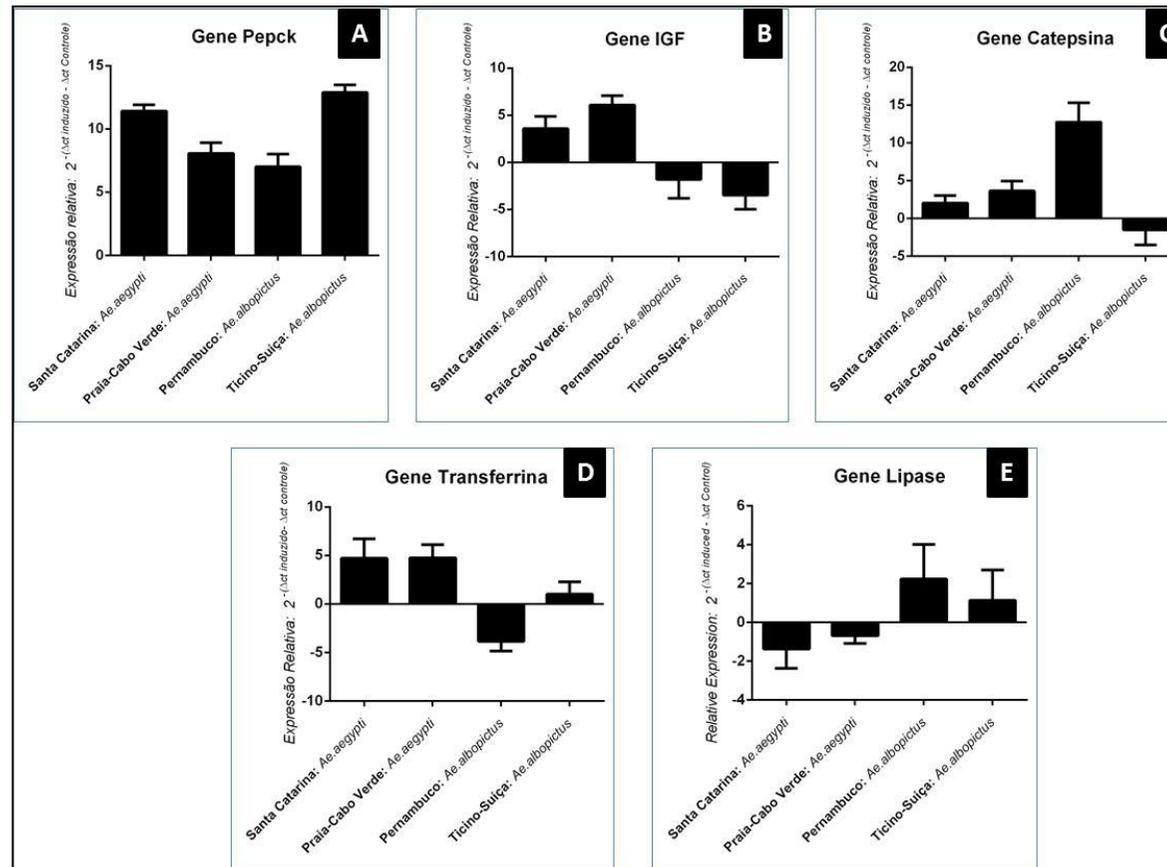
SC - Santa Catarina; PE - Pernambuco; PR-CV – Praia (Cabo Verde); T-S Ticino (Suíça), (C) - grupo controle, (I) – grupo induzido. Valores representados pelas barras com a mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste-t ( $p < 0.05$ ).

**Figura 16** – Eletroforese dos fragmentos referentes aos genes associados à diapausa e controle endógeno (actina) em amostras de ovos, larvas e mosquitos das espécies *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*.



**Fonte:** O autor.

**Nota:** **PM** - marcador de peso molecular (1Kb); **E** - amostras de *pools* de ovos (embriões); **L** – amostras de larvas; **M** – amostras de mosquitos (fêmeas); **CN** - controle negativo; **act -1** – gene da actina (controle endógeno). Por meio deste teste, é possível observar que não houve a amplificação dos fragmentos dos transcritos destes genes na fase de larva e adulta. Estes resultados acima foram evidentes em todas as populações estudadas de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* e mostraram o mesmo padrão de bandas nas eletroforeses.

**Gráfico 5** – Análise de expressão diferencial de genes relacionados à diapausa em ovos das populações de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* por qRT-PCR.**Fonte:** O autor.

**Nota:** Os valores representados no eixo y representam quantas vezes os genes foram diferencialmente expressos em populações de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* induzidas à diapausa em relação a seus respectivos grupos controle. Representação dos genes associados à diapausa: A) pepck; B) IGF; C) Catepsina; D) Transferrina; E) Lipase.

## 9 DISCUSSÃO

Os termos diapausa e quiescência são facilmente confundidos na literatura (Diniz et al., 2017), e estes processos biológicos representam estratégias importantes de sobrevivência para algumas espécies de mosquitos. Esses traços da biologia destes insetos garantem a permanência de seus ovos com viabilidade no ambiente e dificultam sobremaneira as ações de controle vetorial. No presente estudo, a diapausa embrionária foi investigada nas duas principais espécies de mosquitos vetores de arbovírus, *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*, comparando populações de distintas regiões geográficas, desafiadas por condições de estresse ambiental que induzem esse tipo de dormência embrionária.

A diapausa embrionária não foi confirmada para as populações de *Ae. aegypti* investigadas neste estudo, e este achado responde experimentalmente a questão que repercutia de forma errônea na literatura sobre o mosquito, quanto a ser portador desta característica evolutiva (CHOI et al., 2013; CHRISTOPHERS, 1960b; CONSOLI; LOURENÇO DE OLIVEIRA, 1994; SILVA; SILVA, 1999; SOARES-PINHEIRO et al., 2016). Por outro lado, os dados do presente estudo mostraram que *Ae. aegypti* apresenta quiescência como mecanismo de viabilidade prolongada do embrião que lhe confere tolerância às altas temperaturas e ao estresse hídrico, como já demonstrado anteriormente (DENLINGER; ARMBRUSTER, 2014; DINIZ et al., 2017; PEREZ; NORIEGA, 2012, 2013).

Todos os grupos analisados em nosso estudo, controle ou induzidos ao estresse hídrico, de temperatura e fotoperíodo, de ambas espécies, apresentaram uma taxa de não eclosão das larvas ou inviabilidade de ovos, em torno de 3-5%, a qual não correspondeu ao processo de diapausa nem de quiescência. Estes resultados corroboram os apresentados por Lounibos et al. (2003), que observaram um percentual ainda maior (15%) de não eclosão das larvas de *Ae. albopictus* não associado à diapausa.

A ideia de que populações naturais de *Ae. albopictus* tem uma alta valência ecológica e maior plasticidade adaptativa do que *Ae. aegypti*, parece também ser reforçada pelas respostas de diapausa encontradas para as populações de Pernambuco (ID = 33%) e Ticino (ID = 90%), adaptadas a contextos abióticos diferentes (clima tropical e temperado). É muito importante destacar que o percentual complementar a incidência da diapausa (ID), que correspondem a taxa de eclosão larvária, são resultantes de ovos previamente em estado quiescente e isto também é válido para os grupos refratários à indução diapáusicas que revelaram uma taxa de eclosão acima de 90%, representados por todos os controles e os induzidos de *Ae. aegypti* (Santa Catarina e Praia).

Nossos achados revelaram que a maioria dos embriões de *Ae. albopictus* de Ticino entrou em estado diapáusico, o que de certa forma era esperado, admitindo o pressuposto de que tal população é oriunda de uma área temperada, sujeita a invernos severos sazonalmente. Por outro lado, a diapausa de 33% dos ovos observada em Pernambuco difere dos resultados relatados para outras populações de *Ae. albopictus* de áreas subtropicais (HAWLEY et al., 1987) e tropicais, inclusive do Brasil (LOUNIBOS et al., 2003). Os autores afirmam que tais populações não respondem aos estímulos que desencadeiam o processo de diapausa (LOUNIBOS; ESCHER; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 2003).

No entanto, nós sugerimos a hipótese de existir uma associação entre o tempo de adaptação da espécie aos contextos ambientais tropicais e a possibilidade de existência de microclimas nas áreas de coleta dos ovos de *Ae. albopictus*. São Lourenço da Mata, município pernambucano de onde provieram as amostras do nosso estudo, por exemplo, é uma localidade que ainda mantém um contato importante com o ambiente silvestre, onde ocorrem temperaturas mais amenas, e que de alguma forma, pode ter atuado como um sinalizador para uma expressão basal da diapausa nesta população.

Percentuais de 33% e 90% de embriões em diapausa encontrados nas populações de Pernambuco e Ticino, respectivamente, sugerem que há uma grande diversidade genética intra e interpopulacional, para os genes que controlam o processo de diapausa, o que merece posterior investigação. É possível que o fluxo gênico de outras populações de *Ae. albopictus* oriundas de outras localidades do mundo tenham influenciado o surgimento da diapausa na população de Pernambuco e isso pode ter sido facilitado pelas ações antrópicas. Portanto, estudos de ordem filogenética certamente são necessários para responder essa questão. Sendo assim, podemos inferir que possivelmente essa população possa apresentar polimorfismos em genes associados com a mudança do metabolismo basal.

Em relação à fecundidade foi possível observar que há um decaimento do potencial reprodutivo das populações tropicais de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* quando submetidas ao triplo estresse (luminosidade reduzida; baixas temperatura e umidade relativa). Essa redução na produção de ovos pode estar relacionada à transferência de reservas energéticas, sobretudo os lipídeos, para a sobrevivência em temperaturas mais baixas, haja vista, que as populações de Santa Catarina (subtropical) e Ticino (temperada) mais adaptadas a essas mudanças fotoperiódicas e de temperatura, não apresentaram nenhuma desvantagem em relação à produção de ovos.

Nossos resultados também sugerem que a exposição ao estresse para indução da diapausa, levou a um prolongamento da fase de pupa em até quatro dias. Logo, o retardo da

emergência pode gerar uma certa desvantagem, devido a uma maior exposição dos indivíduos à predação e/ou a xenobióticos, presentes nos criadouros. Porém, ao mesmo tempo, pode garantir o sucesso da próxima geração filial, pois é na fase de pupa que ocorre a sinalização para as fêmeas da proximidade das mudanças ambientais sazonais e da necessidade de produzir ovos diapáusicos.

É importante ressaltar que as populações de *Ae. albopictus*, exibiram maior reserva lipídica nos ovos e nas fêmeas, independentemente da exposição aos estímulos de indução à diapausa. A análise bioquímica constatou uma maior reserva de lipídios nas fêmeas e nos ovos das populações de *Ae. albopictus* de Pernambuco e Ticino, sugerindo, mais uma vez, a associação com a diapausa. Estes dados também estão de acordo com os de Denlinger e Armbruster (2014) e Reynolds et al. (2013), que ao estudarem genes envolvidos com o metabolismo dos lipídeos, como *lipase 2*, *lipase 3*, *lipase 4*, *acyl-CoA dehydrogenase 4*, *isovaleryl-CoA dehydrogenase*, *desaturase*, e *fatty acyl-CoA elongase*, verificaram que estes são mais expressos em condições de diapausa. Segundo os autores, a reserva de lipídeos pode ser usada para aumentar a superfície externa do ovo devido a uma maior deposição de hidrocarbonetos, promovendo assim, uma maior tolerância ao frio e resistência à dessecação (DENLINGER; ARMBRUSTER, 2014; DINIZ et al., 2017; REYNOLDS et al., 2013).

O presente estudo revelou que todos os genes associados à diapausa investigados apresentaram expressão estágio-específica, aparentemente restrita a fase de ovo, embora as pupas não tenham sido avaliadas. É possível que em larvas e adultos tais genes não sejam expressos ou que os respectivos transcritos tenham sido produzidos em níveis abaixo do limite de detecção desta técnica.

Em relação ao perfil de expressão gênica, foi verificado que todos os genes mostraram-se diferencialmente expressos em populações submetidas aos estímulos de indução à diapausa e à quiescência. O gene *Pepck*, por exemplo, foi expresso em todas as populações induzidas, independentemente da incidência de diapausa. Assim, a proteína codificada pelo mesmo, deve ter um papel significativo na resposta às condições de estresse ambiental que levaram à dormência nas populações investigadas neste estudo. O gene *Pepck* codifica uma proteína que participa do metabolismo de carboidratos em condições de anaerobiose. Durante o processo de dormência existe uma inversão do processo respiratório de aeróbico para anaeróbico (HAHN; DENLINGER, 2011; POELCHAU et al., 2011).

As populações de *Ae. aegypti*, Santa Catarina e Praia, apresentaram um padrão similar de expressão diferencial dos genes estudados (*Pepck*, *IGF*, *Catepsina* e *Transferrina* – superexpresso; *Lipase* – subexpresso). Isso revela que independente do mecanismo que levou

à dormência dos embriões, as populações submetidas ao estresse hídrico, fotoperiódico e de temperatura apresentam modulação na expressão de genes ligados ao metabolismo basal.

As duas populações de *Ae. albopictus* (Pernambuco e Ticino), que de fato entraram em diapausa, apresentaram o mesmo padrão de expressão para os genes lipase e pepck (superexpressos) e IGF (subexpresso), havendo diferenças apenas entre os gene da Catepsina e Transferrina, com perfis inversos de expressão.

O gene da lipase possui muitas variantes de seu transcrito no transcriptoma de mosquitos, a exemplo de *Ae. albopictus* (POELCHAU et al., 2013a) e, alguns deles são subexpressos e outros superexpressos em condição de diapausa. Neste estudo foi selecionado um gene, cujo transcrito é superexpresso após indução à diapausa. O produto deste gene participa do metabolismo de lipídeos e está envolvido numa maior estocagem de reserva lipídica. Sendo assim, nossos resultados bioquímicos, tanto para fêmeas quanto para embriões diapáusicos de *Ae. albopictus*, Pernambuco e Ticino, revelaram um maior armazenamento de lipídeos nessas populações talvez como um reflexo da maior expressão de lipase nestes grupos.

O gene IGF, como esperado, foi subexpresso nas populações cujos ovos entraram em diapausa. O gene IGF (*insulin-like growth factors*) codifica uma proteína que participa de diferentes eventos metabólicos. Um deles é o processo de maturação dos ovos de mosquitos (BROWN et al., 2008). É comum haver picos de abundância de proteína IGF-I durante o desenvolvimento inicial de embriões em condições normais que estão prontos para eclodir no contato com a água. Em contraste, os níveis de IGF-I permanecem baixos durante o desenvolvimento inicial de embriões que entrarão na diapausa (WOLL; PODRABSKY, 2017), ou ainda subexpresso como observado em nosso estudo. Quando trata-se da diapausa em fêmeas adultas, o comportamento da expressão de IGF é inverso, ele é superexpresso para a supressão metabólica e o armazenamento de reservas, tal como referido para *Culex pipens* (SIM; DENLINGER, 2008).

O gene catepsina, por outro lado, foi subexpresso nos embriões diapáusicos de Ticino, embora 90% deles não estavam prontos para a eclosão. Esse resultado foi diferente nos embriões de *Ae. albopictus* de Pernambuco, em que cerca que apenas 30% deles estavam em diapausa, justificando a necessidade da superexpressão desta proteína. Este gene, superexpresso em condição de diapausa, codifica uma protease envolvida na degradação do vitelo em mosquitos, que vai dar subsídio energético ao embrião dormente (CHO et al., 1999).

O perfil de transcrição da transferrina foi de superexpressão em ambas as espécies, embora o comportamento tenha sido oposto para as populações diapáusicas. Este gene está

envolvido na resposta imune, portanto, seria esperada sua superexpressão em todos os grupos, haja vista que os ovos diapáusicos, assim como os quiescentes, estão expostos a inúmeros microorganismos patogênicos presentes no ambiente (VELASQUEZ et al., 2008). O comportamento de subexpressão observado para o gene transferrina em Pernambuco (São Lourenço da Mata) pode representar um possível mecanismo de co-evolução do embrião e da microbiota intrínseca aos ovos desta população com os microorganismos presentes nos criadouros locais.

Estudos de Poelchau et al. (2011, 2013a), que sequenciaram por meio de RNA-seq o transcriptoma de oócitos de fêmeas de *Ae. albopictus* em diapausa e embriões em diapausa, revelaram a superexpressão de genes envolvidos em vários processos biológicos. Dentre eles foram destacados: o gene *ing1*, que codifica o inibidor da proteína de crescimento e está envolvido na interrupção do ciclo de divisão celular; o gene *rack1* que é um receptor putativo para a proteína quinase, que pode se ligar a várias moléculas de sinalização, incluindo fatores de transcrição relacionados à ecdisona (provavelmente associada com a preparação da diapausa); o gene *pepck*, que também foi avaliado no presente estudo, cujo produto participa na via metabólica da glicólise (respiração celular) em embriões em diapausa e o gene GPCR (receptor acoplado a proteína G) cujo produto está envolvido na tolerância ao estresse ambiental (DENLINGER, 2002; DINIZ et al., 2017; HAHN; DENLINGER, 2011; KADRMAS et al., 2007; LIN; SEROUDE; BENZER, 1998a).

O presente estudo demonstrou que *Ae. aegypti* não apresenta a diapausa como traço adaptativo, como fora reportado em alguns estudos prévios. Esse fato, ajuda a entender porque essa espécie não se estabelece em países/áreas com temperaturas muito baixas. Além disso, revelou que *Ae. albopictus* adaptado as áreas tropicais pode manifestar os dois processos de dormência, diapausa e quiescência, simultaneamente. Além disso, pode manter a diapausa em um nível aparentemente basal, mas ainda importante para garantir a existência de alguns indivíduos de sua prole, caso as condições ambientais se tornem ainda mais rigorosas. Não perdendo, portanto, a programação genética deste processo, usado como estratégia de sobrevivência pela espécie.

É notório que a diapausa tem contribuído para o potencial de expansão de *Ae. albopictus*, pois tal característica influenciada pela temperatura e fotoperíodo é determinante para abundância da espécie no espaço e no tempo. Essa estratégia, quando bem sucedida, afeta fortemente sua dinâmica populacional (ARMBRUSTER, 2016). Isso é consideravelmente preocupante porque o mosquito *Ae. albopictus* é classificado como uma das 100 espécies mais invasivas em todo o mundo e está sendo reconhecido como vetor

potencial de inúmeros arbovírus, (BONIZZONI et al., 2013; LOUIS; SCOTT; GUBLER, 2012; MEDLOCK et al., 2012). Nos últimos 10 anos, esta espécie foi considerada vetor primário em vários surtos de dengue e chikungunya no Havaí, em ilhas do Oceano Índico, África Central e Sul da China, além das primeiras transmissões autóctones da DENV na Europa, enfatizando seu impacto na saúde pública. Recentemente, um possível papel na transmissão do vírus da febre amarela nos ambientes silvestres e urbanos no Brasil foi sugerido por pesquisadores do Instituto Evandro Chagas, o que aponta para a necessidade urgente de um maior conhecimento sobre a dinâmica populacional desta espécie no país.

Estudos moleculares mais robustos como o sequenciamento de última geração do transcriptoma de *Ae. aegypti* poderão caracterizar melhor o fenômeno da quiescência desta vez, gerando informações aplicadas ao bloqueio da dormência embrionária, com vistas ao desenvolvimento de novas estratégias para controle destas espécies de mosquitos.

## 10 CONCLUSÕES

- a) As populações estudadas induzidas à quiescência e induzidas ou não à diapausa apresentaram uma elevada taxa de embriogênese, revelando o sucesso reprodutivo das espécies de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*;
- b) Embora ovos de *Ae. aegypti* não entrem em diapausa, as condições ambientais (temperatura e fotoperíodo) que induzem tal processo geraram perdas no potencial reprodutivo das populações tropicais do Brasil e de Cabo Verde;
- c) A população de *Ae. albopictus* Pernambuco-Brasil, mesmo adaptada a área tropical, exibiu a diapausa embrionária em baixa frequência, mostrando que a história de vida das populações define a forma de uso das suas estratégias de sobrevivência, já que a espécie possui diapausa e quiescência concomitantes.
- d) O presente trabalho sugere variabilidade intrapopulacional e interpopulacional no padrão de diapausa dos ovos de *Ae. albopictus*, refletindo adaptações locais e possível processo de seleção dos genes envolvidos neste fenômeno;
- e) O estresse hídrico, fotoperiódico e de temperatura induz alterações no padrão de expressão diferencial dos genes do metabolismo basal avaliados neste estudo, em ambas as espécies, além de levar ao acúmulo de reservas lipídicas, sobretudo nas populações de *Ae. albopictus*;
- f) Os padrões de expressão dos genes lipase e IGF apresentaram associação com o processo de diapausa nas populações de *Ae. albopictus* de Pernambuco-Brasil e Ticino-Suíça;
- g) A expressão dos genes associados à diapausa analisados neste estudo mostrou-se estágio-específica à fase de ovo, em ambas as espécies de *Aedes*.

## REFERÊNCIAS

- ABDEL-RAHMAN, A.; ADHAM, F. The effect of photoperiod on diapause induction in *Aedes caspius* Pallus. **J. Egyptian Soc. Parasitol.**, Cairo, v. 13, p. 343 - 347, 1983.
- ALMEIDA, E. **Fecundidade, fertilidade e quiescência dos ovos de *Aedes aegypti* Linnaeus, 1762 (Diptera: Culicidae) em resposta a variações de temperatura e umidade.** 2005. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2005.
- ANDERSON, J. F. Influence of photoperiod and temperature on the induction of diapause in *Aedes atropalpus* (Diptera, Culicidae). **Entomol. Exp. Appl.**, Amsterdam, v. 11, p. 321–330, 1968.
- ANGEL, A.; ANGEL, B.; JOSHI, V. Rare occurrence of natural transovarial transmission of dengue virus and elimination of infected foci as a possible intervention method. **Acta Trop.**, Basel, v. 155, p. 20–24, 2016.
- ANGELINI, R. et al. Un'epidemia di febbre chikungunya nella provincia di Ravenna. **Euro surveill.**, Saint-Maurice, v. 12, n. 9, 2007. Disponível em: <[http://www.epicentro.iss.it/problemi/Chikungunya/pdf/chikungunya\\_Ravenna.pdf](http://www.epicentro.iss.it/problemi/Chikungunya/pdf/chikungunya_Ravenna.pdf)> Acesso em: 15 Jan. 2018.
- ARMBRUSTER, P. A. Photoperiodic Diapause and the Establishment of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in North America. **J. med. entomol.**, Honolulu, v. 53, n. 5, p. 1013-1023, 2016.
- BENEDICT, M. Q. et al. Spread of The Tiger: Global Risk of Invasion by The Mosquito *Aedes albopictus*. **Vector-Borne and Zoonotic Dis.**, New York, v. 7, n. 1, p. 76–85, 2007.
- BENOIT, J. B.; DENLINGER, D. L. Suppression of water loss during adult diapause in the northern house mosquito, *Culex pipiens*. **J. Exp. Biol.**, London, v. 210, n. 2, p. 217–226, 2007.
- BESERRA, E. B. et al. Ciclo de vida de *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (Diptera: Culicidae) em águas com diferentes características. **Iheringia Sér. Zool.**, Porto Alegre, v. 99, n. 3, p. 281–285, 2009.
- BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO. Brasília: Ministério da Saúde, v. 48, n. 29, Set. 2017.
- BONIZZONI, M. et al. The invasive mosquito species *Aedes albopictus*: Current knowledge and future perspectives. **Trends in Parasitol.**, Oxford, v. 29, n. 9, p. 460–468, 2013.
- BRADSHAW, W. E.; LOUNIBOS, L. P. Photoperiodic control of development in the pitcher-plant mosquito, *Wyeomyia smithii*. **Can. j. zool.**, Ottawa, v. 50, n. 6, p. 713–719, 1972.
- BRAGA, I. A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. **Epidemiol. serv. saúde.**, Brasília, v. 16, n. 4, p. 279–293, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Dengue, Instruções para Pessoal de Combate ao Vetor: Manual de Normas Técnicas**. 3. ed. Brasília, 2001. 75 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Dados e indicadores selecionados**. Brasília, 2003.

BROWN, M. R. et al. An insulin-like peptide regulates egg maturation and metabolism in the mosquito *Aedes aegypti*. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, Washington, v. 105, n. 15, p. 5716–5721, 2008.

BUCKNER, E. A.; ALTO, B. W.; LOUNIBOS, L. P. Vertical transmission of Key West dengue-1 virus by *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) mosquitoes from Florida. **J. med. entomol.**, Honolulu, v. 50, n. 6, p. 1291–1297, 2013.

BUTT, F. H. Embryology of *Sciara* (Sciaridae: Diptera). **Ann. Entomol. Soc. Am.**, College Park, v. 27, p. 565–579, 1934.

CAO-LORMEAU, V. M. . et al. Zika virus, French Polynesia, South Pacific, 2013. **Emerg. infect. dis.**, Atlanta, v. 20, n. 6, p. 1085–1086, 2014.

CAVALCANTE, K. R. L. J. et al. Risco de reintrodução da febre amarela urbana no Brasil. **Epidemiol. serv. saúde.**, Brasília, v. 26, n. 3, p. 617–620, 2017.

CHADEE, D. D.; CORBET, P. S.; TALBOT, H. Proportions of eggs laid by *Aedes aegypti* on different substrates within an ovitrap in Trinidad, West Indies. **Med. vet. entomol.**, Oxford, v. 9, n. 1, p. 66–70, 1995.

CHAPMAN, R. F. (REGINALD F.; SIMPSON, S. J.; DOUGLAS, A. E. **The insects : structure and function**. 5th ed. London: Cambridge University Press, 2013. 770 p.

CHO, W. L. et al. Mosquito cathepsin B-like protease involved in embryonic degradation of vitellin is produced as a latent extraovarian precursor. **J. biol. chem.**, Baltimore, v. 274, n. 19, p. 13311–13321, 1999.

CHOI, M. Y. et al. Identification and expression of PBAN/diapause hormone and GPCRs from *Aedes aegypti*. **Mol. cell. endocrinol.**, Limerick, v. 375, n. 1–2, p. 113–120, 2013.

CHRISTOPHERS, R. ***Aedes aegypti*, the yellow fever mosquito**. 1st ed. London: Cambridge University, 1960. 752 p.

CHRISTOPHERS, S. R. Structure of the *Culex* egg and egg-raft In relation to function (Diptera). **Ecol. entomol.**, London, v. 95, p. 25–34, 1945.

CHUN XIAO, L. et al. Vector competence and transovarial transmission of two *Aedes aegypti* strains to Zika virus. **Emerg. microbes. infect.**, New York, v. 6, n. 4, 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5457675/>>. Acesso em: 13 Jan. 2018.

CLEMENTS, A. N. **The biology of mosquitoes**. London: Chapman & Hall, 1992. v. 1, 509 p.

CLEMENTS, A. N.; KERKUT, G. A. **The Physiology of Mosquitoes**. Oxford: Pergamon, 1963. v. 17, 410p.

CONSOLI, R. A. G. B.; LOURENÇO DE OLIVEIRA, R. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz, 1994. 228 p.

CROVELLO, T. J.; HACKER, C. S. Evolutionary Strategies in Life Table Characteristics Among Feral and Urban Strains of *Aedes aegypti* (L.). **Evolution**, Liverpool, v. 26, p. 185–196, 1972.

COSTA-VASCONCELOS, P. F. Febre amarela. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Brasília, v. 36, n. 2, p. 275–293, 2003.

DANKS, H. V. **Insect Dormancy: An Ecological Perspective**. Ottawa: University of Chicago, 1987. 439 p.

DAVIS, G. K.; PATEL, N. H. Short, long, and beyond: molecular and embryological approaches to insect segmentation. **Ann. rev. entomol.**, Palo Alto, v. 47, p. 669–692, 2002.

OLIVEIRA, C. S.; DA COSTA VASCONCELOS, P. F. Microcephaly and Zika virus. **J. pediatr.**, Rio de Janeiro, v. 92, n. 2, p. 103–105, 2016.

OLIVEIRA, M. C. A. **O fim da picada**. Disponível em <<http://www.casadaciencia.com.br/o-fim-da-picada/>>. Acesso em: 1 Jan. 2018.

DEGALLIER, N. et al. New entomological and virological data on the vectors of sylvatic yellow fever in Brazil. **S.B.PC.**, Campinas, v. 44, p. 136-142, 1992.

DENLINGER, D. L. Regulation of diapause. **Ann. rev. entomol**, Palo Alto, v. 47, p. 93–122, 2002.

DENLINGER, D. L.; ARMBRUSTER, P. A. Mosquito Diapause. **Ann. rev. entomol**, Palo Alto, v. 59, p. 73–93, 2014.

DENLINGER, D.; LEE, K. A Role for Ecdysteroids in the Induction and Maintenance of the Pharate First Instar Diapause of the Gypsy Moth, *Lymantria dispar*. **J. insect physiol.**, Oxford, v. 43, n. 3, p. 289–296, 1997.

DENLINGER, D.; YOCUM, G.; RINEHART, J. Hormonal Control of Diapause. In: Gilbert, I. G. **Insect Endocrinology**. San Diego: Academic press, 2012. p. 430–463.

DINIZ, D. F. A. et al. Fitness cost in field and laboratory *Aedes aegypti* populations associated with resistance to the insecticide temephos. **Parasit. vectors.**, London, v. 8, n. 662, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4696322/>>. Acesso em: 30 Nov. 2017.

DINIZ, D. F. A. et al. Diapause and quiescence: dormancy mechanisms that contribute to the geographical expansion of mosquitoes and their evolutionary success. **Parasit. vectors.**, London, v. 10, n. 1, 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5485599/>>. Acesso em 15 Fev. 2017.

DONALISIO, M. R. et al. Arboviroses emergentes no Brasil: desafios para a clínica e implicações para a saúde pública. **Rev. saúde públ.**, Rio de Janeiro, v. 51, n. 30, p. 10–15, 2017.

DONALISIO, M. R.; FREITAS, A. R. R. Chikungunya no Brasil: um desafio emergente. **Rev. bras. epidemiol.**, São Paulo, v. 18, n. 1, p. 283–285, 2015.

DONALÍSIO, M. R.; GLASSER, C. M. Vigilância entomológica e controle de vetores do dengue. **Rev. bras. epidemiol.**, São Paulo, v. 5, n. 3, p. 259–279, 2002.

DUCLAUX, E. De l' "influence de froid d' hiver sur le développement de l' embryon du ver à sole et sur l'éclosion de la graine. **Compt. rend. acad. sci.**, Paris, v. 69, p. 1021–1022, 1869.

DUFFY, M. et al. Zika Virus Outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. **New N. Engl. j. med.**, Boston, v. 360, p. 2536–2543, 2009.

EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL. **Guidelines for the surveillance of native mosquitoes in Europe. Euro surveill.**, Saint-Maurice, bulletin européen sur les maladies transmissibles. Disponível em: < <https://www.ecdc.europa.eu>>. Acesso em: 25 Fev. 2015.

EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL. **Communicable disease threats report. Euro surveill.**, Saint-Maurice, 2017. Disponível em: < <https://www.ecdc.europa.eu>>. Acesso em: 30 Dez. 2017.

ELDRIDGE, B. The effect of temperature and photoperiod on blood - feeding and ovarian development in mosquitoes of the *Culex pipiens* complex. **Am. j. trop. med. hyg.**, Baltimore, v. 17, n. 1, p. 133-140, 1968.

ELDRIDGE, B. F.; JOHNSON, M. D.; BAILEY, C. L. Comparative studies of two North American mosquito species, *Culex restuans* and *Culex salinarius*: Response to temperature and photoperiod in the laboratory. **Mosq. news**, New York, v. 36, p. 506–513, 1976.

EMERSON, K. et al. Environmental control of ovarian dormancy in natural populations of *Drosophila melanogaster*. **J. cell. comp. physiol.**, Philadelphia, v. 195, n. 9, p. 825–329, 2009.

EVANS, K. W.; BRUST, R. A. Induction and Termination of Diapause In *Wyeomyia Smithii* (Diptera: Culicidae), and Larval Survival Studies at Low and Subzero Temperatures. **Can. Entomol.**, Oxford, v. 104, n. 12, p. 1937–1950, 31 dez. 1972.

FARAJI, A. et al. Comparative Host Feeding Patterns of the Asian Tiger Mosquito, *Aedes albopictus*, in Urban and Suburban Northeastern USA and Implications for Disease Transmission. **Plos negl. trop. dis.**, San Francisco, v. 8, n. 8, 2014. Disponível em: < <http://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0003037>>. Acesso em: 10 Abr. 2017.

FARNESI, L. C. et al. Physical features and chitin content of eggs from the mosquito vectors *Aedes aegypti*, *Anopheles aquasalis* and *Culex quinquefasciatus*: Connection with distinct levels of resistance to desiccation. **J. insect physiol.**, Oxford, v. 83, p. 43–52, 2015.

FAULL, K. J.; WILLIAMS, C. R. Intraspecific variation in desiccation survival time of *Aedes aegypti* (L.) mosquito eggs of Australian origin. **J. vector ecol.**, Santa Ana, v. 40, n. 2, p. 292–300, 2015.

FEDER, J. et al. The consequences of expressing hsp70 in *Drosophila* cells at normal temperatures. **Genes dev.**, New York, v. 6, n. 8, p. 1402–1413, 1992.

FLACIO, E. et al. Strategies of a thirteen year surveillance programme on *Aedes albopictus* (*Stegomyia albopicta*) in southern Switzerland. **Parasit. Vectors.**, London, v. 8, n. 208, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4406169/>>. Acesso em 30 Jan. 2018.

FOE, V. E.; ALBERTS, B. M. Studies of nuclear and cytoplasmic behaviour during the five mitotic cycles that precede gastrulation in *Drosophila* embryogenesis. **J. cell. sci.**, London, v. 61, p. 31–70, 1983.

FONSECA, R. N.; GOMES, H.; ARAÚJO, H. Aspectos Morfofuncionais da Embriologia dos Artrópodes. In: Silva-Neto, M. A. C.; Winter, C.; Termignoni, C. **Tópicos Avançados em Entomologia Molecular**. Rio de Janeiro: INCT, 2012. Disponível em: <<http://www.inctem.bioqmed.ufrj.br/biblioteca/arthrolivro-1>>. Acesso em: 15 fev. 2016.

FORATTINI, O. P. **Entomologia Médica**. São Paulo: Faculdade de Higiene e Saúde Pública, 1962. v. 1, 662 p.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE (Brasil). **Controle seletivo de vetores da Malária: Guia para o nível municipal**. Brasília, 1999. 58p.

GALLAWAY, W. Larval diapause of *Aedes hendersoni* and *Aedes triseriatus* from southern Manitoba. **J. Am. Mosq. Contr. Assoc.**, Fresno, v. 1, p. 92–93, 1985.

GENTILE, C. et al. Circadian expression of clock genes in two mosquito disease vectors: *cry2* is different. **J. biol. rhythm.**, Thousand Oaks, v. 24, p. 444–451, 2009.

GIORDANO, B. **Brock team finds first *Aedes aegypti* mosquitoes in Canada**. The Brock News, 2016. Disponível em: <<https://brocku.ca/brock-news/2016/10/brock-team-finds-first-aedes-aegypti-mosquitoes-in-canada/>>. Acesso em: 11 Mar. 2017.

GJENERO-MARGAN, I. et al. Autochthonous dengue fever in Croatia, August- September 2010. **Euro surveill.**, Saint-Maurice, v. 16, n. 9, 2011. Disponível em: <<https://brocku.ca/brock-news/2016/10/brock-team-finds-first-aedes-aegypti-mosquitoes-in-canada/>>. Acesso em: 11 Mar. 2017.

GOLTSEV, Y. et al. Developmental and evolutionary basis for drought tolerance of the *Anopheles gambiae* embryo. **Dev. biol.**, Orlando, v. 330, n. 2, p. 462–470, 2009.

GORDON, G.; HEADRICK, D. H. **A Dictionary of Entomology**. California: CABI, 2001. 1032 p.

GOTO, S.; SHIGA, S.; NUMATA, H. Photoperiodism in insects: perception of light and the role of clock genes. In: NELSON, R. J.; DENLINGER, D. L.; SOMERS, D. E. **Photoperiodism: The Biological Calendar**. Oxford: Oxford Univ., p. 258 – 286, 2010.

GRARD, G. et al. Zika virus in Gabon (Central Africa)-2007: a new threat from *Aedes albopictus*? **Plos negl. trop. dis.**, San Francisco, v. 8, n. 2, 2014. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0002681>>. Acesso em: 3 Jan. 2017.

GRATZ, N. G. Critical review of the vector status of *Aedes albopictus*. **Med. vet. entomol.**, Oxford, v. 18, n. 3, p. 215–227, set. 2004.

GUBLER, D. J. et al. Climate variability and change in the United States: potential impacts on vector- and rodent-borne diseases. **Environ. health perspect.**, Triangle Park, v. 109, p. 223–233, 2001.

HAHN, D. A.; DENLINGER, D. L. Energetics of Insect Diapause. **Ann. rev. entomol.**, Palo Alto, v. 56, n. 1, p. 103–121, 2011.

HAND, S. C.; PODRABSKY, J. E. Bioenergetics of diapause and quiescence in aquatic animals. **Thermochim. acta.**, Amsterdam, v. 349, n. 1–2, p. 31–42, 2000.

HANSON, S. M.; CRAIG, G. B. *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) Eggs: Field Survivorship During Northern Indiana Winters. **J. med. entomol.**, Honolulu, v. 32, n. 5, p. 599–604, 1995.

HAWLEY, W. A. et al. *Aedes albopictus* in North America : Probable Introduction in Used Tires from Northern Asia Beijing. **Sci.**, Oxford, v. 236, n. 5, p. 3–4, 1987.

HOLICK, J. et al. Discovery of *Aedes albopictus* infected with west nile virus in southeastern Pennsylvania. **J. Am. Mosq. Contr. Assoc.**, Fresno, v. 18, n. 2, 2002. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12083357>>. Acesso em: 15 Ago. 2015.

HONÓRIO, N. A. et al. Chikungunya: uma arbovirose em estabelecimento e expansão no Brasil. **Cad. saúde pública.**, Rio de Janeiro, v. 31, n. 5, p. 906–908, 2015.

IOOS, S. et al. Current Zika virus epidemiology and recent epidemics. **Med. mal. infect.**, Paris, v. 44, n. 7, p. 302–307, 2014.

JACOBS, C. G. C. et al. The extraembryonic serosa protects the insect egg against desiccation. **Proc. R. Soc. Lond. Ser. B, Biol. sci.**, London, v. 280, n. 1764, 2013. Disponível em:< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3712428/>>. Acesso em: 15 Jul. 2016.

JORDAN, R. G.; BRADSHAW, W. E. Geographic variation in the photoperiodic response of the western tree-hole mosquito, *Aedes sierrensis*. **Ann. Entomol. Soc. Am.**, v. 71, p. 787, 1978.

JULIANO, S. et al. Desiccation and thermal tolerance of eggs and the coexistence of competing mosquitoes. **Oecologia**, Berlin, v. 130, n. 3, p. 458–469, 2002.

KADRMAS, J. L. et al. Characterization of RACK1 function in *Drosophila* development. **Dev. dyn.**, v. 236, n. 8, p. 2207–2215, New York, 2007.

KNUDSEN, A. B. Global distribution and continuing spread of *Aedes albopictus*. **Parassitologia**, Roma, v. 37, p. 91–97, 1995.

KOŠTÁL, V. Eco-physiological phases of insect diapause. **J. insect physiol.**, Oxford, v. 52, n. 2, p. 113–127, 2006.

KOŠTÁL, V. Insect photoperiodic calendar and circadian clock: Independence, cooperation, or unity. **J. insect physiol.**, Oxford, v. 55, n. 2, p. 538–556, 2011.

KRAEMER, M. U. G. et al. The global compendium of *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus* occurrence. **Sci. Data**, v. 2, 2015. Disponível em:  
< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4493829/>>. Acesso em: 11 Mar. 2017.

LACOUR, G. et al. Seasonal Synchronization of Diapause Phases in *Aedes albopictus* (Diptera : Culicidae). **PLoS 1**, San Francisco, 2015. Acesso em:  
< <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0145311>>. Disponível em:  
15 Mar. 2017.

LI, J. S.; LI, J. Major chorion proteins and their crosslinking during chorion hardening in *Aedes aegypti* mosquitoes. **Insect biochem. mol. biol.**, Oxford, v. 36, n. 12, p. 954–964, 2006.

LIN, Y.-J.; SEROUDE, L.; BENZER, S. Extended Life-Span and Stress Resistance in the *Drosophila* Mutant methuselah. **Sci.**, Oxford v. 282, n. 5390, p. 943–946, 1998.

LINLEY, J. R. Comparative fine structure of the eggs of *Aedes albopictus*, *Ae. aegypti*, and *Ae. bahamensis* (Diptera: Culicidae). **J. med. entomol.**, Honolulu, v. 26, n. 6, p. 510–521, 1989.

LITTLE, S. C. et al. The formation of the bicoid morphogen gradient requires protein movement from anteriorly localized mRNA. **PLoS bio.**, San Francisco, v. 9, n. 3, 2011. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3046954/>>. Acesso em 5 Fev. 2017.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2  $\Delta\Delta$ CT Method. **Methods**, v. 25, n. 4, Orlando, p. 402–408, 2001.

LIVDAHL, T. P.; KOENEKOOP, R. K.; FUTTERWEIT, S. G. The complex hatching response of *Aedes* eggs to larval density. **Ecol. entomol.**, Lodon, v. 9, n. 4, p. 437–442, 1984.

LOUIS, L.; SCOTT, T. W.; GUBLER, D. J. *Aedes albopictus* and the reemergence of Dengue. **BMC public health**, London, v. 12, n. 1, 2012. Disponível em :  
< <https://bmcpublihealth.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2458-12-72>>. Acesso em 5 Jan. 2018.

LOUNIBOS, L. P.; ESCHER, R. L.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. Asymmetric Evolution of Photoperiodic Diapause in Temperate and Tropical Invasive Populations of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). **Ann. entomol. soc. am.**, College Park, v. 96, n. 4, p. 512–518, 2003.

LUZ, C. et al. Impact of moisture on survival of *Aedes aegypti* eggs and ovicidal activity of *Metarhizium anisopliae* under laboratory conditions. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 103, n. 2, p. 214–215, 2008.

MACRO NEWS. **OVITRAMPA ¿SABES QUE ES ESO?** Disponível em:

<http://macronews.mx/estado/locales/ovitrampa-sabes-que-es-eso/>. Acesso em 15 Mar. 2016.

MARCONDES, C. B. **Entomologia médica e veterinária**. São Paulo: Atheneu, 2001. 432p.

MARTINS, R.; LEWINSOHN, T.; BARBEIROS, M. Ecologia e comportamento dos insetos. **Oecologia**, Berlin, v. 8, p. 149–192, 2000.

MATHEW, G.; RAT, K. S. Structure and Formation of Egg Membranes in *Aedes aegypti*. (L.) (Diptera: Culicidae). **Int. j. insect morphol. embryol.**, Oxford, v. 4, n. 5, p. 369–380, 1975.

MATHIAS, D. et al. Geographic and developmental variation in expression of the circadian rhythm gene, timeless, in the pitcher-plant mosquito, *Wyeomyia smithii*. **J. insect physiol.**, Oxford, v. 51, n. 6 SPEC. ISS., p. 661–667, 2005.

MCMENIMAN, C. J.; O'NEILL, S. L. A Virulent wolbachia infection decreases the viability of the dengue vector *Aedes aegypti* during periods of embryonic quiescence. **Plos negl. trop. dis.**, San Francisco, v. 4, n. 7, 2010. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0000748>>. Acesso em: 15 Mar. 2017.

MEDLOCK, J. M. et al. A review of the invasive mosquitoes in Europe: ecology, public health risks, and control options. **Vector borne zoonotic dis.**, Larchmont, v. 12, n. 6, p. 435–447, 2012.

MELO-SANTOS, M. A. V. *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): estudos populacionais e estratégias integradas para controle vetorial em municípios da região metropolitana do Recife, no período de 2001 a 2007. 218 p. Tese (Doutorado em Saúde Pública) Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2008.

MERZENDORFER, H. Insect chitin synthases: A review. **J. comp. physiol. Sect. B, Biochem. syst. environ. physiol.**, Berlin, v. 176, 2006. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00360-005-0005-3>>. Acesso em: 15 Jan. 2018.

MLAKAR, J. et al. Zika Virus Associated with Microcephaly. **N. Engl. j. med.**, Boston, v. 374, n. 10, p. 951–958, 2016.

MORI, A.; ROMERO-SEVERSON, J.; SEVERSON, D. Genetic basis for reproductive diapause is correlated with life history traits within the *Culex pipiens* complex. **Insect biochem. mol. biol.**, Oxford, v. 16, p. 515 – 524, 2007.

MORI, A.; ODA, T.; WADA, Y. Studies on the egg diapause and overwintering of *Aedes albopictus* in Nagasaki. **Trop. med.**, v. 23, n. 2, Nagasaki, p. 79–90, 1981.

MURRAY, N. E. A.; QUAM, M. B.; WILDER-SMITH, A. Epidemiology of dengue: Past, present and future prospects. **Clin. Epidemiol.**, Auckland, v. 5, n. 1, p. 299–309, 2013.

MUSSO, D. et al. Potential sexual transmission of zika virus. **Emerg. infect. dis.**, Atlanta, v. 21, n. 2, p. 359–361, 2015.

NELMS, B. M. et al. Overwintering Biology of *Culex* (Diptera: Culicidae) Mosquitoes in the Sacramento Valley of California. **J. med. entomol.**, Honolulu, v. 50, n. 4, p. 773–790, 2013.

NUNES, M. R. T. et al. Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil. **BMC med.**, London, v. 13, n. 1, 2015.

PARKER, B. M. Effects of photoperiod on the induction of embryonic diapause in *Aedes taeniorhynchus* (Diptera: Culicidae). **J. med. entomol.**, Honolulu, v. 22, n. 4, p. 392–397, 1985.

PARKER, B. M. Photoperiod-induced diapause in a North Carolina strain of *Aedes sollicitans*: photosensitivity of fully formed and developing embryos. **J. Am. Mosq. Control Assoc.**, Fresno, v. 4, n. 1, p. 57–63, 1988.

PAUPY, C. et al. *Aedes albopictus*, an arbovirus vector: From the darkness to the light. **Microbres infect.**, Paris, v. 11, n. 14–15, p. 1177–1185, 2009.

PEREZ, M. H.; NORIEGA, F. G. *Aedes aegypti* pharate 1st instar quiescence affects larval fitness and metal tolerance. **J. insect physiol.**, Oxford, v. 58, n. 6, p. 824–829, 2012.

PEREZ, M. H.; NORIEGA, F. G. *Aedes aegypti* pharate 1st instar quiescence: A case for anticipatory reproductive plasticity. **J. insect physiol.**, Oxford, v. 59, n. 3, p. 318–324, 2013.

PESSOA, V. E. et al. *Aedes albopictus* no Brasil: Aspectos ecológicos e riscos de transmissão da dengue. **Entomotropica**, Maracay, v. 28, n. 2, p. 75–86, 2013.

PINHEIRO, V. C. S.; TADEI, W. P. Frequency, diversity, and productivity study on the *Aedes aegypti* most preferred containers in the City of Manaus, Amazonas, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.**, São Paulo, v. 44, n. 5, p. 245–250, 2002.

POELCHAU, M. F. et al. A de novo transcriptome of the Asian tiger mosquito, *Aedes albopictus*, to identify candidate transcripts for diapause preparation. **BMC genomics**, London, v. 12, n. 1, 2011. Disponível em:  
< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3258294/> > Acesso em 20 Out. 2014.

POELCHAU, M. et al. RNA-Seq reveals early distinctions and late convergence of gene expression between diapause and quiescence in the Asian tiger mosquito, *Aedes albopictus*. **J. exp. biol.**, London, v. 216, n. 21, p. 4082–4090, 2013a.

POELCHAU, M. et al. Deep sequencing reveals complex mechanisms of diapause preparation in the invasive mosquito, *Aedes albopictus*. **Proc. Biol. Sci.**, London, v. 280, n. 20130143, 2013b. Disponível em:  
< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3619507/> >. Acesso em: 22 Mar. 2016.

POELCHAU, M. F. et al. An Experimental and Bioinformatics Protocol for RNA-seq Analyses of Photoperiodic Diapause in the Asian Tiger Mosquito, *Aedes albopictus*. **J. Vis. Exp.**, Boston, n. 93, p. 1–13, 2014. Disponível em:  
< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4354392/> >. Acesso em: 20 abr. 2016.

POLONIO, C. M. et al. Zika virus congenital syndrome: Experimental models and clinical aspects. **J. venom. anim. toxins incl. trop. dis.**, Botucatu, v. 23, n. 1, 2017. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5602956/> >. Acesso em: 19 Mar. 2018.

PTITSYN, A. A. et al. Rhythms and synchronization patterns in gene expression in the *Aedes aegypti* mosquito. **BMC Genomics**, London, v. 12, n. 153, p. 1–16, 2011. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3072344/> >. Acesso em: 20 Mar. 2015..

- PUMPUNI CB, KNEPLER J, C. G. Influence of temperature and larval nutrition on the diapause inducing photoperiod of *Aedes albopictus*. **J. Am. Mosq. Control Assoc.**, Fresno, v. 8, n. 3, p. 223–227, 1992.
- RAGLAND, G.; DENLINGER, D.; HAHN, D. Mechanisms of suspended animation are revealed by transcript profiling of diapause in the flesh fly . **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 107, n. 33, p. 14909–14914., 2010.
- READIO, J.; CHEN, M. H.; MEOLA, R. Juvenile hormone biosynthesis in diapausing and nondiapausing *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). **J. med. entomol.**, Honolulu, v. 36, n. 3, p. 355–360, 1999.
- REGIS, L. et al. Developing new approaches for detecting and preventing *Aedes aegypti* population outbreaks: Basis for surveillance, alert and control system. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 103, n. 1, p. 50–59, 2008.
- REGIS, L. N. et al. Sustained Reduction of the Dengue Vector Population Resulting from an Integrated Control Strategy Applied in Two Brazilian Cities. **PLoS 1**, v. 8, n. 7, 2013. Disponível em: < <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0067682>>. Acesso em: 10 Jan. 2014.
- REISEN, W. K.; MEYER, R. P.; MILBY, M. M. Overwintering Studies on *Culex tarsalis* (Diptera: Culicidae) in Kern County, California: Temporal Changes in Abundance and Reproductive Status with Comparative Observations on *C. quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). **Ann. entomol. soc. am.**, College Park, v. 79, n. 4, p. 677–685, 1986.
- REITER, P.; GUBLER, D. J. Surveillance and control of urban dengue vectors. In: GUBLER D.J.et al. **Dengue and dengue hemorrhagic fever**. Paris: CABI, 2014. p. 425–462.
- REYNOLDS, J. A. et al. Transcript profiling reveals mechanisms for lipid conservation during diapause in the mosquito, *Aedes albopictus*. **J. insect physiol.**, Oxford, v. 58, n. 7, p. 966–973, 2013.
- REZENDE, G. L. et al. Embryonic desiccation resistance in *Aedes aegypti*: presumptive role of the chitinized serosal cuticle. **BMC dev. biol.**, London, v. 8, n. 1, p. 82, 2008. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2561029/>> Acesso em: 25 Maio 2017.
- RINEHART, J. P. et al. Up-regulation of heat shock proteins is essential for cold survival during insect diapause. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, Washington, v. 104, n. 27, p. 11130–11137, 2007.
- ROBICH, R. et al. Diapause - specific gene expression in the northern house mosquito , *Culex pipiens* L., identified by suppressive subtractive. **J. insect physiol.**, Oxford v. 53, n. 3, p. 235–245., 2007.
- ROBICH, R. M.; DENLINGER, D. L. Diapause in the mosquito *Culex pipiens* evokes a metabolic switch from blood feeding to sugar gluttony. **Proceedings of the National Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, Washington, v. 102, n. 44, p. 15912–15917, 2005.
- ROONWALL, M. L. Studies on the embryology of the African migratory locust. **Philos. trans. royal soc. Lon**, London, v. 227, n. 543, p. 391–421, 1936.

ROSEN, L. Sexual transmission of dengue viruses by *Aedes albopictus*. **Am j.trop. med. hyg.**, Baltimore, v. 37, n. 2, p. 398–402, 1987.

RUND, S. S. C. et al. Strain- and sex-specific differences in daily flight activity and the circadian clock of *Anopheles gambiae* mosquitoes. **J. insect physiol.**, Oxford v. 58, n. 12, p. 1609–1619, 2012.

SAUNDERS, D. **Insect Clocks**. Amsterdam: Elsevier, 2002.

SCHAFFNER, F. et al. Rapid protein profiling facilitates surveillance of invasive mosquito species. **Parasit. vectors.**, London, v. 7, n. 1, p. 142, 2014.

SCHAFFNER, F.; MEDLOCK, J. M.; BORTEL, W. VAN. Public health significance of invasive mosquitoes in Europe Invasive Mosquito Species in Europe. **Clin. Microbiol. Infect.**, London, v. 19, p. 685–692, 2013.

SCHMIDT, P.; PAABY, A.; HESCHEL, M. Genetic variance for diapause expression and associated life histories in *Drosophila melanogaster*. **Evolution**, Liverpool, v. 59, p. 2616 – 2625, 2005.

SILVA, H. H.; SILVA, I. G. Influência do Período de Quiescência dos Ovos sobre o Ciclo de Vida de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae) em Condições de Laboratório. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Brasília, v. 32, n. 4, p. 349–355, 1999.

SILVA, H. H. G. DA et al. Metodologia de criação, manutenção de adultos e estocagem de ovos de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) em laboratório. **Rev. patol. trop.**, Goiana, v. 27, n. 1, p. 53–63, 1998.

SIM, C.; DENLINGER, D. L. Insulin signaling and FOXO regulate the overwintering diapause of the mosquito *Culex pipiens*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, Washington, v. 105, n. 18, p. 6777–6781, 2008.

SIMS, S.; MUNSTERMANN, L. Egg and larval diapause in two populations of *Aedes geniculatus* (Diptera: Culicidae). **J. med. entomol.**, Honolulu, v. 3, p. 263 - 271, 1983.

SOARES-PINHEIRO, V. C. et al. Eggs viability of *Aedes aegypti* Linnaeus (Diptera, Culicidae) under different environmental and storage conditions in Manaus, Amazonas, Brazil. **Braz. J. Biol.**, São Carlos, p. 1–6, 2016. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1519-69842016005119111&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1519-69842016005119111&lng=en&nrm=iso&tlng=en)>. Acesso em 23 Mar. 2017.

SOTA, T.; MOGI, M. Survival time and resistance to desiccation of diapause and non-diapause eggs of temperate *Aedes* (Stegomyia) mosquitoes. **Entomol. Exp. Appl.**, Amsterdam, v. 63, n. 2, p. 155–161, 1992.

SPIELMAN, A. Effect of synthetic juvenile hormone on ovarian diapause of *Culex pipiens* mosquitoes. **J. med. entomol.**, Honolulu, v. 11, p. 223 – 225, 1974.

SUCCO, T. et al. Autochthonous dengue outbreak in Nîmes, South of France, July to September 2015. **Euro surveill.**, Saint-Maurice, v. 21, n. 21, 2016. Disponível em: <<https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.21.30240>>. Disponível em: 14 Dez. 2017.

SUMAN, D. S. et al. Differentiation of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) with egg surface morphology and morphometrics using scanning electron microscopy. **Arthropod Struct Dev**, Oxford, v. 40, n. 5, p. 479–483, 2011.

SUMMA, K. et al. Cloning and sequence analysis of the circadian clock genes period and timeless in *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). **J. med. entomol.**, Honolulu, v. 49, p. 777–782, 2012.

TAUBER, M. J.; TAUBER, C. A.; MASAKI, S. Seasonal adaptations of insects. Oxford: **Oxford University**, 1986.

TAUIL, P. L. Aspectos críticos do controle da febre amarela no Brasil. **Rev. Saúde Públ.** Rio de Janeiro, v. 44, n. 3, p. 555–558, 2010.

TEIXEIRA, M. D. G.; BARRETO, M. L.; GUERRA, Z. Epidemiologia e Medidas de Prevenção do Dengue. **Inf. epidemiol. SUS.**, Brasília, v. 8, n. 4, p. 5–33, 1999.

THALER, C. D. et al. Waveform generation is controlled by phosphorylation and swimming direction is controlled by Ca<sup>2+</sup> in sperm from the mosquito *Culex quinquefasciatus*. **Biol. reprod.**, New York, v. 89, n. 6, p. 135, 2013. Disponível em: <<https://academic.oup.com/biolreprod/article/89/6/135,%201-11/2514034>>. Acesso em: 15 Dez. 2016.

TRPIS, M. Seasonal changes in the larval populations of *Aedes aegypti* in two biotopes in Dar es Salaam, Tanzania. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 47, n. 2, p. 245–255, 1972.

TRPIŠ, M. A new bleaching and decalcifying method for general use in zoology. **Canadian Journal of Zoology**, v. 31, n. 2, p. 892–893, 1970.

URBANSKI, J.; ARUDA, A.; ARMBRUSTER, P. A transcriptional element of the diapause program in the Asian tiger mosquito, *Aedes albopictus*, identified by suppressive subtractive hybridization. **J. insect physiol.**, Oxford v. 56, n. 9, p. 1147–1154, 2010.

URBANSKI, J. M. et al. The molecular physiology of increased egg desiccation resistance during diapause in the invasive mosquito, *Aedes albopictus*. **Proc. R. Soc. Lond. Ser. B, Biol. sci.**, London, v. 277, n. 1694, p. 2683–2692, 2010.

VALERIO, L. et al. Host-Feeding Patterns of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Urban and Rural Contexts within Rome Province, Italy. **Vector-Borne and Zoonotic Dis.**, New York, v. 10, n. 3, p. 291–294, 2010.

VAN HANDEL, E. Rapid determination of total lipids in mosquitoes. **J. Am. Mosq. Contr. Assoc.**, Fresno, v. 1, n. 3, p. 302–304, 1985.

VARGAS, H. C. M. et al. Serosal cuticle formation and distinct degrees of desiccation resistance in embryos of the mosquito vectors *Aedes aegypti*, *Anopheles aquasalis* and *Culex quinquefasciatus*. **J. insect physiol.**, Oxford, v. 62, n. 1, p. 54–60, 2014.

VELASQUEZ, L. S. et al. Transferrin expression profile during bacteria infection in *Aedes aegypti* mosquitoes. **FASEB j.**, Bethesda, v. 22, n. 1, p. 1–2, 2008.

VINOGRADOVA, E. **Diapause of blood - sucking mosquitoes and its control**. Leningrad: Nauka Academic Publishers, 1969.

VINOGRADOVA, E. B. Diapause in aquatic insects, with emphasis on mosquitoes. **Monographiae Biologicae**, Boston, v. 84, n. 1987, p. 83–113, 2007.

WANG, R-L. Observations on the influence of photoperiod on egg diapause in *Aedes albopictus* (Skuse). **Acta Entomol. Sinica**, Beijing, v. 15, n. 1, p. 75-77, 1966.

WEBSTER, M. **Collegiate Dictionary**. 11. ed Cambridge: Springfield. 1664p. 2003.

WEISSMAN-STRUM, A.; KINDLER, S. H. Hatching of *Aedes aegypti* (L.) eggs, a two-stage mechanism. **J. insect physiol.**, Oxford, v. 9, n. 6, p. 839–847, 1963.

WHITEHEAD, S. S. et al. In a randomized trial, the live attenuated tetravalent dengue vaccine TV003 is well-tolerated and highly immunogenic in subjects with flavivirus exposure prior to vaccination. **Plos negl. trop. dis.**, San Francisco, v. 11, n. 5, p. 1–19, 2017. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5436874/>>. Acesso em 13 Jan. 2017.

WILTON, D. P.; SMITH, G. C. Ovarian diapause in three geographic strains of *Culex pipiens* (Diptera:Culicidae). **J. med. entomol.**, Honolulu,, v. 22, n. 5, p. 524–528, 1985.

WOLL, S. C.; PODRABSKY, J. E. Insulin-like growth factor signaling regulates developmental trajectory associated with diapause in embryos of the annual killifish *Austrofundulus limnaeus*. **J. Exp. Biol.**, London, v. 220, n. 15, p. 2777–2786, 2017.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Dengue Control**. Geneva, 2017.

YANG, H. M. Assessing the Influence of Quiescence Eggs on the Dynamics of Mosquito *Aedes aegypti*. **Applied Mathematics**, Hubei, v.5, p. 2696–2711, 2014.

ZANLUCA, C. et al. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 110, n. 4, p. 569–572, 2015.

ZHANG, Q.; DENLINGER, D. Expression analysis of the prothoracicotropic hormone gene in the northern house mosquito, *Culex pipiens*, in association with diapause and blood feeding. **Insect mol. biol.**, Oxford, v. 20, n. 2, p. 201–213, 2011.

**Apêndice A - Sequências dos *primers* utilizados para amplificação de genes associados à diapausa**

**Tabela 1** – Sequências dos *primers* utilizados para amplificação de genes associados à diapausa

<b>Genes</b>	<b>Primers (F e R) : 5'----- 3'</b>	<b>Pb</b>	<b>GC (%)</b>	<b>Tm</b>	<b>Comp.</b>
Cathepsin [AAEL006389]	CGTAAAGAAGCTCTTGCCACCAATCC	26	50,0	62,0	~350
	CCTTTGCTCAGTACCCGCCAATTTG	25	52,0	63,4	
Insuline-like growth factor [AAEL001965]	GGAAAGGTGTGGCATGGATTC	21	52,4	55,6	~400
	GATGACGATCTTGCCGGCAG	20	60,0	57,8	
Lipase [AAEL000268]	CGGGACGCTCTCCTGAATGCC	21	66,7	62,5	~300
	CGGAAACGCGGGGTCCAGAC	20	70,0	63,2	
Transferrin [AAEL011641]	GTTGATAGAATATGCGCTAGCACC	24	45,8	54,1	~400
	GAATTTCTTATTGCGCAGACCATC	24	41,7	56,0	
Phosphoenolpyruvate carboxykinase [AAEL000080]	GTTTATACCCCTTCCAAACCAC	23	47,8	54,6	~300
	GGTGCAGATGAAGGTCTTGGAC	22	54,5	55,0	
ACT-1* (Actina- controle enógeno) [U02933. 1]	ATGGTCGGYATGGNCAGAAGGACTC	26	57,7	69,3	~680
	GATTCCATACCCAGGAAG-GADGG	22	53,6	65,1	

Sequencia dos *Primers* desenhados por meio do programa *Primer Select* da plataforma *Lasergene*. [AAEL/UO] – código de acesso no Vectorbase/EMBL-EBI; F- *primer* forward (preto); R- *primer* reverse (vermelho); Tm- temperatura de *melting*; pb- número de pares de base do *primer*; Comp. – comprimento do fragmento amplificado.

\**Primers* universais para amplificação do gene actina-1 para diversas espécies de mosquitos.

## APÊNDICE B – Protocolo para utilização de camundongos



Miracete de Souza

FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz  
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

### COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

#### Certificado de Aprovação

Certificamos que o projeto intitulado: **Protocolo para utilização de camundongos, *Mus musculus*, no repasto sanguíneo de culicídeos, produzidos para fins de pesquisa, no Departamento de Entomologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães-FIOCRUZ/PE**, protocolado sob nº 78/2014 pelo (a) pesquisador (a) Maria Alice Varjal de Melo Santos. Está de acordo com a Lei 11.794/2008 e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz (CEUA/CPqAM) em 25/05/2015. Na presente versão, este projeto está licenciado e tem validade até maio de 2019.

Quantitativo de Animais Aprovados	
Espécie	Nº de Animais
Camundongo heterogênico <i>Swiss (machos/fêmeas)</i>	1604

We certify that project entitled **Protocolo para utilização de camundongos, *Mus musculus*, no repasto sanguíneo de culicídeos, produzidos para fins de pesquisa, no Departamento de Entomologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães-FIOCRUZ/PE**. Protocol nº 78/2014, coordinated by Maria Alice Varjal de Melo Santos. Is according to the ethical principles in animal research adopted by the Brazilian law 11.794/2008 and so was approved by the Ethical Committee for Animal Research of the Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz on May, 25, 2015. In present version this project is licensed and valid until May, 2019.

Recife (PE, Brazil) november 05, 2015.

Drª Sheilla Andrade de Oliveira  
Coordenadora CEUA/CPqAM

Drª Sheilla Andrade de Oliveira  
Coordenadora da Comissão de Ética  
no Uso de Animais - CEUA  
Mat. SIAPE 1554975  
e-mail: sheilla@cpqam.fiocruz.br  
CPqAM/Fiocruz

Av. Professor Moraes Rego, s/n - Cidade Universitária - Campus da UFPE  
Recife - PE - CEP: 50.670-420  
Telefone: (81) 2101-2500/2101-2600 Fax: (81) 3453-1911  
www.cpqam.fiocruz.br

**APÊNDICE C – Artigo de Revisão (2017)**

REVIEW

Open Access



# Diapause and quiescence: dormancy mechanisms that contribute to the geographical expansion of mosquitoes and their evolutionary success

Diego Felipe Araujo Diniz<sup>1</sup>, Cleide Maria Ribeiro de Albuquerque<sup>2</sup>, Luciana Oliveira Oliva<sup>2</sup>, Maria Alice Varjal de Melo-Santos<sup>1</sup> and Constância Flávia Junqueira Ayres<sup>1\*</sup>

## Abstract

Mosquitoes are insects belonging to the order Diptera and family Culicidae. They are distributed worldwide and include approximately 3500 species, of which about 300 have medical and veterinary importance. The evolutionary success of mosquitoes, in both tropical and temperate regions, is due to the various survival strategies these insects have developed throughout their life histories. Of the many adaptive mechanisms, diapause and quiescence, two different types of dormancy, likely contribute to the establishment, maintenance and spread of natural mosquito populations. This review seeks to objectively and coherently describe the terms diapause and quiescence, which can be confused in the literature because the phenotypic effects of these mechanisms are often similar.

**Keywords:** Culicidae, Seasonality, Metabolism, Adaptation, Dispersion, Disease transmission

## Background

Mosquitoes are arthropods that can cause considerable nuisance and affect human health worldwide [1, 2]. They are among the most prolific and invasive species, contributing to the spread of endemic diseases [3, 4]. These organisms are present in most places on the planet, from the Arctic to the most remote desert oases, except Antarctica due to its extremely low temperatures. Thus, mosquitoes are widely diverse and can easily be found in a wide variety of habitats, including forested, rural and urban environments [2, 5].

These insects have been intensely studied since the end of the nineteenth century due to their ability to act as hosts for many pathogens, including helminths, protozoans and arboviruses, that cause disease in humans and other vertebrates [2, 6]. However, only 10% of the approximately 3500 mosquito species are medically relevant [1, 7–11].

Mosquitoes, especially from the genera *Anopheles*, *Aedes* and *Culex*, include vectors for three major groups of human pathogens: parasites from the genus *Plasmodium*, which cause malaria; filarial worms from the genera *Wuchereria* and *Brugia*; and many arboviruses, including the agents of dengue, yellow fever, chikungunya, zika and others [12–14]. Estimates by the World Health Organization (WHO) indicate that diseases transmitted by mosquitoes are among the major causes of morbidity and mortality in developing countries [15], and high densities of mosquitoes severely challenge vector control programs [16]. The explosive growth of natural mosquito populations is strongly related to the survival and dispersion strategies that some species have acquired over the course of their evolutionary history [17].

Dormancy is a biological trait that may play an important role in the maintenance of natural populations and refers to a physiological phenomenon characterised by the interruption or reduction of metabolic activity in an organism. In mosquitoes, dormancy can occur at different stages of the life-cycle [18]. Diapause and quiescence represent different types of dormancy found in many species of mosquitoes. In this review, these terms are

\* Correspondence: tans@cpqam.fiocruz.br

<sup>1</sup>Entomology Department, Aggeu Magalhães Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Av. Professor Moraes Rego, s/n – Cidade Universitária, Recife, PE, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article

analysed for their conceptual principles and their respective delayed developmental effects; in addition, the mosquito species found to exhibit these phenomena will be noted.

### **Insect dormancy and its various types**

Dormancy is a physiological phenomenon defined as a state of suspended development or suppressed metabolic activity in an organism [19]. Dormancy can occur in both plants and animals; in insects, it can manifest in the embryonic (pharate larvae), immature (larvae and pupae) and adult stages [18]. This phenomenon can be triggered by climactic signals, especially the photoperiod for temperate climate insects and relative humidity for tropical insects. This adaptation seeks to promote survival during and after unfavourable environmental conditions and is known in the literature as heterodynamic development [20]. In 1869, the term dormancy was first described as a period of inactivity caused by low temperatures by the French researcher Duclaux, who was studying silkworms (*Bombyx mori*) [20, 21]. According to a literature review by Danks [20] on the definitions and terminology of dormancy in insects, dormancy is divided into two major categories: diapause and quiescence. The terms diapause and quiescence have been reported to be synonymous in the literature [8, 22–27], but these survival strategies arise from distinct signalling pathways even though the strategies have the same goal: to ensure survival during and after environmental stress.

Mosquitoes belong to one of the most well-adapted taxa in the insect group; they are present across most of the planet, they occupy diverse niches and are potential disease vectors [2]. Diapause and quiescence are well characterised in several stages of the mosquito life-cycle. In the embryonic phase, for example, both strategies have the same effect: the inhibition of larval hatching. Conversely, only diapause drives dormancy in the larval and adult stages of mosquitoes [28].

### **Diapause in mosquitoes**

Diapause is a well-studied seasonal survival strategy and is influenced by several factors, such as the species-specific ecological interactions, biogeography, life history and physiology of many insects [29]. The etymology of the word “diapause” comes from the Greek *diapausis* (pause), derived from the verb *diapauein*, which means to stop or to decrease activity at a time of constant action [30]. Biologically, Tauber et al. [31] defined the diapause phenomenon as a dynamic state of low metabolic activity that is genetically determined and mediated by neurohormones that phenotypically affect individuals by decreasing morphogenesis, blocking reproduction and metamorphosis, and increasing tolerance to extreme environmental conditions

The first studies on diapause in mosquitoes coincided with early studies of seasonality, diapause and photoperiod in other insects [17]. Early reviews on the topic were performed by Lees [32], Danilevskii [33], Tauber et al. [31] and Danks [20]. Studies at the time were motivated by the mosquito’s hematophagous habit, which is linked to its ability to transmit the causative agents of several diseases such as malaria, filariasis, and many arbovirus infections (yellow fever, Western equine, St. Louis and Japanese encephalitis, and West Nile fever) [34].

Diapause is common in insects and other arthropods, especially in areas with harsh winters. Many aspects of diapause are critical for understanding the transmission cycle of vector-borne diseases, as this survival strategy contributes to the maintenance, establishment, growth and dispersion of natural vector populations after the end of an unfavourable season to their development [29]. The process of diapause seeks to reactivate development via external signals that control the genetic factors underlying the dormant phenotype. This can occur in several phases of the life-cycle, but most often only one developmental stage enters diapause [34].

### **What is the environmental signal that induces diapause in mosquitoes?**

Species exhibiting the phenotypic plasticity to undergo diapause have the required information encoded in their genomes. The major stimuli inducing diapause in natural populations are changing photoperiod (short days and long nights) and gradual decreases in temperature [31, 35–40]. Mosquito species that use photoperiod to signal diapause include *Aedes albopictus*, *Aedes atropalpus*, *Aedes sollicitans*, *Aedes taeniorhynchus*, *Culex pipiens* and *Culex restuans* [38, 39, 41–44].

Preparation for diapause occurs in mosquitoes when pupae and/or adult females, which are thought to be the determining stages for this biological trait, are stimulated by exposure to the seasonal changes that typically occur during transitions between a favourable and unfavourable season [29, 39, 45–47]. For *Ae. albopictus*, for instance, induced females develop their offspring for diapause, which in turn present low metabolism in each life-cycle stage during the winter [48, 49]. However, for *Cx. pipiens*, the induced pupae females express diapause when they become adults [50]. Therefore, this ecological adaptation is indispensable for coordinating the growth, development and reproduction of mosquito species found in temperate zones [29].

### **Ecophysiological phases of diapause**

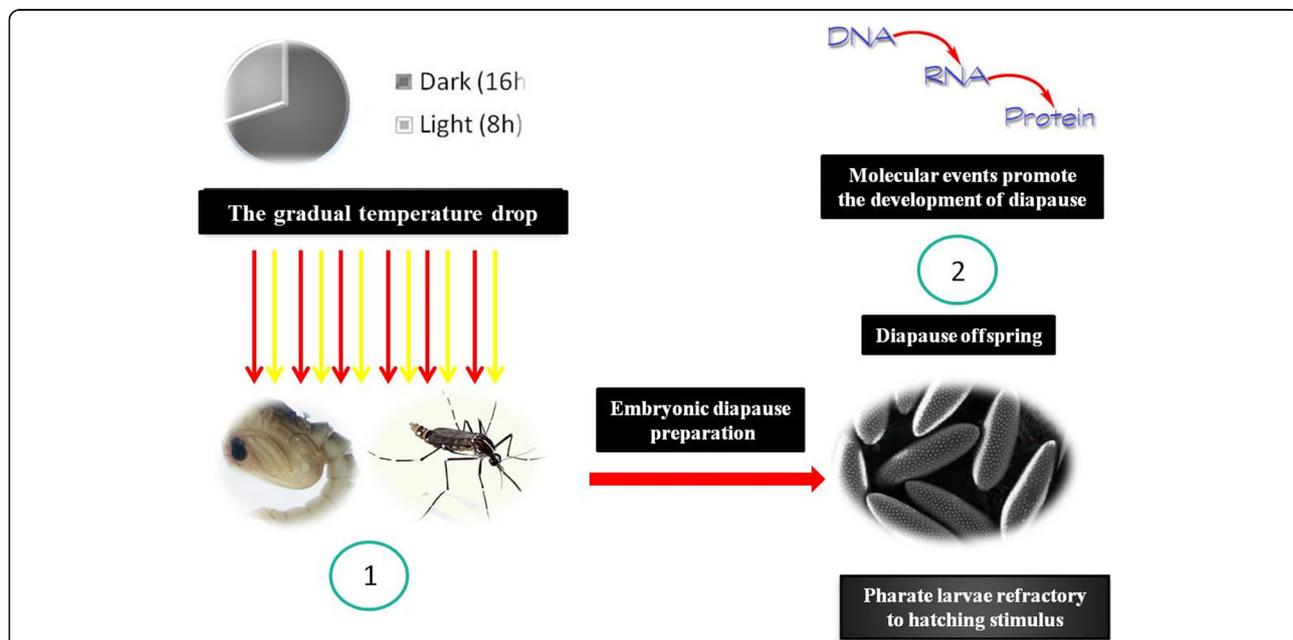
The phenomenon of diapause consists of three ecophysiological phases [51]. The first is the diapause preparation or pre-diapause phase, which corresponds to the sensitive stage in which the insect is exposed to one or more

environmental signals (token-stimuli) that trigger and initiate the phenomenon in the offspring in the following season [19, 48]. In some species, this phase is favourable for the storage of energetic reserves that will be used for basal maintenance of the insect during dormancy and the reinitiation of development at the end of the process. In addition, morphophysiological, biochemical and behavioural changes can be observed in the individuals at this phase [19, 29, 51, 52]. This occurs because some mosquito species extend the developmental time of a specific life-cycle stage (delayed developmental effects) to increase their exposure to the stimulus, which is a favourable event for ensuring that the dormancy phenotype occurs in the offspring [29].

*Culex pipiens* females programmed for adult diapause have a longer larval phase, resulting in larger pupae and adults that have more lipids than their non-diapausing homologs [53]. The fat levels in females of this same species destined for diapause continue to increase significantly during the week following the emergence of the adults, reaching twice the level observed in non-diapausing females [54]. At the molecular level, this increase in energetic reserves is accompanied by an increased expression of genes associated with lipid reserve synthesis [55]. In *Ae. albopictus*, eggs in diapause are larger and contain more lipids than non-diapausing eggs, which is likely due to the increased expression of genes involved in lipid storage during pre-diapause [56].

Diapause programming (Fig. 1) involves the capture of photoperiod information by the central nervous system (CNS) of gravid females, followed by a cascade of biochemical events and culminating in the transfer of a molecular diapause regulator that promotes a dormancy state in embryos [29]. Thus, clock genes can reasonably be assumed to be involved in the regulation of circadian rhythms and, consequently, in the seasonal response based on the length of day and night [57, 58]. The main clock genes in mosquitoes that are involved in circadian rhythm regulation but are not necessarily related to diapause have been characterised in *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus*, *Anopheles gambiae*, *Cx. quinquefasciatus* and *Wyeomyia smithii* [59–65].

Diapause specifically refers to the actual time when development is interrupted or significantly slowed, and the insect does not respond to environmental stimuli [29]. This is the second phase and can be divided into the following sub-phases: (i) the responsive phase-the beginning of the process when development is stopped at a specific life stage; (ii) the initiation stage-the phenomenon is maintained and controlled by endogenous and/or exogenous factors, and (iii) termination-the time when the individuals receive the signal to return to normal metabolic activity [19]. During diapause, various endogenous changes can be observed, but these depend on the species studied. In *Ae. albopictus* embryos, *Wy. smithii* larvae and *Cx. pipiens* adults, for example, lower lipid degradation



**Fig. 1** Embryonic diapause induction in mosquitoes. 1 Exposure of pupae and/or adult females to short days, long nights and gradual temperature drop, and abiotic factors that promote the preparation of the embryonic diapause. 2 Expression of specific genes transferred from the female to the offspring allows diapause to be triggered and the embryos (pharate larvae) to become refractory to the hatching stimulus

and higher tolerance to desiccation and low temperatures are present [48, 66–70].

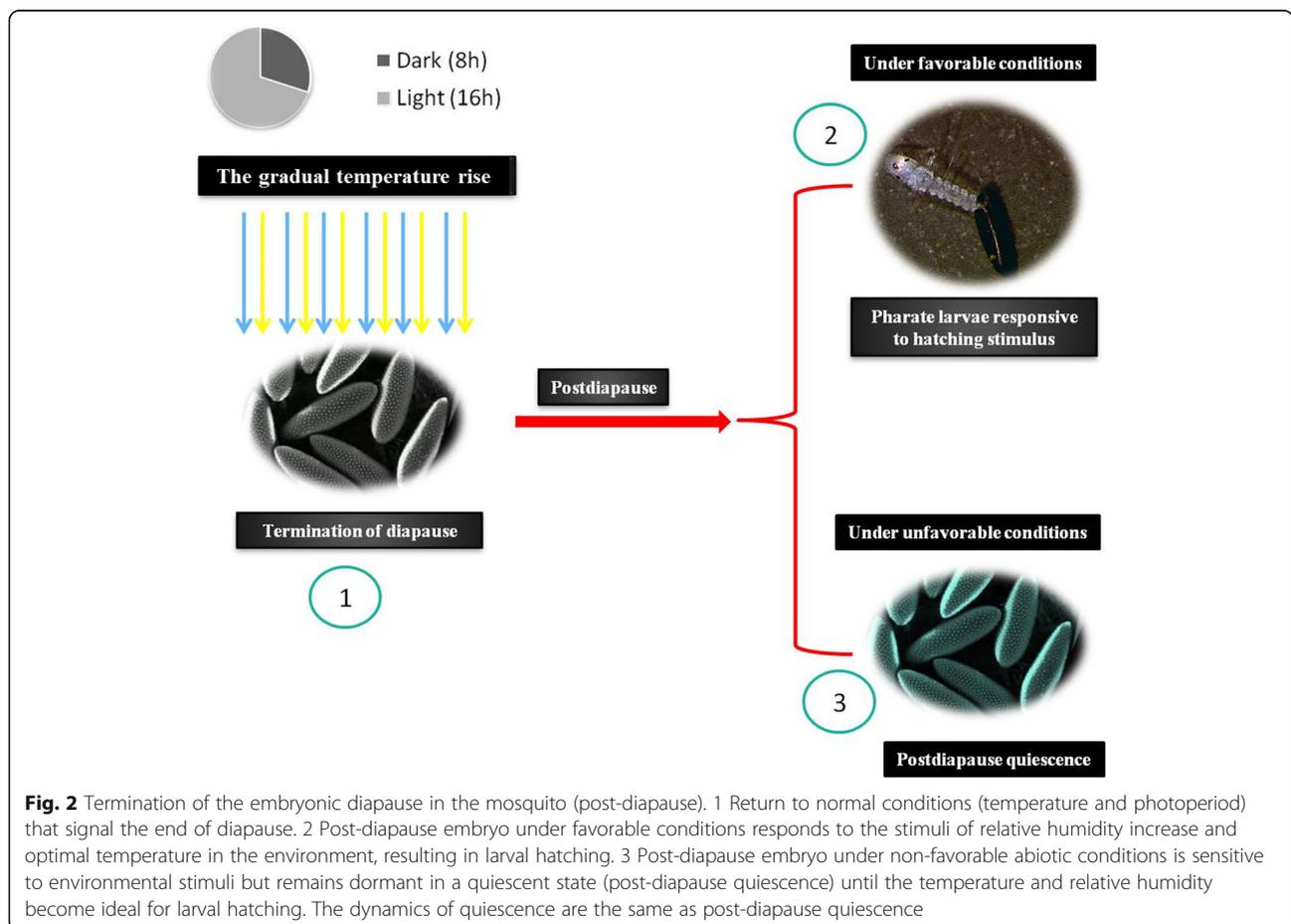
At the molecular level, a few genetic components that mediate these adaptive physiological traits have been reported in previous studies. In *Ae. albopictus*, resistance to desiccation, promoted by diapause, results from an increase in the external surface area of the egg with increased hydrocarbon levels, and this is caused by an overexpression of a transcript involved in lipid storage. However, the mechanisms responsible for cold tolerance in this species have not been determined [71]. In *Cx. pipiens*, increased tolerance to desiccation during diapause is primarily due to an increase in the hydrocarbon layer on the cuticular body surface of adults and an increase in trehalose production, which contribute to both desiccation and cold tolerance [66]. In contrast, the molecular events that promote the effects of diapause in *Wy. smithii* have yet to be discovered [29].

The last phase, termed post-diapause, is characterised by the complete reactivation of metabolism and development in the insect [51]. Although photoperiod is widely used as an environmental stimulus for entering diapause, it is less often used to signal the end of diapause;

however, some exceptions exist, such as, for example, in *Wy. smithii*, where another change in photoperiod causes diapause to end [29, 72]. In *Ae. albopictus*, the termination of diapause in the eggs may be signalled by changes in photoperiod and by increasing temperature [73]. Another interesting characteristic, in addition to post-diapause, is a phenomenon known as post-diapause quiescence (Fig. 2), which is also present in *Ae. albopictus* [49, 73]. This process is considered to be a phenotypically indistinguishable phase from diapause. The insect remains in a state of dormancy, its metabolic rate continues to be low, and many of the same genes associated with diapause continue to be expressed. Thus, diapause and quiescence possibly have many molecular components in common, although the components for initial programming are exclusive to diapause [49]. Physiologically, the only difference is that during quiescence, the insect remains fully capable of responding to environmental stimuli [29, 74, 75].

**Diapause in different mosquito species/life-cycle stages**

Diapause can occur in different phases of the mosquito life-cycle, i.e. in the embryo (pharate larvae inside the



**Fig. 2** Termination of the embryonic diapause in the mosquito (post-diapause). 1 Return to normal conditions (temperature and photoperiod) that signal the end of diapause. 2 Post-diapause embryo under favorable conditions responds to the stimuli of relative humidity increase and optimal temperature in the environment, resulting in larval hatching. 3 Post-diapause embryo under non-favorable abiotic conditions is sensitive to environmental stimuli but remains dormant in a quiescent state (post-diapause quiescence) until the temperature and relative humidity become ideal for larval hatching. The dynamics of quiescence are the same as post-diapause quiescence

egg), larval and adult stages. However, this type of dormancy tends to occur in a single stage of the life-cycle for a given species [19, 29, 34]. Furthermore, in some species, diapause can occur in more than one stage, more precisely, between the embryonic and larval stages [36, 62, 76–78].

#### **Embryonic diapause**

This is the most common type of dormancy and occurs in the mosquito embryo. Using *Ae. albopictus*, a model organism for diapause, as a reference, the embryo is completely formed inside the egg chorion, but a metabolic depression of post-embryonic development occurs due to genetic programming; thus, the larva is unable to respond to any abiotic signals, that is, the larva is refractory to hatching stimuli [29, 45, 46, 79]. Embryos in diapause are more tolerant to desiccation and tend to have a higher total lipid content than normal embryos [57, 68, 80]. The overexpression of ecdysteroid transcripts, found by transcriptomic analysis of mature oocytes, likely regulates embryonic diapause in *Ae. albopictus* and other mosquitoes [48, 49]. The genera of mosquitoes with embryonic diapause are *Aedes*, *Anopheles*, *Psorophora* and *Ochlerotatus* [29, 34], and the major species reported in the literature for each genus are listed in Table 1.

#### **Diapause in larval stages**

This physiological process is known in the literature as the syndrome of larval diapause, which is characterized in mosquitoes by the prolongation of the third- or fourth-instar. The induction of diapause in larvae is directly stimulated by a gradual decrease in environmental temperature, and the metabolic activity rapidly returns to normal in response to its normalisation in the wild, although changes in photoperiod also play a role in its induction [34]. The behaviour of the larvae is characterised by reduced locomotor and feeding activities, consequently promoting an increased accumulation of body reserves that, in turn, provide increased cold tolerance [34]. Under normal conditions, the progression of the development of the larval stages occurs biochemically through the periodic release of the steroid hormone ecdysone by the prothoracic gland, which culminates in the moults. When the larvae are in diapause, ecdysone release is lacking, and therefore, the larvae do not advance from one stage to the next [29]. Currently, no molecular studies have explained the hormonal basis for diapause in mosquitoes, but some studies have reported the absence of ecdysone as a major cause of larval diapause in other insects, which is likely similar to mosquitoes [81]. Mosquito species in which this type of dormancy has been observed are listed in Table 2.

**Table 1** Embryonic diapause in different mosquito species

Species	References
<i>Aedes albopictus</i>	[46]
<i>Aedes atropalpus</i>	[41]
<i>Aedes campestris</i>	[150]
<i>Aedes canadensis</i>	[151]
<i>Aedes caspius</i>	[76]
<i>Aedes dorsalis</i>	[152]
<i>Aedes fitchii</i>	[153]
<i>Aedes geniculatus</i>	[77]
<i>Aedes hendersoni</i>	[78]
<i>Aedes hexodontus</i>	[154]
<i>Aedes impiger</i>	[129]
<i>Aedes japonicus</i>	[155]
<i>Aedes mariaae</i>	[35]
<i>Aedes nigripes</i>	[156]
<i>Aedes nigromaculis</i>	[152]
<i>Aedes sierrensis</i>	[36]
<i>Aedes sticticus</i>	[157]
<i>Aedes taeniorhynchus</i>	[44]
<i>Aedes triseriatus</i>	[158]
<i>Aedes vexans</i>	[159]
<i>Anopheles walkeri</i>	[160]
<i>Psorophora ferox</i>	[151]
<i>Ochlerotatus dorsalis</i>	[152]
<i>Ochlerotatus nigromaculis</i>	[152]
<i>Ochlerotatus hexodontus</i>	[154]
<i>Ochlerotatus flavescens</i>	[34]
<i>Ochlerotatus triseriatus</i>	[75]
<i>Ochlerotatus togoi</i>	[75]

#### **Diapause in adult females**

Diapause in adult female mosquitoes involves a set of important characteristics, such as the interruption of gonadal development, reduced biting behaviour, negative phototaxis and changes in total metabolism, leading to the gradual accumulation of body fat. Mosquitoes can enter diapause in many habitats, such as caves, soil cavities, burrows, vegetable store-houses, empty sheds, basements, and catacombs [34]. In adult females, a type of dormancy occurs, known as reproductive diapause, where sexual immaturity is prolonged because the ovarian follicles do not differentiate completely and hence, delay the blood feeding activity [8, 34, 74].

The majority of studies on diapause in adult mosquitoes has been performed on the species *Cx. pipiens*, which is considered a model organism [29]. Under normal conditions, after the emergence of the winged form, juvenile hormone (JH) is synthesised and released,

**Table 2** Larval diapause in different mosquito species

Species	References
<i>Aedes caspius</i>	[76]
<i>Aedes geniculatus</i>	[77]
<i>Aedes hendersoni</i>	[78]
<i>Aedes sierrensis</i>	[36]
<i>Aedes togoi</i>	[68]
<i>Aedes triseriatus</i>	[159]
<i>Anopheles barberi</i>	[161]
<i>Anopheles plumbeus</i>	[162]
<i>Anopheles pulcherrimus</i>	[85]
<i>Armigeres subalbatus</i>	[163]
<i>Culiseta melanura</i>	[164]
<i>Orthopodomyia alba</i>	[165]
<i>Orthopodomyia puchripalpis</i>	[166]
<i>Orthopodomyia signifera</i>	[167]
<i>Toxorhynchites rutilus</i>	[168]
<i>Wyeomyia smithii</i>	[169]

promoting ovarian follicle growth within 3 days, and shortly after, the female is ready for its blood meal, which will contribute to oocyte maturation. In contrast, females programmed for diapause do not release JH immediately after emergence, and the follicles remain atrophied. The females also have a reduced aggressiveness [82]. Experiments on diapausing *Cx. pipiens* females treated with JH have exhibited ovarian growth stimulation, confirming the importance of inhibiting this hormone to initiate diapause in adult mosquitoes [54, 83]. It is important to highlight that in this species, males do not undergo diapause, thus, they inseminate females and then die, as they cannot overwinter [31, 33, 84]. The *Anopheles* and *Culex* species reported as exhibiting adult diapause are listed in Table 3 [38, 40, 75, 85–94].

#### The molecular biology of diapause in mosquitoes

Most studies on the genetic basis of diapause in mosquitoes have focused on two species, *Ae. albopictus* and *Cx. pipiens*, which are considered model organisms for this approach. Early studies were performed in the fly *Drosophila melanogaster*; however, although this species is a reference for basic genetic studies, it did not yield good results in the gene expression studies, as the insect showed highly variable responses and high variance between individuals [95–97].

Diapause in *Cx. pipiens*, according to breeding experiments, is polygenetically regulated and involves genes on all three chromosomes [98, 99]. A more detailed study on the species using suppressive subtractive hybridization to determine the expression profile of diapause genes revealed that a set of 40 genes were differentially expressed.

**Table 3** Adult diapause in different mosquito species

Species	References
<i>Anopheles atroparvus</i>	[85]
<i>Anopheles earlei</i>	[86]
<i>Anopheles freeborni</i>	[87]
<i>Anopheles superpictus</i>	[85]
<i>Anopheles gambiae</i>	[88]
<i>Anopheles hyrcanus</i>	[87]
<i>Anopheles maculipennis</i>	[85]
<i>Anopheles messeae</i>	[85]
<i>Anopheles punctipennis</i>	[89]
<i>Anopheles sacharovi</i>	[75]
<i>Culex bitaeniorhynchus</i>	[75]
<i>Culex apicalis</i>	[75]
<i>Culex modestus</i>	[75]
<i>Culex pipiens</i>	[39]
<i>Culex restuans</i>	[39]
<i>Culex tarsalis</i>	[90]
<i>Culex tritaeniorhynchus</i>	[91]
<i>Culiseta alaskaensis</i>	[92]
<i>Culiseta impatiens</i>	[93]
<i>Culiseta inornata</i>	[94]

Most of these genes were implicated in the expression of structural components and responses to the environmental stress [100]. One of the upregulated genes was a stress tolerance gene expressing a heat-shock protein (HSP70), which functions as a chaperone to inhibit abnormal protein folding in harsh environmental conditions, including desiccation and cold [101]. In addition, metabolic genes are overexpressed in *Cx. pipiens* during diapause, including the mitochondrial malate dehydrogenase (*mmd*), methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase and cytochrome oxidase (*cox*) genes. These genes may be involved in the specific metabolic events associated with diapause and have been implicated in increased cold tolerance. The expression of certain cytoskeletal genes was also upregulated by preparation for diapause. The actin gene, for example, is overexpressed during the diapause preparation stage, likely due to increased flying activity before dormancy begins, and the expression levels of this gene decrease gradually during diapause and are low at diapause termination. Downregulated genes included the ribosomal genes S3A, rpS6 and rpS24, which are involved in gene regulation (translation initiation) and inhibit or reduce the expression of several other metabolic genes [102].

Most information on changes in gene expression associated with diapause in mosquitoes is based on recent high-throughput sequencing studies (such as RNA-seq) examining the transcriptome of *Ae. albopictus* at

different stages [29, 48, 49, 102]. Early studies on the differential expression of transcripts were performed in the ovary cells of this mosquito (oocytes), and later, the molecular mechanisms during embryogenesis were investigated.

A study by Poelchau et al. [48], who sequenced the oocyte transcriptome of diapausing *Ae. albopictus* females, and another more recent similar study from the same group, Poelchau et al. [49], who used diapausing embryos from *Ae. albopictus*, revealed the overexpression of genes involved in various biological processes. The following are included among these genes: the gene *ing1*, which encodes for the inhibitor of growth protein and is involved in the interruption of the cell division cycle [52, 103]; the gene *rack1*, a putative receptor for activated protein kinase C, which may bind to several signaling molecules, including transcription factors related to ecdysone (20-hydroxyecdysone), and is probably associated with the preparation for diapause [104, 105]; the gene *pepck* (phosphoenolpyruvate carboxykinase), whose product participates in the glycogen pathway to move from aerobic to anaerobic metabolism in diapausing mosquitoes [106, 107]; and the gene GPCR (G protein-coupled receptor), which is involved in increased resistance to environmental stress [108].

#### Quiescence in mosquitoes

Quiescence is a type of irregular dormancy (non-seasonal) characterised by slowed metabolism and directly resulting from unfavourable environmental conditions, including low humidity and high temperatures [22, 74, 109, 110]. This adaptive trait is often confused with diapause, especially when referring to embryonic dormancy, but quiescence is a less complex biological trait that does not depend on endogenous control for its initiation. Stimuli that trigger quiescence are referred to as acyclic environmental changes [19]. Quiescence also differs from diapause because it is neither a previously programmed event, nor is it hormonally controlled; once the stimulus that induces the process ceases, physiological activity is restored [29, 34, 73]. Because quiescence is controlled exogenously, it is possible that rapid gene activation and macromolecule synthesis or degradation are not required for entry into the quiescent state [109].

In mosquitoes, as in other organisms, the term quiescence is applied to various biological events. Most commonly studied in the egg, quiescence in mosquitoes can be stimulated in different stages or structures, enabling the insect to attain favourable conditions for survival. In the mosquito *Cx. quinquefasciatus*, for example, mature spermatozooids are maintained in quiescence in the male reproductive tract and are activated in response to specific chemical signals [111]. In this species, motility is stimulated by substances from the accessory glands in males and is possibly controlled by protein

phosphorylation and  $Ca^{2+}$  levels [111]. In addition, in females, degenerative dilations may develop in the ovary, which contains granular material during winter, and the presence of these expansions in the ovaries is thought to be indicative of quiescence [112, 113].

In the family Culicidae, quiescence, unlike diapause, has been primarily observed in the egg, reflected in the resistance to desiccation that allows the embryo to survive in dry conditions. The process begins when the embryo (pharate larvae) receives an external stimulus, such as a rapid drop in humidity or change in temperature, which signals unfavourable environmental conditions and impedes larval hatching [19, 34, 74]. In this case, the developmental arrest is temporary and immediately reversible, as contact with water induces rapid hatching; that is, the quiescent embryo is not refractory to hatching stimuli as is found in diapausing embryos [18, 19, 34, 49, 114]. As shown in Table 4, the genera reported exhibiting quiescence are *Aedes*, *Anopheles* and *Culex* [23, 49, 68, 80, 115–124]. The species *Ae. aegypti* is prominent among mosquitoes due to its strategy of prolonged viability by embryonic quiescence, significantly contributing to the constant expansion of populations in

**Table 4** Embryonic quiescence in different mosquito species

Species	References
<i>Aedes aegypti</i>	[68]
	[23]
	[116]
	[170]
	[118]
	[119]
	[120]
	[121]
	[122]
	[115]
<i>Aedes albopictus</i>	[123]
	[68]
	[117]
<i>Aedes flavopictus</i>	[71]
	[48]
	[68]
	[68]
	[68]
	[68]
	[121]
	[123]
	[124]
	[123]
<i>Anopheles gambiae</i>	[123]
	[123]

the wild [74, 75]. However, several studies have erroneously reported this trait as diapause [8, 22–24, 26].

#### Egg quiescence or embryonic desiccation resistance

Egg quiescence is commonly referred to as “embryonic desiccation resistance” (EDR) and depends on several factors that range from differences in eggshell composition and structure to physiological changes, resulting in reduced metabolism in the larvae contained within the egg [22, 116, 121, 125]. However, because the ability to resist desiccation is a property of the egg and not of the embryo and because desiccation can occur at other stages of development, the term “egg resistance to desiccation (ERD)” has been suggested as more appropriate for referring to this phenomenon [123].

The three layers that form the eggshell, the exochorion, endochorion and serosal cuticle, are particularly important for ERD [116, 123]. The first two layers are produced in the ovary, by females, and are, therefore, present at laying [74, 123, 126]. The serosal cuticle (the innermost layer), in turn, is an extracellular matrix produced by the extraembryonic serosa during early embryogenesis. In *Ae. aegypti*, secretion of the serosal cuticle occurs between 11 and 13 h after oviposition and approximately 8 h post-fertilization in *An. gambiae* [115, 124].

This cuticle likely secretes a chitin-containing material under the chorion, the external layer of the egg, making it impermeable and protecting the embryo from desiccation [116, 123]. Changes in the amounts of the eggshell components are associated with water loss regulation and are fundamental for determining the intensity of egg dehydration. *Aedes albopictus* females exposed to short day length in temperate regions produce eggs in photoperiodic diapause, unlike populations in tropical regions, which enter quiescence. One of the characteristics of the egg that permits this adaptation is the high quantity of fatty acyl-CoA elongase in the tissue of mature oocytes responsible for producing hydrocarbons in the eggshell [71]. These hydrocarbons regulate water loss in insect eggs, and the abundance of this enzyme varies in the eggs of *Ae. albopictus* exposed to long and short days in temperate populations but is maintained at relatively constant levels in tropical populations [80, 123]. In addition to several hydrocarbons in the eggshell, the amount of chitin is another factor involved in ERD in mosquitoes, such as *Cx. quinquefasciatus*, *An. aquasalis* and *Ae. aegypti*. Eggshells with higher amounts of chitin are more resistant to desiccation [123].

#### Quiescence patterns in container-inhabiting mosquitoes

ERD has been more commonly studied in container-inhabiting mosquitoes, including *Ae. aegypti* and *Ae.*

*albopictus*. In urban areas, females often lay their eggs in containers with clean water, especially disposable containers, tires, plant pots and water storage containers [127, 128]. Because the eggs are laid near the water surface, this developmental phase is very susceptible to dehydration, particularly during the first few hours of development [129].

First-instar larvae that remain inside quiescent eggs have been referred to as pharate first-instar quiescence [34, 74]. Normal development finishes approximately 3 days after oviposition and larval survival depends on maternal reserves [119]. Throughout the quiescent period, the larval developmental period is significantly prolonged, and lipid reserves are reduced, incurring fitness costs for larval viability, compromising the reproductive performance of the adult [34, 74].

Minimally studied, quiescence in mosquito eggs does not appear to have a uniform pattern, exhibiting variability between species or even among populations of the same species [69, 123, 130]. Under similar low-moisture conditions, the pharate first instars of *Cx. quinquefasciatus*, *An. aquasalis* and *Ae. aegypti* can survive for a few hours, 1 day or several months, respectively [123]. These differences may be due to traits inherent to the eggs of each species, such as size, the structure of the exochorion and endochorion, differences in metabolite quantity and formation of the serosal cuticle [68, 121, 131, 132].

Brazilian colonies of *Ae. aegypti* maintained at a temperature of  $28 \pm 1$  °C, a relative humidity of  $80 \pm 5\%$  and a photoperiod of 12 h had a viability period of up to 492 days, with high hatching rates between three and 121 days [23]. A similar pattern with high larval hatching rates (80%) was reported by Diniz et al. [115] in quiescent *Ae. aegypti* eggs that had been stored for up to 150 days. The authors compared eggs from laboratory and wild populations with different susceptibilities to the insecticide temephos, which were then maintained for up to 180 days at 26 °C, with a photoperiod of 12 h and at 50–60% humidity. The high viability of quiescent eggs from temephos-resistant females suggests a high contribution to the maintenance of resistant individuals in the wild. Similarly, in Australia, quiescent *Ae. aegypti* eggs remained viable for more than a year with a hatching rate of approximately 2–15%, allowing its dispersion to new locations [133]. Species inhabiting forests have been shown to be less resistant to changes in humidity. *Aedes riversi*, *Ae. galloisi* and *Ae. flavopictus* eggs have different survivability rates in very humid conditions but were less resistant than *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus* under low humidity. Intraspecific differences in ERD were also observed among these species, as *Ae. riversi* and *Ae. flavopictus* strains from subtropical regions had lower viability than strains from temperate regions [68].

### The molecular biology of quiescence in mosquitoes

Although much is known about the metabolic mechanisms and molecular biology of diapause, very little is known about these aspects during quiescence in mosquitoes. A study by Poelchau et al. [49] that compared the transcriptomes of quiescent and diapausing *Ae. albopictus* eggs found that the genetic expression profile between these samples converged over time; that is, the transcription profile in eggs during late diapause (40 days) is similar to that in quiescent eggs [49]. An important aspect of this study is that expression levels of genes related to lipid metabolism were always higher in eggs in diapause, demonstrating the likely importance of this reserve for maintaining embryonic diapause and explaining why eggs in diapause have more lipid reserves than quiescent eggs [49].

Currently, the metabolic pathways or hormones associated with quiescence are unknown, and only the chitin synthase (CHS) gene has been described as being related to this phenomenon in mosquitoes. This gene promotes the synthesis of chitin, which is then secreted into the extracellular space of the egg, with direct implications for the formation of the serosal cuticle and consequently the resistance to desiccation [116, 124, 134]. Despite being primarily cited for *An. gambiae* (AgCHS), this gene is highly conserved in two other species of mosquitoes, *An. quadrimaculatus* and *Ae. aegypti*. The gene has two variants, but only the allele AgCHS1 is involved in embryogenesis. In *Ae. aegypti*, for example, the expression of the gene peaks between nine and 12 h after oviposition, coinciding with the acquisition of resistance to desiccation through the complete covering of the embryo by the chitinized serosal cuticle [116, 124].

### Eco-epidemiological importance of quiescence

In Europe, a considerable increase in invasive mosquito propagation has been observed since the end of the 1990s, with the species *Ae. albopictus*, *Ae. aegypti*, *Ae. japonicus*, *Ae. atropalpus* and *Ae. koreicus* already established on the continent [131]. In addition to increased population densities, the distribution of *Ae. albopictus* has continued to increase, and several other species of *Aedes* are being reported in new countries each year [135]. For example, recently, a research group from Brock University reported the detection of *Ae. aegypti* for the first time in Canada [136]. In addition, Lima et al. [137] reported a permanent *Ae. aegypti* local population in the Capitol Hill neighbourhood in Washington DC that can overwinter. This is contrary to the previous hypothesis that different introductions of *Ae. aegypti* every year maintain that local population. All these species are well adapted to the urban environment, exploiting a variety of container habitats that proliferate near human settlements, and both quiescence and diapause

may be contributing to the maintenance of these populations. In addition to the annoyance of their bites, these mosquitoes are potential vectors for agents that cause tropical diseases, including Zika, dengue, chikungunya and yellow fever [138]. Quiescence in *Ae. aegypti* may also allow the survival of infected embryos, favouring virus survival and its maintenance in nature [8, 122, 139]. For example, DENV-1 was detected and isolated in 8.33% of *Ae. aegypti* eggs in Florida, suggesting that maintenance of dengue outbreaks in 2009 and 2010 in Key West may have been facilitated by vertical transmission [140]. Transovarian transmission of DENV in the field was also detected in larvae and adults originating from larvae collected in domestic containers in Rajasthan, India. Approximately 1.09% of the reservoirs contained larvae with the virus, detected by the indirect fluorescence antibody test and reverse transcriptase polymerase chain reaction. In this case, dormant eggs may have contributed to prolonging dengue epidemics [141]. Furthermore, Zika virus, a flavivirus that has recently caused large outbreaks in several countries and has been linked to microcephaly cases and other neurological complications, has also been reported as being transferred via transovarian transmission by *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus* [142–144, 145].

Although the implications of quiescence on the ecology of mosquito vectors and public health are well established, its effects on physiology, behaviour and life history are less understood. Maternal reserves accumulated in eggs directly influence the period of dormancy in the first-instar larvae contained within the eggs [8, 120]. Thus, quiescent eggs pose an important problem for vector control because these eggs can directly contribute to the maintenance of mosquito populations in treated areas. *Aedes aegypti* eggs from a single laying, at the same age, and maintained under the same environmental conditions had different hatching rates during the same period of quiescence. *Aedes aegypti* embryos employ a hedge betting mechanism not all eggs hatch at the first stimulus; some need a second wetting stimulus to hatch [146]. This will ensure that in the event of sudden unfavourable conditions, such as cold temperatures or a dry spell, following the oviposition of the egg batch, the entire batch is not lost [34]. Another explanation could be that not all larvae hatch simultaneously because of competition for space and resources as noted by Livdahl et al. [147] for *Ae. triseriatus*. Furthermore, Ebrahimi et al. [148] showed that the eggs of *An. gambiae* embryos are not stimulated to hatch when the water surface is agitated, demonstrating that environmental factors could indicate the best time for hatching. Sota & Mogi [68] suggested that intraspecific variation in the survival time of eggs is an inherited trait dependent on environmental pressures. Variations in the length of quiescence of eggs and variable hatching rates

may be mechanisms that *Ae. aegypti* employs to produce continuous, although fluctuating, populations of adults in the wild at various stages, depending on the existence of favourable or unfavourable environmental conditions [23].

Therefore, quiescence provides a high adaptive potential to *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus* populations, increasing the viability of their eggs and the chances of surviving in nature [148, 149]. This trait has contributed to the geographical expansion of these two species at a global level, an issue that is closely related to the spread of diseases [122].

## Conclusions

As presented in this review, dormancy, especially diapause and quiescence, has a significant impact on the life history of mosquitoes, as well as of many other arthropods. Dormancy is part of the life history of many mosquito species, providing a mechanism to overcome unfavorable seasons in tropical and temperate zones. This trait may have independently evolved several times in the family Culicidae, as the phenomenon occurs at various developmental stages in different species. These adaptive strategies provide, on an evolutionary scale, mechanisms for species survival, as offspring continue to be produced, even when exposed to the various types of stress found in a habitat, and this, in turn, contributes to the territorial expansion of natural populations, consequently increasing their invasive potential. Diapause and quiescence are not the same biological phenomenon but have been treated as synonymous in previous studies. In addition, these different types of dormancy likely aid the propagation of the transmission cycles of diseases caused by different types of arboviruses, as these etiological agents can be transferred via the transovarian route. Both of these biological phenomena could play important roles in the ecology and evolution of many insect species, such as, for example, the mosquito *Ae. albopictus*, which has both phenotypes. Thus, the phenotypic plasticity generated by these intrinsic characteristics results in the reproductive success and survival of mosquitoes in the face of adverse environmental conditions and the different control measures practised by humans. These mechanisms are also fundamental for adapting to more frequent changes in climate. These phenomena are possibly still developing and need to be more thoroughly studied, as the information generated from associated research may be applied to innovative control strategies.

## Abbreviations

AgCHS: Chitin synthase of *Anopheles gambiae*; CHS: Chitin synthase; *cox*: Cytochrome oxidase; EDR: Embryonic desiccation resistance; GPCR: G protein-coupled receptor; *ing1*: Inhibitor of growth protein; JH: Juvenile hormone; MMD: Mitochondrial malate dehydrogenase; *pepck*: Phosphoenolpyruvate carboxykinase; *rack1*: Receptor for activated protein kinase C

## Acknowledgements

Not applicable.

## Funding

Not applicable.

## Availability of data and materials

Not applicable.

## Authors' contributions

DFAD, MAVMS and CFJA designed this study; DFAD conducted the review and wrote the manuscript; CMRA and LOO participated in writing the quiescence topic; and CFJA and MAVMS reviewed the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

## Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

## Consent for publication

Not applicable.

## Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

## Author details

<sup>1</sup>Entomology Department, Aggeu Magalhães Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Av. Professor Moraes Rego, s/n – Cidade Universitária, Recife, PE, Brazil. <sup>2</sup>Zoology Department, Federal University of Pernambuco, Av. Professor Moraes Rego, 1235 – Cidade Universitária, Recife, PE, Brazil.

Received: 26 January 2017 Accepted: 8 June 2017

Published online: 26 June 2017

## References

- Rueda LM. Global diversity of mosquitoes (Insecta: Diptera: Culicidae) in freshwater. *Hydrobiologia*. 2008;595:477–87.
- Lozovel AL. Culicidae (Mosquitos). In: Marcondes CB, editor. *Entomologia médica e veterinária*. Brasil: Atheneu; 2011. p. 107–74.
- Gubler DJ. Resurgent vector-borne diseases as a global health problem. *Emerg Infect Dis*. 1998;4:442–50.
- Lounibos L. Invasions by insect vectors of human disease. *Annu Rev Entomol*. 2002;47:233–66.
- Service M. Mosquito (Diptera: Culicidae) dispersal the long and short of it. *Entomol Soc Am*. 1997;34:579–88.
- Kraemer MUG, Sinka ME, Duda KA, Mylne AQN, Shearer FM, Barker CM, et al. The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *elife*. 2015;4:1–18.
- Almeida PG. Mosquitoes (Diptera, Culicidae) and their medical importance for Portugal: challenges for the 21st century. *Acta Medica Port*. 2011;24:961–74.
- Consoli RAGB, Lourenço de Oliveira R. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Editora FIOCRUZ; 1994.
- Goddard J. Physician's guide 5th edition the public health image library. *Emerg Infect Dis*. 2007;13:2007.
- Harwood F, James MT. *Entomology in human and animal health*. New York: Macmillan Publ. Co. Inc.; 1979.
- National Center for Infectious Diseases Centers for Disease. 2007. Available from: <https://www.cdc.gov/dengue/entomologyecology/index.html>. Accessed 21 Sept 2016.
- Wilke ABB, Gomes A de C, Natal D, Marrelli MT. Control of vector populations using genetically modified mosquitoes. *Rev Lit Arts Am*. 2009; 43:869–74.
- Donalisio MR, Freitas ARR. Chikungunya no Brasil: um desafio emergente. *Rev Bras Epidemiol*. 2015;18:283–5.
- Diallo D, Sall AA, Diagne CT, Faye O, Faye O, Ba Y, et al. Zika virus emergence in mosquitoes in southeastern Senegal, 2011. *PLoS One*. 2014;9: 4–11.
- World Health Organisation. The European health report 2005: public health action for healthier children and populations. World Heal Organ; 2005. Available from: [http://www.euro.who.int/\\_\\_data/assets/pdf\\_file/0020/98300/E87399.pdf](http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0020/98300/E87399.pdf). Accessed 1 Dec 2016.

16. Poopathi S, Tyagi B. The challenge of mosquito control strategies: from primordial to molecular approaches. *Biotech Mol Bio Rev.* 2006;1:51–65.
17. Danks HV. The range of insect dormancy responses. *Eur J Entomol.* 2002;99:127–42.
18. Gordon G, Headrick DH. A dictionary of entomology. Oxford: CABI Publ series; 2001.
19. Martins R, Lewinsohn T, Barbeiros M. Ecologia e comportamento dos insetos. *Oecologia Bras.* 2000;8:149–92.
20. Danks HV. Insect dormancy: an ecological perspective (Biological Survey of Canada Monograph Series, No 1 ). Broadway: Entomological Society of Canada; 1987.
21. Duclaux E. De l'influence de froid d'hiver sur le développement de l'embryon du ver à sole et sur l'éclosion de la graine. *Oompt Eend Acad Sci.* 1869;69:1021–2.
22. Christophers R. *Aedes aegypti*, the yellow fever mosquito. 1st ed. London: Cambridge University Press; 1960.
23. Silva HH, Silva IG. Influência do Período de Quiescência dos Ovos Sobre o Ciclo de Vida de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae) em Condições de Laboratório. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1999;32:349–55.
24. Soares-Pinheiro VC, Dasso-Pinheiro W, Trindade-Bezerrac JM, Tadeib WP. Eggs viability of *Aedes aegypti* Linnaeus (Diptera, Culicidae ) under different environmental and storage conditions in Manaus, Amazonas, Brazil. *Braz J Biol.* 2016;doi: dx.doi.org/10.1590/1519-6984.19815.
25. Luz C, Tai MHH, Santos AH, Silva HHG. Impact of moisture on survival of *Aedes aegypti* eggs and ovicidal activity of *Metarhizium anisopliae* under laboratory conditions. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2008;103:214–5.
26. Choi MY, Estep A, Sanscrainte N, Becnel J, Vander Meer RK. Identification and expression of PBAN/diapause hormone and GPCRs from *Aedes aegypti*. *Mol Cell Endocrinol Elsevier Ireland Ltd.* 2013;375:113–20.
27. Silva HHG Da, Silva Ionizete G da, Lira KDS, Ionizete Garcia da Silva. Metodologia de criação, manutenção de adultos e estocagem de ovos de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) em laboratório. *Rev Patol Trop* 1998;27:53–63.
28. Clements AN, Kerkut GA. The physiology of mosquitoes: international series of monographs on pure and applied biology. Oxford: Pergamon Press. 1963;17:410.
29. Denlinger DL, Armbruster PA. Mosquito diapause. *Annu Rev Entomol.* 2014;59:73–93.
30. Mirriam G, Mirriam C. Collegiate dictionary. 20th ed. Encyclopaedia Britannica, Inc. Massachusetts; 2000.
31. Tauber MJ, Tauber CA, Masaki S. Seasonal adaptations of insects. Oxford: Oxford University Press; 1986.
32. Lees AD. The Physiology of diapause in arthropods. 1955;4:150.
33. Danilevskii AS. Photoperiodism and seasonal development of insects. Minnesota: Leningr Univ Press; 1965.
34. Vinogradova EB. Diapause in aquatic insects, with emphasis on mosquitoes. *Monogr Biol.* 2007;84:83–113.
35. Coluzzi M, Di Deco M, Gironi A. The influence of photoperiod on the selection of oviposition sites in *Aedes mariae* (Diptera: Culicidae). *Parassitologia.* 1975;17:121–30.
36. Jordan RG, Bradshaw WE. Geographic variation in the photoperiodic response of the western tree-hole mosquito, *Aedes sierrensis*. *Ann Entomol Soc Am.* 1978;71:787.
37. Hanson SM, Craig GB. Cold acclimation, diapause, and geographic origin affect cold hardiness in eggs of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol.* 1994;31:192–201.
38. Eldridge BF, Johnson MD, Bailey CL. Comparative studies of two North American mosquito species, *Culex restuans* and *Culex salinarius*: response to temperature and photoperiod in the laboratory. *Mosq News.* 1976;36:506–13.
39. Eldridge B. The effect of temperature and photoperiod on blood feeding and ovarian development in mosquitoes of the *Culex pipiens* Complex. *Am J Trop Med Hyg.* 1968;17:1968.
40. Spielman A, Wong J. Environmental control of ovarian diapause in *Culex pipiens*. *Ann Entomol Soc Amer.* 1973;66:905–7.
41. Anderson JF. Influence of photoperiod and temperature on the induction of diapause in *Aedes atropalpus* (Diptera, Culicidae). *Entomol Exp Appl.* 1968;11:321–30.
42. Pumpuni CB, Knepler JCG. Influence of temperature and larval nutrition on the diapause inducing photoperiod of *Aedes albopictus*. *J Am Mosq Control Assoc.* 1992;8:223–7.
43. Anderson JF. Induction and termination of embryonic diapause in the Salt Marsh mosquito, *Aedes sollicitans* (Diptera: Culicidae). *Bulletin of the Connecticut Agricultural Experiment Station.* 1970. Available: <http://www.ct.gov/caes/lib/caes/documents/publications/bulletins/b711.pdf>. Accessed 16 Jun 2017.
44. Parker BM. Effects of photoperiod on the induction of embryonic diapause in *Aedes taeniorhynchus* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol.* 1985;22:392–7.
45. Wang R-L. Observations on the influence of photoperiod on egg diapause in *Aedes albopictus* (Skuse). *Acta Enomol Sin.* 1966; 15:75–77.
46. Mori A, Oda T, Wada Y. Studies on the egg diapause and overwintering of *Aedes albopictus* in Nagasaki. *Trop Med.* 1981;23:79–90.
47. Shinkawa Y, Takeda SI, Tomioka K, Matsumoto A, Oda T, Chiba Y. Variability in circadian activity patterns within the *Culex-Pipiens* complex (Diptera, Culicidae). *J Med Entomol.* 1994;31:49–56.
48. Poelchau MF, Reynolds JA, Denlinger DL, Elsik CG, Armbruster PA. A *de novo* transcriptome of the Asian tiger mosquito, *Aedes albopictus*, to identify candidate transcripts for diapause preparation. *BMC Genomics.* 2011;12:619.
49. Poelchau M, Reynolds J, Elsik C, Denlinger D, Armbruster P. RNA-Seq reveals early distinctions and late convergence of gene expression between diapause and quiescence in the Asian tiger mosquito, *Aedes albopictus*. *J Exp Biol.* 2013;216:4082–90.
50. Faraji A, Gaugler R. Experimental host preference of diapause and non-diapause induced *Culex pipiens pipiens* (Diptera: Culicidae). *Parasit Vectors.* 2015;8:389.
51. Košťál V. Eco-physiological phases of insect diapause. *J Insect Physiol.* 2006;52:113–27.
52. Denlinger DL. Regulation of diapause. *Annu Rev Entomol.* 2002;47:93–122.
53. Zhang Q, Denlinger D. Expression analysis of the prothoracicotropic hormone gene in the northern house mosquito, *Culex pipiens*, in association with diapause and blood feeding. *Insect Mol Biol.* 2011;20:201–13.
54. Sim C, Denlinger DL. Insulin signaling and FOXO regulate the overwintering diapause of the mosquito *Culex pipiens*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105:6777–81.
55. Robich RM, Denlinger DL. Diapause in the mosquito *Culex pipiens* evokes a metabolic switch from blood feeding to sugar gluttony. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102:15912–7.
56. Reynolds JA, Poelchau MF, Rahman Z, Armbruster PA, Denlinger DL. Transcript profiling reveals mechanisms for lipid conservation during diapause in the mosquito, *Aedes albopictus*. *J Insect Physiol.* 2013;58:966–73.
57. Goto S, Shiga S, Numata H. Photoperiodism in insects: perception of light and the role of clock genes. Oxford: Oxford University Press; 2010. p. 258–86.
58. Košťál V. Insect photoperiodic calendar and circadian clock: independence, cooperation, or unity? *J Insect Physiol.* 2011;57(5):538–56.
59. Gentile C, Rivas GBS, Meireles-filho ACA, Peixoto AA. Circadian expression of clock genes in two mosquito disease vectors: *cry2* is different. *J Biol Rhythm.* 2009;24:444–51.
60. Pittsyn AA, Reyes-solis G, Saavedra-rodriguez K, Betz J, Suchman EL, Carlson JO, et al. Rhythms and synchronization patterns in gene expression in the *Aedes aegypti* mosquito. *BMC Genomics.* 2011;12:1–16.
61. Summa K, Urbanski JM, Zhao X, Poelchau MF, Armbruster P. Cloning and sequence analysis of the circadian clock genes period and timeless in *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol.* 2012;49:777–82.
62. Mathias D, Jacky L, Bradshaw WE, Holzapfel CM. Geographic and developmental variation in expression of the circadian rhythm gene, timeless, in the pitcher-plant mosquito, *Wyeomyia smithii*. *J Insect Physiol.* 2005;51:661–7.
63. Rund SSC, Hou TY, Ward SM, Collins FH, Duffield GE. Genome-wide profiling of diel and circadian gene expression in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108:E421–30.
64. Leming MT, Rund SSC, Behura SK, Duffield GE, O'Tousa JE. A database of circadian and diel rhythmic gene expression in the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. *BMC Genomics.* 2014;15:1128.
65. Meuti ME, Stone M, Ikeno T, Denlinger DL. Functional circadian clock genes are essential for the overwintering diapause of the northern house mosquito, *Culex pipiens*. *J Exp Biol.* 2015;218:412–22.
66. Benoit JB, Denlinger DL. Suppression of water loss during adult diapause in the northern house mosquito, *Culex pipiens*. *J Exp Biol.* 2007;210:217–26.
67. Hanson SM, Craig GB. *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) eggs: field survivorship during northern Indiana winters. *J Med Entomol.* 1995;32:599–604.
68. Sota T, Mogi M. Survival time and resistance to desiccation of diapause and non-diapause eggs of temperate *Aedes* (*Stegomyia*) mosquitoes. *Entomol Exp Appl.* 1992;63:155–61.

69. Evans KW, Brust RA. Induction and termination of diapause in *Wyeomyia smithii* (Diptera: Culicidae), and larval survival studies at low and subzero temperatures. *Can Entomol.* 1972;104:1937–50.
70. Rinehart JP, Li A, Yocum GD, Robich RM, Hayward SAL, Denlinger DL. Up-regulation of heat shock proteins is essential for cold survival during insect diapause. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104:11130–7.
71. Gray EM, Bradley TJ. Physiology of desiccation resistance in *Anopheles gambiae* and *Anopheles arabiensis*. *Am J Trop Med Hyg.* 2005;73:553–9.
72. Lounibos LP, Bradshaw WE. A second diapause in *Wyeomyia smithii*: seasonal incidence and maintenance by photoperiod. *Can J Zool.* 1975;53:215–21.
73. Lacour G, Chanaud L, Ambert GL, Hance T. Seasonal synchronization of diapause phases in *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *PLoS One.* 2015;10(12):1–16.
74. Clements A. The biology of mosquitoes: development, nutrition and reproduction. Florida: Chapman Hall; 1992.
75. Vinogradova E. [Diapause of blood-sucking mosquitoes and its control.] Leningrad. Russia: Nauka Academic Publishers; 1969. (In Russian)
76. Abdel-Rahman A, Adham F. The effect of photoperiod on diapause induction in *Aedes caspius* Pallus. *J Egypt Soc Parasitol.* 1983;13:343–7.
77. Sims S, Munstermann L. Egg and larval diapause in two populations of *Aedes geniculatus* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol.* 1983;3:263–71.
78. Gallaway W. Larval diapause of *Aedes hendersoni* and *Aedes triseriatus* from southern Manitoba. *J Am Mosq Contr Assoc.* 1985;1:92–3.
79. Poelchau MF, Huang X, Goff A, Reynolds J, Armbruster P. An experimental and bioinformatics protocol for RNA-seq analyses of photoperiodic diapause in the Asian Tiger mosquito, *Aedes albopictus*. *J Vis Exp.* 2014:1–13.
80. Urbanski J, Aruda A, Armbruster P. A transcriptional element of the diapause program in the Asian tiger mosquito, *Aedes albopictus*, identified by suppressive subtractive hybridization. *J Insect Physiol.* 2010;56:1147–54.
81. Denlinger D, Yocum G, Rinehart J. Hormonal control of diapause. *insect endocrinol.* San Diego: Gilbert, ed. LI 2012;430–463.
82. Readio J, Chen MH, Meola R. Juvenile hormone biosynthesis in diapausing and nondiapausing *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol.* 1999;36:355–60.
83. Spielman A. Effect of synthetic juvenile hormone on ovarian diapause of *Culex pipiens* mosquitoes. *J Med Entomol.* 1974;11:223–5.
84. Penev MP. Environmental cues, endocrine factors, and reproductive diapause in male insects. *Chronobiol Int.* 1992;9:102–13.
85. Vinogradova E. [An experimental investigation of ecological factors inducing imaginal diapause in blood-sucking mosquitoes (Diptera: Culicidae).] *Entomol Obozr.* 1960;39:327–340. (In Russian).
86. Hudson J. Overwintering sites and ovarian development of some mosquitoes in central Alberta. *Canada Mosq News.* 1978;38:370–379.
87. Depner K, Harwood R. Photoperiodic responses of two latitudinally diverse groups of *Anopheles freeborni* (Diptera: Culicidae). *Ann Entomol Soc Amer.* 1966;59:7–11.
88. Lehmann T, Dao A, Yaro A, Adamou A, Kassogue T, Al. E. Aestivation of the African malaria mosquito, *Anopheles gambiae* in the Sahel. *Am J Trop Med Hyg.* 2010;83:601–606.
89. Washino R, Bailey S. Overwintering of *Anopheles punctipennis* (Diptera: Culicidae) in California. *J Med Entomol.* 1970;7:95–8.
90. Harwood R, Halfhill E. The effect of photoperiod on fat body and ovarian development of *Culex tarsalis* (Diptera: Culicidae). *Ann Entomol Soc Amer.* 1964;57:596–600.
91. Kawai S. Studies on the follicular development and feeding activity of the females of *Culex tritaeniorhynchus* with special reference to those in autumn. *Trop Med.* 1969;11(3):145–69.
92. Frohne W. Biology of an Alaskan mosquito, *Culiseta alaskaensis* (Ludl.). *Ann Entomol Soc Amer.* 1954;47:9–24.
93. Frohne W. Natural history of *Culiseta impatiens* (Wlk.), (Diptera, Culicidae) in Alaska. *Trans Amer Micr Sci.* 1953;72:103–18.
94. Hudson J. Induction of diapause in female mosquitoes, *Culiseta inornata* by a decrease in day length. *J Insect Physiol.* 1977;23:1377–82.
95. Emerson K, Uyemura A, Mcdaniel K, Schmidt P, Bradshaw W, Holzappel C. Environmental control of ovarian dormancy in natural populations of *Drosophila melanogaster*. *J Comp Physiol.* 2009;195:825–329.
96. Saunders D. *Insect clocks.* Amsterdam: Elsevier; 2002.
97. Schmidt P, Paaby A, Heschel M. Genetic variance for diapause expression and associated life histories in *Drosophila melanogaster*. *Evolution (NY).* 2005;59:2616–2625.
98. Wilton DP, Smith GC. Ovarian diapause in three geographic strains of *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol.* 1985;22:524–8.
99. Mori A, Romero-Severson J, Severson D. Genetic basis for reproductive diapause is correlated with life history traits within the *Culex pipiens* Complex. *Insect Mol Biol.* 2007;16:515–24.
100. Robich R, Rinehart J, Kitchen L, Denlinger D. Diapause-specific gene expression in the northern house mosquito, *Culex pipiens* L., identified by suppressive subtractive. *J Insect Physiol.* 2007;53:235–45.
101. Feder J, Rossi J, Solomon J, Solomon N, Lindquist S. The consequences of expressing hsp70 in *Drosophila* cells at normal temperatures. *Genes Dev.* 1992;6:1402–13.
102. Poelchau M, Reynolds J, Elsik C, Denlinger D, Armbruster P. Deep sequencing reveals complex mechanisms of diapause preparation in the invasive mosquito, *Aedes albopictus*. *Proc Biol Sci.* 2013;280(1759):20130143.
103. Lunardi A, Di Minin G, Provero P, Dal Ferro M, Carotti M, Del Sal G, et al. A genome-scale protein interaction profile of *Drosophila* p53 uncovers additional nodes of the human p53 network. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107:6322–7.
104. Kadmas JL, Smith MA, Pronovost SM, Beckerle MC. Characterization of RACK1 function in *Drosophila* development. *Dev Dyn.* 2007;236:2207–15.
105. Quan GX, Krell PJ, Arif BM, Feng Q. Receptor of activated C kinase 1 (RACK1) is necessary for the 20-hydroxyecdysone-induced expression of the transcription factor CHR3 in the spruce budworm *Choristoneura fumiferana*. *Insect Mol Biol.* 2006;15:79–87.
106. Ragland GJ, Denlinger DL, Hahn DA. Mechanisms of suspended animation are revealed by transcript profiling of diapause in the flesh fly. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107:14909–14.
107. Hahn DA, Denlinger DL. Energetics of insect diapause. *Annu Rev Entomol.* 2011;56:103–21.
108. Lin Y, Seroude L, Benzer S. Extended life span and stress resistance in the *Drosophila* mutant. *Science.* 1998;282(5390):943–6.
109. Hand SC, Podrabsky JE. Bioenergetics of diapause and quiescence in aquatic animals. *Thermochim Acta.* 2000;349:31–42.
110. Juliano S, O'Meara G, Morrill J, Cutwa M. Desiccation and thermal tolerance of eggs and the coexistence of competing mosquitoes. *Oecologia.* 2002;130:458–69.
111. Thaler CD, Miyata H, Haimo LT, Cardullo RA. Waveform generation is controlled by phosphorylation and swimming direction is controlled by Ca<sup>2+</sup> in sperm from the mosquito *Culex quinquefasciatus*. *Biol Reprod.* 2013;89:135.
112. Nelms BM, Macedo PA, Kothera L, Savage HM, Reisen WK. Overwintering biology of *Culex* (Diptera: Culicidae) mosquitoes in the Sacramento Valley of California. *J Med Entomol.* 2013;50:773–90.
113. Reisen WK, Meyer RP, Milby MM. Overwintering studies on *Culex tarsalis* (Diptera: Culicidae) in Kern County, California: temporal changes in abundance and reproductive status with comparative observations on *C. quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Ann Entomol Soc Am.* 1986;79:677–85.
114. Almeida E. Fecundidade, fertilidade e quiescência dos ovos de *Aedes aegypti* Linnaeus, 1762 (Diptera: Culicidae) em resposta a variações de temperatura e umidade. UFPE; 2005. Available from: <http://repositorio.ufpe.br/handle/123456789/808>. Accessed 21 Feb 2017.
115. Diniz DFA, Melo-Santos MAV de, Santos EM de M, Beserra EB, Helvecio E, Carvalho-Leandro D, et al. Fitness cost in field and laboratory *Aedes aegypti* populations associated with resistance to the insecticide temephos. *Parasit Vectors* 2015;8:662.
116. Rezende GL, Martins AJ, Gentile C, Farnesi LC, Pelajo-Machado M, Peixoto AA, et al. Embryonic desiccation resistance in *Aedes aegypti*: presumptive role of the chitinized serosal cuticle. *BMC Dev Biol.* 2008;8:82.
117. Juliano SA, O'Meara GF, Morrill JR, Cutwa MM. Desiccation and thermal tolerance of eggs and the coexistence of competing mosquitoes. *Oecologia.* 2002;130:458–69.
118. McMeniman CJ, O'Neill SL. A virulent wolbachia infection decreases the viability of the dengue vector *Aedes aegypti* during periods of embryonic quiescence. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010;4
119. Perez MH, Noriega FG. *Aedes aegypti* Pharate 1st instar quiescence affects larval fitness and metal tolerance. *J Insect Physiol.* 2012;58:824–9.
120. Perez MH, Noriega FG. *Aedes aegypti* Pharate 1st instar quiescence: a case for anticipatory reproductive plasticity. *J Insect Physiol.* 2013;59:318–24.
121. Vargas HCM, Farnesi LC, Martins AJ, Valle D, Rezende GL. Serosal cuticle formation and distinct degrees of desiccation resistance in embryos of the mosquito vectors *Aedes aegypti*, *Anopheles aquasalis* and *Culex quinquefasciatus*. *J Insect Physiol.* 2014;62:54–60.

122. Yang HM. Assessing the influence of quiescence eggs on the Dynamics of Mosquito *Aedes aegypti*. *Appl Math*. 2014;5:2696–711.
123. Farnesi LC, Menna-Barreto RFS, Martins AJ, Valle D, Rezende GL. Physical features and chitin content of eggs from the mosquito vectors *Aedes aegypti*, *Anopheles aquasalis* and *Culex quinquefasciatus*: connection with distinct levels of resistance to desiccation. *J Insect Physiol Elsevier Ltd*. 2015; 83:43–52.
124. Goltsev Y, Rezende GL, Vranizan K, Lanzaro G, Valle D, Levine M. Developmental and evolutionary basis for drought tolerance of the *Anopheles gambiae* embryo. *Dev Biol*. 2009;330:462–70.
125. Urbanski JM, Benoit JB, Michaud MR, Denlinger DL, Armbruster P. The molecular physiology of increased egg desiccation resistance during diapause in the invasive mosquito, *Aedes albopictus*. *Proc R Soc B Biol Sci*. 2010;277:2683–92.
126. Chapman RF, Reginald F, Simpson SJ, Douglas AE. The insects: structure and function. 5th ed. Cambridge: Cambridge University Press; 2013.
127. Teixeira MDG, Barreto ML, Guerra Z. Epidemiologia e medidas de prevenção do Dengue. *Inf Epidemiol SUS*. 1999;8:5–33.
128. Pinheiro VCS, Tadei WP. Frequency, diversity, and productivity study on the *Aedes aegypti* most preferred containers in the city of Manaus, Amazonas, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2002;44:245–50.
129. Chadee DD, Corbet PS, Talbot H. Proportions of eggs laid by *Aedes aegypti* on different substrates within an ovitrap in Trinidad, West Indies. *Med Vet Entomol*. 1995;9:66–70.
130. Trpis M. Seasonal changes in the larval populations of *Aedes aegypti* in two biotopes in Dar es salaam, Tanzania. *Bull World Health Organ*. 1972;47:245–55.
131. Schaffner F, Kaufmann C, Pflüger V, Mathis A. Rapid protein profiling facilitates surveillance of invasive mosquito species. *Parasit Vectors*. 2014;7: 142.
132. Li JS, Li J. Major chorion proteins and their crosslinking during chorion hardening in *Aedes aegypti* mosquitoes. *Insect Biochem Mol Biol*. 2006;36: 954–64.
133. Faull KJ, Williams CR. Intraspecific variation in desiccation survival time of *Aedes aegypti* (L.) mosquito eggs of Australian origin. *J Vector Ecol*. 2015;40: 292–300.
134. Merzendorfer H. Insect chitin synthases: a review. *J Comp Physiol B*. 2006; 176:1–15.
135. Medlock JM, Hansford KM, Schaffner F, Versteir V, Hendrickx G, Zeller H, et al. A review of the invasive mosquitoes in Europe: ecology, public health risks, and control options. *Vector-Borne Zoonotic Dis*. 2012;12:435–47.
136. Bajer E. Brock team finds first *Aedes aegypti* mosquitoes in Canada. The BrockNews. 2016. <https://brocku.ca/brock-news/2016/10/brock-team-finds-first-aedes-aegypti-mosquitoes-in-canada/>. Accessed 13 Jan 2017.
137. Lima A, Lovin DD, Hickner PV, Severson DW. Evidence for an overwintering population of *Aedes aegypti* in Capitol Hill neighborhood, Washington, DC. *Am J Trop Med Hyg*. 2016;94:231–5.
138. Schaffner F, Medlock JM, Bortel WV. Public health significance of invasive mosquitoes in Europe: invasive mosquito species in Europe. *Clin Microbiol Infect*. 2013;19:685–92.
139. Rosen L. Sexual transmission of dengue viruses by *Aedes albopictus*. *Am J Trop Med Hyg*. 1987;37:398–402.
140. Buckner EA, Alto BW, Lounibos LP. Vertical transmission of key West dengue-1 virus by *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) mosquitoes from Florida. *J Med Entomol*. 2013;50:1291–7.
141. Angel A, Angel B, Joshi V. Rare occurrence of natural transovarial transmission of dengue virus and elimination of infected foci as a possible intervention method. *Acta Trop*. 2016;155:20–4.
142. Thangamani S, Huang J, Hart CE, Guzman H, Tesh RB. Vertical transmission of Zika virus in *Aedes aegypti* mosquitoes. *Am J Trop Med Hyg*. 2016;95: 1169–73.
143. Di Luca M, Severini F, Toma L, Boccolini D, Romi R, Remoli ME, et al. Experimental studies of susceptibility of Italian *Aedes albopictus* to Zika virus. *Eur Secur*. 2016;21
144. Ciota AT, Bialosuknia SM, Ehrbar DJ, Kramer LD. Vertical transmission of Zika virus by *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* mosquitoes. *Emerg Infect Dis*. 2017;23:28277199.
145. Smartt, CT, Stenn, TMS, Chen, TY, Teixeira, MG, Erivaldo P, et al. Evidence of Zika virus RNA fragments in *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) field collected eggs from Camaçari, Bahia, Brazil. *J Med Ent*. 2017. (In press).
146. Livdahl TP, Koenekoop RK, Fütterweit SG. The complex hatching response of *Aedes* eggs to larval density. *Ecol Entomol*. 1984;9:437–42.
147. Ebrahimi B, Shakibi S, Foster WA. Delayed egg hatching of *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) pending water agitation. *J Med Entomol*. 2014; 51:580–90.
148. Benedict MQ, Levine RS, Hawley WA, Lounibos LP. Spread of the tiger: Global risk of invasion by the mosquito *Aedes albopictus*. *Vector-Borne Zoonotic Dis*. 2007;7:76–85.
149. Powell JR, Tabachnick WJ. History of domestication and spread of *Aedes aegypti*-a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2013;108:11–7.
150. Tautong P, Brust R. The effect of photoperiod on diapause induction, and temperature on diapause termination in embryos of *Aedes campestris* Dyar and Knab (Diptera: Culicidae). *Can J Zool*. 1977;55:129–34.
151. Pinger R, Eldrige B. The effect of photoperiod on diapause induction in *Aedes canadensis* and *Psorophora ferox* (Diptera: Culicidae). *Ann Entomol Soc Amer*. 1977;70:437–41.
152. Telford A. The pasture *Aedes* of central and northern California. *Seas Hist Ann Entomol Soc Amer*. 1958;51:360–5.
153. Horsfall W, Lum P, Henderson L. Eggs of floodwater mosquitoes (Diptera: Culicidae) V. Effect of oxygen on hatching of intact eggs. *Ann Entomol Soc Amer*. 1958;51:209–13.
154. Beckel W. Investigations of permeability, diapause, and hatching in eggs of the mosquito *Aedes hexodontus* Dyar. *Can J Zool*. 1958;36:541–55.
155. Andreadis T, Anderson J, Munstermann L, Wolfe R, Florin D. Discovery, distribution and abundance of the newly introduced mosquito *Ochlerotatus japonicus* (Diptera: Culicidae) in Connecticut, USA. *J Med Entomol*. 2001;38: 774–9.
156. Corbet P, Danks H. Egg-laying habits of mosquitoes in the high arctic. *Mosq News*. 1975;35:8–14.
157. Parker B. Photoperiod-induced diapause in a North Carolina strain of *Aedes sollicitans*; photosensitivity of fully formed and developing embryos. *J Am Mosq Contr Assoc*. 1988;4:57–63.
158. Kappus K, Venard C. The effects of photoperiod and temperature on the induction of diapause in *Aedes triseriatus* say. *J Insect Physiol*. 1967;13:1007–19.
159. Wilson G, Horsfall W. Eggs of floodwater mosquitoes XII. Installment hatching of *Aedes vexans* (Diptera: Culicidae). *Ann Entomol Soc Amer*. 1970; 63:1644–7.
160. Hurlbut H. Further notes on the overwintering of the eggs of *Anopheles walkeri* with a description of the eggs. *J Parasitol*. 1938;24:521–6.
161. Baker F. The effect of photoperiodism on resting tree-hole mosquito larvae. *Can Entomol*. 1935;67:149–53.
162. Bradshaw W, Holzapfel C. Fitness and habitat segregation of British tree-hole mosquito communities. *Ecol Entomol*. 1991;16:133–44.
163. Zhang X, Huang K, Wang L, Peng X, Fu X, Liu H. A study on the ecology of *Armigeres subalbatus* in Dawa area of the Mengshan mountain in Shandong Province. *Chin J Parasit Dis*. 1992;10:48–51.
164. Wallis RC. Sex difference in pupation of larval *Culiseta melanura*. *J Am Mosq Control Assoc*. 1988;4:192–4.
165. Baker F. A new species of *Orthopodomyia*, *O. alba* sp. n. (Diptera, Culicidae). *Proc Entomol Soc Wash*. 1936;38:1–7.
166. Tate P. The larval instars of *Orthopodomyia pulchripes*. *Parasitology*. 1932;24: 111–20.
167. Bradshaw W. Photoperiodism in *Orthopodomyia signifera*. *Can J Zool*. 1973; 51:355–7.
168. Bradshaw W, Lounibos L. Evolution of dormancy and its photoperiodic control in pitcher - plant mosquitoes. *Evolution*. 1977;31:546–67.
169. Bradshaw WE, Lounibos LP. Photoperiodic control of development in the pitcher-plant mosquito, *Wyeomyia smithii*. *Can J Zool*. 1972;50:713–9.
170. Alto BW, Juliano SA. Precipitation and temperature effects on populations of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae): implications for range expansion. *J Med Entomol*. 2001;38:646–56.