

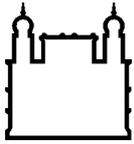
.MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós Graduação Biologia Parasitária

**Estudo de aspectos biológicos de *Aedes aegypti* em  
áreas do Rio de Janeiro com previsão de liberação de  
mosquitos com *Wolbachia***

**LÍLHA MARIA BARBOSA DOS SANTOS**

Rio de Janeiro  
Fevereiro de 2015



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária**

**Lilha Maria Barbosa dos Santos**

Estudos de aspectos biológicos de *Aedes aegypti* em áreas do Rio de Janeiro com previsão de liberação de mosquitos com *Wolbachia*

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

**Orientador :** Prof. Dr. Rafael Maciel de Freitas

RIO DE JANEIRO  
Fevereiro de 2015

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

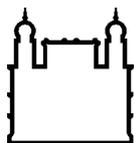
S237 Santos, Lílha Maria Barbosa dos

Estudo de aspectos biológicos de *Aedes aegypti* em áreas do Rio de Janeiro com previsão de liberação de mosquitos com *Wolbachia* / Lílha Maria Barbosa dos Santos. – Rio de Janeiro, 2015.  
xiii, 72 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2015.  
Bibliografia: f. 61-70

1. *Aedes aegypti*. 2. Dengue. 3. *Wolbachia*. 4. Sobrevivência. 5. Ciclo gonotrófico. I. Título.

CDD 616.91852



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária**

**AUTOR: LÍLHA MARIA BARBOSA DOS SANTOS**

**Estudo de aspectos biológicos de *Aedes aegypti* em  
áreas do Rio de Janeiro com previsão de liberação de  
mosquitos com *Wolbachia***

**ORIENTADOR: Prof. Dr. Rafael Maciel de Freitas**

**Aprovada em: 27/02/2015**

**EXAMINADORES:**

**Prof. Dr Ademir de Jesus Martins Júnior – Presidente - FIOCRUZ/IOC**

**Prof. Dr Moacyr Alvim Horta Barbosa da Silva - Fundação Getúlio Vargas**

**Prof. Dr Reginaldo Peçanha Brazil - FIOCRUZ/IOC**

**Prof. Dr Samanta Cristina das Chagas Xavier - FIOCRUZ/IOC**

**Prof. Dr Thiago Affonso Belinato - FIOCRUZ/IOC**

Rio de Janeiro, 27 de Fevereiro de 2015.

“Penso, logo existo”

René Descartes

## Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus por ter me dado saúde para chegar até aqui, pois sem Ele certamente eu não teria superado todos os obstáculos que enfrentei durante minha vida e principalmente nestes dois anos longe de minha família.

E por falar em família, agradeço a minha mãe Maria Benedita que tanto me ajudou todos esses anos com suas palavras sábias, sua luta para que eu possa estudar e sua dedicação não só como mãe, mas também como pai desde o momento em que este não esteve mais presente. Agradeço a minha irmã Lídyia Maria por ter aguentado todos os meus estresses e por ser sempre minha companheira.

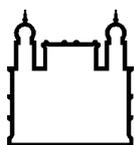
Agradeço ao meu orientador Rafael Maciel de Freitas por tudo que me ensinou, pela paciência e compreensão com os erros cometidos durante este percurso, por acreditar em mim e principalmente por reconhecer minha dedicação. Seus ensinamentos foram fundamentais para este projeto. Junto a isso não posso deixar de agradecer também a todos do LATHEMA que colaboraram para este sucesso, me ensinando e ajudando a realizá-lo tanto em campo quanto no laboratório, principalmente Camila, Edson, Gabriel, Gabriela, Marcelo, Mariana, Renato, Roberto e Vanessa. No campo, também agradeço aos moradores dos bairros de Tubiacanga, Urca e Vila Valqueire no Rio de Janeiro e de Jurujuba em Niterói que permitiram nossa entrada em suas casas para fazermos as coletas. Aos mosquitos também fico grata, pois sem eles não haveria este trabalho.

A todos meus amigos de Volta Redonda, principalmente Gleice, Elisângela, Fernando, Paola e Vinicius, uma imensa gratidão por sempre estarmos unidos, isto é muito importante em minha vida. Também agradeço aos meus parentes: tios, primos, padrinhos pelo incentivo.

As amigas que conheci na UERJ eu jamais esquecerei, pois são sete anos que convivemos e mesmo distante posso contar com elas, inclusive neste momento final da minha dissertação.

As meninas que moraram e moram comigo, em especial Jessica, também fico agradecida pelo acolhimento e pelo que amadureci estando com elas durante este período.

Não citei nomes de todos que colaboraram, pois com certeza não caberia em apenas uma página. Por fim, agradeço a todos os bons momentos vividos e aos que participaram dele, pois isto também faz parte da vida, e esta vitória é apenas o início de muitas outras que virão.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Estudos de aspectos biológicos de *Aedes aegypti* em áreas do Rio de Janeiro com previsão de liberação de mosquitos com *Wolbachia*

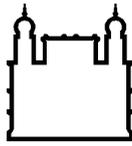
### RESUMO

#### DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

Líliha Maria Barbosa dos Santos

O principal vetor do vírus da dengue no mundo e único comprovado nas Américas é o mosquito *Aedes aegypti*. Atualmente, este mosquito encontra-se distribuído por todos os Estados do Brasil e diversas populações naturais apresentam elevada competência vetorial aos vírus dengue. Anualmente, estima-se que ocorram 50-100 milhões de infecções pelo dengue, com cerca de 2,5 bilhões de pessoas vivendo em países endêmicos. Um dos mecanismos mais recentes, e promissores, para minimizar a transmissão de dengue reside na utilização da bactéria *Wolbachia*. Esta bactéria é um simbiote intracelular obrigatório transmitido verticalmente da fêmea adulta para a sua prole. Seu uso se baseia no fato de que mosquitos *Ae. aegypti* com essa bactéria são capazes de bloquear o vírus dengue em comparação com mosquitos livres de *Wolbachia*. Para se avançar até a liberação dos mosquitos com *Wolbachia* em campo, é recomendável que muitos passos anteriores sejam executados. Dentre eles, avaliar aspectos de populações naturais de *Aedes aegypti*, ou seja, sem a bactéria, são de elevada relevância para propor uma liberação racional de insetos com *Wolbachia* em campo. Assim, propusemos estimar a densidade populacional relativa de mosquitos, a duração do ciclo gonotrófico e a probabilidade de sobrevivência diária (PDS) nas áreas selecionadas pelo projeto que ainda não possuem estas informações conhecidas pelo nosso grupo. Foi coletado um total de 180.728 mosquitos selvagens nas quatro áreas de estudo, sendo que 82.316 destes foram *Ae. aegypti*, 2.867 eram *Ae. albopictus*, e 96.754 foram *Culex quinquefasciatus* pela armadilha BGS-Trap. A média semanal de *Ae. aegypti* foi mais alta em Vila Valqueire ( $256 \pm 74,3$ , média  $\pm$  desvio-padrão), um valor próximo ao dobro do observado na Urca ( $144,1 \pm 40,6$ , média  $\pm$  desvio-padrão). Para a duração do ciclo gonotrófico e sobrevivência liberamos em Vila Valqueire 1730 fêmeas, sendo 530 delas alimentadas (coorte A) e 1200 não-alimentadas (coorte B); em Jurujuba, por sua vez, foram liberadas 900 fêmeas (coorte A) e

2100 (coorte B). Em Vila Valqueire foram coletados 573 indivíduos, sendo 98 fêmeas marcadas correspondendo a uma taxa de recaptura de 5,66%. A média da expectativa de vida nesta área variou de 2,8 a 3,9 dias para as duas coortes, 3,83 a 6,63 dias somente para a A e 2,69 a 4,46 dias para a B. A sobrevivência pelo modelo exponencial foi de 0,8 para A, 0,72 para B e 0,73 para A e B juntas. Em Jurujuba foram capturados 174 *Ae. aegypti*, sendo que 45,4% deles eram nativos. Com 95 mosquitos marcados, observamos uma taxa de recaptura de 3,17%. A média da expectativa de vida nesta área variou de 4,07 a 6,11 dias para as duas coortes, 2,59 a 4,95 somente para a A e 7,43 a 10,6 para a B. A sobrevivência pelo modelo exponencial foi de 0,73 para A, 0,84 para B e 0,81 para A e B juntas. Nossos dados mostram que há condição de invasão da *Wolcachia* em todas as localidades, mesmo naquela que precisaremos liberar maior quantidade de mosquitos com a bactéria para substituir a população local, neste caso o bairro de Vila Valqueire.



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

Study of biological aspects of *Aedes aegypti* in areas of Rio de Janeiro with mosquitoes  
release prediction with *Wolbachia*

### **ABSTRACT**

#### **MASTER DISSERTATION THESIS IN BIOLOGIA PARASITARIA**

**Lilha Maria Barbosa dos Santos**

The main dengue vector in the world and only proven in the Americas is the mosquito *Aedes aegypti*. Currently, this mosquito is found distributed in all states of Brazil and several natural populations have highly vector competent for dengue virus. Annually, it is estimated 50 to 100 million infections by dengue, with about 2.5 billion people living in endemic countries. One of the newest and promising mechanisms to minimize dengue transmission relies in the use of *Wolbachia* bacterium. This bacterium is an obligate intracellular symbiont transmitted vertically from adult female to its offspring. Its use is based on the fact that *Ae. aegypti* with these bacteria are capable to block the dengue virus in comparison with mosquitoes without *Wolbachia*. To advance to the release of mosquitoes with *Wolbachia* in the field, many previous steps must be performed. Among them, evaluating aspects of natural populations of *Aedes aegypti*, ie without the bacteria are highly relevant to propose a rational release of insects with *Wolbachia* in field. Therefore, we propose to estimate the relative population density of mosquitoes, the duration of gonotrophic cycle and the probability of daily survival (PDS) in the areas selected for the project in which these information are not known by our group. A total of 180,728 wild mosquitoes was collected with BGS-Trap in the four study areas, 82,316 of these were *Ae. aegypti*, 2,867 were *Ae. albopictus* and 96,754 *Culex quinquefasciatus*. The weekly average of *Ae. aegypti* was higher in Vila Valqueire ( $256 \pm 74.3$ , mean  $\pm$  standard deviation), a value close to twice that observed in Urca ( $144.1 \pm 40.6$ , mean  $\pm$  standard deviation). For the duration of the gonotrophic cycle and PDS we released in Valqueire Vila 1730 females, 530 of them being fed (cohort A) and 1200 non-fed (cohort B); Jurujuba in turn, we released 900 (Cohort A) and 2100 (Cohort B) females. In Vila Valqueire were collected 573 individuals, 98 females marked corresponding to a recapture rate of 5.66%. The average life expectancy in the area ranging from 2.8 to 3.9 days for the two

cohorts, 3.83 to 6.63 days only for Cohort A and from 2.69 to 4.46 days for Cohort B. The survival by the exponential model was 0.8 to Cohort A, 0.72 to B and 0.73 summing data from both cohorts. In Jurujuba were captured 174 *Ae. aegypti*, wherein 45.4% were native. With 95 marked mosquitoes, we observed a recapture rate of 3.17%. The average life expectancy in this area ranging from 4.07 to 6,11 dias for the two cohorts: cohort A varied from 2.59 to 4.95 and B from 7.43 to 10.6. Survival by the exponential model was 0,73 for A, 0.84 for B and 0.81 to the summing data from both cohorts. Our data show that *Wolcachia* invasion is expected in all locations, even in those we need to release greater of mosquitoes with bacteria to replace the local population, in this case the district of Vila Valqueire.

## ÍNDICE

<b>RESUMO</b>	<b>VI</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>VIII</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Mosquitos vetores: características gerais</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2. Aspectos básicos da biologia do <i>Aedes aegypti</i></b> .....	<b>2</b>
<b>1.3. O agente etiológico: o vírus dengue</b> .....	<b>4</b>
<b>1.4. Controle</b> .....	<b>7</b>
1.4.1. Histórico do controle do <i>Aedes aegypti</i> no Brasil .....	7
1.4.2. Controle vetorial .....	8
1.4.3. Controle mecânico .....	9
1.4.4. Controle químico .....	10
1.4.5. Controle biológico .....	12
<b>1.5. Alternativas de controle</b> .....	<b>12</b>
1.5.1. Inseticidas Reguladores de Crescimento.....	13
1.5.2. Mosquitos Transgênicos .....	13
1.5.3. Bactéria <i>Wolbachia</i> .....	14
<b>1.6. Capacidade vetorial</b> .....	<b>16</b>
<b>1.7. Densidade Populacional de Mosquitos</b> .....	<b>16</b>
<b>1.8. Probabilidade de Sobrevivência diária (PDS)</b> .....	<b>17</b>
<b>1.9. Ciclo gonotrófico</b> .....	<b>18</b>
<b>2. JUSTIFICATIVA</b>	<b>21</b>
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>24</b>
<b>3.1. Objetivo geral</b> .....	<b>24</b>
<b>3.2. Objetivos específicos</b> .....	<b>24</b>
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>25</b>
<b>4.1. Áreas de estudo</b> .....	<b>25</b>
<b>4.2. Estimativa da densidade populacional de mosquitos</b> .....	<b>30</b>
<b>4.3 Dados climáticos</b> .....	<b>31</b>
<b>4.4. Mosquitos</b> .....	<b>32</b>
<b>4.5. Marcação, soltura e recaptura (MSR)</b> .....	<b>33</b>

4.5.1. Marcação .....	33
4.5.2. Soltura.....	33
4.5.3. Recaptura .....	34
<b>4.6. Estimativa da probabilidade de sobrevivência diária (PDS) .....</b>	<b>34</b>
<b>4.7. Estimativa da duração do ciclo gonotrófico .....</b>	<b>35</b>
<b>4.8 Modelagem da potencial invasão da <i>w</i>Mel nas quatro localidades .....</b>	<b>38</b>
<b>4.9 Comitê de ética .....</b>	<b>39</b>
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>40</b>
5.1 Densidade Populacional de Culicidae, com ênfase em <i>Ae. aegypti</i> .....	40
5.2. Probabilidade de Sobrevivência Diária.....	47
5.3. Duração do Ciclo Gonotrófico .....	51
5.4 Modelagem da potencial invasão da <i>w</i> Mel nas quatro localidades.....	53
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>54</b>
<b>7. CONCLUSÃO .....</b>	<b>59</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>60</b>
<b>ANEXO I .....</b>	<b>70</b>
<b>ANEXO II .....</b>	<b>71</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	2
Figura 2	27
Figura 3	28
Figura 4	29
Figura 5	30
Figura 6	31
Figura 7	37
Figura 8	37
Figura 9	41
Figura 10	42
Figura 11	43
Figura 12	44
Figura 13	45
Figura 14	46
Figura 15	52
Figura 16	52
Figura 17	53

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	26
Tabela 2	32
Tabela 3	48
Tabela 4	50

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Mosquitos vetores: características gerais

O Filo Arthropoda se caracteriza por albergar os animais invertebrados que possuem exoesqueleto, corpo segmentado e apêndices articulados (Barnes et al. 2005). Frequentemente apontado como o grupo animal de maior biodiversidade no planeta, tem algumas das espécies de mosquitos mais estudadas pertencendo à Classe Insecta, Ordem Diptera. O grande número de estudos envolvendo os dípteros, frente aos demais insetos, em muito se baseia pelo seu envolvimento na transmissão vetorial de patógeno de impacto na saúde pública ou mesmo de impacto econômico, afetando colheitas e rebanhos em diversas partes do globo terrestre.

Dentre os dípteros destacam-se os mosquitos, insetos pertencentes à Família Culicidae, que possui duas importantes sub-famílias: Anophelinae e Culicinae. Tal importância se deve, principalmente, ao fato de que muitas espécies destas sub-famílias podem atuar como transmissoras de patógenos ao ser humano (Barnes et al. 2005). Na primeira, encontram-se os mosquitos transmissores do protozoário *Plasmodium*, enquanto que na segunda encontram-se os mosquitos transmissores dos arbovírus dengue, febre amarela, chikungunya e alguns parasitas como a filária *Wuchereria bancrofti* (Rey 2008).

Os mosquitos são insetos holometábolos, ou seja, apresentam metamorfose completa ao longo de seu desenvolvimento que é dividido em quatro estágios: ovo, larva, pupa e adulto (Figura 1). O estágio de larva pode ser subdividido em quatro estádios larvares, comumente denominados L1-L4. Nesse estágio, as larvas são filtradoras, detritívoras e capazes de consumir qualquer matéria orgânica presente em seu criadouro, desde limo aderido à margem interna de caixa d'água, como por vezes recorrer ao canibalismo quando os recursos são escassos. Após L4, alcança-se o estágio de pupa, onde enfim acontece a metamorfose que resulta no inseto adulto (Consoli e Lourenço-de-Oliveira 1994). A duração do desenvolvimento do *Ae. aegypti*, da eclosão do ovo até o aparecimento do adulto, dura cerca de doze dias. Entretanto, esse período é amplamente dependente de alguns fatores bióticos e abióticos, tais como temperatura e

disponibilidade de recursos alimentares (Consoli e Lourenço-de-Oliveira 1994). Maior temperatura e maior oferta de recursos alimentares aceleram o desenvolvimento dos imaturos (Alto et al. 2008)

Uma característica marcante deste grupo é que os imaturos (larvas e pupas) habitam ambientes aquáticos, enquanto que os adultos são alados. Sendo assim os imaturos não competem com adultos por recursos, característica importante que pode ter auxiliado no sucesso evolutivo deste grupo.

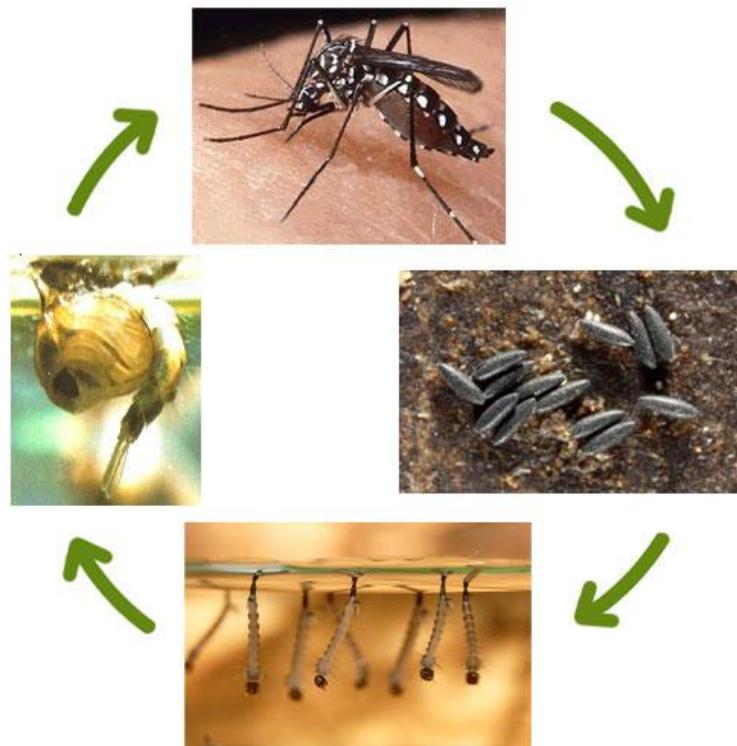


Figura 1: Ciclo de desenvolvimento do mosquito *Aedes aegypti*, representando seus quatro estágios de desenvolvimento: ovo, larva, pupa e adulto. <http://searchpp.com/ciclo-do-mosquito-aedes-aegypti/> - acessado em 02/01/2015.

## 1.2. Aspectos básicos da biologia do *Aedes aegypti*

O principal vetor do dengue no mundo e único comprovado nas Américas é o mosquito *Ae. aegypti*. Esta espécie tem como distribuição geográfica atual as regiões

tropicais e subtropicais do mundo (Simmons et al. 2012, Bhatt et al. 2013). Entretanto, alguns relatos recentes têm demonstrado que a área de distribuição geográfica desta espécie vem se expandindo. O *Ae. aegypti* já pode ser encontrado em densidades alarmantes em países como Argentina e Uruguai, na América do Sul, sul dos Estados Unidos e sul da Europa (Braks et al. 2003, Halstead 2008). Trata-se de uma espécie africana, introduzida pela primeira vez no Brasil e em outros países das Américas provavelmente durante o período colonial, concomitante ao tráfico de escravos, acredita-se que foi erradicado no Brasil, mas não no Caribe e países vizinhos (Lounibos 2002, Monteiro et al. 2014).

Estudos de genética de populações tem ajudado a entender a origem e biogeografia do *Ae. aegypti*. Um estudo de sequência de DNA mitocondrial de várias populações brasileiras revelaram a co-ocorrência de duas linhagens distintas em nosso país (Bracco et al. 2007, Scarpassa et al. 2008). Uma publicação recente também mostrou que a população brasileira de *Ae. aegypti* é separada por dois grupos genéticos. Um é formado por populações da Região Norte e Nordeste e é geneticamente mais semelhante com a população de mosquitos da América Central e sul dos EUA. Outro grupo, por sua vez, formado por populações brasileiras localizadas no sul da Região Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste brasileiro, mais se assemelha com populações da Dominica no Caribe. Atualmente, este mosquito encontra-se distribuído por todos os Estados do Brasil e diversas populações naturais apresentam elevada competência vetorial aos vírus dengue e febre amarela (Lourenço-de-Oliveira et al. 2004).

O *Ae. aegypti* é um mosquito intimamente associado ao ambiente humano, com hábito alimentar endofílico e antropofílico, possui marcada preferência por se alimentar de sangue humano e realizar a postura de seus ovos em recipientes artificiais geralmente localizados nos arredores de habitações humanas (Cunha et al. 2002, Maciel-de-Freitas et al. 2007a). Devido a essa grande associação com os seres humanos, o *Ae. aegypti* é um mosquito encontrado de maneira mais abundante em áreas urbanas (Consoli e Lourenço-de-Oliveira 1994, Braks et al. 2003, Maciel-de-Freitas et al. 2007a). Inclusive, foi observado em zonas rurais da Tailândia que a fêmea deste mosquito, mesmo podendo se alimentar de fonte sanguínea e/ou açucarada, pode buscar recursos energéticos para seu metabolismo se alimentando estritamente de sangue (Edman et al. 1992). A fêmea do *Ae. aegypti* possui hábito

hematofágico, com pico de atividade nos crepúsculos matutino e vespertino (Consoli e Lourenço-de-Oliveira 1994).

Embora os adultos de *Ae. aegypti* tenham uma preferência em ovipor em criadouros artificiais, eventualmente seus imaturos podem ser encontrados em ambientes naturais tais como as axilas ou tanques de bromélias, ambiente onde se acumula água e nutrientes (Varejão et al. 2005). Bromélias são plantas ornamentais e frequentemente usadas em jardins públicos e particulares (Mocellin et al. 2009). A abundância de bromélias onde a dengue é endêmica tem sido uma ameaça ao controle do vetor (Forattini e Marques 2000). Apesar de se ter poucos estudos para avaliar a produtividade em bromélias comparado a outros habitats de larvas, bromélias foram removidas, tratadas com inseticidas ou incineradas durante epidemias de dengue no Rio de Janeiro em 2001, 2002 e 2008 (Lourenço-de-Oliveira 2008). Ao investigar o papel das bromélias como criadouro de *Aedes*, no bromeliário do Jardim Botânico do Rio de Janeiro, foram encontradas apenas duas larvas *Ae. aegypti* e cinco de *Ae. albopictus* em coletas realizadas por cerca de um ano. Tal fato evidencia que as larvas destas espécies não são boas competidoras com espécies que habitam normalmente bromélias (como mosquitos dos gêneros *Culex* e *Wyeomyia*). Alternativamente, fêmeas adultas podem simplesmente preferir não realizar a postura de seus ovos em bromélias (Mocellin et al. 2009).

### **1.3. O agente etiológico: o vírus dengue**

A dengue é uma doença infecciosa cuja incidência pode ser influenciada por fatores que agem sobre um ou mais de seus três elementos: hospedeiro vertebrado (seres humanos), vetor (mosquitos) e agente etiológico (vírus). Anualmente, estima-se que ocorram 50-100 milhões de infecções pelo dengue, com cerca de 2,5 bilhões de pessoas vivendo em países endêmicos (Nathan e Dayal-Drager 2007). Se por um lado quase a metade da população mundial humana encontra-se sob risco de infecção, os casos de dengue concentram-se nas zonas tropicais do planeta, onde seu mosquito vetor encontra-se em maior densidade (Rigau-Pérez et al. 1998, Simmons et al. 2012, Bhatt et

al. 2013). A grande quantidade de novos casos de dengue a cada ano causa impacto na economia e saúde global, com custo anual médio de 2,1 bilhões de dólares apenas nas Américas (Shepard et al. 2011).

O processo de transmissão do vírus dengue ao ser humano ocorre basicamente através da picada de um mosquito infectado em um ser humano susceptível. No corpo do hospedeiro ocorre o período de incubação intrínseco, onde o vírus se replica em alguns tipos celulares, como células dendríticas e macrófagos (Torrentes-Carvalho et al. 2009, Gandini et al. 2013). Após cerca de 10 dias, partículas virais podem ser encontradas no sistema circulatório e podem ser ingeridas por uma fêmea de *Ae aegypti* durante o seu repasto sanguíneo. Após um período de 10 a 14 dias, o vírus alcança a glândula salivar do vetor, que em um novo repasto pode infectar um indivíduo susceptível. Este período entre a alimentação sanguínea e a chegada a glândula salivar é conhecido como período de incubação extrínseco (PIE) e, obviamente, o mosquito precisa sobreviver por estes dias para transmitir o vírus. Por isso, o vírus dengue é um arbovírus, cuja transmissão se dá à custa do hábito hematofágico de artrópodes vetores (Maciel-de-Freitas 2010).

Um dos primeiros microrganismos a serem denominados vírus foi o Dengue em 1907, e seu isolamento ocorreu na década de 1940 (Barreto e Teixeira 2008). O sorotipo 1 foi isolado em 1945 por Sabin e Schlesinger no Havaí e neste mesmo ano Sabin identificou outro vírus em Nova Guiné com características antigênicas diferentes e denominou de sorotipo 2 (Barreto e Teixeira 2008). Já em 1956 com uma epidemia de dengue hemorrágica no Sudeste Asiático os sorotipos 3 e 4 foram isolados (Martinez-Torres 1990).

No ano de 1982, no Brasil, a primeira epidemia registrada foi em Boa Vista, Roraima, com os sorotipos DENV-1 e DENV-4 com possível entrada pela fronteira com a Venezuela, mas foi controlada em Boa Vista sem se disseminar para o restante do país (Osanaí 1984). Em 1986 o DENV-1 foi isolado em Nova Iguaçu (Rio de Janeiro) e a partir daí foi disseminado para as cidades vizinhas. Neste mesmo ano ele foi detectado nos Estados de Ceará e Alagoas e no ano seguinte foi registrado em Pernambuco, São Paulo, Minas Gerais e Bahia (Teixeira et al. 1999). Em 1990 houve a introdução do DENV-2 em Nova Iguaçu (RJ) e nesse período foram registrados os primeiros casos de febre de dengue hemorrágica (FDH) no país com 462 casos e oito mortes (Teixeira et al. 2005). Nos anos subsequentes DENV-1 e 2 ampliaram sua expansão geográfica,

sugestivamente concomitante ao aumento na distribuição do *Ae. aegypti* (Barreto e Teixeira 2008). Em 2001 foi registrada a introdução do DENV-3 no Rio de Janeiro (Nogueira et al. 2005), sendo este o causador da grande epidemia em 2002.

O DENV-4 reinviadiu Roraima em julho de 2010, com uma epidemia de DENV-1 e DENV2 em curso, e talvez por isso não foram registrados mais do que duas dezenas de casos vinculados a este sorotipo (Maciel-de-Freitas et al. 2014). Após seu reaparecimento, alcançou mais dois Estados da região Norte, Amazonas e Pará, em janeiro 2011. Em março foi detectado na Região Nordeste, nos estados do Piauí e mais tarde em Pernambuco, Bahia e Ceará, e Região Sudeste, no Rio de Janeiro e São Paulo. O Rio de Janeiro é um dos principais pontos turísticos do país, possui urbanização descontrolada em grande parte de sua extensão e apresenta populações de *Ae. aegypti* altamente suscetíveis ao vírus dengue (Lourenço-de-Oliveira et al. 2003). O primeiro caso de DENV-4 no Rio de Janeiro foi detectado no bairro de Cafubá, município de Niterói. Subsequentemente, novos casos foram detectados no bairro de São Domingos, também em Niterói (Nogueira e Eppinghaus 2011). A história de rápida dispersão do DENV-4 é apenas mais um exemplo de como o deslocamento passivo do mosquito *Ae. aegypti*, ou de pessoas infectadas com o DENV, pode ser importante para a história natural deste patógeno (Hemme et al. 2010).

Com isso, podemos observar que a cada introdução de um sorotipo ocorrem epidemias com alto número de casos (Barreto et al. 2008). Isto porque, quando há entrada de um novo sorotipo, ou emergência de um sorotipo que não circula há muitos anos, o número de hospedeiros susceptíveis na população humana é alto (Focks 1995).

Recentemente, em uma conferência realizada em Bancoc, Tailândia, em outubro de 2013 foi anunciado a existência do sorotipo DENV-5, descoberto por cientistas da Universidade do Texas que receberam amostras de sangue de uma epidemia de dengue em 2007 na região da Malásia. O material coletado foi armazenado em laboratório e, após passar por ensaios bioquímicos, moleculares e análise de sequência, foi proposta a classificação desta amostra como pertencente a um novo sorotipo do dengue. Tal qual, a recombinação genética, seleção natural e gargalos genéticos são fatores que podem ter auxiliado na emergência do novo sorotipo, que a princípio possui ciclo silvestre em primatas não humanos, ao contrário dos outros quatro sorotipos (Mustafa et al. 2014). Atualmente, este sorotipo está limitado ao dossel de floresta no Sudeste da Ásia, embora

a transmissão para outros países não possa ser excluída devido a facilidade de viagens aéreas em curtos intervalos de tempo (Mustafa et al. 2014).

## **1.4. Controle**

### **1.4.1. Histórico do controle do *Aedes aegypti* no Brasil**

O Brasil apresenta um histórico bem documentado de controle do *Ae. aegypti*, baseado em seu papel como vetor da febre amarela urbana e posteriormente como vetor do dengue. Uma importante campanha de controle do *Ae. aegypti* foi empreendida no início do século passado liderada pelo médico sanitariano Oswaldo Cruz (Franco 1976), após a descoberta de Finley, Bancroft e Ross a respeito do papel dos mosquitos na transmissão de microrganismos causadores de doenças. Dentre estes mosquitos, estava o *Ae. aegypti*, tendo a febre amarela como a razão pela qual se iniciou a campanha de controle no Rio de Janeiro em 1903. Com o apoio da Fundação Rockefeller em um esforço coordenado pela Organização Pan-Americana de Saúde, o Brasil foi considerado livre do *Ae. aegypti* apenas em 1955, quando o último foco do mosquito foi eliminado no Município de Santa Terezinha, na Bahia. O êxito dessa empreitada não foi compartilhado por países vizinhos ou que apresentavam comércio ou fluxo de viajantes com o Brasil, como Venezuela, Cuba e Estados Unidos (Braga e Valle 2007a).

Desta maneira, em 1976 foi observada a reintrodução do *Ae. aegypti* em território nacional, após a descoberta de um foco na cidade de Salvador (Braga e Valle 2007a). Especula-se que falhas na vigilância entomológica, associadas a um processo de urbanização descontrolada já experimentada nos anos 1970 tenha tido grande efeito nessa reintrodução (WHO 1997). Desde então, o *Ae. aegypti* se tornou endêmico no Brasil, causando epidemias de dengue com periodicidade de aproximadamente 4-5 anos desde o início dos anos 1980 até a presente data (Consoli e Lourenço-de-Oliveira 1994, Barreto e Teixeira 2008).

A Funasa (Fundação Nacional de Saúde) foi criada em 1990 com um dos objetivos de coordenar as ações de controle da dengue empreendidas pelo Ministério da

Saúde (MS). No ano de 1996 o MS criou o Plano de Erradicação do *Ae. aegypti* (PEAa), mas que logo foi desacreditado devido à dificuldade logística e operacional em se lograr êxito. O foco do combate ao *Ae. aegypti* mudou em 2001, quando foi implantado o Plano de Intensificação das Ações de Controle de Dengue (PIACD), cujo objetivo deixou de ser a erradicação, para a manutenção de atividades de controle nos municípios que apresentaram maior número de casos de dengue entre 2000-2001 (Braga e Valle 2007b). Para dar continuidade ao PIACD, foi criado em 2002 o Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD), que tem entre suas funções capacitar secretarias estaduais e municipais, determinar as orientações relacionadas ao controle vetorial, classificação de casos e definição dos métodos de controle empregados. (PNCD 2002).

#### **1.4.2. Controle vetorial**

O cerne principal de uma atividade de controle vetorial se baseia na manutenção do tamanho da população do mosquito abaixo de um limite teórico de transmissão onde, por exemplo, epidemias de dengue seriam evitadas (Focks 2003).

Existem algumas abordagens de controle disponíveis para o *Ae. aegypti*, seja em sua forma imatura ou alada. Dentre elas se encontram a utilização de compostos xenobióticos (controle químico), outras espécies de seres vivos (controle biológico), de organismos transgênicos, com liberação em campo de mosquitos inférteis ou incapazes de transmitir patógenos (controle genético), ou provocar alterações em seu habitat natural (controle mecânico) (Rozendaal 1997). Decerto, cada uma dessas alternativas possui seus prós e contras e, destacadamente, podem e devem ser utilizados de maneira integrada, onde gestores devem levar em consideração as características positivas e negativas de modo a criar uma estratégia integrada de controle com maior eficácia.

A utilização de armadilhas é frequentemente apontada como sendo mais uma ferramenta de controle do vetor (Kröckel et al. 2006, Degener et al. 2014). Entretanto, seu uso como controle deve ser analisado com cautela, uma vez que a logística relacionada ao uso massivo de armadilhas em campo parece ilógico frente aos seus benefícios. Desta maneira, o uso de armadilhas ainda deve ser restrito ao monitoramento, direcionando, assim, as atividades de controle e apontando em quais

regiões de uma localidade há maior risco de transmissão da dengue. Outra possibilidade de estudos associada ao uso de armadilhas é, por exemplo, avaliação da eficácia de medidas de controle tais como redução de criadouros e aplicação de inseticidas (larvicida e/ou adulticidas) a partir do monitoramento comparativo do tamanho da população antes e depois da prática de intervenção adotada (Maciel-de-Freitas et al. 2014).

### **1.4.3. Controle mecânico**

Controle mecânico consiste na modificação do ambiente e na eliminação de criadouros, o que conseqüentemente reduz a densidade populacional de *Ae. aegypti*. Sua utilização é bastante disseminada no Brasil, mas é uma atividade extremamente intensa, dependente da disposição e habilidade dos agentes de saúde, da colaboração da população e de campanhas educativas. Sendo de difícil sucesso no longo prazo devido ao alto custo de manutenção de supressão dos criadouros.

Criadouros são os recipientes artificiais e naturais onde se encontram água acumulada contendo ovos, larvas e pupas. Eles podem ser classificados em tipo, forma, tamanho, exposto ou não à luz e dentro ou fora de casa, por exemplo (Maciel-de-Freitas et al. 2007a). Dentre estes, podemos citar ralos domésticos, vasos de planta, pneus, caixas d'água, etc. O *Ae. aegypti* tem preferência em ovipor nestes tipos de criadouros (Cunha et al. 2002), mas se não os encontrar, as fêmeas são capazes de ovipor mesmo em criadouros naturais (por exemplo plantas do tipo bromélias), embora em baixa frequência (Mocellin et al. 2009). Especula-se que as fêmeas de *Ae. aegypti* podem apresentar esse comportamento para que pelo menos uma parte de sua prole permaneça viva na geração seguinte (Mocellin et al. 2009). Fato é que a fêmea do *Ae. aegypti* tem hábito oportunista, pois na ausência de um criadouro produtivo, ainda assim pode realizar a postura em depósitos inesperados ou procurar outro receptáculo em substituição ao de sua preferência (Barrera et al. 2008, Maciel-de-Freitas et al. 2010).

Para se direcionar as atividades de controle é necessário investigar quais e quantos são os criadouros e para isso alguns índices de infestação normalmente são

utilizados, em geral pela prefeitura, embora sejam às vezes insuficientes para estimar a real infestação. Vale ressaltar que somente o número de pupas tem boa correlação com a densidade de adultos (Honório et al. 2006), pois as larvas têm alta mortalidade e, dessa maneira, um número inferior ao visto no momento da inspeção dos criadouros alcançará a fase adulta. Para uma maior confiabilidade foram elaborados índices que analisaram número de pupas por pessoa e por hectare (Focks e Chadee 1997), e a partir daí infere-se a quantidade de adultos em uma determinada área.

Considera-se um criadouro produtivo um recipiente que, além de conter água, também possua grande quantidade de imaturos (larvas e pupas). Um recipiente ainda pode ser classificado como criadouro chave se nele for coletado uma grande proporção de pupas frente ao observado em toda a área de estudo. Em uma tentativa de melhorar o custo-benefício do controle mecânico, foram avaliados os efeitos de focar as atividades de controle no tipo de criadouro mais produtivo ou, indiscriminadamente, em todos os tipos encontrados na área. Foi observado que eliminar somente os criadouros mais produtivos pode ter o mesmo efeito que eliminar todos os tipos. Além disso, a primeira opção pode ser realizada num período de tempo muito menor e utilizando um quantitativo menor de agentes de saúde. Por ser menos laborioso, acredita-se que atuar na eliminação somente do criadouro mais produtivo pode ser uma forma válida de diminuir a infestação em áreas endêmicas (Tun-Lin et al. 2009).

#### **1.4.4. Controle químico**

O inseticida é uma das ferramentas mais usadas no controle de vetores (Rose 2001). Alguns desses compostos podem atuar no sistema nervoso central, causando a morte do inseto. Contudo, seu uso excessivo aumenta a pressão seletiva e favorece a disseminação de alelos de resistência em populações naturais, fato este que pode comprometer e até inviabilizar seu uso em campanhas de controle subsequentes (Donalísio e Glasser 2002). Com o aumento da frequência dos alelos de resistência, em um ambiente sob constante aplicação de inseticidas, nas próximas gerações, as fêmeas

resistentes apresentariam uma sobrevivência mais elevada que as susceptíveis. Assim, a frequência alélica dos genes de resistência aumentaria cada vez mais, reduzindo a eficácia desta ferramenta a médio/longo prazo (Rousch e McKenzie 1987).

Existem quatro classes principais de inseticidas neurotóxicos: organoclorados, carbamatos, organofosforados e piretróides (Rozendaal 1997).

Os organoclorados são inseticidas que contêm carbono, hidrogênio e cloro, tendo como um de seus representantes o DDT, desenvolvido durante a Segunda Guerra Mundial. Sabe-se que este composto atua no canal de sódio mantendo-o aberto e impedindo a transmissão normal de impulso nervoso em insetos (Braga e Valle 2007b). Este já foi muito utilizado, mas como se acumula em tecidos animais hoje possui utilização restrita ou até proibida na maior parte do mundo (Chen e Rogan 2003).

Os organofosforados são inseticidas que possuem fósforo, são biodegradáveis e não se acumulam nos tecidos (Braga e Valle 2007b). Uma de suas desvantagens é a instabilidade química, em especial em relação a variações sazonais de temperatura (Palchick 1996). Um dos principais inseticidas do grupo dos organofosforados é o larvicida temephos, amplamente utilizado por anos em diversos municípios endêmicos para dengue no Brasil. Os organofosforados inibem uma enzima do sistema nervoso chamada Acetilcolinesterase e, acarretando o acúmulo de acetilcolina nas junções nervosas (sinapses), o que impede a interrupção da propagação do impulso elétrico e com isso o sistema nervoso é estimulado continuamente, resultando na morte do inseto (Braga e Valle 2007b).

Os carbamatos são inseticidas derivados do ácido carbâmico e assim como os organofosforados inibem a acetilcolinesterase e tem ação letal rápida sobre os insetos. (Braga e Valle 2007b). Existem duas diferenças entre carbamatos e organofosforados, uma delas é que alguns carbamatos são potentes inibidores de Aliesterase (função desconhecida) e apresentam seletividade contra acetilcolinesterase de certas espécies. E a outra diferença é que a inibição da acetilcolinesterase nos carbamatos é reversível e nos organofosforados é irreversível (Ware 2000).

Os piretróides são análogos de uma substância do crisântemo, são estáveis, biodegradáveis, não cumulativos em tecidos e poucas vezes causam intoxicação aguda em mamíferos, mas podem causar irritação nas mucosas desses animais (Braga e Valle 2007b). A atuação deles é parecida com a do DDT, mantendo os canais de sódio abertos e estimulando as células nervosas a produzir descargas repetitivas, causando paralisia. A

vantagem desse inseticida é que são muito eficazes, agindo com pequenas doses, sendo a desvantagem o alto custo inerente ao seu processo de produção e a logística de campo (Palchick 1996).

#### **1.4.5. Controle biológico**

O controle biológico de mosquitos vetores consiste em introduzir no ambiente, predadores, parasitos ou organismos patogênicos. Uma vantagem é que este método não polui o ambiente, pois geralmente utiliza espécies nativas. Por outro lado, para que seja eficiente, é necessária criação em massa da população que vai exercer o controle, o que pode comprometer o planejamento operacional em campo (Rozendaal 1997). Algumas espécies de peixes e crustáceos predam larvas de *Ae. aegypti*, já a bactéria *Bacillus thuringiensis var israelensis* (Bti) mata a larva via ingestão (Rozendaal 1997). A mortalidade ocorre em decorrência desta bactéria liberar cristais que são pró-toxinas com ação inseticida que são ativadas no intestino das larvas, diminuindo o peristaltismo e conseqüentemente a interrupção da alimentação (Braga e Valle 2007b). Com isso o Bti pode ser utilizado em água potável (Chavasse e Yap 1997) e, portanto, torna-se um dos candidatos para substituir o temephos.

#### **1.5. Alternativas de controle**

Dentre alternativas de controle mais recentemente avaliadas encontramos os inseticidas reguladores de crescimento, uso de mosquitos transgênicos e o emprego da bactéria *Wolbachia*.

### **1.5.1. Inseticidas Reguladores de Crescimento**

Os reguladores de crescimento de insetos formam um grupo de inseticidas de nova geração que podem causar modificações fisiológicas e morfológicas, durante o desenvolvimento e reprodução do inseto. Esse grupo é mais conhecido pela sigla IGR (*insect growth regulator*). Os IGRs surgiram na década de 1970 como um novo grupo de inseticidas de ação mais específica e menor toxicidade para mamíferos do que os outros inseticidas, pois atuam seletivamente interrompendo o desenvolvimento e o crescimento do vetor ao invés de intoxicação direta.

Um dos grupos de IGR é formado pelos inibidores de quitina, enquanto o outro de compostos relacionados ao hormônio juvenil de insetos, designado como análogos do hormônio juvenil (AHJ) (Slama et al. 1974). Os inibidores da síntese de quitina impedem a síntese deste polímero, diretamente relacionado com a formação da cutícula necessária no desenvolvimento do inseto (Post e Mulder 1974). Existem dois compostos recomendados pela Organização Mundial de Saúde (OMS) que são inibidores de quitina e o diflubenzuron (Chavasse e Yap 1997).

Os análogos de hormônio juvenil interferem com o sistema endócrino do inseto, afetando um conjunto de hormônios que atuam em processos fisiológicos como a ecdise, reprodução, metamorfose e desenvolvimento ovariano (Braga e Valle 2007b). Desta maneira, impedem o desenvolvimento adequado do inseto retardando ou impedindo a emergência de adultos (Mian e Mulla 1982). Dentre os AHJ, a OMS recomenda os compostos methoprene e pyriproxifen (Chavasse e Yap 1997).

### **1.5.2. Mosquitos Transgênicos**

O uso de mosquitos transgênicos ganhou fôlego a partir do desenvolvimento da técnica RIDL (*Release of Insects containing Dominant Lethal gene*). Essa metodologia consiste na soltura de machos que possuem um gene letal responsável pela morte da prole resultante destes machos com fêmeas selvagens (Thomas et al. 2000). Para que isso ocorra um gene ativador não é expresso na presença de um antídoto (no caso a tetraciclina), de modo que a linhagem pode ser mantida no laboratório. Na ausência

do inibidor, o gene ativador induz a expressão do efator, levando o inseto à morte em determinada fase da vida.

Desta maneira, espera-se erradicar o mosquito após sucessivas liberações de machos estéreis. Contudo, para evitar a re-introdução de mosquitos em áreas previamente tratadas, deve se manter estas liberações de maneira continuada. Até o momento, essa estratégia já foi avaliada nas Ilhas Cayman e na cidade de Juazeiro, no Estado da Bahia (Oliveira 2011).

### **1.5.3. Bactéria *Wolbachia***

Um novo método foi desenvolvido inicialmente na Austrália, e agora está sendo avaliado concomitantemente em países endêmicos de dengue, como Indonésia, Vietnã, Colômbia e Brasil (Maciel-de-Freitas et al. 2012). Este método consiste na utilização de um simbiote intracelular herdado maternalmente, a bactéria *Wolbachia*.

Cerca de 40% dos insetos estão naturalmente infectados com esta bactéria, dentre coleópteros, dípteros e lepidópteros (Werren et al. 2008). Entretanto, até recentemente, essa bactéria nunca havia sido encontrada naturalmente em alguns vetores de doenças como o *Ae. aegypti* e mosquitos do gênero *Anopheles*, transmissores de malária. Após a coleta de *Anopheles gambiae*, em uma vila remota de Burkina Faso, foi observado que estes anofelinos possuíam uma cepa de *Wolbachia* ainda não descrita, a *wAnga* (Baldini 2014). Apesar de *Wolbachia* já ter sido encontrada naturalmente em uma espécie de *Anopheles*, ainda pode se afirmar que, em geral, este gênero não possui a *Wolbachia*.

Observações iniciais mostraram que moscas da espécie *Drosophila melanogaster* apresentavam redução em sua longevidade quando estavam infectadas com *Wolbachia* (Min e Benzer 1997). Dessa maneira, buscou-se a inoculação desta bactéria em *Ae. aegypti*, baseado no princípio que se a longevidade dos mosquitos fosse diminuída, um número menor de insetos sobreviveria ao período de incubação extrínseco do vírus dengue, reduzindo provavelmente a transmissão. Surpreendentemente, a competência vetorial de fêmeas de *Ae. aegypti* ao vírus dengue foi fortemente influenciada pela presença da *Wolbachia*. Descobriu-se que a bactéria bloqueava o vírus dengue, chikungunya e *Plasmodium gallinaceum* (agente etiológico da malária das aves) nos

mosquitos, enquanto aqueles livres de *Wolbachia* apresentaram grande competência vetorial a estes patógenos (Moreira et al. 2009).

Além do bloqueio do vírus, a bactéria *Wolbachia* é capaz de manipular a biologia reprodutiva do inseto (Min e Benzer 1997). No *Ae. aegypti* causa um fenômeno conhecido como incompatibilidade citoplasmática (IC), que permeia a dinâmica de transmissão da *Wolbachia*. A presença de *Wolbachia* na prole de *Ae. aegypti* está associada à presença da bactéria em ao menos um dos seus progenitores. Se a fêmea está infectada, todas as larvas nascerão com *Wolbachia*, independente de o macho estar ou não com a bactéria. Por outro lado, se apenas o macho estiver com *Wolbachia*, a fêmea selvagem realizará a postura de ovos inviáveis por haver IC nessa cópula. Se macho e fêmea possuírem *Wolbachia*, os filhos terão a bactéria em sua totalidade. Evidentemente, se macho e fêmeas não possuírem a *Wolbachia*, os filhotes nascerão isentos desse microrganismo (Walker et al. 2011). Estudos foram realizados previamente utilizando a cepa *wMel* em mosquitos com *background* brasileiro, onde se confirmou alta IC e transmissão materna (Dutra 2014). A cepa *wMel* foi retirada da mosca *Drosophila melanogaster* e introduzida em ovos *Ae. aegypti* por isso ela recebe este nome.

Desta maneira, a bactéria é capaz de invadir rapidamente populações naturais de *Ae. aegypti*, como já demonstrado na Austrália, em cerca de apenas 10 semanas após a soltura. Cerca de 36 meses após a liberação em Cairns, praticamente 100% dos mosquitos das duas áreas piloto ainda encontravam-se com *Wolbachia* (Walker et al. 2011, Hoffmann et al. 2011). Esse dado mostra que a estratégia é autossustentável, ou seja, não há necessidade de realizar liberações de maneira continuada como no método RIDL, anteriormente descrito.

Essa estratégia visa mitigar a transmissão do vírus dengue e não o mosquito. Além disso, trata de um método seguro, não há transferência da bactéria para outras espécies, autossustentável, natural, uma vez que a bactéria está amplamente presente nos insetos e sem fins lucrativos, o que garante a execução de um projeto de pesquisa sem interesses comerciais (Maciel-de-Freitas et al. 2012, Popovici 2010).

## 1.6. Capacidade vetorial

A capacidade vetorial é, essencialmente, a habilidade de um mosquito em transmitir um dado patógeno. Sua definição formal diz que a capacidade vetorial representa a taxa diária de contatos potencialmente infectantes entre mosquitos e seres humanos susceptíveis (Garret-Jones 1964). A definição foi desenvolvida para malária, mas hoje também é utilizada para dengue (Dye 1990). Pode ser expressa através de uma fórmula matemática, onde são incluídos o número de fêmeas de mosquitos por pessoa, taxa de picadas por ser humano por dia, probabilidade que um mosquito infectado tem de transmitir um patógeno ao picar um hospedeiro humano susceptível, probabilidade que um mosquito tem de se infectar com o parasito enquanto pica o hospedeiro humano infectado, duração do período de incubação extrínseco do parasita e taxa de sobrevivência diária (Coura 2005).

Como os parasitos e vetores de malária e dengue são distintos, variação nos fatores que compõe a capacidade vetorial pode influenciar significativamente a intensidade de transmissão do patógeno (Kuno 1995). Além disso, fatores além daqueles da fórmula da capacidade vetorial também são capazes de influenciar, indiretamente, a transmissão. Como exemplo podemos citar a duração do ciclo gonotrófico, capacidade de dispersão e tamanho do inseto, o primeiro tema desta dissertação.

$$CV = \frac{mbca_2 P_n}{- \ln (P)}$$

## 1.7. Densidade Populacional de Mosquitos

A densidade populacional está diretamente relacionada com a taxa de picada e com o aumento de casos de dengue, uma vez que quanto mais mosquitos, mais chances existem destes se infectarem e transmitir o vírus dengue para um indivíduo sadio. Isto reflete em uma maior capacidade vetorial.

É preciso também saber qual é o limite crítico da densidade de mosquitos para que não se inicie uma epidemia, de modo que as ações de controle sejam feitas no momento e local exatos (Maciel-de-Freitas 2010). O número de indivíduos em uma dada área varia sazonalmente, sendo geralmente maior no verão (Honorio et al. 2009). Com o aumento da temperatura, o desenvolvimento do mosquito, com o ciclo ovo-adulto, pode ser visto em cerca de 8 dias. A pluviosidade pode influenciar a densidade populacional (Consoli e Lourenço-de-Oliveira 1994) através do aumento da oferta de criadouros. Ademais, a maior umidade presente na estação chuvosa permite que os ovos apresentem maior capacidade de resistir à dessecação (Juliano et al. 2002, Rezende et al. 2008).

O estudo da densidade populacional pode nos fornecer informações valiosas sobre a ecologia e comportamento do vetor (Service 1993). Comumente, com o auxílio de armadilhas, pode se avaliar a eficiência de uma intervenção de controle, estimando a densidade de mosquitos pré- e pós-tratamento (Focks 2003, Fávoro et al. 2006, Resende et al 2013, Maciel-de-Freitas et al. 2014).

Para um desenho racional sobre a liberação de mosquitos com *Wolbachia*, um dos fatores cruciais é conhecer a densidade populacional em campo em cada uma das áreas, onde se pretenda fazer este tipo de introdução. Desta maneira, podemos ser capazes de ajustar o número de mosquitos liberados frente a uma estimativa de tamanho populacional para cada área em que a estratégia da *Wolbachia* for testada.

## **1.8. Probabilidade de Sobrevivência Diária (PDS)**

No sistema *Ae. aegypti*-vírus dengue, a taxa de sobrevivência diária de fêmeas adultas é um dos parâmetros mais importantes em modelos de transmissão de dengue, visto que pequenos aumentos na sobrevivência podem aumentar exponencialmente a capacidade vetorial do mosquito (Garret-Jones 1964 e Luz et al. 2003). Basicamente, a sobrevivência pode ser aferida de duas maneiras distintas: através de ensaios em laboratório onde geralmente mosquitos são monitorados diariamente, gerando assim curvas de sobrevivência (Briegel et al. 2001), ou através de experimentos de Marcação, Soltura e Recaptura (MSR) (Trpis et al. 1995). Se o primeiro garante maior precisão nas

estimativas, geralmente é conduzido em ambiente artificial para o mosquito, com recurso alimentar farto, temperatura controlada e sem a pressão de inseticidas. Por outro lado, no campo podemos extrapolar os valores de PDS para os mosquitos selvagens, gerando importante reconhecimento a respeito da dinâmica populacional de *Ae. aegypti* em um ambiente natural. Em ensaios de campo, o número de mosquitos capturados por dia em função do tempo pode se transformar em estimativas de PDS.

Geralmente aplica-se dois modelos de estimativas de PDS: exponencial e não-linear. O modelo exponencial tem uma praticidade maior, que é a facilidade matemática com a qual chegamos ao valor de PDS, e duas desvantagens. A primeira delas é que não considera que a mortalidade dos mosquitos varia de acordo com a idade, esta também está presente no modelo não linear, fato posto em cheque no final da última década (Styer et al. 2007a, 2007b). A segunda é não considerar a remoção dos indivíduos pela recaptura (Gillies 1961, Maciel-de-Freitas 2007a). O método não-linear, proposto por Buonaccorsi et al. (2003) envolve uma ferramenta analítica mais robusta, permitindo a correção das estimativas causadas pela remoção dos indivíduos nas coletas realizadas nos dias anteriores.

Foram derivados destes modelos dois valores: a média da expectativa de vida (ALE), definida como  $1/(-\log_e PDS)$  e o número de mosquitos vivos 10 dias depois das liberações, definida como  $PDS^{10}$  (onde 10 é a duração do período de incubação extrínseco em dias do vírus dengue).

A estimativa de PDS se mostra como um importante fator para avaliar se a *Wolbachia* disseminará numa população nativa. Mosquitos com alta PDS serão capazes de sobreviver por um longo período. Machos longevos podem fazer uso da incompatibilidade citoplasmática e fecundar fêmeas selvagens livres da bactéria. Da mesma maneira, fêmeas longevas serão capazes de realizar um grande número de postura de ovos, disseminando a *Wolbachia*.

## 1.9. Ciclo gonotrófico

O ciclo gonotrófico é o período em dias entre o repasto sanguíneo e a oviposição, e em geral ocorre a cada 3-4 dias para *Ae. aegypti* (Seawright et al. 1977). A duração do primeiro ciclo inclui o tempo necessário para a fêmea acasalar,

obter repasto sanguíneo, desenvolver e colocar seus ovos, e então tentar um segundo repasto (Hamaris e Foster 1990). Em um segundo ciclo não é mais necessário o acasalamento, pois as fêmeas são capazes de armazenar os espermatozoides do primeiro macho que a fecundou em órgãos conhecidos como espermatecas, para o resto da vida (Forattini 2002).

Cada ciclo gonotrófico pode ser dividido em três etapas distintas: a primeira é a busca por hospedeiro e alimentação sanguínea, a segunda é a digestão do sangue obtido no repasto e maturação dos ovos e a terceira é a busca de local adequado para realizar a oviposição (Lardeux et al. 2008). Nas fêmeas de mosquitos, a alimentação sanguínea é essencial para fornecer energia para maturação dos ovos. No sangue existem alguns aminoácidos que são essenciais para a vitelogênese do mosquito como, por exemplo, isoleucina (Clements 1963). Após esta maturação dos ovos, as fêmeas buscam locais para oviposição como criadouros artificiais encontrados no peridomicílio de ambientes urbanos. Nestes criadouros, as fêmeas depositam seus ovos na parte úmida dos recipientes acima do nível da água (Maciel-de-Freitas 2010).

Em *Ae. aegypti* são consideradas grávidas e prontas para ovipor quando o sangue está completamente digerido e com ovos para serem liberados (Harrington et al 2001). Em geral fêmeas grávidas não ingerem mais sangue porque os estágios ovarianos finais podem inibir este comportamento, estimulando que a fêmea concentre seu metabolismo na procura de um criadouro para realizar a postura de seus ovos (Trpis e Hausemann 1986). Desta forma, uma única alimentação sanguínea pode ser suficiente para o desenvolvimento dos ovos, embora já se saiba que *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* podem tomar múltiplas refeições sanguíneas durante um único ciclo gonotrófico (Barata et al. 2001). Para as fêmeas que tomam uma alimentação sanguínea suficiente e colocam seus ovos referentes a esta, chamamos isto de concordância gonotrófica, mas se precisarem de mais de um repasto para ovipor chamamos de discordância gonotrófica (Lardeux et al. 2008). Em fêmeas cujo desenvolvimento larvar se deu em ambiente muito competitivo, estes mosquitos serão menores, ou seja, por ter reserva energética menor, precisarão de mais repastos sanguíneos para ovipor (WHO 1997). Uma fêmea com discordância gonotrófica influencia na capacidade vetorial, uma vez que precisa de mais contato com humano para alimentação sanguínea e completar o ciclo.

Múltiplos repastos são epidemiologicamente importantes porque mais de uma refeição sanguínea durante um ciclo gonotrófico pode aumentar a chance de transmissão do parasita. Fontes sanguíneas, disponibilidade de criadouro e local para repouso em áreas com condições ambientais apropriadas também permitem as fêmeas viverem mais e completar seu ciclo gonotrófico (Lima-Camara et al. 2007) e quanto mais ciclos, maior será a quantidade de indivíduos na próxima geração.

Dados de campo confiáveis podem ser difíceis de serem obtidos e geralmente a duração do ciclo gonotrófico é estimada em experimentos de laboratório, ignorando-se a influência de fatores ambientais e o comportamento dos mosquitos que levam ao atraso da oviposição e realimentação, ou tempo para localizar um local adequado para ovipor (Lardeux et al. 2008). O tamanho do ciclo gonotrófico determina a frequência de contatos entre vetor e hospedeiro (Rodriguez et al. 1992). O alongamento do ciclo tende a aumentar a estimativa de sobrevivência e quanto maior for esta sobrevida, juntamente com a possibilidade de várias alimentações, resulta-se em uma maior estimativa da capacidade vetorial (Rodriguez et al. 1992) e determinar-se-á a produção de ovos e a estabilidade do tamanho da população de mosquitos (Garcia-Rejón et al. 2008).

Condições climáticas podem influenciar o tamanho do ciclo assim como a capacidade vetorial de populações de mosquitos (Garcia-Rejón et al. 2008). Por exemplo, uma temperatura mais alta acelera o metabolismo do mosquito e a chuva ajuda a aumentar a oferta de criadouros tanto para atrair a fêmea para oviposição, a de elevar o nível de água no criadouro até atingir os ovos já colocados para eclodirem. Também varia entre espécies e populações, podendo ser influenciado por abundância, probabilidade de contato com o hospedeiro e tamanho do mosquito. Logo, é necessário o conhecimento de minúcias da biologia da população da localidade trabalhada para se estimar o mais próximo possível a duração exata do ciclo.

A princípio negligenciado em modelos de invasão de *Wolbachia*, a duração do ciclo gonotrófico, associada à probabilidade de sobrevivência diária, pode oferecer uma estimativa de quantos eventos de oviposição passarão os mosquitos com *Wolbachia* quando forem liberados. Esta informação pode ser relevante para modelar a periodicidade da liberação dos insetos e a probabilidade de invasão da *Wolbachia* em populações naturais de *Ae. aegypti*.

## 2. JUSTIFICATIVA

Uma vez que há ausência de medicamentos profiláticos, antivirais para conter a infecção viral ou vacinas para imunizar a população humana, a melhor forma de reduzir os níveis de transmissão do dengue e do chikungunya é a intensificação das atividades de controle de seu vetor, o *Ae. aegypti*. Um dos mecanismos mais recentes em questão para minimizar a transmissão destes patógenos reside na utilização da bactéria *Wolbachia*. Esta bactéria é um simbiote intracelular obrigatório transmitido verticalmente da fêmea adulta para a sua prole. Seu uso se baseia no fato de que mosquitos *Ae. aegypti* com essa bactéria são capazes de bloquear o vírus dengue em comparação com mosquitos livres de *Wolbachia* (Moreira et al. 2009, Walker et al. 2011, Hoffmann et al. 2011). Até o momento, mosquitos *Ae. aegypti* com *Wolbachia* já foram liberados em quatro áreas remotas da Austrália, uma do Vietnã e duas da Indonésia. Em todos os casos, apesar de em cada localidade ter sido detectado um padrão particular de invasão, em modo geral pode-se afirmar que a *Wolbachia* se disseminou em todas as situações, entre diferentes populações naturais de *Ae. aegypti* (Hoffman et al. 2011).

Desta maneira, o objetivo central desta dissertação é avaliar aspectos da biologia de populações naturais do *Ae. aegypti* onde se espera realizar, futuramente, a liberação de mosquitos contendo esta bactéria, Tubiacanga, Jurujuba, Urca e Vila Valqueire (sendo que em Tubiacanga esse experimento se iniciou em setembro de 2014). Contudo, para a liberação dos mosquitos, é necessário o cumprimento de uma série de etapas preliminares, como (a) conhecer a biologia dos mosquitos nas áreas selecionadas, (b) obtenção de autorização dos moradores nas áreas escolhidas permitindo a liberação dos mosquitos e (c) devida autorização de órgãos reguladores e comitês de ética em pesquisa. Claramente, o enfoque dessa dissertação se baseia na observação de aspectos da biologia e da capacidade vetorial de *Ae. aegypti* nas áreas selecionadas para, no futuro, haver uma liberação racional dos mosquitos com *Wolbachia*. Por liberação racional subentende-se o menor número de mosquitos soltos por semana sem comprometer o processo de invasão da *Wolbachia*.

No Brasil, iniciaram-se ensaios de liberação de *Wolbachia* em campo em setembro de 2014, especificamente na área de Tubiacanga, uma das quatro áreas pré-selecionadas pela equipe do Eliminar a Dengue: Desafio Brasil (maiores detalhes abaixo). Mantendo o olhar para o cenário local, podemos descrever que as quatro áreas são muito diferentes entre si no que diz respeito ao microclima, densidade de casas, população humana, condições sanitárias e de infraestrutura, coleta de lixo e abastecimento de água, por exemplo. Um cenário ainda mais diverso poderá ser encontrado se as comparações envolverem as paisagens encontradas nos outros países que compõe o projeto.

Pode-se afirmar, com grande nível de certeza, que a paisagem influencia a biologia do *Ae. aegypti* (Maciel-de-Freitas et al. 2007a). Em comunidades carentes (favelas), por exemplo, onde dentre outras características, a distribuição de água é irregular e há elevado adensamento humano, fêmeas realizam a postura de seus ovos em criadouros geralmente utilizados para armazenamento de água como, tonéis e caixas d'água, dispersam distâncias menores e apresentam maior longevidade. Por outro lado, em área de melhor padrão financeiro, com distribuição regular de água e baixo adensamento humano, as fêmeas ovipõem em ralos e vasos de planta, dispersam distâncias superiores e possuem menor longevidade (Maciel-de-Freitas et al. 2007a, 2007b, David et al. 2009). Em localidades onde tem maior adensamento humano os mosquitos não precisam dispersar muito para encontrar fonte sanguínea e sobrevivem mais por não precisarem ficar muito expostos para buscar hospedeiro e com as casas mais agrupadas também conseguem ser menos vistos. Desta maneira, fica evidente que o conhecimento prévio da biologia de populações naturais de *Ae. aegypti* nessas localidades é fundamental para elaborar um desenho racional e quiçá sítio-específico para as liberações de mosquitos com *Wolbachia*.

Mantendo a ótica neste projeto, podemos afirmar que os diferentes aspectos da paisagem mencionados acima poderão influenciar, principalmente, o tamanho da população nativa em cada área. Por sua vez, o tamanho populacional de mosquitos nativos exercerá grande influência sobre o número de mosquitos com *Wolbachia* que devem ser liberados para que esta bactéria invada e se estabeleça nessas localidades (Barton e Turelli 2011). Além do tamanho da população nativa, nosso grupo já observou que o ambiente parece influenciar a sobrevivência diária e a dispersão (Maciel-de-Freitas et al. 2007b, David et al. 2009).

Como já se sabe que a *Wolbachia* é transmitida verticalmente, pretendemos estimar o número de eventos de oviposição que as fêmeas de *Ae. aegypti* terão em cada uma das áreas de estudo. Para isso, precisaremos ter estimativas da densidade populacional do *Ae. aegypti*, da duração do ciclo gonotrófico e da sua sobrevivência. De posse da estimativa desses parâmetros, saberemos quantas fêmeas serão capazes de realizar postura a cada dia após a soltura para cada localidade.

O Brasil faz parte do Projeto Eliminar Dengue: desafio Brasil, tendo o Rio de Janeiro como sua área inicial de estudos (Maciel-de-Freitas et al. 2012). Para se avançar até a liberação dos mosquitos com *Wolbachia* em campo, muitos passos anteriores devem ser executados. Dentre eles, avaliar aspectos de populações naturais de *Ae. aegypti* para propor uma liberação racional de insetos com *Wolbachia* em campo apresenta elevada relevância, sendo desta maneira tema desta dissertação. Assim, propomos estimar a densidade populacional relativa de mosquitos, a duração do ciclo gonotrófico (período em dias decorrido entre uma alimentação sanguínea e a postura dos ovos gerados a partir desta alimentação) e a probabilidade de sobrevivência diária (PDS) nas áreas selecionadas pelo projeto.

## **3. OBJETIVOS**

### **3.1. Objetivo geral**

Estudar aspectos da biologia de populações naturais de *Aedes aegypti* que possam influenciar a liberação de mosquitos com *Wolbachia* no campo.

### **3.2. Objetivos específicos**

Estimar a densidade relativa de fêmeas de *Aedes aegypti* a partir de coletas semanais;

Avaliar o potencial efeito que variáveis climáticas podem ter na densidade de *Ae. aegypti*;

Estimar a probabilidade de sobrevivência diária e a duração do ciclo gonotrófico em populações naturais de *Ae. aegypti*;

Simular como que variações nos aspectos da biologia do *Ae. aegypti* podem influenciar a invasão da *Wolbachia*.

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1. Áreas de estudo**

Para o projeto “Eliminar a dengue: desafio Brasil” foram selecionadas quatro áreas: Tubiacanga, Urca e Vila Valqueire, no Rio de Janeiro, e Jurujuba em Niterói. Para chegar à escolha destas áreas vários outros bairros foram avaliados e foi realizado um estudo para identificar quais destes seriam melhores para realizar o projeto. Com isso foram levados em conta alguns critérios, tais como: logística (acesso ao local, tempo de deslocamento com saída da Fiocruz, oferta de agentes de saúde com conhecimento da área em questão para auxiliar as atividades de campo), demografia, infestação, número de casas, tamanho da área, isolamento, histórico de casos de dengue, nível de aceitação da comunidade, condições econômicas e sócio-demográficas distintas e interesse das secretarias municipais de saúde destas cidades, grandes parceiras do projeto Eliminar a Dengue desde o início de seu desenvolvimento no Brasil.

Segue abaixo na tabela 1 informações resumidas das localidades de estudo:

Tabela 1: Características das áreas

Características	Jurujuba	Tubiacanga	Vila Valqueire	Urca
Coordenadas	22°55'37" S 43°07'11" O	22°47'06" S 43°13'32" O	22°53'17" S 43°22'20" O	22°56'43" S 43°09'42" O
Ambiente circundado	Baía de Guanabara	Baía de Guanabara	Floresta secundária	Morro Pão de Açúcar
Descrição socioeconômica	Classe baixa	Classe média baixa	Classe média	Classe média alta
Ruas pavimentadas	Parcialmente	Parcialmente	Sim	Sim
Água canalizada	Não	Alguns	Sim	Sim
Coleta de lixo	Não	Sim	Sim	Sim
Reservatórios externos de água	Sim	Sim	Sim	Não
Hábitats comuns dos mosquitos	Tanques de água e tambores de metal	Tanques de água e tambores de metal	Tanques e baldes de água	Ralos domésticos e potes plásticos abandonados
Número de casas	399	753	410	1284
Tipo de casa	Pequena	Normal	Grande (3-4 quartos)	Apartamentos com pelo menos 3 quartos
Habitantes	1196	2425	1423	3212
Densidade humana (habitantes/hectare)	340,2	165,98	74,17	234,54
Tamanho local (blocos quadrados)	6	14	15	13
Área (hectare)	3.515	1.461	19.185	13.695

Dados demográficos das quatro áreas foram coletados do Censo 2010 (<http://censo2010.ibge.gov.br/>). O restante dos dados descritivos foram coletados através de observação durante a caracterização do local de campo e durante as experiências anteriores.

Com estes dados podemos ver claramente como as áreas trabalhadas são distintas com relação a número de casas, pessoas, área, densidade humana (pessoas/área) e vegetação. Com essas informações confirmamos a necessidade de se adequar o projeto de acordo com as variações em cada localidade, em vez de adotar um protocolo único a ser replicado indefinidamente.

Tubiacanga ( $22^{\circ}47'06''\text{S}$ ;  $43^{\circ}13'32''\text{O}$ ) (Figura 2) está localizada na ilha do Governador (RJ), circundada uma parte pela Baía de Guanabara e a outra pelo Aeroporto Internacional do Rio de Janeiro/Galeão – Antônio Carlos Jobim. De um modo geral, trata-se de bairro de classe média baixa, onde as casas possuem, em média, dois quartos e quintal propício para a disseminação do *Ae. aegypti*, sendo que algumas residências possuem água encanada. As ruas são niveladas e parcialmente pavimentadas, há coleta de lixo e elevada presença de grandes depósitos utilizados para o armazenamento de água. Em muito por isso, os criadouros mais produtivos de Tubiacanga são caixas d'água e tonéis (Maciel-de-Freitas et al. 2007a).

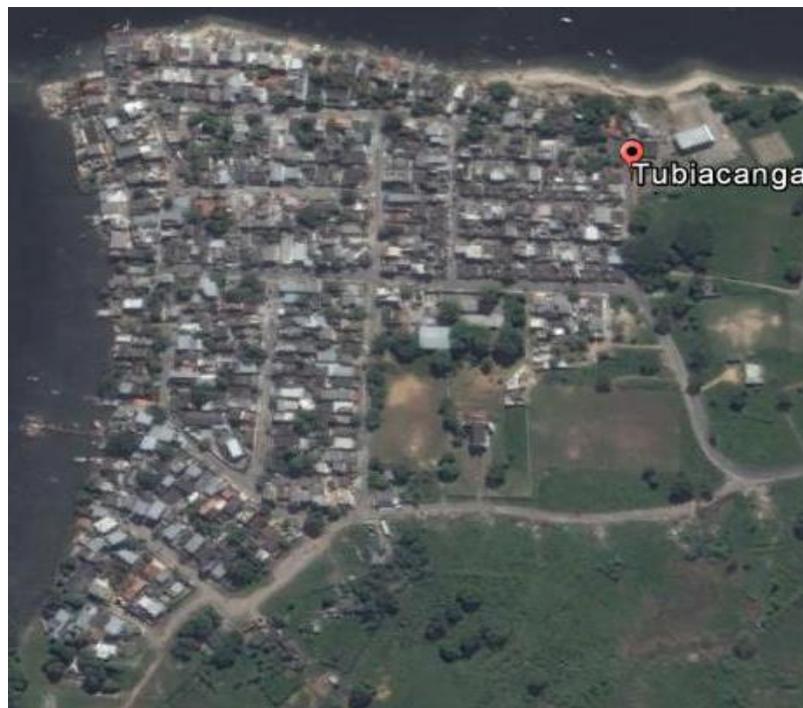


Figura 2: Bairro de Tubiacanga, localizado na Ilha do Governador, próximo ao aeroporto internacional do Galeão.

O bairro de Juruuba ( $22^{\circ}55'37''\text{S}$ ;  $43^{\circ}07'11''\text{O}$ ), em Niterói, apresenta estrutura bastante heterogênea. Em uma parte, localizada na encosta de uma elevação local, existem áreas muito íngremes; as casas são pequenas e muito próximas, sendo separadas por vielas parcialmente pavimentadas. Na outra parte, as casas são maiores e estão inseridas em quarteirões regulares com ruas pavimentadas. Não há coleta de lixo e a distribuição de água é irregular, o que obriga os moradores a armazenarem água em baldes e tonéis (que, assim como em Tubiacanga, podem servir de criadouros). Na Figura 3 podemos observar circundado em vermelho o local onde foi avaliada a

densidade populacional relativa de *Ae. aegypti* com o emprego de armadilhas BGS-Trap por 104 semanas, consecutivas, e em amarelo o estudo do ciclo gonotrófico e probabilidade de sobrevivência diária (PDS) com método de marcação, soltura e recaptura (MSR) que serão explicados mais a diante.

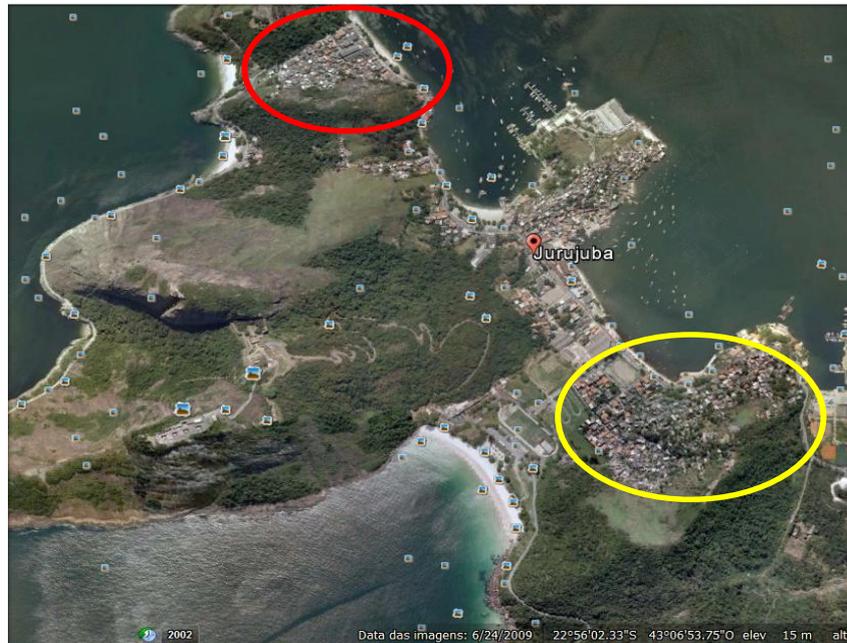


Figura 3: Área de Jurujuba, localizada no Município de Niterói, Rio de Janeiro. O círculo vermelho representa a área que foi realizado o experimento de estimativa de densidade populacional de *Ae. aegypti* e em amarelo o experimento de duração do ciclo gonotrófico e probabilidade de sobrevivência diária.

A Urca ( $22^{\circ}56'56''43''$  S;  $43^{\circ}09'42''$  O) (Figura 4) é um bairro de classe média alta, ruas niveladas e pavimentadas, com elevada cobertura vegetal. As casas possuem água canalizada e coleta de lixo, tem quarteirões regulares com residências de alto padrão com cerca de 3-4 quartos e no peridomicílio um ambiente sombreado e algumas vezes com piscina. Na Urca, diferentemente das outras regiões, observamos a presença de edifícios de 4-5 pavimentos, o que traz um novo desafio para a invasão da *Wolbachia*. Como essa área possui oferta regular de água, não há necessidade de seu armazenamento em grandes depósitos. Talvez por isso, os criadouros mais produtivos são ralos domésticos e potes plásticos abandonados (David et al. 2009).



Figura 4: Bairro da Urca, região litorânea localizada no Município do Rio de Janeiro

Vila Valqueire ( $22^{\circ}53'17''\text{S}$   $43^{\circ}22'20''$  O) (Figura 5) é um bairro de classe média que se localiza na Zona Norte do Rio de Janeiro. Encontra-se ao menos 50% de seu perímetro circundado por floresta secundária, possui ruas niveladas e pavimentadas, distribuição de água regular e encanada e coleta de lixo frequente. Algumas casas possuem amplo espaço peridomiciliar com a presença de piscinas e grandes espaços sombreados. O mosquito *Ae. aegypti* possui como criadouros preferenciais tanques e baldes (Maciel-de-Freitas e Lourenço-de-Oliveira 2011). Na Figura 5 podemos observar circundado em vermelho o local onde foi avaliada a densidade populacional relativa de *Ae. aegypti* com o emprego de armadilhas BGS-Trap por 104 semanas, consecutivas, e em amarelo o estudo do ciclo gonotrófico e probabilidade de sobrevivência diária (PDS) com método de marcação, soltura e recaptura (MSR) que serão explicados mais a diante.



Figura 5: Bairro de Vila Valqueire, localizado na Zona Norte do Rio de Janeiro.

## 4.2. Estimativa da densidade populacional de mosquitos

A estimativa da densidade relativa de *Ae. aegypti* foi feita a partir de coletas semanais de mosquitos adultos nas quatro localidades em que se iniciou o planejamento para realizar a liberação de mosquitos com *Wolbachia*. O monitoramento das populações de campo foi realizado entre outubro/2012 e outubro/2014, ou seja, totalizaram 104 semanas consecutivas. Ao longo desse período, 30 armadilhas BGS-Trap (Figura 6), distribuídas de maneira homogênea em cada localidade, foram vistoriadas semanalmente. Essa armadilha possui atraentes como ácido lático, amônia, e ácido capróico, substâncias comumente encontradas na pele humana. Por simular os odores exalados no suor humano acredita-se que esta armadilha captura preferencialmente fêmeas adultas, em especial aquelas que estejam em busca de um hospedeiro para realizar uma alimentação sanguínea (Maciel-de-Freitas et al. 2006). Em linhas gerais, a armadilha BGS-Trap é conectada a energia, fazendo funcionar uma ventoinha que, ao mesmo tempo que libera para o exterior o odor do atraente, gera uma corrente de vento para o interior da armadilha, capturando os insetos que estiverem voando pelo local (Maciel-de-Freitas et al. 2006).

Todos os insetos coletados foram levados ao Laboratório de Transmissores de Hematozoários (LATHEMA) para contagem e identificação específica dos mosquitos de cada armadilha usando chaves dicotômicas apropriadas (Consoli e Lourenço-de-Oliveira 1994).



Figura 6: BGS-Trap- Armadilha utilizada no experimento de densidade populacional (Foto de Barbosa 2015).

### 4.3 Dados climáticos

Durante todo experimento das 104 semanas de coletas de adultos nas quatro áreas com as BGS-Traps, alguns dados climáticos foram coletados também semanalmente. O objetivo, neste caso, é avaliar em qual época do ano seria ideal para soltura de mosquito com *Wolbachia*. Para isso, precisamos saber se variáveis ambientais tais como temperatura, umidade, velocidade do vento e precipitação podem influenciar a densidade de mosquitos adultos. Quando a densidade de selvagens está mais baixa pode ser devido ao clima pouco favorável para os mosquitos, sendo que esta situação desfavorável se repetiria para os mosquitos liberados com *Wolbachia* semanalmente. Ao contrário, quando a densidade relativa está elevada, é indicativo de uma boa situação

para reprodução e sobrevivência, logo, também para os mosquitos liberados por nós. Com isso, é necessário analisar qual(is) seria(m) o(s) melhor(es) momento(s) para iniciar as liberações semanais de mosquitos com *Wolbachia*. Para isso, encontra-se em andamento análises preliminares de correlação e regressão linear entre as variáveis ambientais e nossa variável dependente (densidade de mosquitos adultos), utilizando o software livre R. Como esta etapa ainda encontra-se incipiente, ela não fará parte da seção dos resultados.

Os dados climáticos também foram utilizados para os dias em que foram realizados o experimento de marcação, soltura e recaptura nas áreas de Jurujuba e Vila Valqueire. Neste caso, não está representado Urca e Tubiacanga devido ao fato de não termos realizados durante esta dissertação o experimento de MSR nestas localidades, utilizando as informações geradas pelo nosso grupo em trabalhos anteriores. Alguns dados climáticos ocorridos durante o experimento seguem na tabela 2.

Tabela 2: Características climáticas

Localidade	Média Temperatura (°C)	Média UR (%)	Média Velocidade do vento (m/s)	Total de precipitação (mm)
Jurujuba	23,87	81,88	2,31	55,8
Vila Valqueire	24,47	64,54	1,67	6,8

Dados de: <http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=estacoes/estacoesautomaticas>

#### 4.4. Mosquitos

Os mosquitos utilizados no experimento de marcação, soltura e recaptura (MSR) foram coletados na própria área de estudo, a partir da instalação de 40 ovitrampas distribuídas de maneira uniforme pela área. Acreditamos que esse número seja capaz de representar a variabilidade genética presente na população de campo no momento da coleta. Levados ao LATHEMA, os ovos foram postos para eclodir em água deionizada e as larvas subsequentes alimentadas com levedura de cerveja (*Saccharomyces cerevisiae*) em tablete. Após alcançarem a fase adulta, os mosquitos foram identificados ao nível de espécie e aqueles apontados como *Ae. aegypti* foram separados para gerar uma nova geração. Para isso, as fêmeas foram alimentadas de 2-3 vezes por semana em camundongo anestesiado (CEUA P-0498/08), maximizando a obtenção de ovos. Os

mosquitos adultos foram mantidos em insetário com solução açucarada a 10%, temperatura 25 a 26°C, umidade relativa 70 a 80% e ciclo de hora claro-escuro 12:12. Após obter um grande estoque de ovos na geração F1-F2, os ovos foram estimulados à eclosão, mantendo os mesmos critérios de criação descritos acima.

## **4.5. Marcação, soltura e recaptura (MSR)**

### **4.5.1. Marcação**

Antes do processo de marcação, os mosquitos foram separados, no estágio de adultos, em dois grupos de fêmeas: a um deles foi oferecido na tarde anterior uma alimentação sanguínea enquanto o outro foi liberado sem se alimentar (maiores detalhes na seção 4.7), logo, o primeiro grupo recebeu uma alimentação sanguínea cerca de 18 horas antes da soltura. Os dois grupos foram marcados com pó fluorescente (Day-Glo Color Corp., Cleveland, OH) de cores distintas cerca de uma hora antes de serem liberados em campo. O pó fluorescente é o método de marcação mais utilizado em entomologia médica, sendo usado desde os anos 1930 até o presente momento (Service 1993). Geralmente, não afeta a sobrevivência dos insetos marcados tampouco aumenta sua taxa de predação, além de permitir que indivíduos marcados se misturem com os selvagens não marcados (Service 1993, Muir e Kay 1998). Para colorir os mosquitos, o pó foi aspergido sob os insetos numa gaiola cilíndrica quando estes já estavam separados.

### **4.5.2. Soltura**

Mosquitos com 4-5 dias de idade, pertencentes a duas coortes (uma alimentada e outra não alimentada) foram liberados por volta das nove horas da manhã em local previamente determinado de acordo com a disposição das armadilhas. A liberação dos mosquitos se dá em vias públicas, preferencialmente em praças ou largos que não restrinjam o vôo logo após a abertura das gaiolas.

### 4.5.3. Recaptura

As recapturas foram iniciadas no dia seguinte e duraram nove dias consecutivos. Para tal, foram utilizados aspiradores (Figura 7) e armadilhas colantes (Figura 8) para avaliar a sobrevivência e duração do ciclo gonotrófico de *Ae. aegypti*. Em cada área de estudo foram instaladas 15 armadilhas colantes, que permaneceram nas mesmas residências durante toda a duração do estudo. Adicionalmente, 15 residências eram amostradas de maneira randômica a cada dia para coleta de mosquitos adultos utilizando um aspirador costal (Maciel-de-Freitas et al. 2007c). Para cada residência era necessário um período de 10-15 minutos para se completar a aspiração em todos os cômodos. Ressaltamos que as casas aspiradas tendiam a variar diariamente, entretanto em raras ocasiões foi realizada a atividade de aspiração em uma casa que possuía uma armadilha colante em seu interior. Todos os mosquitos recuperados foram identificados em laboratório e inspecionados sob luz UV para determinar a sua coloração e, caso se tratasse de um inseto marcado, prosseguia-se para a dissecação dos seus ovários.

### 4.6. Estimativa da probabilidade de sobrevivência diária (PDS)

Uma das maneiras mais tradicionais de estimar a PDS de mosquitos vetores se apresenta através de experimentos de MSR (Service 1993). Para o caso específico de *Ae. aegypti*, a PDS pode ser estimada usando-se métodos baseados em um modelo exponencial ou em um modelo de regressão não-linear (Gillies 1961, Service 1993, Buonaccorsi et al. 2003). Apesar de ser mais simples e de fácil aplicabilidade, o modelo exponencial possui algumas limitações. A mais grave delas é desconsiderar da análise da PDS os indivíduos que foram coletados e retirados nos dias anteriores da coleta, ou seja, não estão disponíveis para serem coletados no(s) dia(s) seguinte(s). Uma das vantagens do modelo não-linear é propor uma correção à essa retirada de indivíduos pelas capturas nos dias anteriores. Outra vantagem do método não-linear é gerar estimativas de PDS e taxa de captura com intervalos de confiança, pois seus cálculos são baseados na técnica de *bootstrapping* (Buonaccorsi et al. 2003). De maneira notável, apesar do método não-linear significar um significativo melhoramento à

estimativa de PDS, pesquisadores no campo da entomologia médica ainda continuam, de um modo geral, preferindo os métodos exponenciais pela sua facilidade de análise (Maciel-de-Freitas, observação pessoal).

Contudo, tanto o método exponencial como o não-linear possuem algumas limitações, sendo a mais grave delas considerar a taxa de mortalidade constante em função da idade do *Aedes aegypti*. Existem modelos que estimam com maior precisão a mortalidade, inclusive avaliando se esta varia em função da idade do vetor, mas, para isso, geralmente requerem múltiplas capturas de muitos indivíduos, o que se trata de uma grande limitação para *Ae. aegypti*. Avaliando apenas os dados gerados pelo grupo, nossos experimentos de MSR possuem, em média, uma taxa de recaptura de 5-12%, o que inviabiliza que, numa coorte de cerca de 500 fêmeas, por exemplo, muitos indivíduos sejam recapturados muitas vezes.

A PDS em Jurujuba e Valqueire foi estimada através da coleta diária de mosquitos marcados e estimada pelos métodos exponencial e não linear (Gillies 1961, Buonaccorsi et al. 2003). Para as demais localidades buscar-se-á estimativas já geradas por nosso grupo em experimentos locais (Maciel-de-Freitas et al. 2007c, David et al. 2009).

A média da expectativa de vida (ALE) foi definida como  $1/(-\log_e PDS)$  (Niebylski e Craig 1994) e o número de mosquitos vivos 10 dias após a soltura como  $PDS^{10}$  (onde 10 é a duração do período de incubação extrínseco para a dengue em dias) (Salazar et al. 2007) que nos deu a proporção esperada de mosquitos sobreviventes para transmitir o vírus dengue. O número de mosquitos capturados por dia, assim como estimativas de sobrevivência e taxas de captura, foi analisado pelo software livre R 3.0.1.

#### **4.7. Estimativa da duração do ciclo gonotrófico**

Além de estimar a PDS, nosso experimento de MSR foi desenhado para se estimar, simultaneamente, a duração do ciclo gonotrófico, que é definido como o período em dias compreendido entre a alimentação sanguínea e a postura dos ovos decorrentes dessa alimentação. Em cada experimento de MSR foram liberadas duas coortes de fêmeas de *Ae. aegypti*, cada uma marcada com uma cor de pó fluorescente.

Uma das coortes (coorte A) foi composta por fêmeas que haviam ingerido até o engurgitamento uma alimentação sanguínea cerca de 18 horas antes da soltura em laboratório com sangue de camundongo (CEUA P-0498/08). Para esse grupo, a conclusão do ciclo gonotrófico se daria quando, a partir da dissecação do ovário de todas as fêmeas marcadas capturadas, quantos dias se passaram até que as mesmas fossem encontradas com ovos em seu abdome, sinalizando conclusão do ciclo gonotrófico. Para a coorte B foram liberadas fêmeas sem estarem alimentadas. O uso dessas duas coortes se justifica para tentar estimar quanto tempo às fêmeas não-alimentadas demoram a encontrar uma fonte sanguínea, aspecto negligenciado em estudos similares de MSR.

No dia seguinte à liberação dos mosquitos, iniciaram-se as capturas diárias no intra e peridomicílio das residências nas áreas de estudo. Todas as fêmeas marcadas capturadas tiveram seu ovário dissecado com o auxílio de estiletos entomológicos e um estereomicroscópio. As fêmeas capturadas nas armadilhas colantes também tiveram seus ovários dissecados, em geral essa armadilha coleta apenas as fêmeas que estejam em busca de um sítio de oviposição, ou seja, que estariam grávidas.

Ao chegar ao LATHEMA, os mosquitos capturados foram separados pela cor do pó fluorescente em estereomicroscópio sobre luz UV e os ovários das fêmeas coletados no aspirador foram dissecados em PBS 0,01M e pH 7,2 e as fases do ovário foram identificadas de acordo com Christophers (1911) em microscópio.



Figura 7: Aspirador utilizado no experimento de marcação, soltura e recaptura (Foto de Barbosa 2015).



Figura 8: Armadilha colante utilizada no experimento de marcação, soltura e recaptura (Foto de Barbosa 2015).

## 4.8 Modelagem da potencial invasão da *wMel* nas quatro localidades

Em uma colaboração com o Dr. Daniel Vilela, do Programa de Computação Científica da Fiocruz foram realizadas simulações com os valores de biologia do *Aedes aegypti* obtidos em cada uma das áreas do projeto Eliminar a Dengue: Desafio Brasil. Tendo posse de dados relevantes das quatro áreas, mais da Comunidade do Amorim, simulamos como seria a disseminação da *Wolbachia* promovendo a liberação semanal de 200 a 400 mosquitos durante 12 semanas dependendo da área. Para isso, inicialmente, foram realizadas regressões para estimar o tamanho da população de *Ae. aegypti* em cada localidade. Este modelo incorporou nossos dados do experimento de MSR e dados demográficos de cada localidade como número de casa e habitantes. O número de mosquitos capturados marcados foi modelado como uma variável binomial “ $y_i \sim \text{Bin}(N_i, p_d)$ ”, onde “ $p_d$ ” é a probabilidade de captura e “ $N_i$ ” é o número de mosquitos liberados em cada local. Foi assumido que a probabilidade de captura no experimento de MSR variou dependendo das condições de cada localidade, como o número de pessoas e o número de casas. Essas duas variáveis foram incluídas no modelo porque elas influenciam significativamente a probabilidade de captura dos mosquitos.

O modelo de disseminação da *Wolbachia* simulou por 12 semanas a soltura de mosquitos infectados com a bactéria e foi vista a variação na proporção de mosquitos infectados na população ao longo do tempo. Estes modelos incorporaram parâmetros derivados da caracterização de mosquitos brasileiros infectados com *wMel* e da população de mosquitos em cada local (Dutra et al. 2014).

## 4.9 Comitê de ética

Para alimentação sanguínea dos mosquitos em camundongos anestesiados, o laboratório possui uma autorização do Comitê de Ética de Uso de Animais (CEUA) com o número P-0498/08.

Os experimentos de MSR foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fiocruz (CEP/FIOCRUZ protocolo no. 22286313.7.0000.5248). Os experimentos de MSR foram conduzidos com a participação das Secretarias Municipais de Saúde do Rio de Janeiro e de Niterói, uma vez que a coleta dos mosquitos nas armadilhas é feita por agentes de saúde dos respectivos municípios. Por recomendação do CEP, a liberação dos mosquitos não pode ser realizada entre dezembro-março, período de maior transmissão de dengue no Estado, e que não podemos liberar um número maior do que o capturado anteriormente. Os moradores locais receberam uma explicação completa sobre o projeto por pelo menos um dos responsáveis da pesquisa acompanhados pelo mesmo agente de saúde que visita sua casa 4-6 vezes por ano durante as atividades de controle rotineiras. Adicionalmente, por recomendação do CEP, os moradores que tiveram uma armadilha instalada em sua residência precisaram assinar um termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo I). Esta explicação destacou a relevância e objetivos do experimento MSR.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Densidade Populacional de Culicidae, com ênfase em *Ae. aegypti*

Como já foi visto, a densidade populacional é um importante parâmetro na capacidade de transmissão de um patógeno. Ao longo do período de coleta de dois anos foi coletado um total de 180.728 mosquitos selvagens nas quatro áreas de estudo, sendo que 82.316 destes foram *Ae. aegypti* (Figura 9), 2.867 eram *Ae. albopictus* (Figura 10) e 96.754 foram *Culex quinquefasciatus* (Figura 11). Como esperado, observamos diferenças no número médio semanal de mosquitos capturados entre os locais. De um modo geral, o bairro de Vila Valqueire, uma área de classe média da Zona Oeste do Rio de Janeiro, teve o maior número de mosquitos *Ae. aegypti* coletados, sendo que nas 104 semanas foi coletado 6.043 a mais do que em Tubiacanga, uma área de classe média baixa, que teve o segundo maior número coletado. O número total foi menor na Urca, uma área de classe média alta. Comparando as áreas que tiveram o extremo em relação à coleta, podemos observar que a média semanal de *Ae. aegypti* foi mais alta em Vila Valqueire ( $256 \pm 74,3$ , média  $\pm$  desvio-padrão), um valor próximo ao dobro do observado em Urca ( $144,1 \pm 40,6$ , média  $\pm$  desvio-padrão).

Ao observar as coletas de fêmeas, vimos que este padrão se manteve entre as localidades, maior quantidade em Vila Valqueire, seguido de Tubiacanga, Jurujuba e Urca (Figura 9).

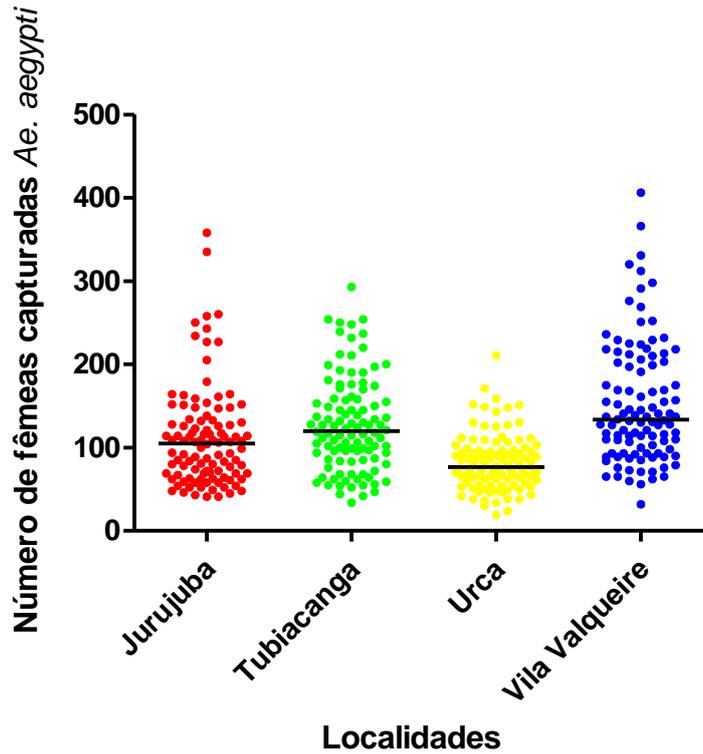


Figura 9: Número total de fêmeas de *Ae. aegypti* por semana em cada localidade, totalizando 104 semanas ininterruptas de coleta. Cada ponto representa a coleta de uma semana. O traço entre os pontos significa a mediana da distribuição.

Em relação ao *Ae. albopictus*, houve um número significativamente menor de coleta de insetos desta espécie quando comparado com *Ae. aegypti*. Ainda assim, podemos observar o mesmo padrão entre essas duas espécies: no bairro de Vila Valqueire foi coletado maior número de mosquitos por semana, com um número menor sendo obtido no bairro da Urca, apesar de sua vasta cobertura vegetal. Isto também se manteve em relação às fêmeas (Figura10).

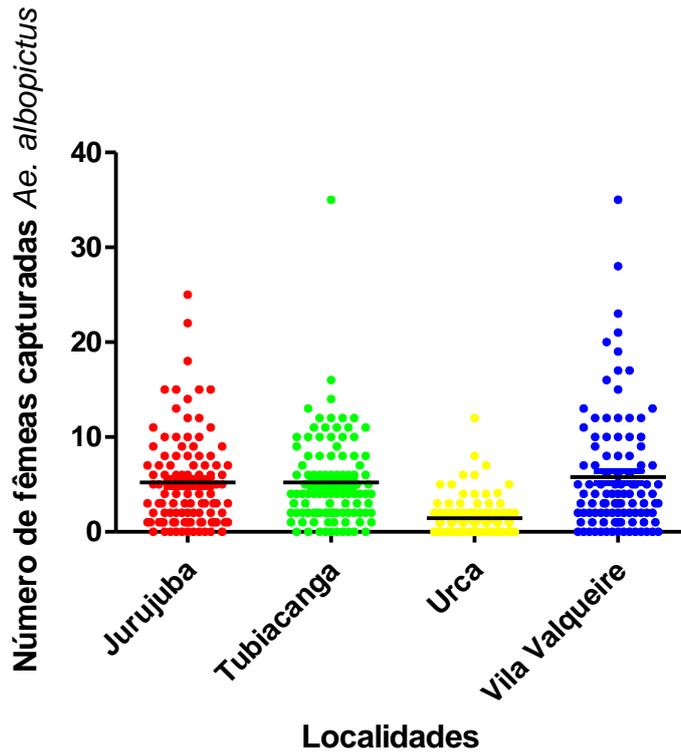


Figura 10: Número total de fêmeas de *Ae. albopictus* por semana em cada localidade, totalizando 104 semanas ininterruptas de coleta. Cada ponto representa a coleta de uma semana. O traço entre os pontos significa a mediana da distribuição.

Por fim, para *Culex quinquefasciatus*, os números de coletas atingiram padrões mais próximos de *Ae. aegypti* em quantidade. De fato, *Cx. quinquefasciatus* foi a espécie mais abundante somando-se as quatro áreas. Alguns pontos de coleta tiveram de ser removidos do gráfico, por exemplo, em uma semana em Tubiacanga foram coletados mais de 1.800 mosquitos *Culex*. Interessantemente, o perfil de coleta de *Cx. quinquefasciatus* foi um pouco diferente ao observado para *Ae. aegypti*. Enquanto o vetor da dengue foi mais abundante nos bairros de Vila Valqueire e Tubiacanga, o vetor da filariose linfática foi mais abundante nos bairros da Urca e Tubiacanga, com a coleta média de 221 e 101,4 fêmeas por semana, respectivamente. Com efeito, na Urca houve uma média de coleta 6,7 vezes maior que em Jurujuba.

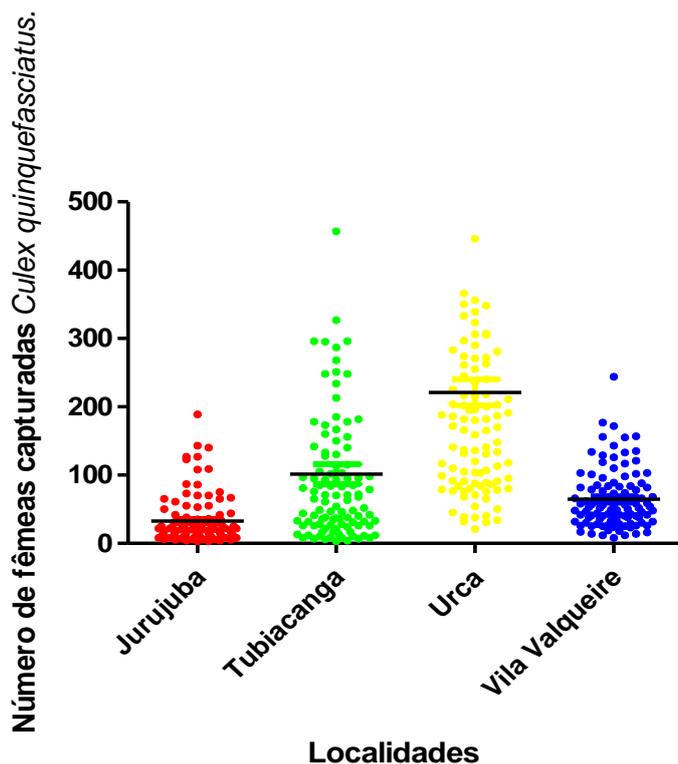


Figura 11: Número total de fêmeas de *Culex quinquefasciatus* por semana em cada localidade, totalizando 104 semanas ininterruptas de coleta. Cada ponto representa a coleta de uma semana. O traço entre os pontos significa a mediana da distribuição.

Uma vez que as coletas dos mosquitos adultos nas BGS-Traps foram realizadas de maneira ininterrupta por dois anos, ou seja, 104 semanas, as capturas podem ser avaliadas em função do tempo, na busca de padrões de sazonalidade em cada área. Desta maneira, a figura 12 mostra a média semanal de fêmeas de *Ae. aegypti*, a figura 13, de *Ae. albopictus* e a figura 14, de *Cx. quinquefasciatus* em cada BGS-Trap entre outubro de 2012 a outubro de 2014 nos quatro bairros onde se planeja a liberação de mosquitos com *Wolbachia*.

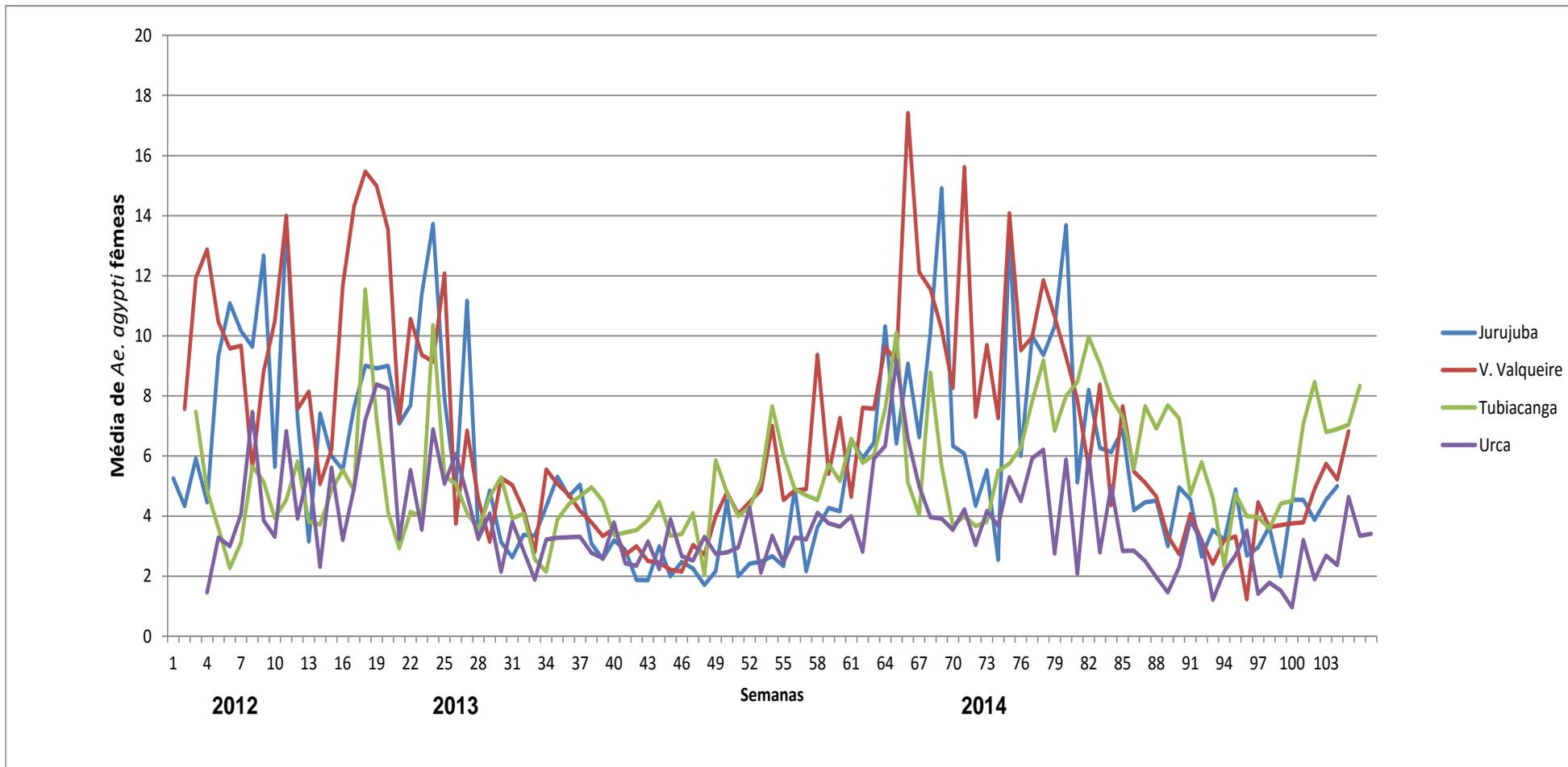


Figura 12: Média de fêmeas de *Ae. aegypti* por armadilha BGS-Trap, por semana.

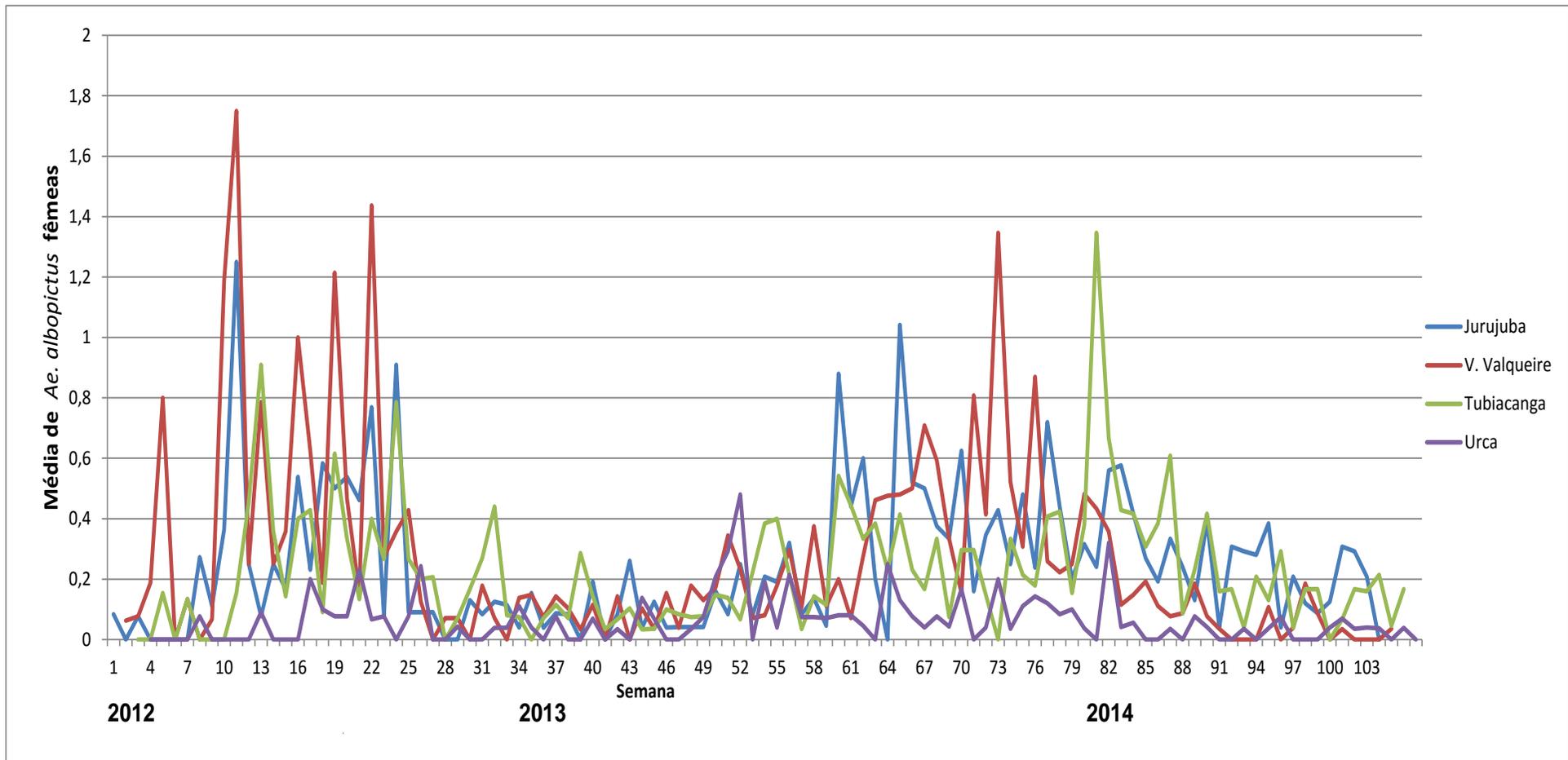


Figura 13: Média de fêmeas de *Ae. albopictus* por armadilha BGS-Trap, por semana.

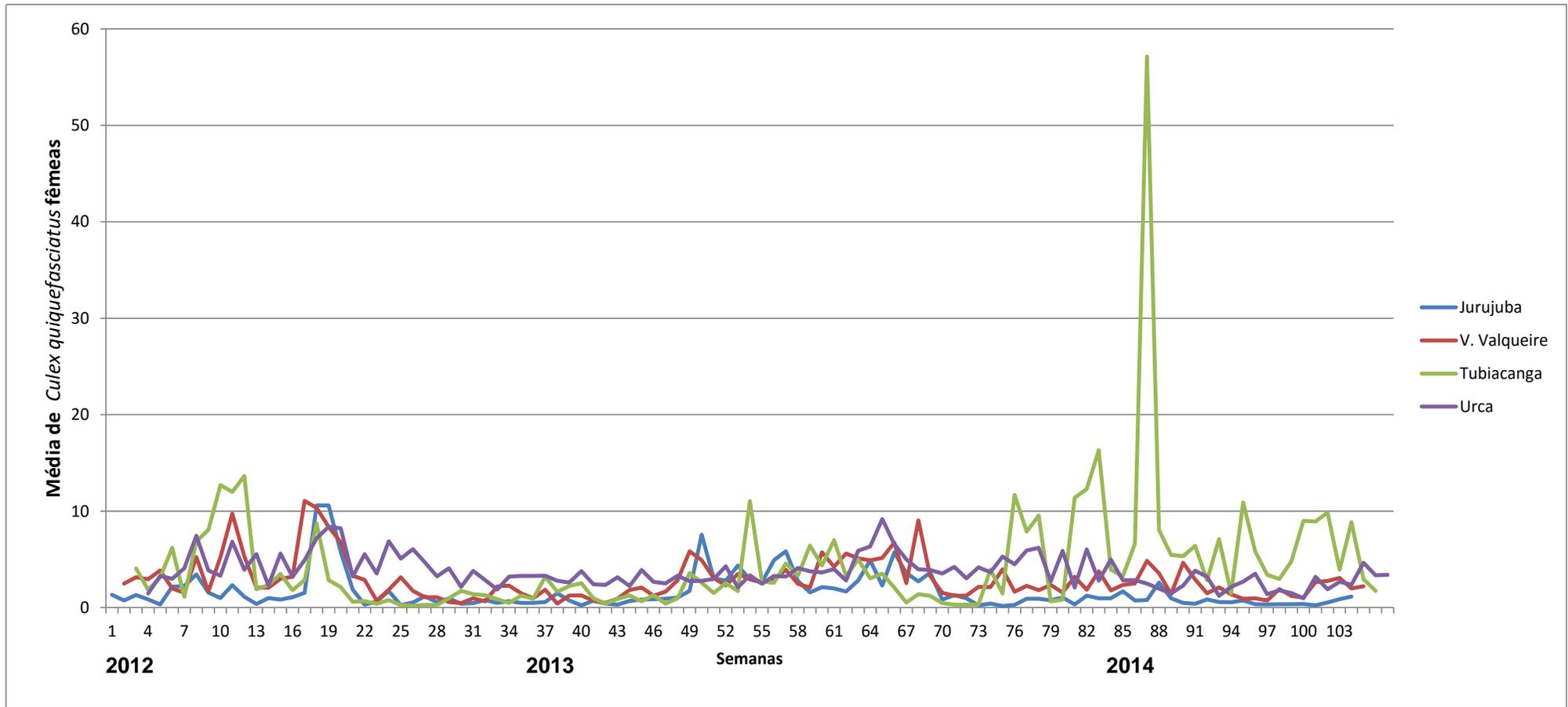


Figura 14: Média de fêmeas de *Culex quinquefasciatus* por armadilha BGS-Trap, por semana.

## 5.2. Probabilidade de Sobrevivência Diária

Durante os nove dias de coleta em Vila Valqueire um total de 573 *Ae. aegypti* foram coletados. Destes, a grande maioria (n=475, equivalendo a 82,9%) foi de indivíduos não marcados. Ao longo dos nove dias coletamos 98 fêmeas marcadas, resultando numa taxa de recaptura de 5,66%. Destes, 67 (68,4%) foram capturados com aspiradores, enquanto o restante foi recuperado a partir de armadilhas colantes (Tabela 3).

Tabela 3: Fêmeas de *Ae. aegypti* marcados e não marcados coletados em Vila Valqueire e Jurujuba usando aspirador e armadilhas colantes.

Dias de coleta	Vila Valqueire				Jurujuba			
	Aspirador		Armadilha colante		Aspirador		Armadilha colante	
	Marcado	Não-Marcado	Marcado	Não-Marcado	Marcado	Não-Marcado	Marcado	Não-Marcado
1	24	38	4	12	12	4	9	6
2	12	70	6	7	9	8	12	1
3	9	24	5	9	4	12	10	3
4	5	35	5	5	8	5	6	1
5	11	47	4	3	2	3	4	2
6	3	24	3	9	3	3	3	2
7	2	58	2	10	3	1	1	5
8	0	56	1	4	2	6	3	5
9	1	57	1	7	1	6	3	6
Total	67	409	31	66	44	48	51	31

Em Jurujuba foram capturados 174 *Ae. aegypti*, também em um período de 9 dias de coleta, sendo que 45,4% deles eram nativos, ou seja, sem nenhum vestígio de marcação. Dos 95 mosquitos marcados, 44 (46,3%) foram coletados com aspiradores, e 51 (53,7%) em armadilhas colantes, que somados geraram uma taxa de recaptura de 3,17% (Tabela 3). A taxa de recaptura foi muito mais elevada em Vila Valqueire do que em Jurujuba. Em Vila Valqueire observamos taxas de recaptura muito semelhantes para ambos as coortes, no entanto, para Jurujuba a taxa de recaptura da coorte alimentada foi quase o dobro da coorte não alimentada (Tabela 4).

Com estas informações pudemos observar as duas coortes juntas de cada área, em Jurujuba a sobrevivência diária é maior que em Vila Valqueire.

Tabela 4: Experimento de Marcação, Soltura e Recaptura mostrando a taxa de captura e sobrevivência das diferentes coortes nas duas áreas.

	Vila Valqueire			Jurujuba		
	Coorte A (alimentada)	Coorte B (não alimentada)	Somatório (Coorte A + B)	Coorte A (alimentada)	Coorte B (não alimentada)	Somatório (Coorte A + B)
<b>Número de fêmeas liberadas</b>	<b>530</b>	<b>1200</b>	<b>1730</b>	<b>900</b>	<b>2100</b>	<b>3000</b>
<b>Taxa de captura (%)</b>	<b>5,47</b>	<b>5,58</b>	<b>5,66</b>	<b>4,56</b>	<b>2,48</b>	<b>3,1</b>
<b>Sobrevivência método exponencial</b>	<b>0,80</b>	<b>0,72</b>	<b>0,73</b>	<b>0,73</b>	<b>0,84</b>	<b>0,81</b>
<b>Sobrevivência método não-linear</b>	<b>0,82</b>	<b>0,74</b>	<b>0,74</b>	<b>0,74</b>	<b>0,84</b>	<b>0,81</b>
<b>Intervalo de sobrevivência</b>	<b>0,77 - 0,86</b>	<b>0,69-0,79</b>	<b>0,70-0,77</b>	<b>0,68-0,81</b>	<b>0,78- 0,91</b>	<b>0,78- 0,84</b>
<b>Média da expectativa de vida (dias)</b>	<b>3,83 - 6,63</b>	<b>2,69-4,46</b>	<b>2,86 - 3,96</b>	<b>2,59-4,95</b>	<b>7,43 -10,6</b>	<b>4,07 - 6,11</b>

A partir de nossos dados de MSR, o modelo não-linear forneceu estimativas mais elevadas de PDS que o modelo exponencial. Isso era esperado porque aquele modelo corrige a remoção de mosquitos coletados nos dias anteriores. Os mosquitos liberados em Jurujuba tiveram uma taxa de sobrevivência maior do que aqueles liberados em Vila Valqueire (teste t de Student,  $t = 6,75$ ,  $df = 1$ ,  $P < 0,001$ ). No último local, os mosquitos liberados logo após alimentação tiveram melhor sobrevida, com o PDS 10,27% maior do que para aqueles soltos não alimentados. No entanto, observamos um padrão oposto em Jurujuba, onde a PDS da coorte B (não alimentados) foi 13,76% maior do que a de coorte A (alimentados). Observamos variação nas estimativas média de expectativa de vida (ALE) entre os dois locais de campo, e entre as diferentes coortes liberadas nos mesmos locais. Portanto, em Jurujuba a expectativa de vida foi maior do que em Vila Valqueire em cerca de dois dias (Tabela 4)

### **5.3. Duração do Ciclo Gonotrófico**

Liberamos em Vila Valqueire 1730 mosquitos, sendo 530 alimentados e 1200 não alimentados e em Jurujuba foram 900 alimentados e 2100 não alimentados.

Para as duas áreas o dia 1 foi o dia de soltura, logo a primeira captura ocorreu no dia 2.

Em Jurujuba pudemos observar que no primeiro dia de coleta já foram capturadas fêmeas grávidas da coorte liberada já alimentada (coorte A) (Figura 15), mas o maior número foi no terceiro dia (segunda coleta), enquanto que para a coorte não alimentada (coorte B) (Figura 15) encontramos no terceiro dia a primeira fêmea grávida, mas seu pico foi alcançado nos dias 3-4 pós-soltura. O grupo de fêmeas soltas alimentadas teve um pico (numero de fêmeas grávidas) que precedeu aquele das fêmeas soltas como não-alimentadas. Uma vez que o número de fêmeas marcadas em estágio de desenvolvimento de ovário sendo classificadas como grávidas foi baixo em Jurujuba, nossa estimativa de duração do ciclo gonotrófico deve ser vista com cautela.

O número de mosquitos soltos foi de 3000 e coletadas grávidas (estágio V do ovário) foram 24 da coorte alimentada e 34 da não alimentada.

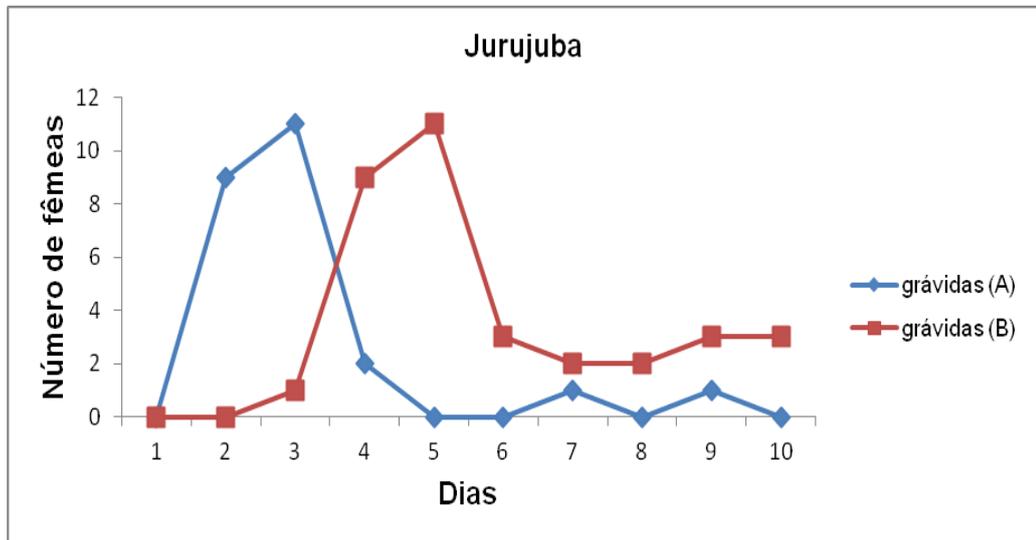


Figura 15: Número de fêmeas capturadas grávidas por dia de coleta: A= liberadas alimentadas e B= liberadas não alimentadas.

Em Vila Valqueire observamos que fêmeas liberadas alimentadas já estavam grávidas no segundo dia de coleta (dia 3) (Figura 16). Para a coorte de fêmeas não alimentadas tivemos dois picos de coletas: um no segundo dia de coleta (dia 3) e outro no quinto dia de coleta (dia 6) (Figura 16). Logo, não podemos afirmar se as fêmeas coletadas neste segundo pico estão no primeiro ciclo ou no segundo, uma vez que vimos que mesmo para a coorte B nós capturamos fêmeas grávidas no segundo dia de coleta. Com os dados de Vila Valqueire teremos que ser cautelosos para estimar a duração do ciclo gonotrófico uma vez que tivemos poucos indivíduos recuperados

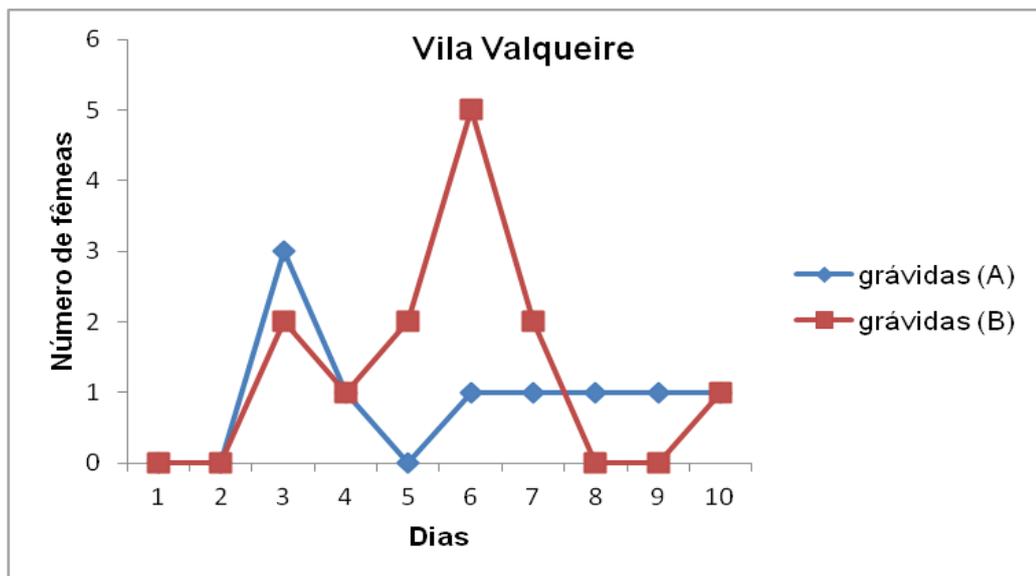


Figura 16: Número de fêmeas capturadas grávidas por dia de coleta: A= liberadas alimentadas e B= liberadas não alimentadas.

#### 5.4. Modelagem da potencial invasão da *w*Mel nas quatro localidades

As informações obtidas em campo, com o monitoramento das BGS-Trap e experimentos de MSR, ou seja, densidade e sobrevivência, foram utilizadas em modelos matemáticos para simular a soltura semanal de *Ae. aegypti* infectado com *w*Mel em cada localidade. Uma modelagem inicial teve uma taxa de 96% da transmissão materna da *w*Mel e um encurtamento de vida de 10% associado à infecção (Walker et al. 2011). Em uma simulação, cerca de 200 mosquitos liberados levou a *Wolbachia* a se estabelecer em 50 dias (sete semanas) em Tubiacanga e Urca. Já para Jurujuba foi necessária uma soltura de 300 fêmeas para que a infecção por *Wolbachia* chegasse a 100% em 100 dias. Para Vila Valqueire foi necessária a liberação de 400 fêmeas por semana para a invasão completa, e isso ocorreu dentro de 100 dias (Figura 17).

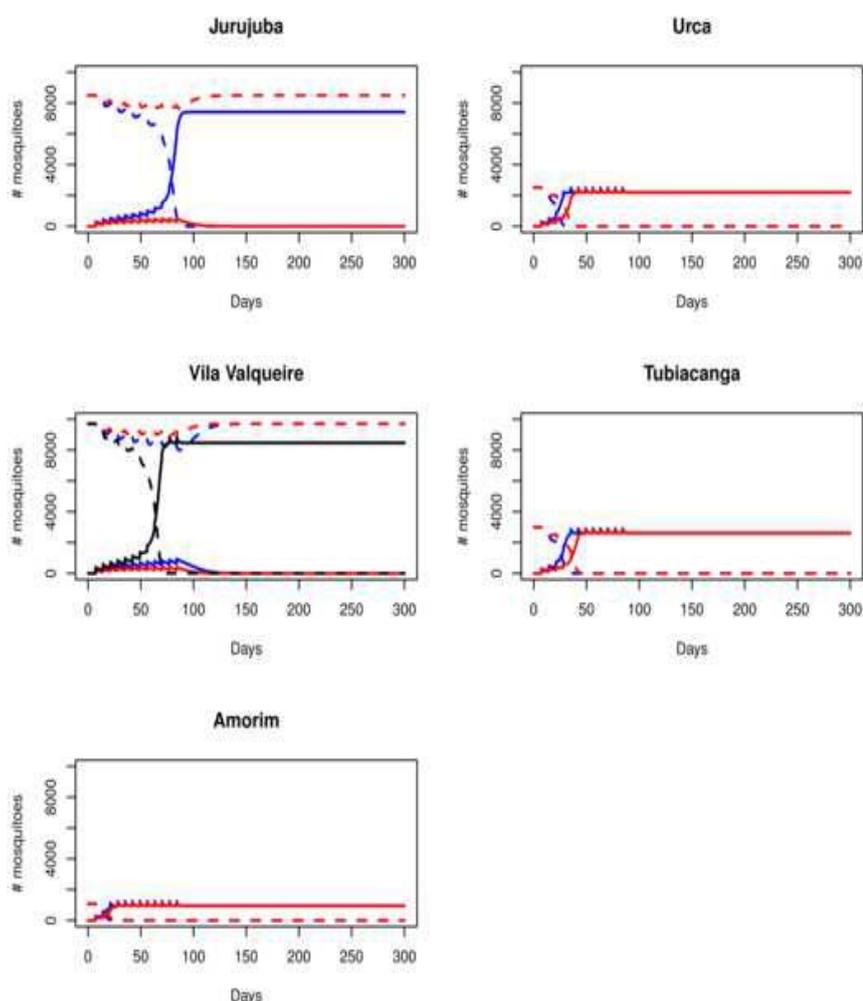


Figura 17: Modelagem da potencial invasão de *w*Mel nas diferentes localidades. Linhas tracejadas são os mosquitos sem *Wolbachia* e linhas sólidas são os que possuem a bactéria. Azul: 200, vermelho 300 e preto 400 mosquitos liberados para o sucesso da invasão.

## 6. DISCUSSÃO

O uso da bactéria *Wolbachia* para controlar a transmissão da dengue é um método novo e promissor, em especial por fazer uso de um agente de controle biológico do vetor. Entretanto, esta ferramenta ainda carece de avaliações consistentes a respeito de sua eficácia, além de aspectos relevantes da biologia do *Ae. aegypti* que podem ser inseridos às liberações, permitindo assim incorporar maior racionalidade aos desenhos experimentais nesta temática.

Nos dias atuais, o uso da *Wolbachia* ainda se restringe a testes de campo em áreas pequenas ou isoladas de poucos países, a conferir: Austrália, Vietnam, Indonésia, Brasil e Colômbia. A partir do momento em que a *Wolbachia* se mostrar viável, inevitavelmente seu uso se expandirá. Mas antes disso, alguns aspectos da biologia de campo do *Ae. aegypti* são fundamentais, em especial se forem estimadas nas áreas onde se planeja efetuar a liberação de mosquitos com *Wolbachia*. Nas Américas, por exemplo, o primeiro lugar que recebeu mosquitos com *Wolbachia* foi o bairro de Tubiacanga, na Ilha do Governador, onde há cerca de 10 anos o Laboratório de Transmissores de Hematozoários do Instituto Oswaldo Cruz realiza trabalhos de campo. A liberação dos mosquitos nessa localidade se iniciou em setembro de 2014 e foi finalizada em janeiro de 2015. O projeto possui autorização do CONEP para efetuar liberações em mais três áreas do Rio de Janeiro (Urca, Vila Valqueire e Jurujuba), todas examinadas nessa dissertação e no Anexo II.

De um modo geral, podemos assumir que a principal conclusão desta dissertação mostra que aspectos relevantes da biologia do *Ae. aegypti* como densidade populacional e sobrevivência podem variar enormemente entre áreas com diferentes características geográficas, mas que ainda assim permitiriam a disseminação da *Wolbachia*. Ainda assim, é importante conhecer as características urbanas, fatores demográficos da população humana, e a bionomia de populações naturais de *Ae. aegypti* para propor desenhos racionais de liberação deste mosquito em campo. Com isso, é preciso conhecer os componentes chaves para o processo de soltura, como, o número de mosquitos necessários para liberação, o número de pontos de liberação, o comprimento do período de soltura para adaptar a cada localidade individualmente e a longevidade que os mosquitos com *Wolbachia* terão em condição de campo.

Para a *Wolbachia* invadir com sucesso uma determinada área, os mosquitos infectados devem apresentar um alto nível de incompatibilidade citoplasmática (Sinkins 2004), fato que poderia compensar uma transmissão materna imperfeita da bactéria (Turelli 2010). A

linhagem *wMelBR*, originária a partir do cruzamento entre machos brasileiros de campo e fêmeas australianas com *Wolbachia*, apresenta elevada incompatibilidade citoplasmática, indicando que os mosquitos infectados teriam grande vantagem reprodutiva em relação aos de campo, requisito *sine qua non* para que a *Wolbachia* se dissemine pela população. A capacidade da *Wolbachia* se fixar em populações de mosquitos selvagens tem sido previamente examinada usando modelos teóricos (Hancock e Godfray 2012). No entanto, nenhum deles têm considerado como conduzir os experimentos em grandes cidades heterogêneas como Rio de Janeiro, de forma que a probabilidade de uma cepa de *Wolbachia* seja melhor disseminada. Para testar os efeitos das diferenças entre os distritos, buscamos caracterizar os quatro locais de campo no Rio de Janeiro, e as populações de mosquito das residências seguidos de modelos matemáticos preditivos de como essas diferenças poderiam afetar a invasão por *Wolbachia*.

Através da realização das coletas de mosquitos ao longo de um período de dois anos, fomos capazes de fazer estimativas de tamanho das populações de mosquitos existentes, que variou muito entre os quatro locais de campo. A média semanal das coletas de mosquitos não se correlacionou com o índice de desenvolvimento dos lugares. Dos quatro locais onde as coletas foram feitas por 104 semanas, Vila Valqueire teve a maior taxa de coleta de *Ae. aegypti*, enquanto que a Urca teve a menor. Interessantemente, estes dois locais apresentam o maior índice de desenvolvimento das nossas quatro áreas. Ambos os locais contêm casas grandes e apartamentos, têm água encanada e coleta de lixo organizado.

Tauil (2001) diz que no Rio de Janeiro maiores níveis de infestação de *Ae. aegypti* estão associados a alta densidade humana. Entretanto, vimos que em Vila Valqueire, a localidade com maior número de mosquitos coletados, é o bairro que possui justamente a menor densidade humana. O segundo bairro onde houve mais coleta, Tubiacanga, possui uma densidade humana em torno de quatro vezes maior que a de Vila Valqueire. Logo, não parece haver uma relação linear e direta entre densidade humana e nível de infestação.

O fator mais importante que influencia a propagação de *Wolbachia* em qualquer um dos locais de campo foi a densidade de mosquito local. De acordo com a simulação utilizando nossos dados locais, quanto maior a infestação, maior deve ser o número de mosquitos com *Wolbachia* a ser liberado para maximizar a probabilidade de invasão da bactéria (Hancock e Godfray (2012).

Os nossos modelos indicaram que dois locais de campo, Tubiacanga e Vila Valqueire, tinham maior abundância de *Ae. aegypti* do que Jurujuba e Urca. Há várias explicações possíveis para as diferenças que observamos neste sentido. Poderia ter havido diferenças no número, localização e disponibilidade de locais de reprodução, as diferenças na probabilidade

de encontrar um hospedeiro, as diferenças de medidas de controle do mosquito, ou nas condições ambientais. Todos estes fatores não podiam ser diretamente considerados em nossos modelos. Curiosamente, nossos dados não indicam que houve uma forte relação entre a PDS e abundância.

Por outro lado, se olhamos para as espécies não-alvo da estratégia da *Wolbachia*, podemos observar que o *Ae. albopictus* esteve em baixíssimas densidades ao longo de todo o período de estudo, nas quatro áreas. Com relação ao *Culex quinquefasciatus*, na Urca, por exemplo, foi coletado um número quase 7 vezes superior desta espécie quando comparado com Jurujuba. Como a liberação de *Ae. aegypti* em Tubiacanga se encerrou em Janeiro de 2015, teremos uma série histórica maior da qual poderemos observar se a densidade de *A. albopictus* e/ou *Cx. quinquefasciatus* foi modificada pela presença da *Wolbachia*.

Em nossos experimentos de MSR observamos que a taxa de recaptura dos mosquitos foi de aproximadamente duas vezes maior para Vila Valqueire em relação a Jurujuba. Os mosquitos da coorte alimentada foram recapturados em uma taxa muito maior do que a coorte não alimentada em Jurujuba, mas não houve diferença significativa na taxa de recaptura entre as duas coortes na Vila Valqueire. É possível que esta diferença na taxa de recaptura tenha ocorrido devido a um efeito micro-ambiental específico em Jurujuba que diferencialmente afetou as duas coortes. Também foi observada variação na sobrevivência, com a PDS de mosquitos da coorte A (alimentada) maior que da coorte B (não-alimentada) em Vila Valqueire, mas com um padrão oposto em Jurujuba. Isto sugere que podem existir certas condições presentes em alguns locais do campo onde seria vantajoso liberar indivíduos alimentados com sangue. Experimentos semelhantes devem ser conduzidos com mosquitos com *wMel* para determinar se há vantagem em liberar fêmeas alimentadas com sangue portando *Wolbachia*.

Foi observada grande variação na taxa de sobrevivência diária de mosquitos entre os quatro locais de campo. A PDS mais alta (0,81) foi observada no bairro de Jurujuba, enquanto a menor PDS de 0,60 foi na Urca, que tem o mais alto nível de desenvolvimento social. Isto sugere que o desenvolvimento de uma área em particular pode ter algum efeito sobre a sobrevivência de mosquitos locais como, por exemplo, maior aquisição de inseticida doméstico. Ainda assim, o efeito que diferentes taxas de sobrevivência podem ter na invasão da *Wolbachia* ainda parecem menores frente ao efeito causado pela densidade vetorial.

A probabilidade de sobrevivência diária foi maior em uma favela quando comparado a um bairro suburbano no Rio de Janeiro (Maciel-de-Freitas et al. 2007c), e ainda menor quando comparada com bairro de alto padrão (David et al. 2009). Além disso, também foi visto que o efeito da sazonalidade na PDS foi inexistente. A menor PDS observada no bairro

de alta renda, em comparação com a comunidade e área suburbana, é provavelmente o resultado final de diversos componentes e o aspecto mais óbvio seria a menor densidade humana na Urca, além da ausência de grandes reservatórios para armazenamento de água, ainda abundantes na favela e na área suburbana (Maciel-de-Freitas et al. 2007b, David et al. 2009). Maciel-de-Freitas et al. (2007b) observaram uma tendência para maior sobrevivência de *Ae. aegypti* em áreas com alta densidade humana. Em áreas com grande adensamento, como em comunidades, os mosquitos não precisam se deslocar por grandes distâncias para encontrar uma fonte sanguínea, o que poderia aumentar a chance de ser morto pelo comportamento defensivo do hospedeiro, ou fatores ambientais tais como vento e variações diárias de temperatura e chuva (Clements e Peterson 1981).

Nossos modelos indicam que a frequência de *wMel* nas populações avaliadas poderia alcançar 100% em todas as áreas, com apenas um pequeno número de mosquitos necessário para serem liberados a cada semana (Anexo II). Os modelos indicaram ainda que uma taxa de transmissão materna imperfeita seria um fator determinante na dinâmica de invasão. Um aumento na transmissão materna de 96 para 99%, por exemplo, levou a uma diminuição do número de mosquitos necessários e redução no tempo suficiente para a infecção por *Wolbachia* se disseminar pela população.

Uma outra simulação foi realizada após aumentar o custo no *fitness* associado com *wMel*, de 10% para 33% de sua longevidade com a bactéria. Nestas condições, o número de mosquitos necessários para a liberação semanal aumentou drasticamente. Em Urca e Tubiacanga, o número necessário foi de 900 fêmeas, com uma taxa de invasão de 100% a ser alcançado dentro de 50 e 100 dias, respectivamente, nos dois locais. Para Jurujuba e Vila Valqueire, o número de soltura necessária seria entre 1.500 e 2.000 fêmeas, respectivamente, e em ambos os casos, foi previsto para a *Wolbachia* se espalhar dentro de 100 dias (Anexo II).

Logo após, foi considerado uma transmissão materna de 99% e encurtamento de vida de 10% e mesmo com esse aumento da transmissão materna não houve efeito na invasão da *Wolbachia* em Tubiacanga e Urca. No entanto, em Jurujuba e Vila Valqueire o número de mosquitos liberados para se alcançar uma infecção estável foi diminuído e o tempo para alcançar uma infecção estável foi menor. Se o encurtamento de vida subir para 33%, mesmo com o aumento da transmissão materna, seria necessário aumentar o número de mosquitos liberados para aumentar a frequência de infecção por *Wolbachia*.

Há alguns fatores que não foram considerados em nossos modelos que poderiam contribuir para diferenças na abundância dos mosquitos de campo entre os locais como, por exemplo, as diferenças sazonais não foram levadas em conta. Mas um valor de média que contemplasse todas as coletas desenvolvidas por 104 semanas.

Além disso, os dados de MSR, que foi utilizado para calcular a sobrevivência, foram obtidos a partir de experimentos realizados por um período relativamente curto de tempo, e poderia ter sido influenciado por efeitos sazonais. Como os experimentos MSR em Jurujuba e Vila Valqueire foram realizados separadamente daqueles outros locais, extrapolações feitas a partir de experimentos de MSR devem ser feitas com cautela.

A duração do ciclo gonotrófico visto para Vila Valqueire e Jurujuba teve estimativas de acordo com o que se tem registro na literatura. Pant e Yasuno (1973) viram, por exemplo, que a duração do ciclo gonotrófico de *Ae. aegypti* em Bangkok era de 3-4 dias. Apesar de ser uma característica muito relevante da bionomia do *Ae. aegypti*, este padrão tem sido muito pouco estudado. Sendo assim, precisamos recorrer a outras espécies em busca de um entendimento maior de nossos resultados.

A duração do ciclo gonotrófico pode ser influenciada pela temperatura ambiental e pelo tempo gasto para alimentação sanguínea e oviposição que dependem da disponibilidade de hospedeiro e local para ovipor (Haramis e Foster 1990). Ao comparar a duração do ciclo de outras espécies pudemos ver que Lardeux et al. (2008) analisaram a duração do ciclo gonotrófico para *Anopheles pseudopunctipennis* em diferentes temperaturas em laboratório e observou que mesmo a 12°C uma de suas coortes foi capaz de desenvolver seus ovos, adotando-se este o limite mínimo de temperatura para esta espécie. Também viram uma longevidade maior em baixas temperaturas como 15°C e maior mortalidade a 25°C podendo viver o suficiente para transmissão em baixas temperaturas.

Em *Aedes triseriatus*, um mosquito que tem um habitat silvestre, Haramis e Foster (1990) viram que para um grupo de fêmeas liberadas não alimentadas e tampouco inseminadas em um bosque na Colômbia, não houveram fêmeas inseminadas no primeiro dia após soltura, aumentando-se para 50% no terceiro dia. Em laboratório, eles viram que a duração do ciclo desta espécie é de 5 dias a 22°C, e confirmaram isso liberando em campo fêmeas recém alimentadas, ou seja, recapturaram fêmeas grávidas após estes dias. Já para as não alimentadas e não inseminadas, foram encontradas fêmeas prontas para ovipor, oito dias após a soltura. Estima-se que esta diferença em dias tenha sido devido a precisarem de mais tempo para se inseminar e se alimentar para a partir de isto iniciar seu ciclo gonotrófico.

## 7. CONCLUSÃO

Com as informações coletadas e mostradas acima, fomos capazes de estimar que aspectos da biologia do *Aedes aegypti* apresentam importantes diferenças entre as áreas, como já suspeitávamos. Desta maneira, acreditamos que a dinâmica de invasão da *Wolbachia* será bastante influenciada pela biologia dos mosquitos nas áreas selecionadas. Como era objetivo da dissertação simular como seria a disseminação da *Wolbachia* em uma área heterogênea, onde esses ambientes estarão presentes usamos modelos matemáticos de invasão já descritos, que foram alimentados com os dados estimados nesse projeto (Anexo II).

Nossos resultados sugerem que a cepa *wMel* provavelmente será capaz de invadir com sucesso quatro locais distintos de campo nos arredores da cidade do Rio de Janeiro, Brasil. Nossos dados de MSR indicaram que houve diferenças na probabilidade de sobrevivência diária para os mosquitos nos diferentes locais. Observamos que *wMel* foi capaz de se espalhar de forma mais eficaz quando a população de mosquitos locais foi menor, mas que também poderia se espalhar em locais que têm populações de mosquitos mais abundantes, como observamos com Vila Valqueire. Estes dados suportam a hipótese de que as liberações seriam mais eficazes durante a estação seca, quando a população do mosquito é naturalmente menor (Hoffmann et al. 2011).

Mostramos que os locais de campo no Rio de Janeiro são paisagens complexas que suportam populações de mosquitos de tamanhos muito diferentes, e isso pode afetar a dinâmica da *Wolbachia*. No entanto, as diferenças entre locais não servem como um impedimento para o sucesso global da invasão por *wMel*. Apesar disso, pode ser benéfico caracterizar adequadamente locais do campo antes da liberação de mosquitos infectados com *Wolbachia*. Fatalmente, isso irá ajudar a determinar a estratégia de liberação ideal, aumentando a racionalidade inerente a esse processo.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alto BW, Reiskind MH, and Lounibos LP 2008. Size Alters Susceptibility of Vectors to Dengue Virus Infection and Dissemination. *Am J Trop Med Hyg*.

Baldini F, Segata N, Pompon J, Marcenac P, Shaw WR ET al. 2014. Evidence of natural Wolbachia infections in field populations of *Anopheles gambiae*. *Nature*.

Barata EAM, Costa AIP, Chiaravalloti-Neto F, Glasser CM, Barata JMS, Natal, D 2001. Populações de *Aedes aegypti* (L.) em área endêmica de dengue, Sudeste do Brasil. *Rev. Saúde Pública, São Paulo* v.35, n.3, p.237- 242.

Barreto FR, Teixeira MG, Costa MC N, Carvalho MS, Barreto ML 2008. Spread pattern of the first dengue epidemics in the City of Salvador, Brazil. *BMC Public Health* v.8.

Barreto ML e Teixeira MG 2008. Dengue no Brasil: situação epidemiológica e contribuições para uma agenda de pesquisa. *Estudos avançados* 22 (64).

Barnes RD, Ruppert EE, Fox RS 2005. *Zoologia de invertebrados*. 4ª ed., Rocca, São Paulo.

Barrera R , Amador M, Diaz A , Smit HJ, Munoz-Jordan J. L. and Rosario Y 2008. Unusual productivity of *Aedes aegypti* in septic tanks and its implications for dengue control. *Medical and Veterinary Entomology* 22, 62–69.

Barton NH, Turelli M 2011. Spatial waves of advance with bistable dynamics: cytoplasmic and genetic analogues of Allee effects. *Am Nat* 178: E48–E75.

Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, et al. 2013. The global distribution and burden of dengue. *Nature* 496: 504–507.

Braga JÁ, Valle D 2007a. *Aedes aegypti*: vigilância, monitoramento da resistência e alternativas de controle no Brasil. *Epidemiol Serv Saúde* 295-302.

Braga e Valle 2007b. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. *Epidemiol Serv Saúde* 16(4): 279-293.

Bracco JE, Capurro ML, Lourenço-de-Oliveira R, Sallum MA 2007. Genetic variability of *Aedes aegypti* in the Americas using a mitochondrial gene: evidence of multiple introductions. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 102: 573–580.

Braks MAH, Honorio NA, Lourenço-de-Oliveira R, Juliano AS, Lounibos LP 2003. Convergent habitat segregation of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in southeastern Brazil and Florida. *J Med Entomol* 40:785-794.

- Briegel H, Knüsel I, Timmermann SE 2001. *Aedes aegypti*: size, reserves, survival, and flight potential . Journal of Vector Ecology. 26 , 21 – 31 .
- Buonaccorsi JP, Harrington LC, Edman JD 2003. Estimation and comparison of mosquito survival rates with release-recapture-removal data. J Med Entomol 40:6-17.
- Chavasse DC, Yap HH 1997. Chemical methods for the control of vectors and pests of public health importance. World Health Organization.
- Chen A, Rogan WJ. Nonmalarial infant deaths and DDT use for malaria control 2003. Emerging Infectious Diseases 9(8):960-964.
- Clements AN 1963. The physiology of mosquitoes. International Series of Monographs on pure and applied biology. The Macmillan Company - NY, 393 pp.
- Clements AN, Paterson GD 1981. The analysis of mortality and survival rates in wild populations of mosquitoes. J Appl Ecol 18: 373-399.
- Coura JR 2005. Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias. Guanabara Koogan.
- Consoli RAGB, Lourenço-de-Oliveira R 1994. Principais Mosquitos de Importância Sanitária no Brasil, Fiocruz, Rio de Janeiro.
- Christophers SR 1911. The development of the egg follicle in anophelines. Paludism 2: 73-89.
- Cunha SP, Carreira Alves JR, Lima MM, Duarte JR, Barros LCV, Silva JL, Gammara AT, Monteiro Filho OS, Wanzeler AR 2002. Presença de *Aedes aegypti* em Bromeliaceae e depósitos com plantas no município do Rio de Janeiro, RJ. Rev Saude Publica 36: 244-245.
- David MR, Lourenço-de-Oliveira R, Maciel-de-Freitas R 2009. Container productivity, daily survival rates and dispersal of *Aedes aegypti* females in a high income dengue epidemic neighborhood of Rio de Janeiro: presumed influence of differential urban structure on mosquito biology. Mem Inst Oswaldo Cruz. 104: 927-932.
- Degener CM, Ázara TMF, Roque RA, Codeço CT, Nobre AA , JJ Ohly , Geier M, Eiras AE 2014. Temporal abundance of *Aedes aegypti* in Manaus, Brazil, measured by two trap types for adult mosquitoes. Mem Inst Oswaldo Cruz vol. 109(8): 1030-1040.
- Dye C 1990. Epidemiological significance of vector-parasite interactions. Parasitol 101: 409-415.
- Donalísio MR, Glasser CM 2002. Vigilância Entomológica e Controle de Vetores do Dengue. Rev. Bras. Epidemiol vol. 5, nº 3.
- Dutra HLC 2014. Aspectos biológicos da infecção pelas cepas wMel e wMelPop de *Wolbachia* sobre Populações Naturais de *Aedes aegypti* do Rio de Janeiro. Dissertação de Mestrado.

Edman JD, Strickman D, Kittayapong P, Scott T 1992. Females *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Thailand rarely feed on sugar. J Med Entomol.

Fávaro EA, Dibo MR, Mondini A, Ferreira AC, Barbosa AAC, Eiras AE, et al. 2006. Physiological state of *Aedes (Stegomyia) aegypti* mosquitoes captured with MosquiTRAPs in Mirassol, São Paulo, Brazil. J Vector Ecol 31:285-91.

Focks DA 2003. A review of entomological sampling methods and indicators for dengue vectors. Geneva: World Health Organization. Available from: [http://www.who.int/tdr/publications/publications/pdf/dengue\\_vectors.pdf](http://www.who.int/tdr/publications/publications/pdf/dengue_vectors.pdf).

Focks DA, Daniels E, Haile DG, Keesling JE 1995. A simulation model of the epidemiology of Urban dengue fever: literature analysis, Model development, preliminary validation, And samples of simulation results. Am. J. Trop. Med. Hyg 53(5),pp.409-506.

Focks DA, Chadee DD 1997. Pupal survey: an epidemiologically significant surveillance method for *Aedes aegypti*: an example using data from Trinidad. Am J Trop Med Hyg 56: 159-167.

Forattini OP, Marques GRAM 2000. Nota sobre o encontro de *Aedes aegypti* em bromélias. Rev Saude Publica 34: 543-544.

Forattini OP, 2002. Culicidologia Médica. Ed. Universidade de São Paulo,

Franco O 1976. História da Febre Amarela no Brasil. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde.

Fundação Nacional de Saúde (FUNASA) 2002. Programa Nacional de Controle da Dengue-PNCD, Brasília.

Gandini M, Gras C, Azeredo EL, Luzia Maria de Oliveira Pinto LMO, Smith N 2013. Dengue Virus Activates Membrane TRAIL Relocalization and IFN- $\alpha$  Production by Human Plasmacytoid Dendritic Cells In Vitro and In Vivo. PLOS Neglected Tropical Diseases Vol. 7.

Garcia-Rejón JE, Farfan-Ales JÁ, Ulla A, Flores-Flores LF, Rosado-Paredes E 2008. Gonotrophic cycle estimate for *Culex quinquefasciatus* in Mérida, Yucatán, México. Jornal of the American Mosquito Control Association 24(3): 344-348.

Garret-Jones C 1964. The human blood index of malaria vectors in relation to epidemiological assessment. Bull World Health Organ 30: 241-261.

Gillies MT 1961. Studies on the dispersion and survival of *Anopheles gambiae* Giles in East Africa, by means of marking and releasing experiments. Bull Entomol Res 52: 99-127.

Halstead SB 2008. Dengue-virus mosquito interactions. Annu Rev Entomol 53:273–291.

Hamiris LD and Foster WA 1990. Gonotrophic cycle duration, population age structure, and onset of sugar feeding and insemination of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae).

Hancock PA, Godfray HCJ 2012. Modelling the spread of *Wolbachia* in spatially heterogeneous environments. *J R Soc Interface* 9: 3045–3054.

Harrington LC, Edman JD 2001. Indirect evidence against delayed “skip oviposition” behavior by *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Thailand. *J Med Entomol* 38:641-645.

Hemme RR, Thomas CL, Chadee DD, Severson DW 2010. Influence of urban landscapes on population dynamics in a short-distance migrant mosquito: evidence for the dengue vector *Ae. aegypti*. *Public library of Sciences Neglected Diseases*.

Hoffmann AA, Montgomery BL, J. Popovici J, Iturbe-Ormaetxe I, Johnson PH, Muzzi F, Greenfield M, M. Durkan, Leong YS, Dong Y, Cook H, Axford J, Callahan AG, Kenny N, Omodei C, McGraw EA, Ryan PA, Ritchie SA, Turelli M, O’Neill SL 2011. Successful establishment of *Wolbachia* in *Aedes* populations to suppress dengue transmission. *Nature* 476: 454-459.

Honório NA, Cabello PH, Codeço CT, Lourenço-de-Oliveira R 2006. Preliminary data on the performance of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* immatures developing in water-filled tires in Rio de Janeiro. *Mem Inst Oswaldo Cruz* vol. 101(2): 225-228.

Honório NA, Codeço CT, Alves FC, Magalhães MAFM, Lourenço-de-Oliveira R 2009. Temporal distribution of *Aedes aegypti* in three different districts of Rio de Janeiro, Brazil, measured by two types of traps. *J Med Entomol* 46: 1001-1014.

Kröckel U, Rose A, Eiras AE, and Geier M 2006. New tools for surveillance of adult yellow fever mosquitoes: comparison of trap catches with human landing rates in an urban environment. *Journal of the American Mosquito Control Association* 22(2):229-238.

Juliano SA, O’Meara GF, Morrill JR, Cutwa MM 2002. Desiccation and thermal tolerance of eggs and the coexistence of competing mosquitoes. *Oecologia* 130(3): 458–469.

Kuno G 1995. Review of the factors modulating dengue transmission. *Epidemiol Ver* 17: 321-335.

Lardeux FJ, Tejerina RH, Quispe V, Chavez TK 2008. A physiological time analysis of the duration of the gonotrophic cycle of *Anopheles pseudopunctipennis* and its implications for malaria transmission in Bolivia. *Malaria Jornal* 7:141.

Lima-Camara TN, Honório NA, Lourenço-de-Oliveira R 2007. Parity and ovarian development of *Aedes aegypti* and *Ae. Albopictus* (Diptera:Culicidae) in metropolitan Rio de Janeiro. *Jornal of Vector Ecology* 32(1): 34-40.

Lounibos LP 2002. Invasion by insect vectors of human diseases. *Annu Rev Entomol* 47: 233-266.

Lourenço-de-Oliveira R, Vazeille M, Filippis AMB, Failloux AB 2004. *Aedes aegypti* in Brazil: genetically differentiated populations with high susceptibility to dengue and yellow fever viruses. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 98:43-54.

Lourenço-de-Oliveira R 2005. Principais insetos vetores e mecanismos de transmissão das doenças infecciosas e parasitárias, pp. 75-97. In: *Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias*, Volume I. Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1132pp.

Lourenço-de-Oliveira R 2008. Rio de Janeiro against *Aedes aegypti*: yellow fever in 1908 and dengue in 2008. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 103: 627-628.

Luz PM, Codeço CT, Massad E, Struchiner CJ 2003. Uncertainties regarding dengue modeling in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 98:871-8.

Maciel-de-Freitas R, Eiras EE, Lourenço-de-Oliveira 2006. Field evaluation of effectiveness of the BG-Sentinel, a new trap for capturing adult *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101: 321-325.

Maciel-de-Freitas R, Marques WA, Peres RC, Cunha SP, Lourenço-de-Oliveira R 2007a. Variation in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) container productivity in a slum and a suburban district in Rio de Janeiro during dry and wet seasons. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102: 489-496.

Maciel-de-Freitas R, Codeço CT, Lourenço-de-Oliveira R 2007b. Body size-associated survival and dispersal rates of *Aedes aegypti* in Rio de Janeiro. *Med Vet Entomol* 21: 284-292.

Maciel-de-Freitas R, Codeço CT, Lourenço-de-Oliveira R 2007c. Daily survival rates and dispersal of *Aedes aegypti* females in Rio de Janeiro, Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg* 76(4): 659–665.

Maciel-de-Freitas 2010. Avaliação de aspectos da capacidade vetorial de fêmeas de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) no Rio de Janeiro. Tese de doutorado apresentada a Coordenação de Pós Graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz.

Maciel-de-Freitas R, Souza-Santos R, Codeço C, Lourenço-de-Oliveira R 2010. Influence of the spatial distribution of human hosts and large size containers on the dispersal of the mosquito *Aedes aegypti* within the first gonotrophic cycle. *Medical and Veterinary Entomology* v. 24, p. 74-82.

Maciel-de-Freitas R, Lourenço-de-Oliveira R 2011. Does targeting key containers effectively reduce *Aedes aegypti* population density? *Trop Med Int Health* 16: 965–973.

Maciel-de-Freitas R, Aguiar R, Bruno RV, Guimarães MC, Lourenço-de-Oliveira R, Sorgine MHF, Struchiner CJ, Valle D, O'Neill S, Moreira LA 2012. Why do we need

alternative tools to control mosquito-borne disease in Latin America? Mem Inst Oswaldo Cruz 107(6): 828-829.

Maciel-de-Freitas R, Avendanho FC, Santos R, Sylvestre G, Araújo SC, et al. 2014. Undesirable consequences of insecticide resistance following *Aedes aegypti* control activities due to a dengue outbreak. PLoS One 9:e92424.

Martinez-Torres, M. E 1990. Dengue hemorrágico em crianças: editorial. Havana: José Martí, 180p.

McMeniman, C.J., Lane, R.V., Cass, B.N., Fong, A.W., Sidhu, M., Wang, Y.F., and O'Neill, S.L. 2009. Stable introduction of a life-shortening *Wolbachia* infection into the mosquito *Aedes aegypti*. Science 323, 141–144.

Mocellin MG, Simões TC, Nascimento TFS, Teixeira MLF, Lounibos PL, Lourenço-de-Oliveira R 2009. Bromeliad-inhabiting mosquitoes in an urban botanical garden of dengue endemic Rio de Janeiro. Are bromeliads productive habitats for the invasive vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*? Mem Inst Oswaldo Cruz vol. 104(8): 1171-1176.

Mian LS, Mulla MS 1982. Biological and environmental dynamics of insect growth regulators (IGRs) as used against Diptera of public health importance Residue Review 84:27-112.

Min KT, Benzer S 1997. *Wolbachia*, normally a symbiont of *Drosophila*, can be virulent, causing degeneration and early death. Proc Natl Acad Sci U S A 94: 10792–10796.

Monteiro FA, Shama R, Martins AJ, Gloria-Soria A, Brown JE, et al. 2014. Genetic Diversity of Brazilian *Aedes aegypti*: Patterns following an Eradication Program. PLoSNegl Trop Dis 8(9): e3167. doi:10.1371/journal.pntd.0003167

Moreira LA, Iturbe-Ormaetxe I, Jeffery JAL, Lu G, Pyke AT, Hedges LM, Rocha BC, Hall-Mendelin S, Day A, Riegler M, Higo LE, Johnson KN, Kay BH, McGraw EA, Hurk AF, Ryan PA, O'Neill SL 2009. A *Wolbachia* symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with dengue, Chikungunya and *Plasmodium*. Cell 139: 1268-1278.

Mustafa MS, Rasotgi V, Jain S, Gupta V 2014. Discovery of fifth serotype of dengue virus (DENV-5): A new public health dilemma in dengue control. Medical Journal Armed Forces India.

Muir LE and Kay BH 1998. *Aedes aegypti* survival and dispersal estimated by mark-release-recapture in northern Australia. Am J Trop Med Hyg 58(3), pp. 277–282.

Nathan MB, Dayal-Drager R 2007. Recent epidemiological trends, the global strategy and public health advances in dengue. WHO, Scientific Working Group – Report on Dengue. Geneva, Switzerland: WHO, 30-34.

Niebylski ML, Craig GB 1994. Dispersal and survival of *Aedes albopictus* at a scrap tire yard in Missouri. J AM Mosq Control Assoc 10: 339-343.

Nogueira, RMR, Schatzmayr HG, Filippis AMB, Santos FB, Cunha RV, Coelho JO, Souza LJ, Guimaraes FR, Araujo ESM, Simone TS, Teixeira Jr MBJG, and Miagostovich MP. Dengue Virus type 3, Brazil, 2002. Emerging Infectious Diseases v.11, n.9, p.1376-81.

Nogueira RMR, Schatzmayr HG, Filippis AMB, Santos FBS, Cunha RV ET al. 2005. Dengue Virus Type 3, Brazil, 2002. Emerging Infectious Diseases vol. 11, No. 9.

Nogueira RMR, Eppinghaus ALF 2011. Dengue virus type 4 arrives in the state of Rio de Janeiro: a challenge for epidemiological surveillance and control. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro vol. 106(3): 255-256,

Oliveira SL, Carvalho DO, Capurro 2011. Mosquito transgênico: do *paper* para a realidade. Revista da Biologia 6b: 38-43.

Osanaí CH 1984. A epidemia de dengue em Boa Vista, Território Federal de Roraima, 1981-1982. Dissertação de mestrado, Escola Nacional de Saúde Pública, Rio de Janeiro, RJ.

Palchick S 1996. Chemical Control of Vectors In: The Biology of Disease Vectors. Colorado: University Press of Colorado.

Pant CP, Yasuno M 1973. Field studies on the gonotrophic cycle of *Aedes aegypti* in Bangkok, Thailand. J Med Entomol 10:219-223.

Popovici J, Moreira LA, Poinsignon A, Iturbe-Ormaetxe I, McNaughton D, Scott L O'Neill 2010. Assessing key safety concerns of a *Wolbachia*-based strategy to control dengue transmission by *Aedes* mosquitoes. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 105(8): 957-964.

Post LC, Mulder R (1974). Insecticidal properties and mode of action of 1-(2,6-dihagenzoyl)-3-phenylureas CA: American Chemical Society National Meeting.

PNCD-Programa Nacional de Controle da Dengue 2002. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde.

Resende MC, Silva IM, Ellis BR, Eiras AE 2013. A comparison of larval, ovitrap and MosquiTRAP surveillance for *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti*. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 108(8): 1024-1030.

Rey, L. 2008. Parasitologia. 4ª ed. Guanabara.

Rezende GL, Martins AJ, Gentile C, Farnesi LC, Pelajo-Machado M, Peixoto A A 2008. Embryonic desiccation resistance in *Aedes aegypti*: presumptive role of the chitinized sersalcuticle. BMC Develop Biol 8: 82.

Rigáu-Perez JG, Clark GG, Gubler DJ, Reiter P, Sanders EJ, Vorndan AV 1998. Dengue and dengue haemorrhagic fever. The Lancet 352:971-977.

Rodriguez MH, Bown DN, Arredondo-Jimenez, Villarreal C, Loyola EG and Frederickson CE 1992. Gonotrophic cycle and survivorship of *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae) in Southern México. *Jornal of Medical Entomology* Vol.29, nº.3

Rose RI 2001. Pesticides and public health: integrated methods of mosquito management. *Emerg Infect Dis* 7:17-23.

Rozendaal JA 1997 Vector control methods for use by individuals and communities. Geneva: World Health Organization.

Rousch RT, MCKenzie JA 1987. Ecological genetics of insecticide and resistance. *Ann Rev Entomol* 32: 361-380.

Salazar MI, Richardson JH, Sánchez-Vargas I, Olson KE, Beaty BJ 2007. Dengue virus type 2: replication and tropisms in orally infected *Aedes aegypti* mosquitoes. *BMC Microbiol* 7: 9.

Scarpassa VM, Cardoza TB, Junior RPC 2008. Population Genetics and Phylogeography of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Brazil. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 78: 895–903.

Seawright JA, Dame DA, Weidhaas D.E 1977. Field survival and ovipositional characteristics of *Aedes aegypti* and their relation to population dynamics and control. *Mosquito News* 37, 62 – 70.

Simmons CP, Farrar JJ, Chau NVV, Wills Bridget 2012. Dengue. *N Engl J Med* 366: 1423-32.

Sinkins SP 2004. *Wolbachia* and cytoplasmic incompatibility in 811 mosquitoes. *Insect Biochem Mol Biol* 34: 723–729.

Slama K, Romanuk M, Sorm F 1974. *Insect Hormones and Bioanalogues*. New York: Springer Verlag.

Service MW 1993. *Mosquito ecology: field sampling methods*. 2 ed., London. Elsevier Applied Science.

Shepard DS, Coudeville L, Halasa YA, Zambrano B, Dayan GH 2011. Economic impact of dengue illness in the Americas. *Am J Trop Med Hyg* 84: 200–207.

Styer LM, Carey JR, Wang JL, Scott TW 2007a. Mosquitoes do senesce: departure from the paradigm of constant mortality. *Am J Trop Med Hyg* 76: 111-117.

Styer LM, Minnick SL, Sun AK, Scott TW 2007. Mortality and reproductive dynamics of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) fed human blood. *Vector Borne Zoonotic Dis* 7: 86-98.

Tauil P 2001. Urbanização e ecologia do dengue. *Cad Saúde Públ* 17: 99-102.

Teixeira MG, Barreto ML, Guerra Z 1999. Epidemiologia e medidas de prevenção do dengue. *Informe Epidemiol SUS* 8: 5-33.

Teixeira MG, Barreto ML, Guerra Z 1999. Epidemiologia e medidas de prevenção do dengue. Informe Epidemiológico do SUS vol. 8, nº.4, p.5-33.

Teixeira MG, Barreto ML, Guerra Z 2005. Dengue and dengue hemorrhagic fever epidemics in Brazil: what research is needed based on trends, surveillance, and control experiences? Cadernos de Saúde Pública vol.21, nº.5, p.1307-15.

Thomas DD, Donnelly CA, Wood RJ, Alphey LS 2000. Insect population control using a dominant repressible, lethal genetic system. *Science* 287: 2474-2476.

Torrentes-Carvalho A, Azeredo EL, Reis SR, Miranda AS, Gandini M, et al. 2009. Dengue-2 infection and the induction of apoptosis in human primary monocytes. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104: 1091–1099.

Trpis M, Hausermann W 1986. Dispersal and others population parameters of *Aedes aegypti* in an African village and their possible significance in epidemiology of vector-borne disease. *Am J Trop Med Hyg* 35: 1263-1279.

Trpis M, Hausermann W, Craig Jr. GB 1995. Estimates of population size, dispersal, and longevity of domestic *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) by markrelease- recapture in the village of Shauri Moyo in eastern Kenya. *J Med Entomol* 32:27-33.

Tun-Lin W, Lenhart A, Nam VS, Rebollar-Teñlez, E, Morrison, AC, Barbazan P, Cote M, Midega, Sanchez F, Manrique-Saide P, Kroeger A, Nathan MB, Meheus F and Petzold M. 2009. Reducing costs and operational constraints of dengue vector control by targeting productive breeding places: a multi-country non-inferiority cluster randomized trial. *Trop Med Int Health* 14: 1143-1153.

Turelli M 2010. Cytoplasmic incompatibility in populations with 870 overlapping generations. *Evolution* 64: 232–241.

Varejão JBM, Santos CB, Rezende HR, Bevilacqua LC, Falqueto A 2005. Criadouros de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) em bromélias nativas na cidade de Vitória, ES. *Rev Soc Brasil Med Trop* 38: 238-240.

Walker T, Johnson PH, Moreira LA, Iturbe-Ormaetxe I, Frentiu FD, McMeniman CJ, Leong YS, Dong Y, Axford J, Kriesner P, Lloyd AL, Ritchie SA, O'Neill SL, Hoffmann AA 2011. The wMel *Wolbachia* strain blocks dengue and invades caged *Aedes aegypti* populations. *Nature* 476: 450-454.

Ware GW 2000. An introduction to insecticides [monografia na Internet]. 3rd ed. University of Minnesota. Disponível em: <http://ipmworld.umn.edu/chapters/ware.htm>

Werren JH, Baldo L, Clark ME 2008. *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology. *Nature Reviews Microbiology* 6, 741-751.

WHO 1997. Executive committee of the directing council the regional committee Pan  
American World Health 120th Meeting CE120/21.

# ANEXO I

## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

### Dados de identificação

Título do Projeto: Avaliação de alguns aspectos populacionais de *Aedes aegypti* em áreas do Rio de Janeiro

Pesquisador Responsável: Rafael Maciel de Freitas

Instituição a que pertence o Pesquisador Responsável: Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz - RJ

Telefones para contato: (21) 2562-1285 - (21) 2562-1328

Nome \_\_\_\_\_ do \_\_\_\_\_ voluntário:

Idade: \_\_\_\_\_ anos R.G. \_\_\_\_\_  
Responsável legal (quando for o caso): \_\_\_\_\_

R.G. Responsável legal: \_\_\_\_\_

O Sr. (ª) está sendo convidado(a) a participar do projeto de pesquisa "Avaliação de alguns aspectos populacionais de *Aedes aegypti* em áreas do Rio de Janeiro", de responsabilidade do pesquisador Rafael Maciel de Freitas.

Esse projeto de pesquisa tem como principal objetivo avaliar hábitos do mosquito vetor da dengue em diferentes ambientes e bairros no Rio de Janeiro. Estaremos olhando, principalmente, para quantos metros esse mosquito é capaz de voar (dispersão) e por até quantos dias eles podem ser encontrados (sobrevivência/longevidade). Acreditamos que, o raio de voo e a duração dos mosquitos em campo possa ser influenciada por algumas características dos bairros testados, como por exemplo, presença de árvores e plantas, densidade humana, condição de saneamento e se o abastecimento de água é regular. Para isso, vamos recorrer a liberação de mosquitos marcados nos bairros selecionados e acompanharemos seu deslocamento nesses ambientes diariamente.

A marcação empregada consistirá de pó fluorescente, método de aplicação tópica que já é utilizado para esse tipo de estudo a quase 100 anos. Se trata de um método não invasivo e não-prejudicial para os mosquitos e também para os seres humanos. Ou seja, não acarreta qualquer risco para os moradores. A coleta desses mosquitos será realizada diariamente, com o emprego de armadilhas específicas e apropriadas para a captura dos mosquitos. Essas armadilhas permitirão a captura de insetos marcados e insetos não marcados, já presentes no seu bairro. Os moradores que optarem por participar do estudo receberão a visita diária da equipe do projeto, que realizará a coleta dos mosquitos em seu terreno/domicílio. Além disso, terão a disposição o número de telefone do coordenador do projeto para sanar qualquer dúvida referente à metodologia, execução ou resultados deste projeto. Garantimos ainda que todos os moradores que permitirem a coleta dos mosquitos terão suas informações privadas mantidas sob confidencialidade e que os resultados do estudo serão divulgados para os voluntários envolvidos no projeto, assim como, para as autoridades de saúde do Município.

Qualquer dúvida sobre os direitos assegurados por esse termo pode ser esclarecida entrando em contato com o Comitê de Ética (CEP Fiocruz) responsável pela autorização desse estudo, através dos telefones e/ou endereço disponibilizado no rodapé deste documento. Eu, \_\_\_\_\_, RG nº \_\_\_\_\_ declaro ter sido informado e concordo em participar, como voluntário, do projeto de pesquisa acima descrito.

Rio de Janeiro, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Nome e assinatura do voluntário

\_\_\_\_\_  
Testemunha

\_\_\_\_\_  
Testemunha

## **ANEXO II**

RESEARCH ARTICLE

# From Lab to Field: The Influence of Urban Landscapes on the Invasive Potential of *Wolbachia* in Brazilian *Aedes aegypti* Mosquitoes

Heverton Leandro Carneiro Dutra<sup>1</sup>✉, Lilha Maria Barbosa dos Santos<sup>2</sup>✉, Eric Pearce Caragata<sup>1</sup>, Jéssica Barreto Lopes Silva<sup>1</sup>, Daniel Antunes Maciel Villela<sup>3</sup>, Rafael Maciel-de-Freitas<sup>2</sup>, Luciano Andrade Moreira<sup>1\*</sup>

**1** Mosquitos Vetores: Endossimbiontes e Interação Patógeno Vetor, Centro de Pesquisas René Rachou—Fiocruz, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, **2** Laboratório de Transmissores de Hematozoários, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, **3** Programa de Computação Científica, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

✉ These authors contributed equally to this work.

\* [luciano@cpqrr.fiocruz.br](mailto:luciano@cpqrr.fiocruz.br)



**OPEN ACCESS**

**Citation:** Dutra HLC, dos Santos LMB, Caragata EP, Silva JBL, Villela DAM, Maciel-de-Freitas R, et al. (2015) From Lab to Field: The Influence of Urban Landscapes on the Invasive Potential of *Wolbachia* in Brazilian *Aedes aegypti* Mosquitoes. PLoS Negl Trop Dis 9(4): e0003689. doi:10.1371/journal.pntd.0003689

**Editor:** Mark Quentin Benedict, University of Perugia, ITALY

**Received:** November 17, 2014

**Accepted:** March 9, 2015

**Published:** April 23, 2015

**Copyright:** © 2015 Dutra et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

**Funding:** This work was supported by FAPEMIG, CNPq, INCT-EM, the Brazilian Ministry of Health (DECIT/SVS), and a grant to Monash University from the Foundations for the National Institutes of Health through the Vector-Based Transmission of Control: Discovery Research (VCTR) program of the Grand Challenges in Global Health Initiatives of the Bill and Melinda Gates Foundations. LAM is a CNPq fellow. The funders had no role in study design, data

## Abstract

### Background

The symbiotic bacterium *Wolbachia* is currently being trialled as a biocontrol agent in several countries to reduce dengue transmission. *Wolbachia* can invade and spread to infect all individuals within wild mosquito populations, but requires a high rate of maternal transmission, strong cytoplasmic incompatibility and low fitness costs in the host in order to do so. Additionally, extensive differences in climate, field-release protocols, urbanization level and human density amongst the sites where this bacterium has been deployed have limited comparison and analysis of *Wolbachia*'s invasive potential.

### Methodology/Principal Findings

We examined key phenotypic effects of the *wMel* *Wolbachia* strain in laboratory *Aedes aegypti* mosquitoes with a Brazilian genetic background to characterize its invasive potential. We show that the *wMel* strain causes strong cytoplasmic incompatibility, a high rate of maternal transmission and has no evident detrimental effect on host fecundity or fertility. Next, to understand the effects of different urban landscapes on the likelihood of mosquito survival, we performed mark-release-recapture experiments using *Wolbachia*-uninfected Brazilian mosquitoes in two areas of Rio de Janeiro where *Wolbachia* will be deployed in the future. We characterized the mosquito populations in relation to the socio-demographic conditions at these sites, and at three other future release areas. We then constructed mathematical models using both the laboratory and field data, and used these to describe the influence of urban environmental conditions on the likelihood that the *Wolbachia* infection frequency could reach 100% following mosquito release. We predict successful

collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

invasion at all five field sites, however the conditions by which this occurs vary greatly between sites, and are strongly influenced by the size of the local mosquito population.

## Conclusions/Significance

Through analysis of laboratory, field and mathematical data, we show that the *wMel* strain of *Wolbachia* possesses the characteristics required to spread effectively in different urban socio-demographic environments in Rio de Janeiro, including those where mosquito releases from the Eliminate Dengue Program will take place.

## Author Summary

*Wolbachia* are maternally inherited bacterial endosymbionts that induce cytoplasmic incompatibility in mosquitoes, and use this pattern of sterility to facilitate their spread into naïve, uninfected host populations. These bacteria were recently introduced into *Aedes aegypti*, a species naturally free of *Wolbachia*, and the primary vector of dengue virus. *Wolbachia* are currently being used as a biological tool to control dengue transmission in many countries, including Brazil. We performed a series of laboratory and field assays and then created mathematical models in order to understand the invasive ability of the *wMel* *Wolbachia* strain in Brazilian *Ae. aegypti* mosquito populations. We show that *wMel* infection had no detrimental fitness effects on its new Brazilian host, and would theoretically be able to successfully invade the mosquito populations in the five distinct urban landscapes that we studied. We found that *Wolbachia* spread more easily where the local mosquito population was smaller. The size of the local human population did not overtly influence the likelihood of spread. These findings provide insight into how the nature of different urban landscapes will affect the likelihood of *Wolbachia* spreading effectively, which will greatly assist future releases of *Wolbachia*-infected mosquitoes in Brazil as part of the Eliminate Dengue Program.

## Introduction

Dengue is widely considered the most important vector-borne virus, with an estimated 2.5 billion people living at risk of infection in more than 100 countries [1]. The virus is transmitted by mosquitoes from the genus *Aedes*, with *Aedes aegypti* being the primary vector. There are an estimated 100 million new cases of the disease each year, and this imposes a heavy burden on global health and economics, with the average annual cost of the disease estimated to be US \$2.1 billion for the Americas alone [2]. Control efforts are complicated by the current lack of an effective dengue vaccine, the emergence of insecticide resistance in natural vector populations, and the difficulties and costliness associated with maintaining effective suppression of mosquito breeding sites. Consequently, alternative approaches are required in order to restrict dengue transmission [3].

A novel and promising form of biocontrol designed to reduce dengue transmission utilizes the endosymbiotic bacterium *Wolbachia pipientis*, which is naturally present in up to 40% of all insect species [4]. Different strains of this bacterium can cause a variety of phenotypic effects. Of these, the phenotypes of cytoplasmic incompatibility (CI), high bacterial density, and as a result, a high maternal transmission rate are the two main determinants of *Wolbachia*'s "drive" mechanism, which facilitates the spread of the bacterium into field mosquito

populations [5]. CI is a reproductive incompatibility that prevents females without *Wolbachia* from producing viable offspring after copulation with *Wolbachia*-infected males. In contrast, *Wolbachia*-infected females can successfully reproduce after mating with any male. This increases the frequency of *Wolbachia* infection in a given population with each subsequent generation. *Ae. aegypti* is not naturally infected with *Wolbachia*, but has been transinfected with several different *Wolbachia* strains that cause strong CI [6–8]. A further, significant discovery was the fact that some *Wolbachia* strains can prevent or severely restrict infection by key pathogens, including dengue virus, in the host mosquito [7,9]. Together these phenotypes would allow the replacement of wild, dengue-susceptible mosquitoes with dengue-resistant, *Wolbachia*-infected mosquitoes potentially ameliorating the great burden of dengue [10].

The use of *Wolbachia* as a biocontrol tool to reduce dengue transmission is currently being tested in several countries ([www.eliminatedengue.org](http://www.eliminatedengue.org)). Here *Wolbachia*-infected mosquitoes are released in large numbers over a period of weeks, and eventually replace the wild *Ae. aegypti* population. So far, field trials have already been conducted in four sites in Australia, one in Vietnam, and two in Indonesia, while trials in Brazil have been underway since September 2014 using *Ae. aegypti* infected with the *wMel* *Wolbachia* strain. The Brazilian trials are set to take place at four different field sites over the next two years. Critically, there is a great deal of variability in the physical, environmental and socioeconomic conditions between these four sites, and between those from the other countries involved in the project. These differences include factors such as climate, housing and population density, sanitation conditions and the use of piped or stored drinking water. All of these factors can affect the size and characteristics of the already-established wild mosquito populations [11], which in turn determines the number of *Wolbachia*-infected mosquitoes that must be released in order for the bacterium to spread to high frequencies in a given area [12]. As such, it is important to identify these factors and determine if any could potentially limit the invasive potential of *Wolbachia*, as this could necessitate that mosquito release characteristics, including release duration and mosquito numbers, be tailored for individual release sites within a city.

Therefore, the objective of this work was to determine whether the likelihood of a successful *Wolbachia* invasion could be influenced by differences between release sites, in preparation for the release of *Wolbachia*-infected *Ae. aegypti* in Brazil. To address this objective, we first examined whether the key invasion phenotypes of CI and maternal transmission were present in *Ae. aegypti* with a Brazilian genetic background, infected with the *wMel* *Wolbachia* strain, as these phenotypes had only previously been characterised in mosquitoes from other genetic backgrounds. We then investigated the characteristics of *Ae. aegypti* populations in five Brazilian suburbs in Rio de Janeiro with different socio-demographic characteristics. Of special interest were those factors that could directly influence or restrict the spread of *Wolbachia* into natural mosquito populations, including the *Ae. aegypti* population size, and mosquito daily survival rate. Finally, by amalgamating these data we were able to simulate the likelihood that *Wolbachia* would disseminate and spread so that all mosquitoes at the five sites became infected. We observed that successful invasion would likely occur for all sites; however the means by which it did so varied between the sites, and invasion occurred more slowly at sites where local mosquitoes were more abundant. Through the results of these models we were then able to develop optimized release strategies for each field site, which will greatly benefit the upcoming biocontrol trials, and likely prove applicable to field sites in other cities and countries that share similar characteristics.

## Methods

### Ethics statement

MRR experimental protocols were submitted to and approved by FIOCRUZ Ethical Committee (CEP/FIOCRUZ protocol no. 22286313.7.0000.5248). Permission was obtained from the Rio de Janeiro Department of Health before releases commenced. Local residents received a full explanation of the project by at least one of the co-authors, and by the same health agent who visited their home 4–6 times per year during routine mosquito surveillance. This explanation highlighted the relevance and objectives of the MRR experiment.

Households were only entered after receiving formal written consent from the householders.

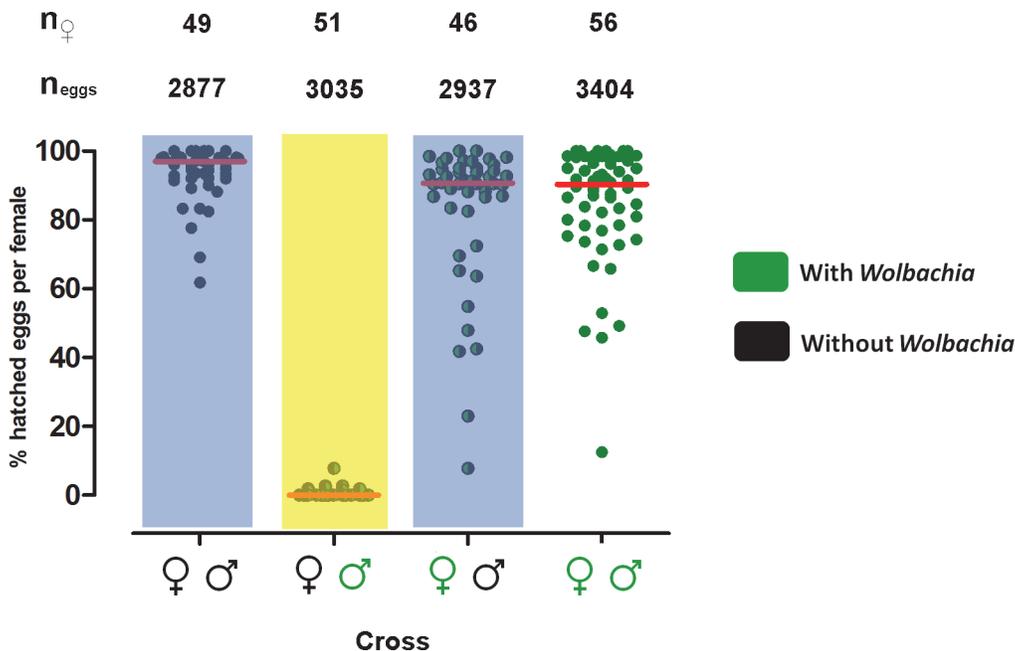
### Laboratory assays

**Mosquito rearing.** All mosquitoes used in these experiments were maintained in a climate controlled insectary, at  $27 \pm 1^\circ\text{C}$  and  $70 \pm 10\%$  relative humidity, with a 12:12 hour light:dark cycle. Larvae were reared in filtered and dechlorinated water, and fed with one Tetramin Tropical Fish Food tablet every two days. Adult mosquitoes received 10% sucrose solution ad libitum, and females were blood-fed weekly with human blood using a Hemotek membrane feeder (Hemotek Ltd) when eggs were required for experimental or colony rearing purposes. Prior to feeding, the blood was tested for the presence of dengue virus using the Dengue NS1 Ag Strip test (BioRad Laboratories).

**Backcrossing of wMel-infected *Ae. aegypti*.** wMel-infected *Ae. aegypti* were imported to Brazil from Australia (IBAMA license 11BR005873/DF). Prior to field releases in Brazil it was necessary to create a *Wolbachia*-infected line with a Brazilian genetic background. To that end, the Australian wMel-infected mosquitoes were backcrossed with wildtype Brazilian mosquitoes collected from four different districts in Rio de Janeiro (Paquetá, Jurujuba, Belford Roxo and Vila Valqueire) following a previously described protocol [13]. The parental generation in the backcross consisted of 250 virgin, *Wolbachia*-infected, Australian females and 200 uninfected, Brazilian males. This process was repeated for nine generations in order to generate the backcrossed *Wolbachia*-infected line named wMel\_Br.

**Generation of *Ae. aegypti* line cured of wMel infection.** A group of wMel\_Br mosquitoes were cured of their *Wolbachia* infection through treatment with antibiotics over three successive generations. Adult mosquitoes were provided with 10% sucrose solution containing 0.1mg/mL of tetracycline hydrochloride for a period of 10 to 14 days, which encompassed the first gonotrophic cycle [14]. Approximately 1000 adult mosquitoes were treated every generation, in order to limit detrimental genetic effects that might occur as a consequence of low population size. In each generation, twenty-four females and twelve males were randomly screened using qPCR (as described below) to confirm the loss of *Wolbachia*. Antibiotic treatment was discontinued when 100% of samples were negative for *Wolbachia*. This process took three generations to complete. The resulting line, named wMel\_BrTET, was allowed two generations for microbiota reacquisition prior to the start of experiments. During this period, wMel\_BrTET larvae were reared in trays dosed with the larval water from wildtype mosquitoes that were not treated with antibiotics.

**Monitoring *Wolbachia* infection status.** Conventional PCR for the *Wolbachia surface protein (wsp)* gene was used to examine the *Ae. aegypti* colonies for the presence of *Wolbachia* [15]. DNA was extracted from individual mosquitoes by homogenization in 80 $\mu\text{L}$  of Squash buffer using a Mini-Beadbeater-16 (BioSpec) [16]. PCR reactions were performed using a Veriti Thermal cycler using previously published primers for *wsp* and the *Ae. aegypti* Ribosomal S17 (*rps17*) gene [9], following previously described reaction conditions [14]. In cases where



**Fig 1. wMel causes strong cytoplasmic incompatibility in Brazilian *Ae. aegypti* mosquitoes.** Percentage of hatched eggs per female for all potential crosses between wMel-infected Brazilian *Ae. aegypti* (green) and *Wolbachia*-uninfected Brazilian *Ae. aegypti* (black). Each circle represents a single adult female, while the red horizontal lines indicate the median number of hatched eggs for each cross. The cross highlighted in yellow is the incompatible cross and was statistically different from the other three groups, while the two crosses highlighted in blue had significantly different hatch rates according to Dunn's test. These data were pooled from two independent biological replicates. The total number of females ( $n_f$ ) and the total number of eggs ( $n_{eggs}$ ) are indicated above each cross.

doi:10.1371/journal.pntd.0003689.g001

the PCR result was unclear, samples were rerun using real-time PCR on a 7500 Real-Time PCR System (Life Technologies). For real-time PCR, crude DNA was extracted from individual mosquitoes according to existing protocols [16], and then quantified in duplicate for both *wsp* and *rps17*, using a two-step reaction (Vol. = 10 $\mu$ L) using 2X SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) [14].

**Cytoplasmic Incompatibility and maternal transmission.** To determine if wMel caused CI in the Brazilian genetic background, reciprocal crosses were performed between wMel\_Br and wMel\_BrTET lines. In two replicate experiments, 50 male and female pupae from each line were sexed by visual analysis of their terminalia using a stereomicroscope, and then placed in a single cage (each cage representing one of the reciprocal crosses depicted in Fig 1) where they were allowed to mate for five days. On the fifth day, females from all groups were blood-fed for one hour using a Hemotek feeder. At 72 hours post-feeding, thirty females from each group were randomly selected and placed individually in inverted petri dishes containing moist filter paper for oviposition [17]. The total number of eggs laid by each female (fecundity) was counted using EggCounter V 1.0 [18]. The number of hatched eggs from each female (fertility) was counted with the aid of a stereomicroscope. Conventional PCR for the *wsp* gene (as described above) was used to check the infection status of males and females in all reciprocal crosses. A TaqMan-based assay was used for verification when conventional and SYBR Green-based real-time PCR results were unclear. In order to evaluate the rate of *Wolbachia* maternal transmission, females originally used in the cytoplasmic incompatibility experiment described above, had their eggs hatched and their offspring reared and tested for the presence of *Wolbachia*. Total DNA from larvae, pupae and adults was extracted and then used in the conventional PCR assay for *wsp* (as described above).

## Field assays

**Study areas.** For our field release assays, we selected five distinct field sites in the vicinity of Rio de Janeiro, Brazil. Collectively, these sites are representative of the broad range of socio-demographic and economic conditions found across the city, with each providing a distinct environment for mosquito release (Table 1). Demographic data from all five of the sites were collected from the 2010 Census (<http://censo2010.ibge.gov.br/>). The remaining descriptive data were collected via observation during the field site characterization, and during previous experiments [19,20].

**Characteristics of mosquito populations at field sites.** Approximately 30 BG-Sentinel traps (Biogents) were deployed at each of the five field sites in order to collect *Ae. aegypti* females, as a means to estimate the mosquito population size, as well as the species composition at each field site. The traps were checked weekly between October 2012 and October 2014, for a total of 104 weeks of mosquito collection. Each trap was analysed individually. All captured mosquitoes were transported to the laboratory, mosquito numbers were counted and individual mosquitoes were identified down to the species level using taxonomic keys [21].

**Probability of daily survival.** In order to estimate mosquito survival we conducted mark-release-recapture experiments in Jurujuba, a working class area, and Vila Valqueire, a middle class area. Information regarding the probability of daily survival (PDS) from the other three field release was obtained during previous MRR experiments [19,22]. The mosquitoes used in these experiments were the F1 and F2 generations of eggs collected from 40 ovitraps that were deployed at the field sites. These mosquitoes were reared as described above, unless specified below. Wildtype mosquitoes were used in these assays in order to obtain an accurate picture of the fitness of mosquitoes already present at the sites where *Wolbachia*-infected mosquitoes will be released.

**Table 1. Field site characteristics.**

Characteristic	Field Site				
	Amorim	Jurujuba	Tubiacaanga	Vila Valqueire	Urca
Co-ordinates	22°52'29"S; 43°14'54"W	22°55'37"S; 43°07'11"W	22°47'06"S; 43°13'32"W	22°53'17" S; 43°22'20" W	22°56'43" S; 43°09'42" W
Surrounding environment	Highways & vegetation	Guanabara Bay	Guanabara Bay	Secondary forest	Sugar Loaf Mountain
Socio-demographic description	Favela (slum)	Working class	Lower middle class	Middle class	Upper middle class
Paved Streets	No	Partially	Partially	Yes	Yes
Piped water	No	No	Some	Yes	Yes
Garbage collection	No	No	Yes	Yes	Yes
External water tanks	Yes	Yes	Yes	Yes	No
Common mosquito habitats	Water tanks and metal drums	Water tanks and metal drums	Water tanks and metal drums	Water tanks and buckets	Domestic drains and abandoned plastic pots
Number of houses	897	399	753	410	1284
Housing type	Very small	Small	Standard	Large (3–4 bedrooms)	Large duplexes (at least 3 bedrooms)
Inhabitants	2992	1196	2425	1423	3212
Human density (inhabitants/ha)	1086.03	340.2	165.98	74.17	234.54
Site size (square blocks)	10	6	14	15	13
Area (ha)	2.755	3.515	1.461	19.185	13.695

doi:10.1371/journal.pntd.0003689.t001

**Mark and release.** Before each experiment, eggs were divided into two groups, which were hatched 3 days apart to produce two independent cohorts of adult females. Females from one cohort were blood-fed approximately 18h before release (Cohort A), whereas females from the second cohort were released while unfed (Cohort B). The reason for this disparity was to observe potential effects on the PDS due to blood feeding. A greater PDS amongst Cohort A mosquitoes could promote more effective invasion by *Wolbachia* as the mosquitoes would not need to spend time searching for a host. We sought to assess whether there were any benefits to releasing using this technique. Each cohort was marked with a different colour fluorescent powder (Day-Glo Color Corp.) in small cylindrical cups (12 x 10cm). Females from both cohorts were released into the test sites on the morning of their fourth day post-eclosion (between 8:00 AM and 9:00 AM), 1h after powder application. Mosquitoes were released outside of the houses at the field sites, with an average of 4.2 mosquitoes/house released in Vila Valqueire and 7.5 in Jurujuba.

**Recapture.** Marked females were captured with CDC backpack aspirators (John W. Hock), and sticky traps [20]. Captures started one day after mosquito release. Fifteen houses were randomly selected per day for backpack aspiration. Collections were completed within 15–20 mins for each house. The entire property, inside and outside, was aspirated. If the house in question had a backyard or garden, mosquitoes in that area were also collected, but only within the limits of the property. Sticky traps were installed in 15 randomly selected houses. These were monitored daily for the presence of dust-marked females, throughout the course of the assay. Occasionally, aspiration was conducted in the same house where a sticky trap was installed. Daily captures were conducted by nine consecutive days. Captured mosquitoes were examined and sorted by cohort/powder type under UV light (S1 Table).

**Climatic conditions during MRR assays.** The Climate in Rio de Janeiro is characterized by a dry winter (May–August) and a wet summer season (November–March). MRR experiments were performed during September (Vila Valqueire) and November (Jurujuba). During the thirteen days of fieldwork (one day to release and twelve of capturing marked mosquitoes), we registered a mean temperature of  $25.7 \pm 4.8^\circ\text{C}$ , 6.8 mm rainfall, mean relative humidity of 64.54% and an average wind speed of 1.67m/s in Vila Valqueire. While in Jurujuba there was a mean temperature of  $24.7 \pm 2.6^\circ\text{C}$ , 55.8mm total rainfall, mean relative humidity of 81.88%, and an average wind speed of 2.31m/s. Air temperature and precipitation data for these periods were recorded every hour and were obtained from meteorological stations located less than 10km away from the two study areas.

**Survival rate analysis.** PDS for each of the two cohorts was estimated by fitting two models, the first being exponential [23], and the second, nonlinear [24]. From these models we derived two values: the average life expectancy (ALE), defined as  $1/(-\log_e \text{PDS})$ , and longevity, defined as  $\text{PDS}^{10}$  (where 10 is the estimate of the duration of the extrinsic incubation period for dengue in days given the temperature of the field sites) [25], which gave us the expected proportion of mosquitoes surviving long enough to transmit dengue virus. We fit both models to our data, using linear and nonlinear least squares standard procedures using R version 3.0.1 [26].

## Modelling the invasive potential of *wMel* in the five field sites

**Abundance estimation.** We used a logistic regression model based on a Lincoln type index to estimate the size of the *Ae. aegypti* population at each of the five field sites. This model incorporated the PDS estimations calculated from the MRR experiments and also demographic data from each field site (using two parameters; (1) the number of premises, and (2) number of inhabitants). The number of captures of marked mosquitoes (observations) was modeled as a

binomial variable “ $y_i \sim \text{Bin}(N_i, p_d)$ ”, where “ $p_d$ ” is the probability of capture, and “ $N_i$ ” is the number of mosquitoes released at each site. We assumed that the probability of capture in the MRR experiments varied depending on each site’s conditions, namely the number of people living in each area (*hpopsize*) and the number of premises in the area (*premises*), as represented by a logistic model:

$$\text{logit}(p_d) \sim k_0 + k_1 \times \text{premises} + k_2 \times \text{hpopsize}$$

where “logit” represents a logistic function. The coefficient  $k_0$  describes the proportion of the mosquito capture rate that is associated with intrinsic characteristics of the type of trap used. The coefficients  $k_1$ , and  $k_2$  indicate the weighting of each of the two variables (number of premises and human population size) indicating the extent to which each variable influenced the probability of mosquito capture. These coefficients were estimated using the GLM framework in the R statistical platform. These two variables were included in the model because they both had a statistically significant influence on the likelihood of mosquito capture (at the 95% significance level), and because a two-variable model was a better fit for our MRR data, than compared to models that included additional variables (geographical area, human density). These other variables did not have a significant effect on mosquito capture. This type of modeling approach differs to the more traditional use of a Lincoln Peterson estimation, which considers all variables for each site as a single coefficient. Although there were clear landscape heterogeneities between the sites, the recapture protocol we used was identical, which meant that the significance of these parameters could be estimated using logistic regression [27]. The estimate of mosquito abundance at each field site was described by the relationship between the average number of mosquitoes collected each week and their recapture probability. These values were derived from the model and adjusted for weekly differences, and then used to represent the carrying capacity of each site in the mathematical models used to examine *wMel* invasion (see below).

**Invasion analysis.** In order to study the spread of *Wolbachia* into the five field sites, we used models based on ordinary differential equations (ODE) [28] to mathematically describe the dynamics of the invasive potential of the *wMel* strain. The models simulated 12 weekly releases of a group of *wMel*-infected mosquitoes into each of the field sites (the size of this group varied in order to determine the number of mosquitoes required for successful spread), and then described changes to the proportion of *Wolbachia*-infected individuals in the total mosquito population over time. We assumed that the female-to-male ratio was equal for both populations [28]. These models incorporated parameters derived from our phenotypic characterization of *wMel*-infected Brazilian mosquitoes, and characteristics of the local mosquito population at each field site (Table 2). In this model *Wolbachia* infection imposed a fitness cost, increasing the mortality of infected individuals [11].

The two ODE were as follows:

$$\frac{dI}{dt} = v \cdot b \cdot I - \frac{b(1+s)I(I+U)}{K} \tag{1}$$

$$\frac{dU}{dt} = b \cdot f \cdot (U + (1-v)I) - \frac{b(I+U)U}{K} \tag{2}$$

Where Eq1 describes the *wMel*-infected population, and Eq2 the-uninfected, wildtype population. The variables  $I$  and  $U$  respectively describe the number of infected and uninfected individuals. The equations contained several parameters describing the release and spread of *Wolbachia*.  $v$ —the vertical transmission rate of *wMel*.  $b$ —the recruitment rate ( $b = \log(1 + \alpha \cdot p)$ ), where  $\alpha$  is the mean number of eggs laid, and  $p$  is the probability that any given egg would

**Table 2. Field site mosquito population characteristics & model parameters.**

Field Site Characteristics derived from MRR experiments					
	Vila Valqueire	Tubiacaanga	Jurujuba	Urca	Amorim
Number of mosquitoes released	1730	4572	3000	1750	4220
Number of recaptured mosquitoes	98	478	93	171	512
Weekly Probability of capture	0.0264	0.0661	0.0214	0.0572	0.0696
Carrying capacity (K)	9705	2993	8499	2518	1084
Probability of daily survival (PDS)	0.73	0.73	0.81	0.65	0.93
ODE Model parameters used in wMel invasion scenarios					
Parameter	Symbol		Value		
Probability of cytoplasmic incompatibility	<i>c</i>		0.9951		
Probability of eggs developing to adulthood	<i>p</i>		0.02		
Egg output rate	$\alpha$ (day <sup>-1</sup> )		60		
Probability of vertical transmission of wMel	<i>v</i>		0.96, 0.99		
Life shortening rate of wMel	<i>s</i>		0.10, 0.33		

The number of uninfected mosquitoes was estimated from data from field experiments. The probability of eggs developing to adulthood was derived from the field data, including PDS estimates. All other data were derived from laboratory experiments

doi:10.1371/journal.pntd.0003689.t002

result in a live adult mosquito. The value for *p* was derived from the PDS data from each field site. *s*—the life shortening effect associated with wMel infection. *K*—the carrying capacity of the mosquito population at each field site, as calculated using the logistic regression models. *f*—the cost of CI in the uninfected population,  $f = 1 - \frac{cI}{(I+U)}$ , where *c* is the rate of CI.

For each site, we considered scenarios involving changes to the maternal transmission rate and decreased longevity resulting from wMel infection in order to determine their effect on the likelihood of *Wolbachia* spreading to infect all mosquitoes in the area. We then considered changes to the number of *Wolbachia*-infected mosquitoes released each week, in order to determine the optimal release strategy at each site.

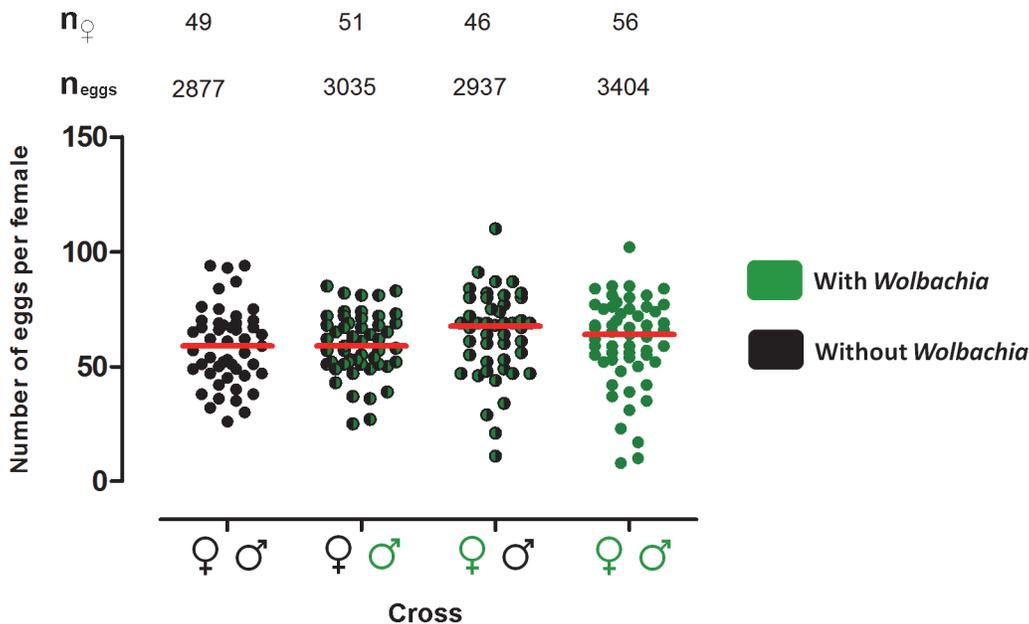
## Data analysis

The CI data were analysed using Kruskal-Wallis one-way analysis of variance, followed by pairwise comparison using Dunn’s tests, and fecundity data were compared using Mann-Whitney U-tests. Differences in survival rates between the field sites were evaluated using exponential and non-linear models. Exponential models have traditionally been used to estimate *Ae. aegypti* survival but these possess two fundamental drawbacks; they assume a priori that mosquito mortality does not vary with increasing age, and do not account for the removal of mosquitoes from the population during the recapture process. Consequently, we utilised a non-linear survival model, which incorporated a correction for the removal of individuals [24]. All results were analysed through GraphPad Prism version 5.03 for Windows (GraphPad Software, CA, ([www.graphpad.com](http://www.graphpad.com))), or using R 3.0.1 software [26].

## Results

### CI and fecundity

Reciprocal crosses between the wMel\_Br and wMel\_BrTET mosquito lines revealed strong cytoplasmic incompatibility due to the presence of wMel in *Ae. aegypti* mosquitoes with a Brazilian genetic background (Fig 1). A CI rate of 99.51% was observed when uninfected females were crossed with infected males (the “incompatible” cross), where only 15 of 3035 eggs



**Fig 2. wMel does not affect fecundity in Brazilian *Ae. aegypti*.** Number of eggs laid by females from the reciprocal crosses between wMel-infected (green) and antibiotic-treated (black) Brazilian *Ae. aegypti* mosquitoes. Each circle represents a single adult female, while the horizontal red lines indicate the median number of eggs laid in each cross. The presented data are pooled from two independent biological replicates. No significant differences were detected between the four crosses. The total number of females ( $n_{\text{♀}}$ ) and the total number of eggs ( $n_{\text{eggs}}$ ) are indicated above each cross.

doi:10.1371/journal.pntd.0003689.g002

hatched, a significantly lower proportion than what was observed in the other crosses (Kruskal-Wallis,  $H = 124.1$ ,  $df = 3$ ,  $P < 0.0001$ ). Conversely, the median percentage egg hatch per female in the other three “compatible” crosses ranged between 90.3 and 96.9%. Additionally, the cross between infected females and uninfected males resulted in a higher number of hatched eggs compared to the cross between uninfected females and uninfected males (Mann-Whitney U test,  $U = 603.5$ ,  $df = 1$ ,  $P < 0.0001$ ). All females involved in the three compatible crosses laid at least one viable egg, indicating that they all had mated successfully. Although there was slightly higher fecundity in crosses involving wMel-infected females, there were no significant statistical differences between the four experimental crosses (Fig 2; Kruskal-Wallis,  $H = 4.141$ ,  $df = 3$ ,  $P = 0.2466$ ).

### Maternal transmission rate

All adult wMel\_Br females that were involved in the first replicate of the CI experiments were screened for *Wolbachia* infection using qPCR, with a 100% infection rate observed. The resulting progeny from these mosquitoes were also screened for *Wolbachia* to provide an estimate of the maternal transmission rate in the Brazilian genetic background. Overall, 757 larvae, pupae and adult mosquitoes were screened. Of these, 725 were infected and 32 were uninfected, which implied a 96% maternal transmission rate of wMel, in Brazilian *Ae. aegypti* mosquitoes. This experiment was then repeated using the progeny from the second CI experiment. This time only adult mosquitoes were screened for *Wolbachia*, and 239 of 239 samples were identified as positive, indicating a 100% maternal transmission rate.

### Mosquito population characteristics at field sites

Over the course of the two-year collection period we collected a total of 181,937 wild mosquitoes across the five field sites; 82,316 of these were *Ae. aegypti*, 2,867 were *Aedes albopictus* and

**Table 3. *Ae. aegypti* collection data from field sites.**

Field site	Total <i>Ae. aegypti</i> collections	Mean weekly collection ± SD
Vila Valqueire	26625	256 ± 74.3
Tubiacanga	20582	197.9 ± 55.8
Jurujuba	18915	181.8 ± 66.3
Urca	14985	144.1 ± 40.6
Amorim*	1209	75.5± 28.37

\*Collection period only 16 weeks

doi:10.1371/journal.pntd.0003689.t003

96,754 were *Culex quinquefasciatus*. We observed differences in the mean weekly number of mosquitoes captured between the sites (Table 3). The highest numbers of collected mosquitoes were obtained from Vila Valqueire, the middle class area, where 6043 more mosquitoes were collected than in Tubiacanga, the lower middle class area, which had the next highest number collected. Aside from the slum, Amorim, where the collection period was shorter than for the other sites, total collections were the lowest in Urca, the upper-middle class area. Mean (SD) weekly *Ae. aegypti* collections were the highest in Vila Valqueire (256 ± 74.3), almost double that of Urca (144.1 ± 40.6), which had the lowest collection rate.

### MRR rate

During the MRR assay, a total of 1,730 *Ae. aegypti* females were released in Vila Valqueire. Daily captures occurred for 9 consecutive days after the initial release. A total of 98 marked females were collected during this period for a recapture rate of 5.66%. Of these, 67 (68.4%) were captured with backpack aspirators, while the remainder were recovered from sticky traps. In Jurujuba, 3,000 *Ae. aegypti* females were released, with collections again occurring daily for 9 days post-release. We collected 95 marked mosquitoes, corresponding to a recapture rate of 3.17%. Of these, 44 (46.3%) were collected using backpack aspirators, and 51 (53.7%) in sticky traps. The overall recapture rate was much higher for Vila Valqueire than for Jurujuba (Table 4). In Vila Valqueire we observed very similar recapture rates for both Cohorts, however for Jurujuba the recapture rate of Cohort A, where mosquitoes were blood fed prior to release, was almost twice that of Cohort B (Table 4).

**Table 4. Recapture rate and longevity of *Ae. aegypti* females released in Vila Valqueire and Jurujuba.**

	Vila Valqueire			Jurujuba		
	Cohort A	Cohort B	Cohort A+B	Cohort A	Cohort B	Cohort A+B
Number of released females	530	1200	1730	900	2100	3000
Recapture rate (%)	5.47	5.58	5.66	4.56	2.47	3.10
PDS by exponential method	0.804	0.721	0.727	0.731	0.839	0.808
PDS by non-linear method	0.819	0.739	0.745	0.744	0.844	0.815
Interval of survivorship	0.77–0.86	0.69–0.80	0.71–0.78	0.68–0.82	0.78–0.91	0.78–0.85
Average life expectancy (days)	3.83–6.63	2.69–4.46	2.86–3.96	2.59–4.95	7.43–10.66	4.07–6.11

Mosquitoes were either blood-fed (Cohort A) or starved (Cohort B) prior to release.

doi:10.1371/journal.pntd.0003689.t004

## Daily survival rates and longevity estimates

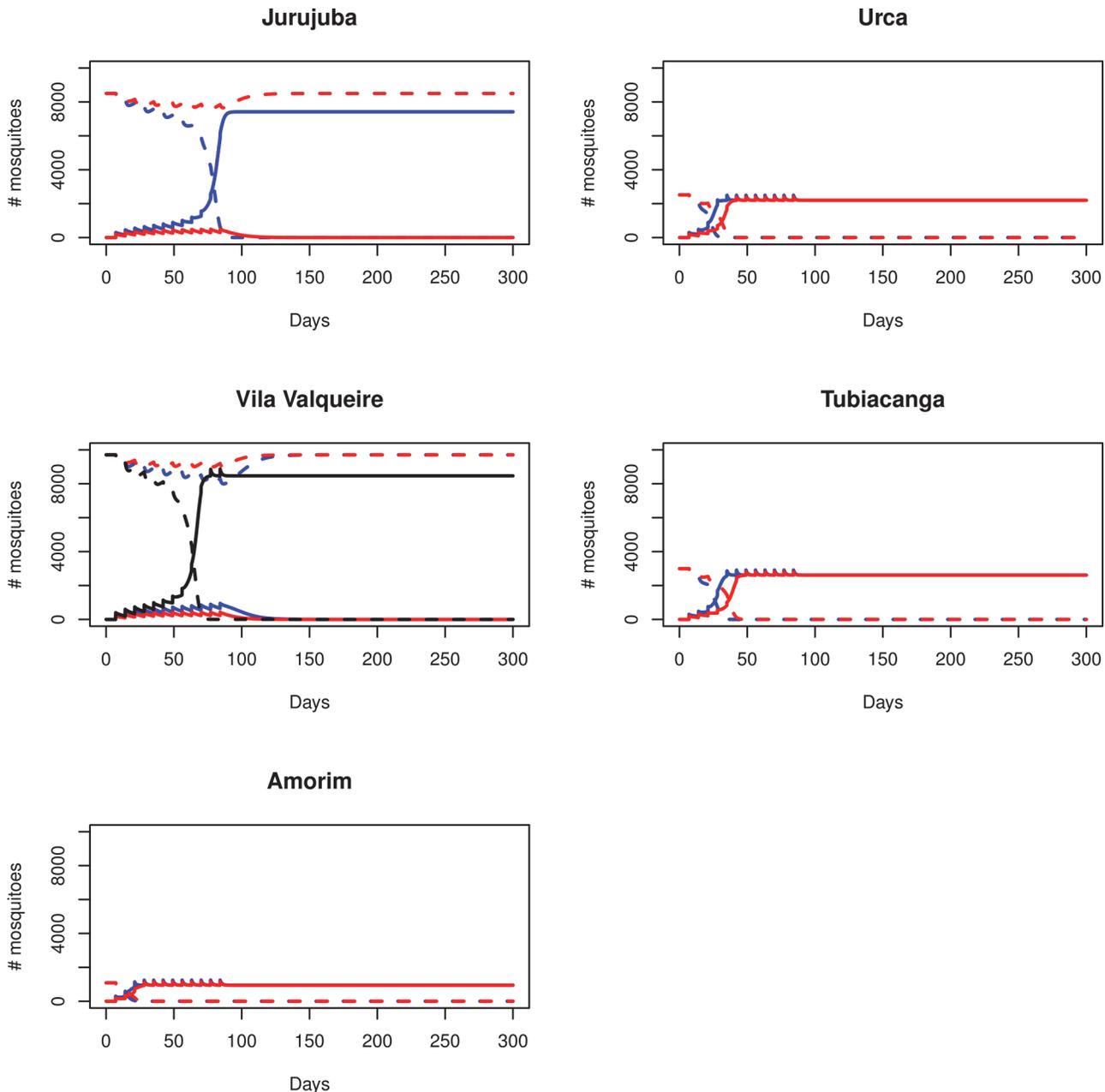
We used the MRR data to create two models, a non-linear model and an exponential model, in order to estimate the PDS of the two mosquito cohorts that were released at each of the two field sites. The non-linear model provided higher estimates of PDS than the exponential model. This was expected because that model corrects for the removal of mosquitoes collected over previous days (Table 4). Mosquitoes released in the Jurujuba had a higher overall survival rate than those released in Vila Valqueire (Student's  $t$  test,  $t = 6.75$ ,  $df = 1$ ,  $P < 0.001$ ). At the latter site, mosquitoes released soon after blood-feeding (Cohort A) had a better survival rate, with the PDS 10.27% higher than for those released under conditions of starvation (Cohort B) (Table 4). However, we observed the opposite pattern in Jurujuba, where the PDS of Cohort B was 13.76% higher than that of Cohort A. We observed variation in estimates of average life expectancy (ALE) between the two field sites, and between the different cohorts released at the same sites. Regardless of the pre-release feeding regime, the expected lifespan of mosquitoes released in Jurujuba was higher than those released in Vila Valqueire, as evidenced by a two-day difference in the ALE upper limit estimate.

## Likelihood of successful *wMel* invasion at field sites

We used statistical models based on logistic regression that incorporated data from the MRR experiments to estimate the average *Ae. aegypti* population size at each of our five field sites (Table 2). The highest estimate of abundance was obtained in Vila Valqueire, with Jurujuba having the second largest population of mosquitoes. The estimated *Ae. aegypti* population size at the other three sites was three to four times smaller than either Jurujuba or Vila Valqueire.

We then used mathematical models based on ordinary differential equations in order to simulate the spread of *wMel*-infected *Ae. aegypti* at each of the five field sites. These models incorporated parameters that were determined from the laboratory experiments and the abundance values derived from the MRR experiments (Table 2). In these models, only the variables of human population size and number of houses were significant predictors. The geographical area and density of inhabitants had no effect. We then compared the effects of different maternal transmission rates and life-shortening levels on the ability of the mosquitoes to spread. The initial scenario assumed a 96% rate of maternal transmission of *wMel*, and life shortening of 10% associated with infection [7]. We considered scenarios where the numbers of *wMel*-infected female mosquitoes released each week varied between 200 and 400 (Fig 3). For all five sites, a release number of 200 mosquitoes led to *Wolbachia* becoming established in Amorim, Tubiacanga and Urca inside of 50 days. A release size of 300 was sufficient for the *Wolbachia* infection frequency to reach 100% within 100 days in Jurujuba. For Vila Valqueire the release of 400 female mosquitoes per week was required for complete invasion, and this occurred inside of 100 days.

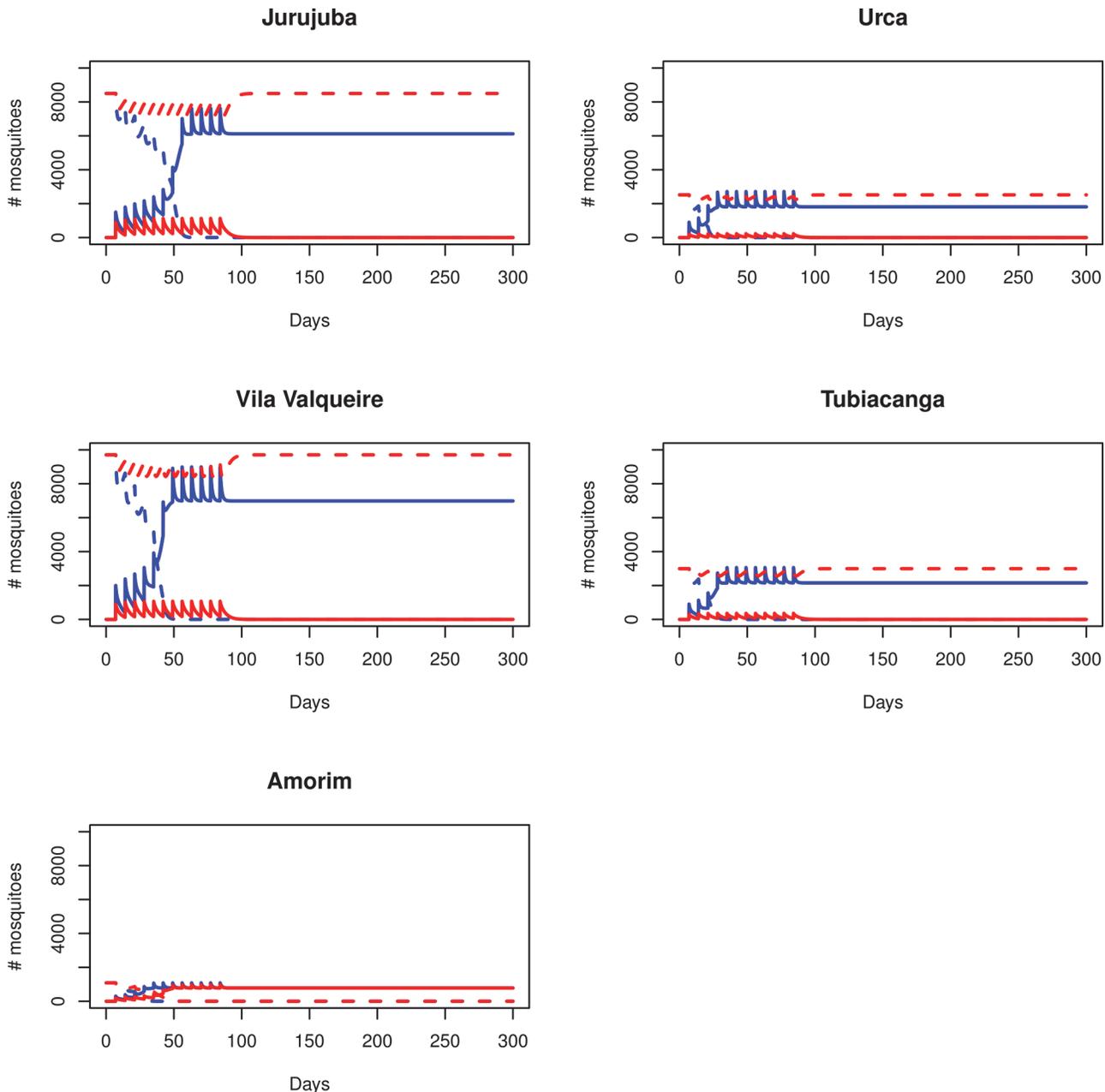
Next, we examined a scenario where the life shortening associated with *wMel* was greater than expected—increasing from 10% to 33%. Under these conditions the number of mosquitoes required for weekly release increased dramatically (Fig 4). In both Urca and Tubiacanga, the required number was 900 females, with a 100% infection rate being reached inside 50 and 100 days respectively at the two sites. For Jurujuba and Vila Valqueire, which had a greater natural abundance of *Ae. aegypti*, the release number required was 1500 and 2000 females respectively, and in both cases, *Wolbachia* was predicted to spread to all mosquitoes inside 100 days. In Amorim, the increased mortality rate had no effect on the number of mosquitoes required, with a 100% infection rate occurring within 50 days under a release regime of 200 or 300 mosquitoes.



**Fig 3. Modeling the invasive potential of wMel at different field sites.** Models of the invasive potential of wMel at the five different field sites based on ordinary differential equations assuming a maternal transmission rate of 96% and a longevity cost of 10%. Each plot shows the changes to the total number of *Wolbachia*-infected (solid lines) and—uninfected (dashed lines) mosquitoes (y-axis) in the population over time (x-axis), during the course of a *Wolbachia* invasion involving 12 weekly releases of different sized cohorts of infected mosquitoes. When *Wolbachia* becomes fixed the size of the uninfected population decreases to zero. Red lines depict a weekly release of 200 *Wolbachia*-infected females, which was sufficient for wMel to spread to infect all mosquitoes in Amorim, Tubiacanga, and Urca. Blue lines depict a release of 300 females, which led to successful invasion at all sites except Vila Valqueire, which required 400 females per week (black lines). The differences in the number of mosquitoes at each site reflect the *Ae. aegypti* abundance derived from experimental data.

doi:10.1371/journal.pntd.0003689.g003

We then considered the effect of a higher maternal transmission rate (99%) for both of the above scenarios. When life shortening was 10%, the increased maternal transmission rate had no effect on the spread of *Wolbachia* at Tubiacanga or Urca (S1 Fig). For Amorim, the



**Fig 4. The effect of a stronger life shortening on the invasive potential of *wMel*.** Models depict the invasive potential of *wMel* with a higher than expected life shortening effect (33% rather than 10%). Each plot shows the changes to the total number of *Wolbachia*-infected (solid lines) and—uninfected (dashed lines) mosquitoes (y-axis) in the population over time (x-axis), during the course of a *Wolbachia* invasion involving 12 weekly releases of different sized cohorts of infected mosquitoes. In this scenario far greater numbers of released mosquitoes were required for *Wolbachia* to reach 100% infection (than for a 10% life shortening effect), and these numbers differed greatly between sites. In Jurujuba, stable infection occurred after weekly releases of 1500 mosquitoes (blue lines), but not 900 (red lines). In Urca, invasion occurred with 900 mosquitoes (blue), but not 200 (red). For Tubiacanga, a release number of 900 mosquitoes was also sufficient to lead to a 100% infection (blue), but 300 was not (red). In Vila Valqueire, releases of 900 mosquitoes was insufficient (red), and 2000 mosquitoes per week were required (blue). In Amorim, releases of both 200 (red) and 300 (blue) mosquitoes led to all mosquitoes becoming infected.

doi:10.1371/journal.pntd.0003689.g004

decreased fitness cost led to equivalent invasion profiles with either 200 or 300 females per week. However, at both Jurujuba and Vila Valqueire, the number of released mosquitoes required to achieve stable infection was decreased, and the time to achieve a stable infection was

shorter. When life shortening was increased to 33%, the increased maternal transmission did not affect the release dynamics at any of the field sites, with cohorts of similar size to those at the lower maternal transmission rate required to increase the frequency of *Wolbachia* infection (S2 Fig).

## Discussion

### Characterisation of *wMel* infection in Brazilian *Ae. aegypti*

The use of *Wolbachia* to control dengue transmission represents a novel and promising method of mosquito biocontrol. Although the technique is still in early-stage field trials and restricted to small or isolated areas in a handful of countries, the scope and scale of these trials will inevitably expand. Releases of *Ae. aegypti* infected with the *wMel* *Wolbachia* strain have recently commenced in Brazil, where regulatory agencies provided approval for releases at four isolated sites through 2016 (these being four of the field sites examined in this article, with the exception of Amorim). Given that there could potentially be great variability in the conditions present at these sites, it is important to understand how differences in physical characteristics, human population demographic factors, and local mosquito population characteristics between these sites might affect the likelihood of successful invasion by *Wolbachia*. If there was such an effect, it would necessitate that key components of the release process (e.g. mosquito release numbers, number of release points, release period length) be tailored to individual release sites.

For *Wolbachia* to successfully invade in a given area, the infected mosquitoes must display a high level of cytoplasmic incompatibility [5]. This would compensate for imperfect maternal transmission of *Wolbachia* and any detrimental effects on host fitness resulting from infection, if either of those things were to occur [29]. In the case of the Brazilian releases, it was first necessary to transfer the *wMel* strain to mosquitoes with a Brazilian genetic background. Our results indicated that near-complete cytoplasmic incompatibility occurred when infected males mated with uninfected females. This would provide infected mosquitoes with a large reproductive advantage over uninfected mosquitoes in a mixed population, as might occur during a field release. Interestingly, we observed that egg viability was higher when uninfected males mated with uninfected females than with *Wolbachia*-infected females. This suggests that there may be a small cost associated with *wMel* infection that lead to reduced egg viability. When mated with uninfected males, the majority of *Wolbachia*-infected females displayed an egg hatch level that was comparable to that produced by matings of uninfected males and females, while a small group of these infected females laid eggs with greatly reduced viability. It is possible that this group of females all had higher than normal levels of *Wolbachia*, as this can lead to more extreme phenotypes in the host [30].

Fecundity is an important life-history trait in invertebrates, and is also important for *Wolbachia*-based control strategies, as higher fecundity will promote a more rapid spread of the bacterium [31]. In our experiments, we observed no significant difference in fecundity levels due to the presence of the *wMel* infection, which suggests that there will be no fitness impact on this trait due to infection. This was similar to what was observed in *wMel*-infected *Ae. aegypti* with an Australian genetic background [7].

In one of two experiments, we detected a lower rate of *wMel* maternal transmission in the Brazilian genetic background than what has previously been described (96% as opposed to 100% in the other experiment) [6,7]. Loss of transmission efficiency can be associated with environmental factors like high temperature [32], or with the host genetic background [33]. Given the consistency of laboratory temperatures, a difference due to the change in host genetics represents a more plausible scenario. Another potential explanation could be due to the *Ae.*

*aegypti*-*Wolbachia* relationship, which is still rather novel from an evolutionary point of view. Consequently, we would expect a stronger host immune response to *Wolbachia* [34,35], which could potentially promote the loss of infection in some individuals [36]. This could occur if the immune response of Brazilian mosquitoes to *Wolbachia* is different to that of other clades. It is also possible that the maternal transmission rate could have been underestimated, and some of the samples were falsely identified as negative, perhaps due to insufficient dilution prior to qPCR at that time. Given the high levels of maternal transmission that have previously been observed for *wMel* [7], we were of the opinion that the results of the second experiment were more likely to be accurate. Nevertheless we also included the lower rate in the subsequent models.

## Characterization of local mosquito populations

The ability of *Wolbachia* to become fixed in wild mosquito populations has previously been examined using theoretical models [37]. However, none of these have considered how conducting the experiments in large, heterogeneous cities such as Rio de Janeiro would affect the likelihood of a *Wolbachia* strain spreading effectively. *Ae. aegypti* life history traits and population size may vary dramatically between districts, depending on the nature and influence of urban landscapes and human demographic factors. This in turn would influence how *Wolbachia* might spread. To test these effects, we sought to characterise five distinct field sites in Rio de Janeiro, and the mosquito populations dwelling within, and then used mathematical models to predict how the resulting differences might affect invasion by *Wolbachia*.

By conducting mosquito collections over a period of two years, we were able to make estimates of existing mosquito population sizes, which varied greatly amongst our five field sites. The average weekly mosquito collection did not correlate with the development index of the sites. Of the four sites where collections ran the full 104 weeks, Vila Valqueire had the highest collection rate, and Urca the lowest. Interestingly, these two sites had the highest developmental index of our five sites. Both sites contain large houses/duplexes, have piped water, and organized garbage collection and have good mosquito control programs. This suggests that the developmental index of these areas is not a major determinant of the number of mosquitoes at these sites. In Urca there was no regular use of external water tanks, which may also have contributed to the lower prevalence of *Ae. aegypti* in the area.

In our MRR experiments we observed that the mosquito recapture rate was approximately twice as high for Vila Valqueire as for Jurujuba. This could have occurred because of increased access to properties in Vila Valqueire as a result of greater assistance from local residents. Alternatively, it is possible that insecticide usage may have been higher in Jurujuba during the experiment. During this experiment we released two different cohorts of mosquitoes, one blood fed prior to release, and the other unfed. The bloodfed mosquito cohort (A) was recaptured at a far greater rate than the non-bloodfed cohort (B) in Jurujuba, but there was no difference in the recapture rate between the two cohorts at Vila Valqueire. It is possible that this difference in recapture rate occurred due to a specific micro-environmental effect in Jurujuba that differentially affected the two cohorts, however it is not currently clear what that might be. Alternatively, this observation could have been an artefact of small collection numbers, rather than a real difference. We also observed a differential effect of pre-release blood feeding on survival, with the PDS of Cohort A mosquitoes higher than Cohort B in Vila Valqueire, but lower in Jurujuba. This suggests that there may certain conditions present at some field sites where it would be advantageous to release blood fed individuals. Similar experiments should be conducted with *wMel*-infected mosquitoes to determine if this effect is consistent in the presence of *Wolbachia*.

Comparable MRR experiments for the other three field sites; Amorim, Urca and Tubiacanga had been performed previously [19,22]. In these experiments only non-blood fed females were released, so the results were comparable to our data for Cohort B. Overall, we observed a much lower recapture rate for Jurujuba and Vila Valqueire than what was previously described at the other sites. A comparison of all sites revealed the highest recapture rates were in Amorim (13.10%) and Tubiacanga (12.82%) during the wet season. These values decreased slightly during the dry season but were still higher than either of the two new sites, as was the recapture rate in Urca (9.77%). The ALE of mosquitoes at Vila Valqueire was similar to those from Urca and Tubiacanga (during the wet season). While ALE values at Jurujuba were similar to those from Amorim (during both the wet and dry seasons) and Tubiacanga (during the dry season).

We observed great variation in the daily survival rate of mosquitoes between our five field sites. The highest PDS (0.93) was observed in the less affluent district of Amorim [22], while the lowest PDS of 0.60 was observed in Urca, which had the highest level of social development. The PDS of the other three sites ranged between 0.72 and 0.81. Although we obtained data for only five sites, we saw a very strong negative correlation between field site affluence and mosquito PDS. This suggests that the developmental area of a particular area could potentially have some effect on the survival of local mosquitoes, which is likely reflective of a disparity in mosquito control measures. We also saw a strong positive correlation between human density and PDS, which could be explained by the fact that higher density makes it easier for mosquitoes to find hosts and feed successfully. The fact that there were such considerable differences in PDS between the sites indicates that this is a factor that must be considered when planning releases. A lower PDS coupled with a large wild population could make it more difficult for *Wolbachia*-infected mosquitoes to become established, especially taking into account potential life shortening effects due to infection.

### Invasive potential of *wMel*-infected Brazilian *Ae. aegypti*

We utilised the data obtained through the laboratory and field experiments described above to model the spread of *wMel* through the five field sites. Our models indicated that two field sites, Jurujuba and Vila Valqueire, had far greater abundance of *Ae. aegypti* than the other three sites. There are several potential explanations for the differences we observed in mosquito abundance. There could have been differences in the numbers, location, and favorability in breeding sites, differences in the likelihood of finding a host, differences in mosquito control measures, or in environmental conditions. All of these factors could not be directly considered in the statistical models. Interestingly, our data did not indicate that there was a strong relationship between PDS and abundance. Vila Valqueire and Jurujuba had high abundance but far lower numbers of houses and inhabitants than the other three field sites. This is somewhat counterintuitive, as a positive correlation between abundance and these factors makes more sense when considering the biological requirements of mosquito populations for hosts and breeding sites. Given that there are a large number of factors that affect the size of a mosquito population, some of which have not been considered in our models, it is unclear if this effect is something real or an artifact of considering only five locations.

Estimates of abundance at each of the five sites were directly incorporated in our models, and used to represent the initial size of *Wolbachia*-uninfected mosquitoes naturally present at each site prior to the time of release. The release protocols used in these models were simulated based on the general format of *Wolbachia*-infected mosquito releases as utilised as part of the Eliminate Dengue Project [11]. This involves the weekly release of a number of *Wolbachia*-infected female mosquitoes for a period of several months, during which time the frequency of

*Wolbachia*-infected individuals in the population typically rises and then eventually reaches 100%.

Our models indicated that the *wMel* infection frequency would likely reach 100% at each of the five field sites, with only a small number of mosquitoes required for release each week. Interestingly though, the requirements for a successful release differed between the sites in terms of the numbers of mosquitoes required, and the expected period of time required for *Wolbachia* to become fixed. Unsurprisingly, these differences proved to be strongly related to the predicted mosquito abundance at the sites. Under the initial modelled conditions of a low cost of infection and slightly decreased maternal transmission rate, we determined that a weekly release of 200–300 females was typically sufficient for a successful invasion for all sites with the exception of Vila Valqueire, which had the greatest abundance and mosquito carrying capacity of all the sites. This represented a release cohort far smaller than what was released in Australia [11]. For Amorim, Tubiacanga and Urca, which all had smaller wild mosquito populations, the models predicted that the infection would spread to all mosquitoes in the area within the first 50 days after the initial release occurred. These results were expected, given the high importance of mosquito abundance on the ability of *Wolbachia* to spread quickly [12]. Even so, a period of less than 100 days was predicted for the two sites with higher abundance. The models indicated that a lower maternal transmission rate was a large determining factor in the dynamics of invasion, as an increase in the modelled rate from 96% to 99%, led to a decrease in the number of mosquitoes and time required for the *Wolbachia* infection to spread to 100%.

The success of *Wolbachia*-infected mosquitoes in all of these locations is strongly linked to fitness costs resulting from the infection [11,38]. While the cost associated with *wMel* infection is fairly low [11] we also considered a scenario where a stronger than expected life shortening effect occurred amongst released mosquitoes. This resulted in less effective invasion. At the three sites with lower abundance, the number of mosquitoes required for weekly release tripled, while at the sites with higher abundance, five times more mosquitoes were required. These numbers may appear high, but they are still significantly lower than the what was released each week at field sites in Australia [11]. Our models also indicated that the detrimental effect of this fitness cost on invasive potential was far greater than the benefit obtained through a higher maternal transmission rate, as a combination of these two parameters led to invasion patterns that were largely similar to those seen with the lower maternal transmission rate. This scenario could be considered a worst-case scenario for invasion with *wMel*, and is also rather unlikely to eventuate given that such extreme fitness effects have not been observed in *wMel*-infected mosquitoes after more than two years in the field [38]. What is encouraging is that, although the invasion was less effective under these conditions, our data suggest that it is still possible for *Wolbachia* to spread and completely infect the mosquito population at any of the five sites.

The most important factor influencing the spread of *Wolbachia* at any of the field sites was local mosquito abundance, and our data reinforce the need to release *Wolbachia*-infected mosquitoes in higher numbers at sites where there are larger populations of wildtype mosquitoes [28,29,37]. This factor is clearly more of an influence than any of the urban landscape conditions that we analysed. However there is little doubt that there are socio-demographic factors that are important to determining abundance. For instance a larger human population and greater human density would likely provide a higher chance of locating a blood meal host, and potentially an increase in the number of favourable breeding site containers. Better sanitation conditions at the field site would be expected to have the opposite effect, decreasing breeding site availability. We observed the greatest abundance of *Ae. aegypti* at Vila Valqueire and Jurujuba. These sites had by far the smallest number of houses and total human population of the five sites. They differed from each other in terms of sanitation (no garbage collection in Jurujuba), and human density (high in Jurujuba, but low in Vila Valqueire). It is difficult to

establish relationships between these variables and abundance, and part of the reason may be that they are only indirect or partial determinants. A similar study in Australia, focusing more specifically on micro-environmental conditions at the residential block level, indicated that the type of house, level of shade on the property, and availability of breeding sites all affected the proportion of mosquitoes in the area that were infected with *Wolbachia* [39]. Our study was not designed to assess differences between sites at this level, however there is likely a strong link between these parameters, and those from our models.

There were some factors that were not considered in our models that could potentially contribute to differences in wildtype mosquito abundance between the sites. The first of these is that seasonal differences were not taken into account. Estimations of mosquito population size at each site were an average taken across all collection points, and normalized the effects of time and spatial homogeneity across the area. In addition, the MRR data, which was utilised to calculate abundance, were obtained from experiments conducted over a comparatively shorter period of time, and could have been influenced by seasonal effects. As the MRR experiments at Jurujuba and Vila Valqueire were conducted separately to those for the other sites, this could also have contributed to the higher abundance and lower recapture rates observed there. The data obtained from Amorim were also interesting. There we observed the highest PDS of all the sites, yet the carrying capacity was the lowest, and the site was the easiest of the five for *Wolbachia* to invade. It is possible that given the shorter mosquito collection period at this site, the carrying capacity was underestimated, or perhaps the mosquito population is just naturally low at that location in spite of the high human density. Given the complexity and heterogeneity of the landscapes encompassing our field sites it is entirely possible that there are other unmeasured or potentially cryptic factors that could contribute to local mosquito abundance or to the successful spread and invasion of *Wolbachia*. It is also possible that, given the developing nature of the field sites, and other future release areas in different countries there may be changes in the landscape over time that may have a similar effect. To that end, it would be useful to consider future modelling at these or other sites in the context of high resolution, real-world landscape data, as such models would be both more rigorous and more sensitive [40,41]. At the time of this study such data were not available, and while they would have no doubt proven to be valuable, they were too costly to obtain.

## General conclusions

Our results suggest that the *wMel* strain of *Wolbachia* will likely be able to successfully invade five distinct field sites around the city of Rio de Janeiro, Brazil. We observed both strong CI, and no decrease to fecundity associated with infection, both of which will promote invasion. Our survival data indicated that there were differences in the daily probability of survival for mosquitoes at the different sites, with the better-developed sites being less hospitable. We also observed that *wMel* was able to spread more effectively when the local mosquito population was smaller. This suggests that *Wolbachia* could potentially struggle to spread at better-developed sites that have more abundant mosquito populations, as we observed with Vila Valqueire. Critically, although we saw a difference in the invasive potential of *wMel* between the field sites, the maximum numbers of mosquitoes required for weekly releases was only 2000, and under most conditions, the number was far lower. These data support the hypothesis that releases would be more effective during the dry season, when the mosquito population is naturally smaller [11].

We show that field sites in Rio de Janeiro are complex landscapes that support mosquito populations of greatly different sizes, and this can affect the dynamics of *Wolbachia*. However, inter-site differences in key aspects of these landscapes do not serve as an impediment to the

overall success of invasion by *wMel*. In spite of this it can be beneficial to adequately characterise field sites prior to the release of *Wolbachia*-infected mosquitoes as this will help determine the optimal release strategy. Our results provide a useful framework for the ongoing field-releases of *wMel*-infected *Ae. aegypti* in Brazil, and will likely hold similar utility for future releases of these mosquitoes in other similarly heterogeneous urban landscapes.

## Supporting Information

**S1 Table. Raw capture data from the Mark-Release-Recapture experiments in Jurujuba and Vila Valqueire.** Marked mosquitoes were released into the field sites and then re-captured over the course of 9 days using both backpack aspirators and Sticky traps. Marked mosquito numbers represent both Cohorts A and B (see [methods](#) section for details). Unmarked mosquitoes were not released as part of the experiments.

(DOCX)

**S1 Fig. Modeling the invasive potential of *wMel* with a 99% vertical transmission rate.**

Under this scenario the maternal transmission rate of *wMel* increased to 99%, while the life shortening effect remained at 10%. All modeled releases sizes were as per [Fig 3](#) (red; 200 females, blue; 300, black; 400). In this case a release cohort size of 300 led to a *Wolbachia* infection frequency of 100% at all sites. In general, invasion occurred more quickly at all sites after the initial release than with a maternal transmission rate of 96%.

(TIF)

**S2 Fig. Modeling the invasive potential of *wMel* with a 99% vertical transmission rate, and increased life shortening.** The models here depict the invasive potential of *wMel* with the maternal transmission rate increased to 99% and the life shortening effect increased to 33%. Mosquito release numbers were the same as those depicted in the models from [Fig 4](#). The models here indicate that the adverse effects of increased life shortening, which necessitate the release of additional mosquitoes each week, are not ameliorated by the increase in vertical transmission. As such the dynamics of *wMel* invasion were not different from the data presented in

[Fig 4](#).

(TIF)

## Acknowledgments

We are grateful to all members of the Laboratório de Malária (LAMAL—CPqRR/FIOCRUZ), Laboratório de Transmissores de Hematozoários (LATHEMA—FIOCRUZ), members of Programa de Computação Científica (PROCC—FIOCRUZ), to the Brazilian and Australian coordinators of the Eliminate Dengue program. The Australian *wMel*-infected *Aedes aegypti* line and TaqMan probes were kindly provided by Prof Scott O'Neill. We are also indebted to the Municipal Health Secretariats of Rio de Janeiro and Niterói for providing logistics support and health agents.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: HLCD LAM LMBdS RMdF. Performed the experiments: HLCD JBLS LMBdS DAMV. Analyzed the data: EPC HLCD DAMV. Wrote the paper: HLCD EPC DAMV RMdF LAM.

## References

1. Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, et al. (2013) The global distribution and burden of dengue. *Nature* 496: 504–507. doi: [10.1038/nature12060](https://doi.org/10.1038/nature12060) PMID: [23563266](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23563266/)
2. Shepard DS, Coudeville L, Halasa YA, Zambrano B, Dayan GH (2011) Economic impact of dengue illness in the Americas. *Am J Trop Med Hyg* 84: 200–207. doi: [10.4269/ajtmh.2011.10-0503](https://doi.org/10.4269/ajtmh.2011.10-0503) PMID: [21292885](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21292885/)
3. Maciel-de-Freitas R, Avendanho FC, Santos R, Sylvestre G, Araújo SC, et al. (2014) Undesirable consequences of insecticide resistance following *Aedes aegypti* control activities due to a dengue outbreak. *PLoS One* 9: e92424. doi: [10.1371/journal.pone.0092424](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092424) PMID: [24676277](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24676277/)
4. Zug R, Hammerstein P (2012) Still a host of hosts for *Wolbachia*: analysis of recent data suggests that 40% of terrestrial arthropod species are infected. *PLoS One* 7: e38544. doi: [10.1371/journal.pone.0038544](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038544) PMID: [22685581](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22685581/)
5. Sinkins SP (2004) *Wolbachia* and cytoplasmic incompatibility in mosquitoes. *Insect Biochem Mol Biol* 34: 723–729. PMID: [15242714](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15242714/)
6. McMeniman CJ, Lane R V, Cass BN, Fong AWC, Sidhu M, et al. (2009) Stable introduction of a life-shortening *Wolbachia* infection into the mosquito *Aedes aegypti*. *Science* 323: 141–144. doi: [10.1126/science.1165326](https://doi.org/10.1126/science.1165326) PMID: [19119237](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19119237/)
7. Walker T, Johnson PH, Moreira LA, Iturbe-Ormaetxe I, Frentiu FD, et al. (2011) The wMel *Wolbachia* strain blocks dengue and invades caged *Aedes aegypti* populations. *Nature* 476: 450–453. doi: [10.1038/nature10355](https://doi.org/10.1038/nature10355) PMID: [21866159](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21866159/)
8. Xi Z, Khoo CCH, Dobson SL (2005) *Wolbachia* establishment and invasion in an *Aedes aegypti* laboratory population. *Science* 310: 326–328. PMID: [16224027](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16224027/)
9. Moreira LA, Iturbe-Ormaetxe I, Jeffery JA, Lu G, Pyke AT, et al. (2009) A *Wolbachia* symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with dengue, Chikungunya, and *Plasmodium*. *Cell* 139: 1268–1278. doi: [10.1016/j.cell.2009.11.042](https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.11.042) PMID: [20064373](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20064373/)
10. McGraw EA, O'Neill SL (2013) Beyond insecticides: new thinking on an ancient problem. *Nat Rev Microbiol* 11: 181–193. doi: [10.1038/nrmicro2968](https://doi.org/10.1038/nrmicro2968) PMID: [23411863](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23411863/)
11. Hoffmann AA, Montgomery BL, Popovici J, Iturbe-Ormaetxe I, Johnson PH, et al. (2011) Successful establishment of *Wolbachia* in *Aedes* populations to suppress dengue transmission. *Nature* 476: 454–457. doi: [10.1038/nature10356](https://doi.org/10.1038/nature10356) PMID: [21866160](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21866160/)
12. Barton NH, Turelli M (2011) Spatial waves of advance with bistable dynamics: cytoplasmic and genetic analogues of Allee effects. *Am Nat* 178: E48–E75. doi: [10.1086/661246](https://doi.org/10.1086/661246) PMID: [21828986](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21828986/)
13. Yeap HL, Mee P, Walker T, Weeks AR, O'Neill SL, et al. (2011) Dynamics of the “popcorn” *Wolbachia* infection in outbred *Aedes aegypti* informs prospects for mosquito vector control. *Genetics* 187: 583–595. doi: [10.1534/genetics.110.122390](https://doi.org/10.1534/genetics.110.122390) PMID: [21135075](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21135075/)
14. Baton LA, Pacidônio EC, Gonçalves DDS, Moreira LA (2013) wFlu: characterization and evaluation of a native *Wolbachia* from the mosquito *Aedes fluviatilis* as a potential vector control agent. *PLoS One* 8: e59619. doi: [10.1371/journal.pone.0059619](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059619) PMID: [23555728](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23555728/)
15. Braig HR, Zhou W, Dobson SL, O'Neill SL (1998) Cloning and characterization of a gene encoding the major surface protein of the bacterial endosymbiont *Wolbachia pipientis*. *J Bacteriol* 180: 2373–2378. PMID: [9573188](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9573188/)
16. Fu Y, Gavotte L, Mercer DR, Dobson SL (2010) Artificial triple *Wolbachia* infection in *Aedes albopictus* yields a new pattern of unidirectional cytoplasmic incompatibility. *Appl Environ Microbiol* 76: 5887–5891. doi: [10.1128/AEM.00218-10](https://doi.org/10.1128/AEM.00218-10) PMID: [20601501](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20601501/)
17. Valencia MD, Miller LH, Mazur P (1996) Permeability of intact and dechorionated eggs of the *Anopheles* mosquito to water vapor and liquid water: a comparison with *Drosophila*. *Cryobiology* 33: 142–148. PMID: [8812093](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8812093/)
18. Mollahosseini A, Rossignol M, Penetier C, Cohuet A, Anjos A Dos, et al. (2012) A user-friendly software to easily count *Anopheles* egg batches. *Parasit Vectors* 5: 122. doi: [10.1186/1756-3305-5-122](https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-122) PMID: [22713553](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22713553/)
19. David MR, Lourenço-de-Oliveira R, Freitas RM de (2009) Container productivity, daily survival rates and dispersal of *Aedes aegypti* mosquitoes in a high income dengue epidemic neighbourhood of Rio de Janeiro: presumed influence of differential urban structure on mosquito biology. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104: 927–932. PMID: [19876569](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19876569/)
20. Maciel-de-freitas R, Neto RB, Gonçalves JM, Codeço CT, Lourenço-de-oliveira R (2006) Movement of Dengue Vectors Between the Human Modified Environment and an Urban Forest in Rio de Janeiro. *J Med Entomol* 43: 1112–1120. PMID: [17162942](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17162942/)
21. Consoli RAGB, Oliveira RL de (1994) Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil: 228.

22. Maciel-de-Freitas R, Codeço CT, Lourenço-de-Oliveira R (2007) Daily survival rates and dispersal of *Aedes aegypti* females in Rio de Janeiro, Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 76: 659–665. PMID: [17426166](#)
23. Gillies MT (1961) Studies on the dispersion and survival of *Anopheles gambiae* Giles in East Africa, by means of marking and release experiments. *Bull Entomol Res* 52: 99–127.
24. Buonaccorsi JP, Harrington LC, Edman JD (2003) Estimation and comparison of mosquito survival rates with release-recapture-removal data. *J Med Entomol* 40: 6–17. PMID: [12597647](#)
25. Salazar MI, Richardson JH, Sánchez-Vargas I, Olson KE, Beaty BJ (2007) Dengue virus type 2: replication and tropisms in orally infected *Aedes aegypti* mosquitoes. *BMC Microbiol* 7: 9. PMID: [17263893](#)
26. R Core Team (2014) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria.
27. Royle JA, Chandler RB, Sollmann R, Gardner B (2013) Spatial Capture-Recapture. Waltham MA, USA: Academic Press.
28. Keeling MJ, Jiggins FM, Read JM (2003) The invasion and coexistence of competing *Wolbachia* strains. *Heredity (Edinb)* 91: 382–388. PMID: [14512953](#)
29. Turelli M (2010) Cytoplasmic incompatibility in populations with overlapping generations. *Evolution* 64: 232–241. doi: [10.1111/j.1558-5646.2009.00822.x](#) PMID: [19686264](#)
30. Min KT, Benzer S (1997) *Wolbachia*, normally a symbiont of *Drosophila*, can be virulent, causing degeneration and early death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 10792–10796. PMID: [9380712](#)
31. Rasgon JL, Scott TW (2003) *Wolbachia* and cytoplasmic incompatibility in the California *Culex pipiens* mosquito species complex: parameter estimates and infection dynamics in natural populations. *Genetics* 165: 2029–2038. PMID: [14704183](#)
32. Stevens L (1989) Environmental factors affecting reproductive incompatibility in flour beetles, genus *Tribolium*. *J Invertebr Pathol* 53: 78–84. PMID: [2915149](#)
33. Stouthamer R, Breeuwer J, Hurst G (1999) *Wolbachia pipientis*: microbial manipulator of arthropod reproduction. *Microbiology*: 71–102.
34. Kambris Z, Cook P, Phuc H, Sinkins S (2009) Immune activation by life-shortening *Wolbachia* and reduced filarial competence in mosquitoes. *Science* (80: -) 134.
35. Rancès E, Ye YH, Woolfit M, McGraw EA, O'Neill SL (2012) The relative importance of innate immune priming in *Wolbachia*-mediated dengue interference. *PLoS Pathog* 8: e1002548. doi: [10.1371/journal.ppat.1002548](#) PMID: [22383881](#)
36. Zug R, Hammerstein P (2014) Bad guys turned nice? A critical assessment of *Wolbachia* mutualisms in arthropod hosts. *Biol Rev Camb Philos Soc* 49.
37. Hancock PA, Godfray HCJ (2012) Modelling the spread of *Wolbachia* in spatially heterogeneous environments. *J R Soc Interface* 9: 3045–3054. PMID: [22675165](#)
38. Hoffmann AA, Iturbe-Ormaetxe I, Callahan AG, Phillips BL, Billington K, et al. (2014) Stability of the wMel *Wolbachia* infection following invasion into *Aedes aegypti* populations. *PLoS Negl Trop Dis* 8: e3115. doi: [10.1371/journal.pntd.0003115](#) PMID: [25211492](#)
39. Hoffmann AA, Goundar AA, Long SA, Johnson PH, Ritchie SA (2014) Invasion of *Wolbachia* at the residential block level is associated with local abundance of *Stegomyia aegypti*, yellow fever mosquito, populations and property attributes. *Med Vet Entomol* 28 Suppl 1: 90–97. doi: [10.1111/mve.12077](#) PMID: [25171611](#)
40. Keeling MJ, Woolhouse ME, Shaw DJ, Matthews L, Chase-Topping M, et al. (2001) Dynamics of the 2001 UK foot and mouth epidemic: stochastic dispersal in a heterogeneous landscape. *Science* 294: 813–817. PMID: [11679661](#)
41. Meentemeyer RK, Cunniffe NJ, Cook AR, Filipe JAN, Hunter RD, et al. (2011) Epidemiological modeling of invasion in heterogeneous landscapes: spread of sudden oak death in California (1990–2030). *Ecosphere* 2: art17.