

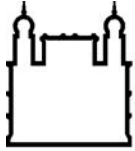
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

EFEITOS DA INFECÇÃO PELO VÍRUS ZIKA EM ASPECTOS
REPRODUTIVOS E NO RITMO CIRCADIANO DO VETOR *Aedes*
Aegypti LINNAEUS 1762 (DIPTERA, CULICIDAE)

MARIA EDUARDA BARRETO RESCK

Rio de Janeiro
Maio de 2020



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

MARIA EDUARDA BARRETO RESCK

Efeitos da infecção pelo vírus Zika em aspectos reprodutivos e no ritmo circadiano do vetor *Aedes aegypti* Linnaeus 1762 (Diptera, Culicidae)

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

Orientador (es): Prof. Dr. Rafaela Vieira Bruno
Prof. Dr. Luana Cristina Farnesi Ferreira

RIO DE JANEIRO

Maio de 2020

Resck, Maria Eduarda Barreto.

Efeitos da infecção pelo vírus Zika em aspectos reprodutivos e no ritmo circadiano do vetor *Aedes aegypti* Linnaeus 1762 (Diptera, Culicidae) / Maria Eduarda Barreto Resck. - Rio de Janeiro, 2020.
70 f.

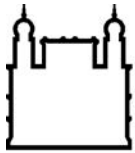
Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2020.

Orientadora: Rafaela Vieira Bruno.

Co-orientadora: Luana Cristina Farnesi Ferreira.

Bibliografia: f. 46-54

1. *Aedes aegypti*. 2. Zika. 3. Fecundidade. 4. Fertilidade. 5. Relógio circadiano. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

MARIA EDUARDA BARRETO RESCK

Efeitos da infecção pelo vírus Zika em aspectos reprodutivos e no ritmo circadiano do vetor *Aedes aegypti* Linnaeus 1762 (Diptera, Culicidae)

**ORIENTADOR (ES): Prof. Dr. Rafaela Vieira Bruno
Prof. Dr. Luana Cristina Farnesi Ferreira**

Aprovada em: 22/ 05/ 2020

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Ademir de Jesus Martins Junior – IOC/FIOCRUZ - Presidente
Prof^a. Dr^a. Samira Chahad Ehlers - UFSCar
Prof^a. Dr^a. Patrícia Carvalho de Sequeira – IOC/FIOCRUZ
Prof^a. Dr^a. Tamara Nunes de Lima Camara – USP
Prof^a. Dr^a. Helena Carolina Martins Vargas – IOC/FIOCRUZ

Rio de Janeiro, 22 de maio de 2020

Dedico esta dissertação à minha mãe
Flávia Barreto dos Santos e ao meu
esposo Jhonathan Martins de Lima
D'Ávila

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária, do Instituto Oswaldo Cruz, IOC, FIOCRUZ, pela minha formação.

Ao Programa Bolsista Nota 10 da FAPERJ, pela bolsa concedida ao longo do desenvolvimento deste trabalho e ao auxílio financeiro da CAPES, FAPERJ, CNPq e IOC, FIOCRUZ.

Às minhas orientadoras Dra. Rafaela Vieira Bruno e Dra. Luana Cristina Farnesi pela confiança, suporte, incentivo e oportunidades ao longo de todos os anos desde o meu início no laboratório. Pela sabedoria, conselhos e orientações a mim passados nessa longa etapa.

À equipe do Laboratório de Biologia Molecular de Insetos (LABIMI), IOC, FIOCRUZ por todo o apoio durante o meu crescimento profissional, na parceria, no cotidiano, nas dicas, conselhos e união.

Aos colaboradores Dr Pedro Langerblad, Dr Marcos Sorgine e Mestre Octávio Talyuli do Laboratório de Bioquímica de Insetos Hematófagos, UFRJ, Dr. Ricardo Lourenço de Oliveira do Laboratório de Transmissores de Hematozoários, IOC, FIOCRUZ e Dra. Priscila Conrado Guerra Nunes do Laboratório de Imunologia Viral, IOC, FIOCRUZ pelo apoio laboratorial e técnico, imprescindíveis à realização deste trabalho.

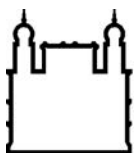
A todos os membros da banca por terem aceitado o convite, que se prontificaram a avaliar este trabalho e por todas as contribuições e sugestões, em especial ao Dr Ademir de Jesus Martins Júnior pela revisão deste trabalho.

À minha família, por sempre me apoiarem e estarem ao meu lado (mesmo que no momento, a 3200 km de distância) nessa jornada que foi o Mestrado. Pelo carinho e esforços realizados durante toda a minha vida. Em especial, à minha mãe Flavia Barreto dos Santos por ter me guiado a vida inteira e incentivado a nunca desistir dos meus sonhos. E ao meu amado e agora esposo Jhonathan D'Ávila, pelo companheirismo, incentivo, paciência, amor e dedicação.

À minha avó Sydélia, ao meu “paidrasto” Rodrigo Alves que nunca mediram esforços para o meu crescimento pessoal e profissional. Aos meus irmãos Rodriguinho e Giovanna, que iluminam minha vida.

“O que eu faço, é uma gota no meio de um oceano. Mas sem ela, o oceano será menor.”

Madre Teresa de Calcutá



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Efeitos da infecção pelo vírus Zika em aspectos reprodutivos e no ritmo circadiano do vetor *Aedes aegypti* Linnaeus 1762 (Diptera, Culicidae)

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

Maria Eduarda Barreto Resck

Envolvido na transmissão de diversos arbovírus, entre eles o vírus Zika, o *Aedes aegypti* é um vetor de grande importância médica. Os ritmos circadianos regulam diferentes comportamentos de insetos vetores que estão ligados a aspectos importantes da capacidade vetorial. O padrão de expressão dos principais genes de relógio que fazem parte do relógio circadiano central em mosquitos já foi descrito em cabeças de fêmeas. A partir desses dados, os efeitos de mudanças fisiológicas como a ingestão sanguínea e a infecção por arbovírus no comportamento do mosquito começaram a ser avaliados com relação a alterações naquele padrão de expressão. Ainda não se sabe como o relógio central e o relógio periférico se comunicam para estabelecer o comportamento do ritmo de oviposição, portanto, estudos da expressão dos genes de relógio nos ovários de mosquitos são necessários. Nesta dissertação, avaliamos o efeito da infecção pelo ZIKV em importantes aspectos da capacidade vetorial (fecundidade e fertilidade) e na expressão de genes do relógio. Vimos que a infecção pelo ZIKV não altera a fecundidade e fertilidade de ovos, mas a eficiência de postura de ovos cai no segundo ciclo gonotrófico. Dos quatro genes de relógio analisados, *tim*, *vri*, *cry2* e *per*, os três primeiros apresentaram arritmidade tanto em ovários de fêmeas infectadas quanto na condição controle (sem infecção), diferente do perfil encontrado em cabeças do mosquito. O único gene que aparenta ter expressão cíclica comumente observada foi *period*, em ambas as condições. Observamos que, independente do perfil rítmico ou arritmico dos genes, a infecção pelo ZIKV parece não afetar o relógio periférico de fêmeas de *Ae. aegypti*, assim como a infecção não afeta os parâmetros fisiológicos analisados (fecundidade e fertilidade). Em conjunto, essas observações nos indicam que os genes de relógio não são modulados pela infecção pelo vírus Zika em ovários de *Aedes aegypti*.

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Effects of Zika virus infection on reproductive aspects and circadian rhythm of *Aedes aegypti* vector Linnaeus 1762 (Diptera, Culicidae)

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION IN PARASITE BIOLOGY

Maria Eduarda Barreto Resck

Involved in the transmission of several arboviruses, including the Zika virus, *Aedes aegypti* is a vector of great medical importance. Circadian rhythms regulate different behaviors of insect vectors that are linked to important aspects of vectorial capacity. The expression pattern of the main clock genes that are part of the central circadian clock in mosquitoes have already been described in female heads. With this knowledge, the effects of physiological changes such as blood intake and arbovirus infection on mosquito behavior started being evaluated. It is not yet known how the central clock and the peripheral clock communicate to establish the oviposition rhythm behavior, therefore, studies of the expression of clock genes in mosquito ovaries are necessary. In this dissertation, we evaluated the effect of ZIKV infection on important aspects of vectorial capacity (fecundity and fertility) and on the expression of clock genes. We noticed that ZIKV infection does not alter the fecundity and fertility of eggs, but egg-laying efficiency drops in the second gonotrophic cycle. Of the four clock genes analyzed, *tim*, *vri*, *cry2* and *per*, the first three showed non cycling profile in both infected and control (without infection) ovaries, differently found from mosquito heads. The only gene that appears to have a cyclic expression is *period*. We noticed that, regardless of the cycling or non-cycling profile pattern of the genes, infection with ZIKV does not seem to affect the peripheral clock of *Ae. aegypti* females, as well as the infection does not affect the analyzed physiological parameters (fecundity and fertility). Taken together, these observations indicate that clock genes they are not modulated by Zika virus infection in *Ae. aegypti* ovaries.

ÍNDICE

RESUMO	VIII
ABSTRACT	IX
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 <i>Aedes aegypti</i>	1
1.2 Vírus Zika	3
1.2.1 Período de incubação extrínseco	5
1.3 Relógio circadiano	6
1.3.1 Propriedades do relógio circadiano	6
1.3.2 O controle molecular do relógio em <i>Drosophila melanogaster</i>	8
1.3.3 Relógio circadiano em vetores	11
1.4 Justificativa	15
2 OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo Geral	16
2.2 Objetivos Específicos	16
3 CAPÍTULO 1	17
3.1 Artigo: Unlike Zika, Chikungunya interferes in the viability of <i>Aedes aegypti</i> eggs, regardless of females' age.	17
4 CAPÍTULO 2	28
4.1 MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1.1 Considerações éticas	28
4.1.2 Criação de Mosquitos	28
4.1.3 Vírus	29
4.1.4 Infecção experimental com ZIKV.....	29
4.1.5 Análise da expressão dos genes de relógio circadiano:	30
4.1.6 Análise estatística.....	33
4.2 Resultados	34
4.2.1 Presença de ZIKV nos ovários de fêmeas de <i>Aedes aegypti</i>	34
4.2.2 Perfil de expressão dos genes de relógio em ovários.....	36

5	DISCUSSÃO	38
6	CONCLUSÃO	44
7	PERSPECTIVA	45
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema do ciclo de vida do mosquito <i>Aedes aegypti</i>	1
Figura 2 - Fertilização dos ovos de fêmeas de <i>Ae.aegypti</i>	2
Figura 3 - Organização da partícula e genoma do vírus Zika.	4
Figura 4 - Principais etapas da infecção do vetor por arbovírus.	6
Figura 5 - Experimento desenvolvido por Jean Jacques d'Ortous de Mairan. ...	7
Figura 6 - Representação da atividade locomotora em escuro constante dos mutantes para o gene <i>per</i> em <i>D. melanogaster</i>	9
Figura 7 - Representação do relógio circadiano em <i>D. melanogaster</i>	10
Figura 8 - Expressão dos genes de relógio em cabeça de fêmeas virgens dos mosquitos <i>Ae. aegypti</i> e <i>Cx. quinquefasciatus</i>	12
Figura 9 - Expressão dos genes <i>cryptochrome1</i> e <i>cryptochrome2</i> em mosquitos <i>Ae. aegypti</i> e <i>Cx. quinquefasciatus</i>	13
Figura 10 - Expressão dos genes <i>timeless</i> , <i>vriille</i> , <i>cryptochrome2</i> e <i>period</i> em ovários de <i>Aedes aegypti</i> infectadas e não infectadas pelo ZIKV em regime LD 12:12.	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Reagentes utilizados na RT-qPCR: concentração e volume final dos componentes do mix de reação para cada poço. 31

Tabela 2 - Reagentes utilizados na síntese de cDNA: concentração e volume final dos componentes do mix de reação de qPCR para cada amostra. 32

Tabela 3 - Genes e *primers* usados para análise quantitativa por PCR em Tempo Real dos genes de relógio em ovários de fêmeas de *Ae. aegypti* infectada com ZIKV. Na tabela constam os genes, e nomes e sequências dos pares de *primers* correspondente a cada gene (*forward* em cima e *reverse* embaixo)..... 32

Tabela 4 - Reagentes utilizados nas reações de qPCR: concentração e volume final dos componentes do mix de reação para cada amostra. 33

Tabela 5 – Efeito da infecção pelo ZIKV na expressão diária dos genes de relógio em ovários de *Ae. aegypti* em regime LD12:12, realizada através da análise de variância (ANOVA One-way)..... 37

Tabela 6 - Expressão diária dos genes de relógio em ovários de *Ae. aegypti* não infectadas (controles) em regime LD12:12, realizada através da análise de variância (ANOVA One-way). 37

LISTA DE QUADRO

Quadro 1 – Quantificação de ZIKV em ovários de fêmeas coletadas ao longo de 24 horas 7 dias pós alimentação infectiva..... 34

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

C = Proteína do capsídeo

cDNA = do inglês *complementar Desoxiribonucleic Acid* (sequência complementar de DNA).

CHIKV = do inglês *Chikungunya vírus*, Vírus Chikungunya

CK2 = proteína CASEÍNA QUINASE 2

Clk = gene *Clock*.

CLK = proteína CLOCK.

cry = gene *cryptochrome*.

CRY = proteína CRYPTOCHROME.

cry2 = gene *cryptochrome 2*.

CRY2 = proteína CRYPTOCHROME 2.

CT = do inglês *Circadian time* (tempo medido em horas de um período sem variações ambientais).

C_T = do inglês *cycle threshold*.

cwo = gene *clockwork orange*.

CWO = proteína CLOCKWORK ORANGE.

cyc = gene *cycle*.

CYC = proteína CYCLE.

DBT = proteína DOUBLETIME

DD = do inglês *Dark-Dark*. Regime artificial de escuro constante em temperatura constante.

DENV = do inglês *Dengue vírus*, Vírus Dengue.

dpi = dia após infecção.

E: Proteína do envelope

E75 = gene *Ecdysone-induced protein 75*.

E75 = proteína ECDYSONE-INDUCED PROTEIN 75.

LD = do inglês *Light/Dark*. Regime artificial de ciclos de claro-escuro.

LiCl = Cloreto de Lítio.

M = Proteína de membrana

mRNA = RNA mensageiro.

NS = Não estrutural

P = probabilidade de um determinado valor estatístico ter ocorrido ao acaso.

PBS= do inglês *Phosphate Buffered Saline* (Tampão Fosfato Salino).

Pdp1 = gene *PAR domain protein 1*.

PDP1 = proteína PAR DOMAIN PROTEIN 1.

per = gene *period*.

PER = proteína PERIOD.

PFU = do inglês *Plaque Forming Unit* (unidade formadora de placa).

qPCR = do inglês *quantitative polymerase chain reaction*. (PCR quantitativo em tempo real).

RT-PCR = do inglês *reverse transcription-polymerase chain reaction*.

SGB = síndrome de Guillain-Barré

SGG = proteína SHAGGY

tim = gene *timeless*.

TIM = proteína TIMELESS.

vri = gene *vrille*.

VRI = proteína VRILLE.

ZIKV= do inglês *Zika vírus*, Vírus Zika.

ZT = *Zeitgeber Time* (Tempo de acordo com o sincronizador ambiental).

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Aedes aegypti*

O mosquito *Aedes (Stegomyia) aegypti* Linnaeus, 1762, é um díptero pertencente à família *Culicidae* e sub-família *Culicinae*. De origem africana, o *Ae. aegypti* foi inicialmente relatado em regiões silvestres do Egito e introduzido no Brasil possivelmente no período colonial por meio de navios de tráfico humano vindos da África¹. É um mosquito encontrado atualmente em regiões tropicais e subtropicais do globo e em algumas regiões de clima temperado nos hemisférios norte e sul^{2,3,4}.

O *Ae. aegypti* é um mosquito holometábolo, e possui ciclo de desenvolvimento aquático e terrestre com duração média de 7 a 10 dias, dependendo da temperatura. Este ciclo apresenta quatro estágios bem definidos: ovo, quatro instares larvais, pupa e adulto⁵ (Figura 1). No início de sua vida são aquáticos, onde suas larvas alimentam-se de matéria orgânica dissolvida e de microrganismos encontrados no criadouro^{6,7} e na fase adulta tornam-se terrestres. Além da temperatura, o desenvolvimento do mosquito até a forma adulta pode depender também da disponibilidade de alimentos e de competição inter e intra-específica no criadouro⁵.

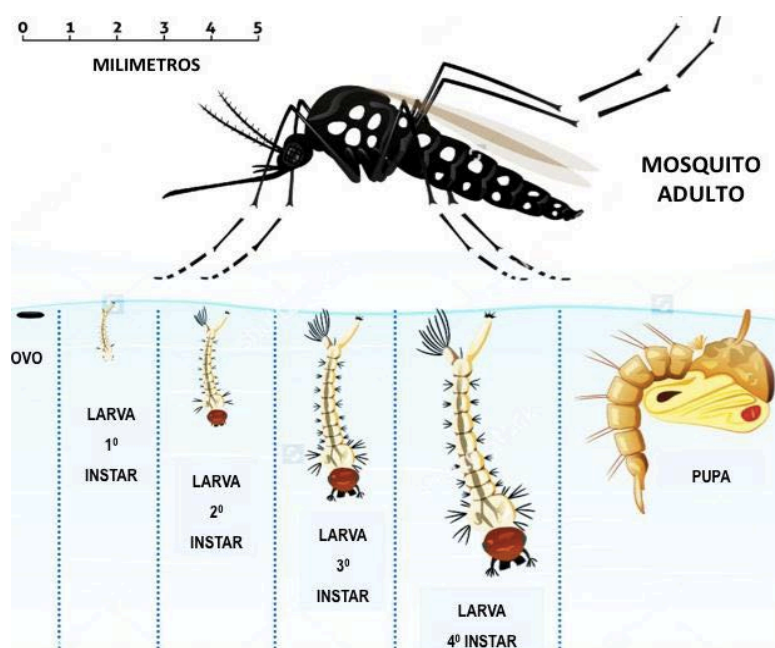


Figura 1 - Esquema do ciclo de vida do mosquito *Aedes aegypti*. Na figura os estágios de vida do mosquito *Ae. aegypti* estão ilustrados: ovo, quatro instares larvais (L1, L2, L3 e L4), pupa e adulto (Fonte: Adaptado de <http://www.istockphoto.com/br>).

Ae. aegypti é uma espécie antropofílica. Os machos são exclusivamente fitófagos e as fêmeas são hematofágicas, uma vez que necessitam de sangue, preferivelmente humano, para a maturação de seus ovos^{8,9}. Após cerca de 3 a 4 dias do repasto sanguíneo as fêmeas já têm seus ovos prontos e podem ovipor em diversos locais que contenham água parada e com pouca matéria orgânica. O tempo entre a alimentação sanguínea e a ovoposição é chamada de ciclo gonotrófico^{5,10}.

Os ovos são depositados na parte úmida da superfície interna dos recipientes, acima do nível da água. Após o desenvolvimento embrionário, que dura cerca de três dias, os recipientes se tornarão criadouros para as larvas recém eclodidas^{1,11}. Vale ressaltar que as fêmeas de *Ae. aegypti* preferem ovipor em locais de fundo escuro e/ou sombreados como por exemplo: pneus, caixas d'água, pratos de planta entre outros^{1,12}. Cada fêmea do mosquito é capaz de produzir cerca de 100 a 200 ovos após cada ingestão de sangue, portanto sendo aptas a realizar inúmeras posturas no decorrer de sua vida. Todavia, a cópula com o macho é necessária apenas uma vez, pois os espermatozoides ficam armazenados por toda vida do inseto em estruturas chamadas de espermatecas^{13,14}. Os ovócitos são fertilizados, no momento da sua passagem pelo oviduto quando espermatozoides são liberados, em uma região especializada denominada micrópila¹⁴ (Figura 2).

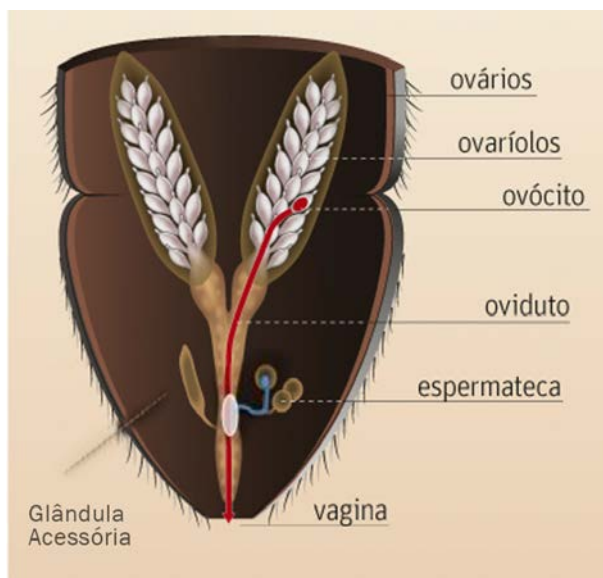


Figura 2 - Fertilização dos ovos de fêmeas de *Ae. aegypti*. Esquema do aparelho reprodutor no interior do último segmento abdominal do mosquito. O trajeto em vermelho representa a passagem do ovócito pelo oviduto até sua saída do corpo da fêmea. O trajeto em azul mostra o caminho percorrido pelo espermatozoide da espermateca até o encontro do ovócito para que ocorra a fertilização. (Fonte: Adaptado de <http://www1.folha.uol.com.br/infograficos/2015/04/119391-dossie-do-mosquito.shtml>)

Os ovos dos *Ae. aegypti* no momento da oviposição são elípticos, côncavos, de coloração esbranquiçada, tornando-se escuros após alguns minutos^{5,13,15}. Geralmente, os ovos postos na superfície da água eclodem assim que terminam o seu desenvolvimento embrionário, que dura cerca de 77.5 horas na temperatura de 25°C, podendo variar para mais ou menos horas de acordo com o aumento ou diminuição da temperatura¹¹.

Caso aconteça uma diminuição da umidade relativa, os ovos passam por um processo de pausa no seu desenvolvimento embrionário, denominado de quiescência facultativa^{1,16,11}. Uma característica dos ovos de *Ae. aegypti* é a resistência à dessecação, a qual é majoritariamente adquirida no primeiro terço da embriogênese e que já foi visto estar diretamente relacionada à formação da cutícula serosa quitinosa e ao processo de melanização da casca do ovo¹⁷⁻¹⁹. Esse processo permite que o embrião sobreviva a vários meses em condições secas e permaneça viável por longos períodos, principalmente se mantidos em ambientes úmidos^{1,19}.

Características biológicas desse vetor, como preferência pela hematofagia em humanos, dispersão dos ovos em diversos criadouros e sítios de postura, discordância gonotrófica (ocorrência de mais de um repasto sanguíneo para produção de um mesmo lote de ovos) e a resistência à dessecação^{5,13,17} favorecem sua manutenção e expansão geográfica ao longo dos anos, dificultando seu controle⁴. Além disso a discordância gonotrófica das fêmeas de *Ae. aegypti* aumenta o número de contatos com a fonte sanguínea (humanos), potencializando o risco de transmissão de arbovírus²⁰.

1.2 Vírus Zika

O vírus Zika (ZIKV), pertencente à Família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*, foi isolado pela primeira vez na África, em 1947 em macacos *Rhesus* sentinelas na Floresta de Ziika, em Uganda²¹. O ZIKV é um vírus esférico e envelopado, com um genoma de RNA de fita simples polaridade positiva, com 10.794 kilobases (kb) de comprimento, que codifica três proteínas estruturais (capsídeo [C], proteína da membrana [M] e do envelope [E], e sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5)²²⁻²⁴(Figura 3). Possui dois genótipos: um Africano e um Asiático²⁴.

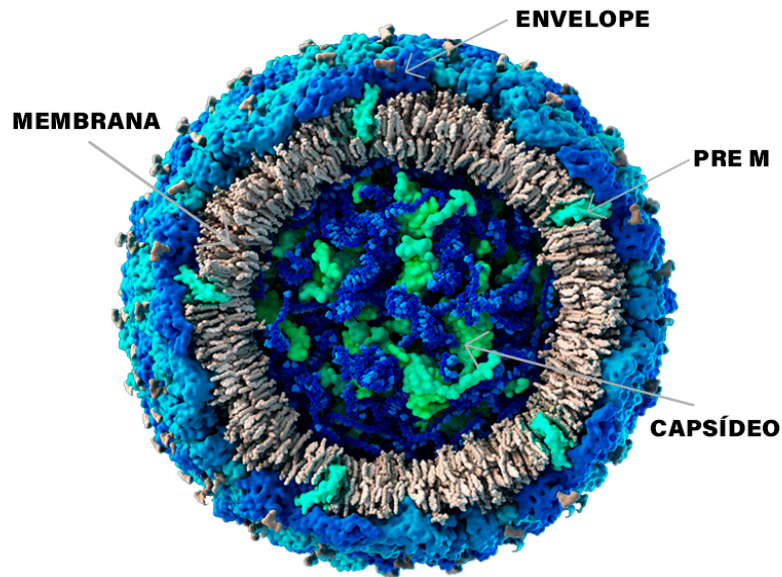
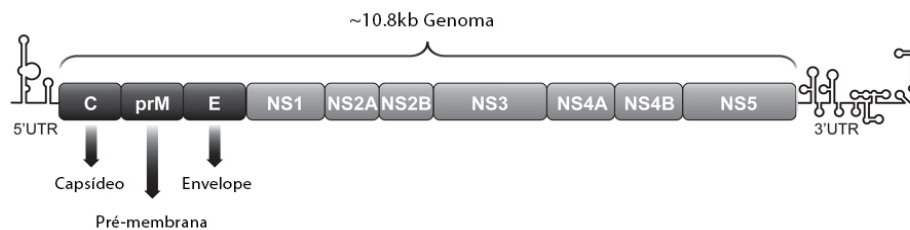
A**B**

Figura 3 - Organização da partícula e genoma do vírus Zika. (A) Esquema representativo da partícula viral e (B) esquema representativo do genoma viral. C: capsídeo, prM: precursor de Membrana, E: envelope, NS (proteínas não estruturais) (Fonte: Adaptado de <http://www.visual-science.com/projects/zika/3d-model> e Rombi e colaboradores¹¹⁵).

O primeiro relato de caso humano ocasionado por infecção pelo ZIKV ocorreu na Nigéria em 1954²⁶. Desde então, apenas casos esporádicos de Zika foram relatados na África e no Sudeste Asiático incluindo a Malásia, Indonésia, Índia, Camboja, Paquistão, Filipinas, Singapura, Tailândia e Vietnã²⁷. Contudo foi em 2007 que uma grande epidemia foi registrada na Ilha de Yap, na Micronésia²⁸ e desde então outras epidemias se seguiram, ocorrendo em ilhas do Oceano Pacífico, na Polinésia Francesa em 2013²⁹, Nova Caledônia³⁰, Ilha de Páscoa³¹ e Ilhas Cook³².

Em maio de 2015 foram relatados os primeiros casos de ZIKV no Brasil, ocorrendo em pacientes em Camaçari, na Bahia³³ e em Natal, Rio Grande do Norte³⁴, associando-o como causador de um surto no nordeste do Brasil.

Zika é uma doença com maioria de casos assintomáticos do que sintomáticos, no entanto os 18% que resultam em manifestações clínicas, apresentam febre baixa, exantema, artralgia, mialgia, cefaleia, hiperemia conjuntival, dentre outros sintomas^{28,35}. Zika normalmente não é associada a complicações

graves, no entanto, há relatos de casos da síndrome de Guillain-Barré (SGB) em infecções por ZIKV²⁵.

Em outubro de 2015, um aumento expressivo de casos de microcefalia em fetos e possivelmente associada à infecção pelo ZIKV foi reportado no nordeste do Brasil. No mês seguinte, o genoma do vírus foi constatado no líquido amniótico de gestantes da Paraíba, com relato de infecção pelo ZIKV e fetos com microcefalia confirmada³⁶. A infecção pelo vírus Zika também é capaz de causar, além da microcefalia, doenças neurológicas congênitas e manifestações de desenvolvimento fetal^{37,38}; tais manifestações em conjunto foram denominadas de Síndrome Congênita do Zika³⁹⁻⁴².

Diante destes novos acontecimentos, a Organização Mundial da Saúde anunciou em fevereiro de 2016 a epidemia de Zika como Emergência Sanitária em Saúde Pública⁴³. O ZIKV é mantido em circulação no ambiente por dois tipos de ciclos de transmissão: silvestre e urbano⁴⁴. A manutenção do primeiro ciclo ocorre devido a interação entre mosquitos e primatas não humanos⁴⁵. Além da interação mosquito/primata, no ciclo silvestre, há também detecção de anticorpos contra o ZIKV em diversas outras espécies de animais, como roedores, morcegos e ovelhas^{46,25}. Já no ciclo urbano, os humanos passam a manter o ciclo de transmissão (mosquitos-humanos). Neste ciclo, os humanos são hospedeiros primários e servem de reservatórios e amplificadores para o vírus²⁸ e os mosquitos do gênero *Aedes*²⁵ como vetores. Estudos de laboratório e de campo revelaram que a principal espécie conhecida que transmite o ZIKV naturalmente no continente americano é o *Aedes aegypti*⁴⁷.

1.2.1 Período de incubação extrínseco

Quando o mosquito realiza o repasto sanguíneo em sangue virêmico de um hospedeiro, ele se torna infectado, iniciando o ciclo de replicação do vírus no intestino do mosquito. Para isso as partículas virais precisam se aderir às células receptoras no epitélio intestinal do inseto para estabelecer infecção. Após a infecção desse tecido, os vírions (partícula viral infecciosa) atravessam a lâmina basal do intestino para adentrar na hemocele (cavidade corporal aberta dos mosquitos que contém os órgãos e músculos)⁴⁸, disseminando para os tecidos secundários e órgãos como ovários, corpo gorduroso e tecido nervoso. O próximo passo é se aderir e replicar nas glândulas salivares antes de invadir o lúmen da glândula salivar para ser transmitido por meio da saliva para um novo hospedeiro vertebrado no

próximo repasto sanguíneo. Uma vez infectado, o mosquito é capaz de transmitir o vírus durante toda a sua vida⁴⁹ (Figura 4). O tempo entre a ingestão de um sangue virêmico e a capacidade do vetor de transmitir as partículas virais infecciosas na saliva é denominado período de incubação extrínseco⁴⁸.

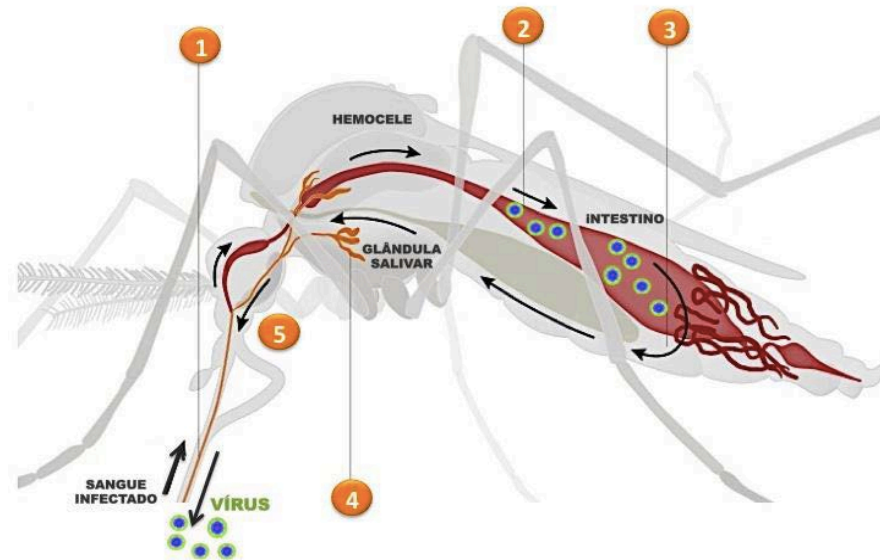


Figura 4 - Principais etapas da infecção do vetor por arbovírus. (1) o mosquito é exposto e se torna infectado quando ingere o sangue de um hospedeiro virêmico, (2) infecção das células epiteliais do intestino pelas partículas virais ingeridas, com replicação e dispersão no epitélio do intestino, (3) disseminação viral do intestino para a hemocele, (4) infecção da glândula salivar e (5) liberação do vírus nos ductos salivares que poderá resultar na infecção do hospedeiro vertebrado não infectado, por transmissão horizontal durante o repasto sanguíneo (Fonte: Adaptado de Chouin-Carneiro & Santos¹¹⁶).

1.3 Relógio circadiano

1.3.1 Propriedades do relógio circadiano

A rotação da Terra gera variações no ambiente às quais animais e plantas são constantemente expostos. Ao longo dos anos esses seres passaram a apresentar oscilações diárias com um período de 24 horas, denominados de “ritmos circadianos” (do latim circa = cerca e diem = dia)^{50,51}.

A observação dos ritmos circadianos tem suas origens desde a antiguidade. No entanto, a primeira descrição da existência de um controle endógeno veio em 1729 com o trabalho do astrônomo Jean Jacques d'Ortous de Mairan. Nesse trabalho, de Mairan observava o ritmo diário de abrir e fechar das folhas da planta *Mimosa pudica* (“dormideira”). A planta abria suas folhas durante o dia e as fechava durante a noite. Em seu experimento, de Mairan submeteu essa planta em condições controladas de escuro constante e averiguou que a planta era capaz de

manter, mesmo sem a presença de luz, o comportamento de abrir e fechar as suas folhas⁵⁰ (Figura 5).



Figura 5 - Experimento desenvolvido por Jean Jacques d'Ortous de Mairan. Espécimes de *Mimosa pudica* (dormideira) são submetidas à luz ou ao escuro constante. Foi observado que em ambas as condições, as plantas continuavam abrindo suas folhas durante o dia subjetivo mesmo na ausência de luz e fechando durante a noite subjetiva (Fonte: Amoretty e colaboradores¹¹⁷).

Em 1832 outro estudo envolvendo *Mimosa pudica* foi publicado pelo botânico suíço Augustin de Candolle. Nesse estudo o pesquisador repetiu os ensaios de Mairan e descobriu que o ritmo de movimento das folhas apresentava um atraso de uma ou duas horas, demonstrando uma periodicidade de 22 a 23 horas. O período próximo a 24 horas notado na ausência de indicadores ambientais foi denominado de “persistência em livre-curso” e foi posteriormente considerada a primeira propriedade do relógio circadiano^{50,52}.

O relógio circadiano pode ser sincronizado por fatores ambientais externos abióticos (como luz, temperatura) ou bióticos (como disponibilidade de alimento e organização social). Este sincronismo é a segunda propriedade do relógio denominada de “arrastamento”^{50,53,52}. Os fatores ambientais externos foram chamados por Jurgen Aschoff de *Zeitgebers*, palavra de origem alemã que significa “doador de tempo”, possuem a função de acertar o ritmo em livre-curso para exatas 24 horas⁵⁰.

A última propriedade do relógio biológico é a termo-compensação. Na termo-compensação, uma variação de até 10°C a mais ou menos numa faixa constante não altera o período em livre curso dentro de uma faixa tolerável para a fisiologia de cada espécie⁵⁰. O primeiro estudo sobre essa propriedade ocorreu na década de 1950 onde o pesquisador Colin Pittendrigh observou que a fase de eclosão da

mosca *Drosophila pseudoobscura*, que ocorre normalmente pela manhã, não se alterava quando a temperatura era diminuída em 10°C, em escuro constante⁵⁴.

1.3.2 O controle molecular do relógio em *Drosophila melanogaster*

Com o objetivo de tentar melhorar o entendimento do mecanismo do relógio circadiano, diferentes modelos de animais e plantas foram utilizados ao longo dos anos seguintes. Contudo foi com a espécie-modelo *Drosophila melanogaster* que os aspectos moleculares do funcionamento do relógio circadiano tomaram um novo rumo servindo então de base para o entendimento do relógio de diversos organismos.

Foi em 1971 que Ron Konopka e Seymour Benzer⁵⁵ descreveram o primeiro gene envolvido no ritmo circadiano, para isso submetem drosófilas a mutagênicos químicos, gerando três linhagens mutantes, que teriam padrões diferentes nos ritmos de eclosão e atividade locomotora dos observados em moscas não mutantes. Ao mapear as mutações, eles observaram que todas elas eram no mesmo *locus* gênico, *period* (*per*).

As linhagens selvagens, em livre curso, apresentavam um período próximo a 24 horas. Quando os mutantes foram submetidos a um regime de escuro constante, as moscas *per^{Short}* (*per^S*) apresentaram um período mais curto, de 19 horas. Já os mutantes *per^{Long}* (*per^L*) apresentaram um período mais longo, de cerca de 29 horas e os mutantes *per⁰¹* mostraram-se arrítmicos^{55,56} (Figura 6).

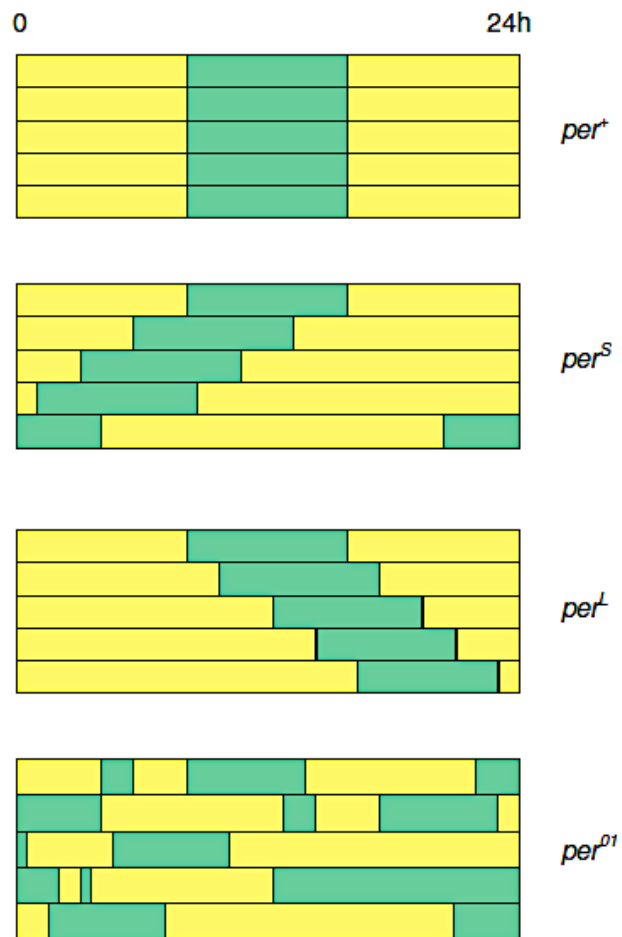


Figura 6 - Representação da atividade locomotora em escuro constante dos mutantes para o gene *per* em *D. melanogaster*. Moscas selvagens (*per*⁺) possuem um período endógeno de atividade locomotora de ~24h; moscas mutantes *per*^S possuem um período endógeno de 19 horas; moscas mutantes *per*^L apresentam um período de 29 horas; moscas mutantes *per*⁰¹ não possuem um período definido. No gráfico, o amarelo representa o horário de repouso e a cor verde, o horário de atividade, cada barra horizontal representa um dia. (Fonte: Konopka & Benzer⁵⁴, e adaptada por Rivas, 2010¹¹⁸).

Desde então, vários genes que compõem o relógio de *D. melanogaster* foram descritos e caracterizados molecularmente, revelando que o relógio central desse inseto é controlado por 3 alças auto-regulatórias interligadas e de retroalimentação negativa^{57,58}.

Na primeira alça regulatória do relógio, durante o dia, os fatores de transcrição CLOCK (CLK) e CYCLE (CYC) formam um heterodímero e se ligam na região E-box (CACGTG) dos genes *period* (*per*) e *timeless* (*tim*), ativando a transcrição desses genes. As proteínas PER e TIM começam a acumular no citoplasma algumas horas após a transcrição de seus respectivos RNAs mensageiros. À medida que PER é traduzido, é fosforilado pelas quinases DOUBLETIME (DBT) e CASEÍNA QUINASE (CK2), o que leva à sua instabilidade e

possibilidade de degradação. Ao mesmo tempo, TIM é fosforilado pela quinase SHAGGY (SGG). No momento em que ambas as proteínas conseguem se acumular no citoplasma, elas se ligam formando o heterodímero PER/TIM, estabilizando PER, que continua ligado a DBT, evitando sua degradação. PER/TIM são então fosforilados por DBT, que promove seu transporte para o núcleo. Uma vez no núcleo, o heterodímero PER/TIM reprimem a ligação de CLK/CYC às regiões promotoras de seus respectivos genes^{59,60,58} (Figura 7). Ao amanhecer, o heterodímero PER/TIM se desfaz, reiniciando o processo.

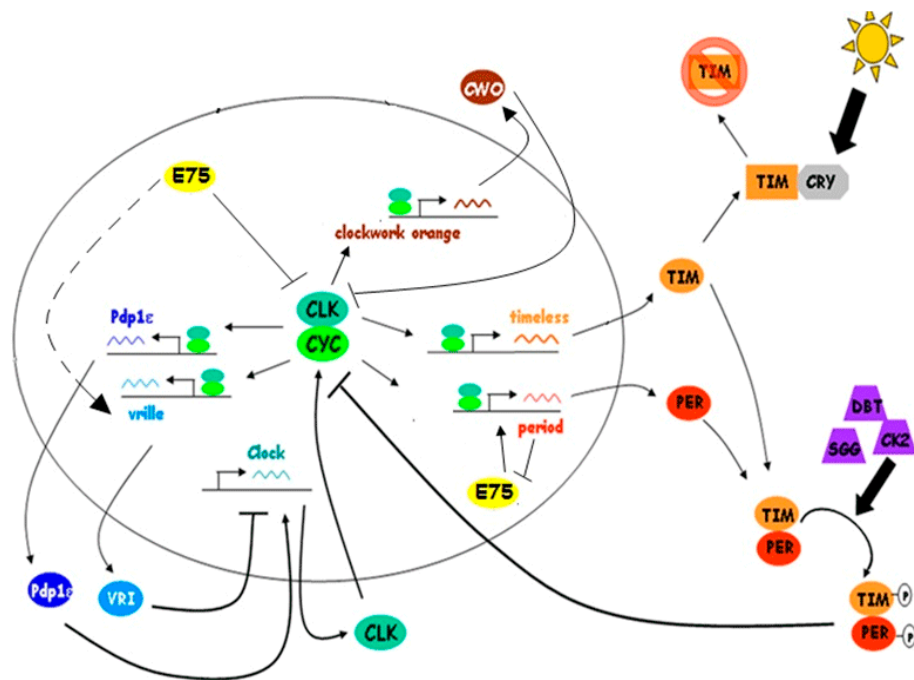


Figura 7 - Representação do relógio circadiano em *D. melanogaster*. Representação das três alças de retroalimentação negativa, mediadas pelo heterodímero CLK-CYC. Resumidamente a primeira alça regulatória envolve a repressão da transcrição dos genes *per* e *tim*. A segunda alça está relacionada à regulação da transcrição de *Clk* pelas proteínas PDP1 (ativador) e VRI (repressor) e a terceira alça é composta por CWO, que reprime a transcrição de *Clk* e modula a amplitude de transcrição de genes do relógio. As setas indicam a regulação positiva e as linhas com final reto indicam repressão transcripcional (Fonte: Bruno *et al.*, 2012 adaptado por Karine Padilha).

Como mencionado anteriormente, a segunda propriedade do relógio é a capacidade de ser sincronizado por fatores ambientais externos, como por exemplo, a luz. Esse reinício de processo ocorre ao amanhecer e é devido a uma proteína denominada CRYPTOCHROME (CRY) que, na presença de luz, se torna ativa e muda sua conformação, permitindo a sua ligação a TIM que é fosforilado e ubiquitinado por outras proteínas, sendo, desta forma, marcado para degradação via proteossoma^{61,62}.

Na segunda alça do relógio, o heterodímero CLK/CYC ativa a transcrição dos genes *vri* (*vri*) e *PAR domain protein ε* (*PDP1ε*) que codificam as proteínas VRI e PDP1ε. No início da noite, a proteína VRI acumula em fase parecida ao seu transcrito, e quando seus níveis aumentam promove a repressão de *Clk* (Figura 7). VRI e PDP1ε competem pelo mesmo sítio de ligação na região promotora de *Clk*, atuando respectivamente como seu repressor e ativador transcricional. Níveis do transcrito de *PDP1ε* acumulam em diferentes fases, algumas horas depois do transcrito de *vri*^{63,64,58}. Acredita-se que a ativação e repressão em diferentes horários poderia causar a expressão rítmica de *Clk*^{63,65}. O gene *cyc* apresenta um perfil constitutivo tanto em seu transcrito, como em sua proteína⁶⁶.

A última alça do relógio, mais recentemente descoberta e pouco conhecida, envolve a transcrição do gene *clockwork-orange* (*cwo*). O heterodímero CLK/CYC se liga à região *E-Box* do gene *cwo* e promove a sua transcrição. Até o momento acredita-se que o gene seria um repressor transcricional do relógio. A proteína CWO se ligaria a sítios *E-boxes* na região promotora tanto do seu, quanto de outros genes, o que inibiria por competição a atuação de CLK/CYC⁶⁷⁻⁶⁹ (Figura 7).

Há pouco tempo, um novo gene do relógio circadiano foi descoberto, o *Ecdysone-induced protein 75* (*E75*). Não se sabe muito sobre o papel do *E75*, no entanto foi observado que *D. melanogaster* silenciadas para esse gene, apresentaram um padrão de atividade locomotora arritmico⁷⁰. Sabe-se também que *E75* atua na transcrição de *per* mediada por CLK-CYC⁷⁰ (Figura 7), inibe a transcrição de *Clk* sozinho ou em conjunto com VRI e que a sua atividade é reprimida por PER⁷¹.

1.3.3 Relógio circadiano em vetores

O padrão de expressão dos principais genes de relógio em cabeças de fêmeas virgens de mosquitos *Ae. aegypti* e *Culex quinquefasciatus* foi descrito em 2009 por Gentile e colaboradores⁷². Nesse estudo, os mosquitos submetidos a ciclos de claro e escuro em ambas espécies mostraram, de maneira geral, um perfil de expressão do RNA mensageiro semelhante ao que é visto em *D. melanogaster*. Os genes *period* e *timeless* têm seu pico de expressão na fase escura e os genes *Clock* e *cycle* em fase clara. O gene *cycle*, diferentemente de *D. melanogaster*, apresenta um padrão de expressão cíclico. Os genes *vri* e *Pdp1* apresentam seus picos de expressão em fases distintas, o que sugere uma competição entre os dois genes pelos mesmos sítios de regulação (Figura 8).

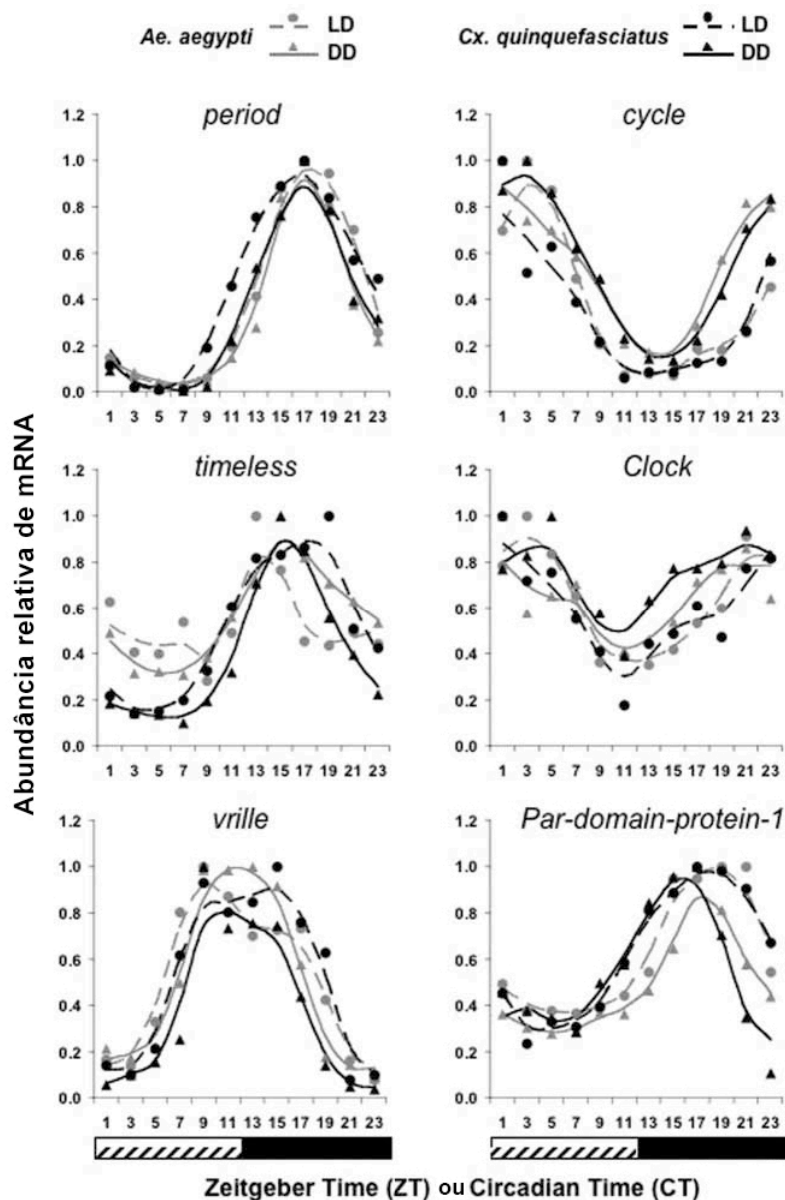


Figura 8 - Expressão dos genes de relógio em cabeça de fêmeas virgens dos mosquitos *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus*. Os gráficos mostram a expressão dos genes *per*, *cyc*, *tim*, *Clk*, *vri* e *Pdp1* em regimes de claro/escuro (LD, linhas tracejadas) e escuro constante (DD, linhas contínuas). As linhas cinzas representam a expressão dos genes em *Ae. aegypti* e as pretas, em *Cx. quinquefasciatus*. O eixo y indica a abundância relativa do RNAm e o eixo x, o ZT (*Zeitgeber* luz) em LD e o CT (*Circadian Time*, o tempo circadiano, em DD). Já a barra branca indica a fase clara em LD, a barra hachurada representa o dia subjetivo em DD (fase em que a luz estaria acesa em um regime claro/escuro) e barra preta indica a fase escura em LD e a noite subjetiva em DD. Os pontos representam LD e os triângulos, DD (Fonte: Modificado de Gentile *et al.*, 2009).

Uma diferença marcante em relação ao modelo *D. melanogaster* é a presença de dois genes *cryptochrome*, um é semelhante ao fotoreceptor (*cry1*) de *Drosophila* e outro (*cry2*), que é ortóloga ao repressor transcricional encontrado em vertebrados⁷³ mas que não se encontra na mosca de frutas.

A expressão do gene *cry1* tanto para *Ae. aegypti* quanto para *Cx. quinquefasciatus* não apresenta padrão de ciclagem. Em relação à expressão de *cry2*, o mosquito *Ae. aegypti* apresenta um padrão bimodal, ou seja, com dois picos de expressão gênica, um pico na fase clara e outro na fase escura. Diferentemente, *Cx. quinquefasciatus* apresenta somente um pico de expressão na fase escura (Figura 9). Não sabemos qual a importância destes dois picos presentes em *Ae. aegypti* na regulação do relógio circadiano. Pressupõe-se que as diferenças observadas na expressão de *cry2* entre estas duas espécies poderiam contribuir para os diferentes padrões de atividade diurno e noturno, respectivamente em *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus*⁷². A partir deste trabalho, foram avaliados os efeitos de mudanças fisiológicas na expressão destes genes e no comportamento do vetor *Ae. aegypti*⁷⁴⁻⁷⁷.

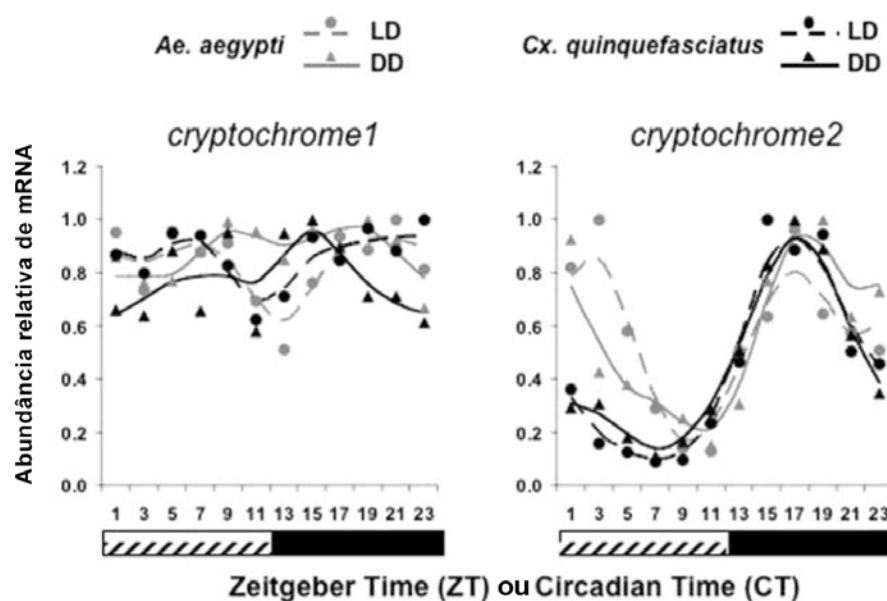


Figura 9 - Expressão dos genes *cryptochrome1* e *cryptochrome2* em mosquitos *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus*. Os gráficos mostram a expressão dos genes *cryptochrome 1* e *2* em regimes de claro/escuro (LD, linhas tracejadas) e escuro constante (DD, linhas contínuas). As linhas cinzas representam a expressão dos genes em *Ae. aegypti* e as pretas, em *Cx. quinquefasciatus*. O eixo y indica a abundância relativa do RNAm e o eixo x, o ZT (*Zeitgeber luz*) em LD e o CT (*Circadian Time, o tempo circadiano*) em DD. Já a barra branca indica a fase clara em LD, a parte hachurada representa o dia subjetivo em DD (fase em que a luz estaria acesa em um regime claro/escuro) e barra preta indica a fase escura em LD e a noite subjetiva em DD. Os pontos representam LD e os triângulos DD (Fonte: Modificado de Gentile *et al.*, 2009).

Nosso grupo⁷⁵ avaliou a expressão dos genes de relógio em corpos de fêmeas de *Ae. aegypti* em diferentes condições fisiológicas: virgem/não alimentada, inseminada/não-alimentada, virgem/alimentada e inseminada/alimentada. A expressão dos genes do relógio foi reduzida quando as fêmeas estavam

alimentadas, independente da condição de cópula e, por isso, pode-se observar que esse fator era suficiente e significativo para impactar na expressão de tais genes⁷⁴. Juntamente com aquele estudo, outros conduzidos com o flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis*⁷⁸ e o mosquito *Anopheles gambiae*^{79,80,81} mostram que a expressão dos genes de relógio e diversos genes controlados pelo relógio podem ser afetados pelo repasto sanguíneo.

Além do efeito da ingestão sanguínea, em outro momento foi observado que a infecção pelo arbovirus DENV2 aumenta o padrão da atividade locomotora de *Ae. aegypti* quando comparadas com mosquitos controles. Esse achado pode significar que a infecção por esse vírus poderia ter um papel na modulação deste comportamento no mosquito⁷⁴. Ao contrário de DENV2, a infecção por ZIKV diminui a atividade locomotora de *Ae. aegypti*, conseqüentemente podendo reduzir sua mobilidade o que indicaria o grande número de casos vistos num mesmo domicílio durante a epidemia de 2015/2016⁸².

Além do relógio central, os organismos possuem relógios periféricos localizados em diversos órgãos e tecidos que muitas vezes regulam ritmos em funções específicas do mesmo⁸³. Os relógios periféricos podem ser autônomos em relação ao relógio central, recebendo estímulos diversos como temperatura, umidade e vibrações mecânicas para o seu funcionamento. No entanto, uma vez que os tecidos do relógio periférico sejam submetidos a condições constantes, podem perder a sincronia entre células⁸⁴. Por volta dos anos 2000, os osciladores periféricos eram considerados autônomos, podendo ser sincronizados pela luz e independentes do oscilador central^{84,85}. Daquele ano em diante, estudos moleculares começaram a esclarecer a complexidade por trás do mecanismo oscilatório, que possui certo grau de independência do relógio central e que varia entre os relógios periféricos^{83,86}.

Apesar de já ter sido observada a influência de mudanças fisiológicas na expressão de genes de relógio, levando a alterações no comportamento, não se sabe ainda como o relógio central e os relógios periféricos se comunicam para estabelecer certas atividades, como por exemplo, o do ritmo de oviposição. Estudos da expressão dos genes de relógio nos ovários de mosquitos são necessários, uma vez que estes padrões são conhecidos somente para *Drosophila*^{87,62,88}. No caso do ritmo de oviposição, já é sabida a preferência das fêmeas de *Ae. aegypti* por ovipor na fase escura¹², no entanto é desconhecida a relação dessa preferência com as bases moleculares do relógio circadiano do vetor.

1.4 Justificativa

O ZIKV se tornou um problema de saúde pública, desde a epidemia ocorrida no Brasil em 2015. Apesar dos relatos de distintos mecanismos de transmissão do vírus²⁵, a transmissão vetorial é o principal meio de dispersão do vírus e, conseqüentemente, da doença.

O conhecimento das bases moleculares dos ritmos circadianos e da fisiologia de insetos vetores é de extrema importância para o conhecimento da biologia do vetor, e para a formulação de estratégias alternativas de controle. Estudos em outras espécies de insetos tem ampliado a compreensão de como os genes de relógio funcionam e se relacionam com a fisiologia, metabolismo e comportamento do animal⁸⁹.

A ovogênese e o comportamento de oviposição, bem como a fecundidade (quantidade de ovos postos/fêmea) e a fertilidade (viabilidade dos ovos postos), são processos cruciais para perpetuação de insetos vetores como o *Ae. aegypti* e atualmente estão sendo alvo de estudos relacionados com a capacidade vetorial^{11,90-92,12}. Testamos aqui a hipótese de que a infecção de fêmeas de *Ae. aegypti* pelo vírus Zika deve chegar aos ovários e afetar a quantidade de ovos postos pela fêmea e a viabilidade dos mesmos, assim como deve alterar o perfil de expressão de genes do relógio circadiano, que sabidamente estão envolvidos nos processos de ovogênese e embriogênese em outras espécies de dípteros^{88,93}.

Neste estudo, tivemos interesse em avaliar o efeito da infecção pelo ZIKV em importantes aspectos da capacidade vetorial (fecundidade e fertilidade) e na expressão de genes do relógio circadiano em ovários de *Ae. aegypti*.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar o papel da infecção experimental do ZIKV na fecundidade, fertilidade e na expressão de genes do relógio circadiano em ovários de fêmeas de mosquitos *Ae. aegypti*.

2.2 Objetivos Específicos

1. Verificar a influência da infecção do ZIKV na quantidade de ovos (fecundidade) de fêmeas individualizadas de *Ae. aegypti*;
2. Investigar a viabilidade (fertilidade) dos ovos oriundos destas fêmeas infectadas experimentalmente pelo ZIKV;
3. Investigar o efeito da infecção do ZIKV, na expressão dos genes de relógio *tim*, *vri*, *cry2* e *per* nos ovários das fêmeas de *Ae. aegypti* alimentadas e não infectadas submetidas a ciclos de claro/escuro (LD 12:12).
4. Investigar o efeito da infecção do ZIKV, na expressão dos genes de relógio *tim*, *vri*, *cry2* e *per* nos ovários das fêmeas de *Ae. aegypti* infectadas com ZIKV e submetidas a ciclos de claro/escuro (LD 12:12).

3 CAPÍTULO 1

3.1 Artigo: Unlike Zika, Chikungunya interferes in the viability of *Aedes aegypti* eggs, regardless of females' age.

Relação do Manuscrito com os Objetivos:

O artigo aqui apresentado é de autoria compartilhada com a aluna de Doutorado Karine Pedreira Padilha do Programa de Pós graduação em Biologia Celular e Molecular do IOC, realizado no LABIMI. Este artigo aborda os efeitos de infecções pelos vírus chikungunya e Zika em parâmetros da capacidade vetorial. Os resultados relacionados à infecção por chikungunya são parte do projeto de Doutorado e a infecção pelo vírus Zika é parte de meu projeto de mestrado. Este capítulo versará especificamente sobre os objetivos específicos 1 e 2 desta dissertação (citados abaixo).

Objetivo específico 1: Verificar a influência da infecção do ZIKV na quantidade de ovos (fecundidade) de fêmeas individualizadas de *Ae. aegypti*;

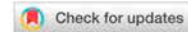
Objetivo específico 2: Investigar a viabilidade (fertilidade) dos ovos oriundos destas fêmeas infectadas experimentalmente pelo ZIKV;

Submetido para publicação em: *Scientific Reports*.

Resumo:

Chikungunya e Zika são arbovírus transmitidos pelo mosquito *Aedes aegypti*. A fecundidade e a viabilidade dos ovos do mosquito são parâmetros importantes da capacidade vetorial. Pretendemos entender, comparativamente, os efeitos da infecção pelo vírus Chikungunya (CHIKV) e Zika (ZIKV) na fecundidade e fertilidade de fêmeas jovens e velhas de *Ae. aegypti*. Utilizando experimentos artificiais de alimentação sanguínea infectiva, observamos que infecção com CHIKV e o ZIKV não alteraram no número de ovos postos em comparação a fêmeas não infectadas. No entanto, a fertilidade diminuiu significativamente em fêmeas jovens ou velhas infectadas com CHIKV, mas não com ZIKV. Observamos uma tendência de aumento de fêmeas nulas (inférteis) em proporção à idade na infecção por ZIKV. Nossos dados em conjunto revelaram que CHIKV e ZIKV afetaram diferentemente um

aspecto reprodutivo relevante de *Ae. aegypti*, que poderiam estar relacionados a disseminações virais diferentes na natureza.



OPEN

Unlike Zika, Chikungunya virus interferes in the viability of *Aedes aegypti* eggs, regardless of females' age

Maria Eduarda Barreto Resck^{1,5}, Karine Pedreira Padilha^{1,5}, Aline Possati Cupolillo¹, Octávio A. C. Talyuli², Anielly Ferreira-de-Brito³, Ricardo Lourenço-de-Oliveira^{3,4}, Luana Cristina Farnesi^{1,5} & Rafaela Vieira Bruno^{1,4,5}✉

Chikungunya and Zika are arboviruses transmitted by the mosquito *Aedes aegypti*. Mosquito fecundity and egg viability are important parameters of vectorial capacity. Here we aim to understand, comparatively, the effects of Chikungunya virus (CHIKV) and Zika virus (ZIKV) infections on the fecundity and fertility of young and old *Aedes aegypti* females. Using artificial infection blood feeding experiments we observed that both CHIKV and ZIKV do not alter the number of eggs laid when compared to uninfected females, although the egg fertility significantly decreases in both young and old CHIKV-infected females. There is an upward trend of null females (infertile females) from 2.1% in young to 6.8% in old ZIKV-infected females. Together, our data revealed that CHIKV and ZIKV affects differently *Ae. aegypti* physiology, that may be related to different viral spread in nature.

Chikungunya virus (CHIKV), a member of the *Togaviridae* family, *Alphavirus* genus, was first isolated in 1952 in Tanzania¹. Emerging and reemerging outbreaks have occurred since its discovery in several regions in Africa, Asia, Indian Ocean islands and Mediterranean areas in Europe^{2,3}. In Brazil, the first Chikungunya autochthonous cases occurred in 2014⁴. The virus spread throughout the country⁵, being in co-circulation with dengue (DENV) and Zika (ZIKV) viruses during this period⁶. Zika, a virus belongs to *Flaviviridae* family, *Flavivirus* genus, was first isolated in 1947⁷. For 60 years, only sporadic Zika cases were reported in humans, however in 2007 an outbreak occurred in Yap Island, Micronesia⁸. Subsequently, ZIKV expanded throughout the Pacific islands and reached the Americas in 2015, turning into an epidemic in Brazil. It is currently considered a new public health threat^{9–11}.

Both arboviruses (Zika and Chikungunya) are transmitted by the bite of mosquitoes of genus *Aedes*^{7,12,13}. Among them, the *Aedes aegypti* is the main vector in the urban transmission cycle^{14–16}. This domestic and anthropophilic species is anautogenous (the females need blood supply for eggs maturation)¹⁷. After one or more blood feedings, egg maturation occurs in about 3 or 4 days. Each period between blood feeding and egg laying is called gonotrophic cycle (GC)^{17–19}. An *Ae. aegypti* female is able to lay approximately 100 eggs per GC²⁰. The ingestion of more than one blood meal by mosquito females within a single gonotrophic cycle is called gonotrophic discordance and can occur in *Aedes aegypti* mosquitoes. This feature is involved in vectorial capacity and is very important for the transmission of viruses^{21–23}.

Comparatively, the biology of the egg phase is less explored than other in the mosquito life cycle. The *Ae. aegypti* eggs can survive for long periods in dry conditions at the end of their embryonic development^{17,19,24–26}. This important feature is related to ecological issues such as dormancy, that enables the embryo to survive

¹Laboratório de Biologia Molecular de Insetos, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz - Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil. ²Laboratório de Bioquímica de Insetos Hematófagos, Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo de Meis, Universidade Federal Do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil. ³Laboratório de Mosquitos Transmissores de Hematozoários, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz - Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil. ⁴Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Médica, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Rio de Janeiro, Brazil. ⁵These authors contributed equally: Maria Eduarda Barreto Resck, Karine Pedreira Padilha, Luana Cristina Farnesi and Rafaela Vieira Bruno. ✉email: rafaelav@ioc.fiocruz.br

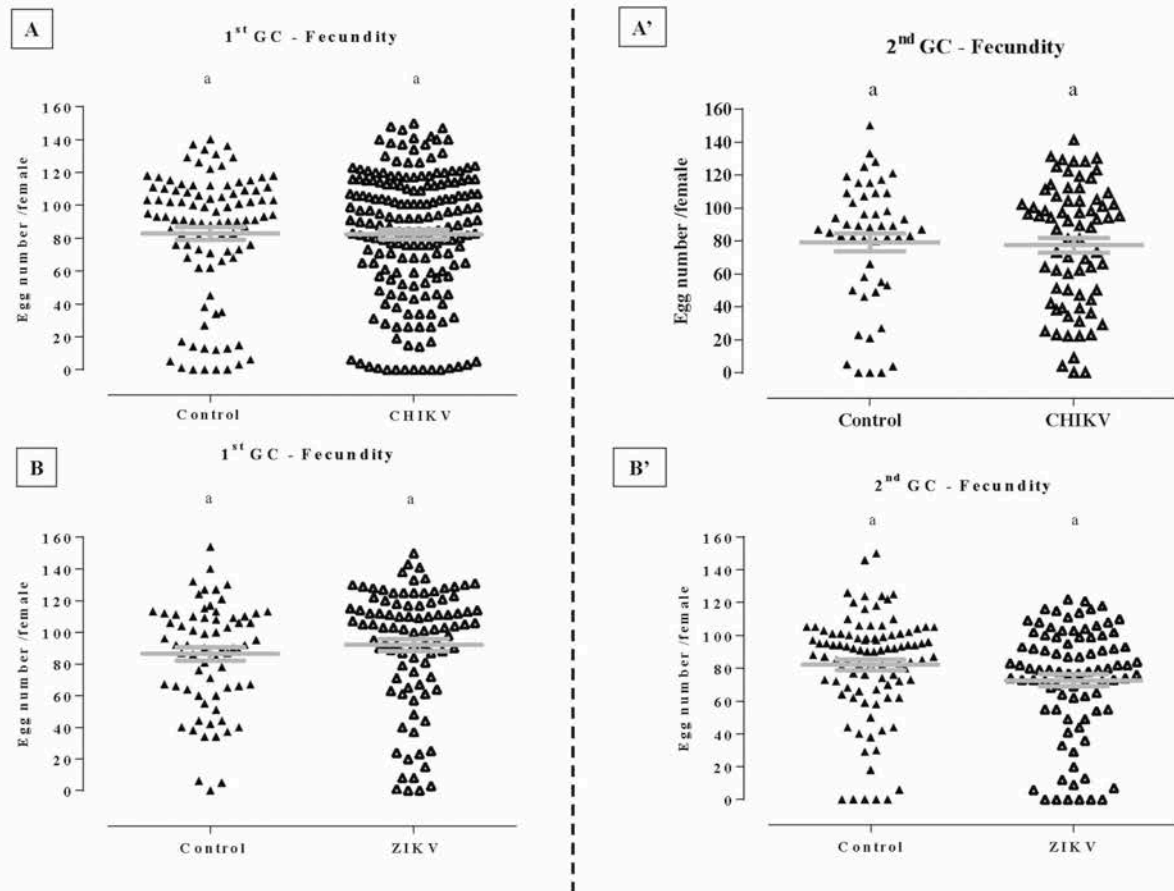


Figure 1. Effect of Chikungunya (CHIKV) and Zika (ZIKV) virus infections on first gonotrophic cycle (GC) (A,B) and second GC (A',B') fecundity of *Aedes aegypti* females. The significance is represented by $p < 0.05$ obtained by using the non-parametric Mann–Whitney test. Bars represent mean and \pm se of independent experiments.

drought periods¹⁹. Furthermore, egg resistance to desiccation (ERD) facilitates passive dispersal to new locations being important to epidemiologic features of arboviruses that has *Ae. aegypti* as the main vector²⁷.

Distinct arbovirus may replicate in different velocities and consequently the time between taking a viremic blood meal and shedding virus into saliva (extrinsic incubation period, EIP) vary. CHIKV reaches the *Aedes* salivary glands faster than DENV2, which directly affects the potential of viral spread²⁸. During the EIP, virus replicate in the midgut and in several secondary mosquito tissues following disseminate in the hemocoel prior to be shed into saliva. Thus, arbovirus can interfere in female biology and consequently in their physiology such as fecundity and fertility^{29–31}. Hence, the analysis of number of eggs laid by an infected mosquito (fecundity) and their viability (fertility) are also key parameters to comprehend the vectorial capacity.

Our previous studies have shown that ZIKV infection can modulate *Ae. aegypti* females' locomotor activity but did not change significantly the fecundity and fertility neither in the second or third GCs when the female egg laying is clustered³⁰. Here we refined our methodology focusing on understand, comparatively, the effect of infection by CHIKV and ZIKV in fecundity and fertility of *Ae. aegypti* females from different ages, analyzed at distinct GC.

Results

CHIKV and ZIKV infection do not change the fecundity. We analyzed whether CHIKV and ZIKV infection influenced in the fecundity in females of different ages following the first or second GCs. Infection rate of randomly chosen samples of mosquitoes orally challenged with viruses was 80% for CHIKV infection and 89.5% for ZIKV infection. We observed that the number of eggs did not change in any of the tested settings for CHIKV infected (7-days-old or 14-days-old females; $p = 0.88$ and $p = 0.96$, respectively) and non-infected mosquitoes (Fig. 1A,A'). The same was observed when females were infected with ZIKV, where no significant differences were observed in fecundity, independent of the females' age ($p = 0.09$ and $p = 0.0542$, respectively) (Fig. 1B,B').

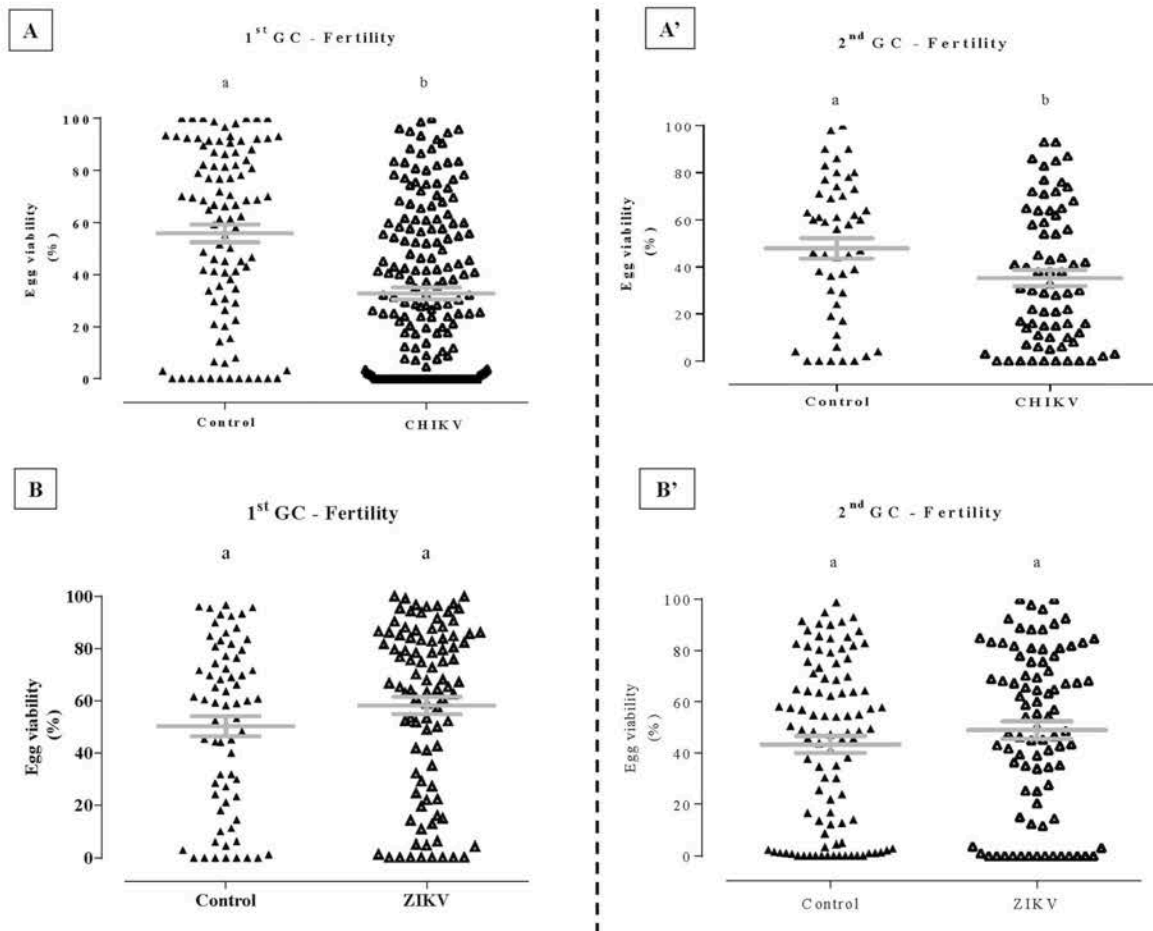


Figure 2. Effect of Chikungunya (CHIKV) and Zika (ZIKV) virus infections on first GC (A,B) and second GC (A',B') fertility of *Aedes aegypti* females. The significance is represented by $p < 0.05$ obtained by using the non-parametric Mann–Whitney test. Bars represent mean and \pm se of independent experiments.

CHIKV infection affects females' fertility, dissimilar from ZIKV infection. As opposed to the fecundity, the fertility (the quantity of egg hatching) was affected by CHIKV infection. When females were younger (infectious blood meal taken in the 1st GC), the average of fertility in non-infected females was $55.77 (\pm 3.43)$ compared to $32.73 (\pm 2.27)$ in CHIKV infected females. In addition, when females were older (infectious feeding was performed in the 2nd GC), the average of the control group was $47.88 (\pm 4.31)$ and decreased to $35.22 (\pm 3.37)$ in the treated group (Fig. 2A,A') ($p < 0.05$ in both cases).

We evaluated the influence of ZIKV infection in *Ae. aegypti*'s fertility, in the same conditions of CHIKV (females were blood fed in different ages/GCs). We did not observe any significant difference for ZIKV infected and non-infected *Ae. aegypti* females' fertility (Fig. 2B,B'; $p = 0.09$ and $p = 0.35$, respectively).

Fecundity and fertility lose correlation when females are infected with CHIKV. We analyzed the correlation between fecundity and fertility in the first and second GCs of females infected with CHIKV or ZIKV. In the former, we can observe that the 7-days-old and 14-days-old females from the control group showed a positive correlation (Fig. 3A,A' boxes; $r = 0.45$ and $r = 0.33$, respectively; $p < 0.0001$, $p = 0.02$, respectively). On the other hand, correlation data from females infected with CHIKV are different when feeding occurred in the first (young females) or second GC (old females). In the first cycle, the positive correlation observed in the control is maintained ($r = 0.30$; $p < 0.0001$), however, in the second GC this correlation is lost ($r = 0.11$, $p = 0.35$) (Fig. 3A,A').

Analyzing the correlation between fecundity and fertility in ZIKV young and old females, we observed a positive linear relationship in the control group (Fig. 3B,B' boxes; $r = 0.42$; $r = 0.27$, respectively and $p = 0.004$, $p = 0.0065$, respectively). When analyzing infected *Ae. aegypti* females' eggs throughout the ages, this positive correlation is still maintained (Fig. 3: B,B'; $r = 0.38$; $r = 0.40$, respectively and $p = 0.0002$, $p = 0.0002$, respectively).

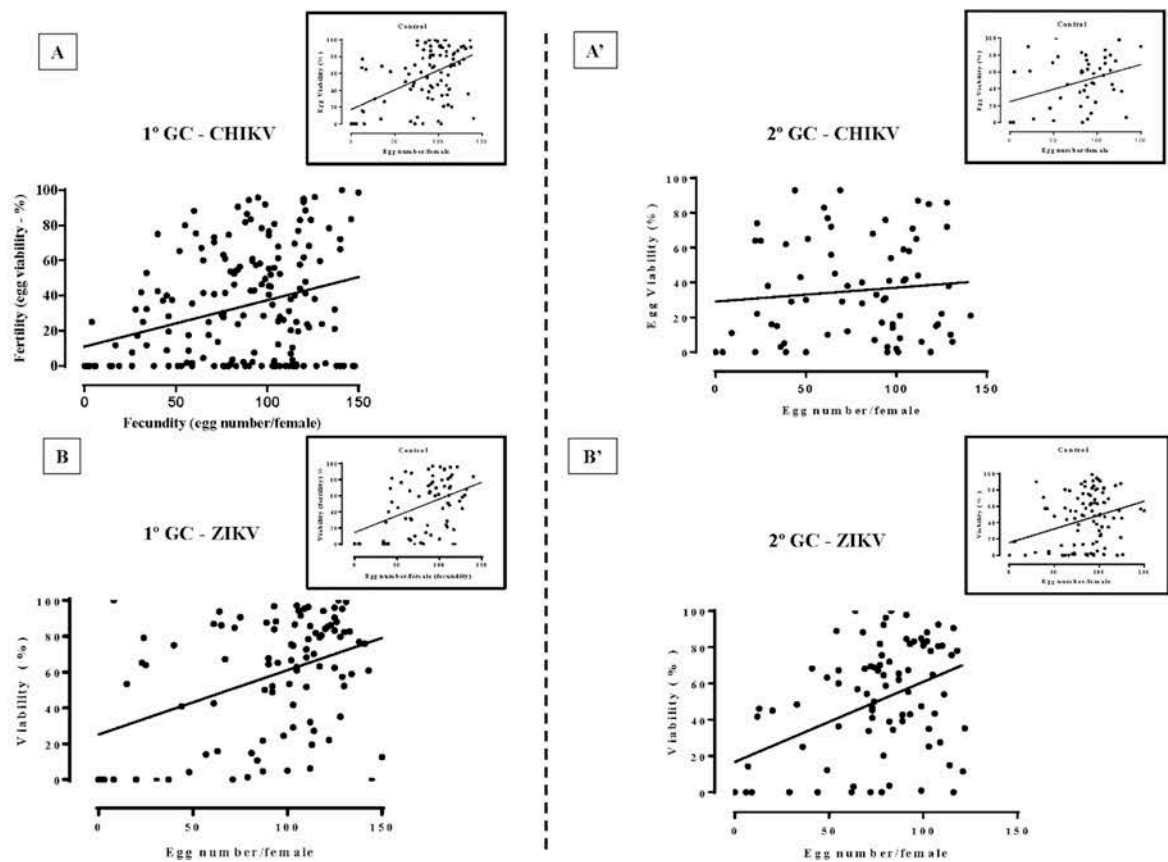


Figure 3. Correlation between fecundity and fertility of *Aedes aegypti* females uninfected and infected with Chikungunya or Zika virus. (A): CHIKV—1^o gonotrophic cycle (GC); (A’): CHIKV—2^o gonotrophic cycle (GC); (B): ZIKV—1^o gonotrophic cycle (GC); (B’): ZIKV—2^o gonotrophic cycle (GC). All boxes shows controls of each conditions. Analysis was made for Correlation of Spearman, the R number of each correlation is described in the text.

	N	Median	% of efficient females ^a	% of null females ^b
1st gonotrophic cycle				
CHIKV	186	91	49.5	3.8
ZIKV	97	92	64.9	2.1
2nd gonotrophic cycle				
CHIKV	72	87	52.8	2.7
ZIKV	88	91	35.2	6.8

Table 1. Oviposition efficiency of *Ae. aegypti* females infected with CHIKV or ZIKV. N number of females. ^aEfficiency was measured according to the control median. ^bFemales that did not lay eggs were considered null.

Oviposition efficiency for CHIKV and ZIKV. We considered as oviposition efficiency the percentage of infected females (with CHIKV or ZIKV) that presented an oviposition value equal to or greater than the median value of control females. In the CHIKV infection, we obtained 49.5% of efficient females when feeding was performed in the first GC and 52.8% when it occurred in the second one. For ZIKV infection, oviposition efficiency was of 64.9% and 35.2% for first and second GCs, respectively. Regarding the number of nulls, that is, females that did not lay eggs, we obtained for CHIKV infection 3.8% and 2.7% when virus challenge was performed in the first or second GC, respectively. When analyzing the number of null females for ZIKV infection, the percentage increased from 2.1% in the first to 6.8% in the second GC (Table 1). In the case of ZIKV null females, we observed an increase of infertility in ZIKV infected females in second GC.

Discussion

Vectorial capacity (VC), critical for arboviruses transmission, is the predictable value through a mathematical formula that considers beyond environmental conditions, intraspecific physiological and behavioral parameters, those that will be important to arboviruses transmission in nature^{32,33}. The VC contemplates mainly biting behavior (frequency of host contact for blood feeding), mosquito-vector survivorship and population density^{32–36}. Population density is very dependent on mosquito fecundity and fertility. *Aedes aegypti* behavior and physiology as well as arbovirus-mosquito interactions are thoroughly studied topics, but additional studies are needed in order to endorse the development of new tools to mosquito control actions.

There are different methods described in the literature to study the fertility of *Ae. aegypti* females^{24,37,38}. Here, we used the methodology called synchronized posture that is successful in forcing females *Ae. aegypti* to lay their eggs in short time intervals^{24,39}. The calculation of the oviposition time of 90 min was based on a comparison of the average number of eggs per female from previous studies in our group with longer time intervals³⁷. In that paper, we showed a female laid an average number of 82 eggs in synchronized postures that lasted 6 h, while we present in this study an average number of 86 eggs per female in postures lasting 90 min. Therefore, we optimized the bioassay and achieved success in a shorter time.

In 2018, Padilha and collaborators³⁰ tested the effects of ZIKV in fecundity and fertility in clusters of infected and non-infected *Ae. aegypti*. Here we aimed for a more accurate evaluation, where eggs laid by individual females were analyzed for additional parameters such as oviposition efficiency and number of null females, and tested correlation between fecundity and fertility.

We examined whether CHIKV or ZIKV infection could affect the number of eggs laid per females and hatching. We noted that, regardless of female age, CHIKV infection does not alter fecundity, but had significant influence on fertility. It is important to report that our results are different from those observed by Sirisena et al.³¹, when using a different methodology from ours. They performed their experiments with different mosquito and virus strains. The oviposition was carried out with females in group and during three GCs, where infective blood feeding occurred only in the first GC. Sirisena et al.³¹ found that CHIKV infection caused the group of females to lay fewer eggs than the control in the first and third GCs but not in the second one; the authors did not test for fertility of individual females.

In relation to ZIKV, despite using different methodologies, our data corroborate those of Padilha et al.³⁰, where ZIKV infection does not cause damage to the overall fertility and viability of *Ae. aegypti*, but with a decreasing tendency ($p = 0.0542$) of egg numbers laid by older females. On the other hand, Petersen et al.³⁸ considered the first three clutches of eggs individually laid by young (7 days), mature (14 days) and old (21 days) *Ae. aegypti* females, analyzing two aspects of fecundity: the oviposition success and clutch size. These authors observed that ZIKV infected mosquitoes laid fewer eggs than the uninfected ones and the egg production was affected by the age of feeding, once younger females laid more eggs than the older ones; egg viability was not tested. When we analyzed the oviposition success, we considered the percentage of females that presented an oviposition value equal to or greater than the control median, while Petersen et al.³⁸ considered individual females that laid at least one egg, in a qualitative analysis.

Our results regarding the success of oviposition indicated that CHIKV-infected females showed a small increase of about three percent in the oviposition efficiency when feeding was performed in the second GC. ZIKV-infected females, on the other hand, showed to be less efficient in this GC, showing a greater decrease in almost half of their efficiency percentage. Moreover, in relation to the percentage of null females, those infected with CHIKV presented infertility of 3.8% and 2.7%, when feeding was performed in the first or second gonotrophic cycles, respectively. However, interestingly, the females infected with ZIKV presented a percentage of 2.1% and 6.8%, respectively, indicated that infertility increases when they get older as expected.

Unlike what was reported by previous studies^{30,31}, in which they used in the second GC the same females that had already had the first oviposition, we aimed to isolate the age factor from the possible drop in viral load over time^{31,40}. That is why we performed infective blood feeding only in the first or in the second GC.

The temporal tropism of the virus was taken into consideration when we decided to perform the infective blood feeding, since the females lay eggs about 4 days after feeding. According to Sirisena et al.³¹ and Ryckebusch et al.⁴⁰, after 4 days of infection, CHIKV and ZIKV have already disseminated over the mosquito's body, although CHIKV does it more quickly. Vega-Rúa et al.¹⁶ showed that CHIKV of distinct genotypes disseminated in 80–100% of *Ae. albopictus* in only 3 days after oral challenge. Le Coupanec et al.²⁸ described the quick distribution of CHIKV particles in *Ae. aegypti* body, more specifically in the midgut (MG) and salivary glands (SG). The virus was detected in the SG at 4-day post viral exposure, peaking by day 8. The replication kinetics of CHIKV is different from other viruses, such as ZIKV, which seems to disseminate to secondary tissues of the mosquito body in a slower manner, with the peaking at 10–14 days after oral challenge^{41,42}.

Finally, we observed a positive correlation between the number of laid eggs and the tendency of hatching viable larvae in younger females. Interestingly, CHIKV and ZIKV infection does not change this pattern in *Ae. aegypti*. On the other hand, when females are older, this correlation is lost in CHIKV infected females.

Our data revealed that ZIKV infection may increase infertility as the females get old but did not affect the viability of the eggs, while CHIKV infection affects viability and shows a loss of correlation of viability versus number of eggs. It indicates that a high oviposition efficiency (high number of eggs) does not correspond to a high number of viable larvae. CHIKV and ZIKV affects differently *Ae. aegypti* physiology, which can have relation with the different viral spread in nature. Understanding these parameters of vectorial capacity is crucial to elucidate the arboviruses transmission as well as the infected *Ae. aegypti* biology.

Methods

Mosquito rearing. *Aedes aegypti* mosquito eggs (PAEA strain from Tahiti, French Polynesia⁴³, maintained in laboratory since 2003) were hatched in plastic trays containing 1.5 L of Milli-RO water and approximately 1 g of yeast (Vitalab, Brazil). First instar larvae were counted and redistributed to new plastic trays (300 larvae per tray) and fed with the same quantity of yeast, every 2 days, until pupae development (according to Farnesi et al.³⁹). Pupae were counted and separated in cages (with approximately 400 each) for adult emergence; males and female mosquitoes were kept together (with 10% sucrose solution ad libitum) to allow copulation. For all experiments, mosquitoes were maintained in an incubator (Forlab Scientific Incubator, USA) at 25 ± 1 °C, with a photoperiod of 12 h of light and dark (LD 12:12) and 60–80% relative humidity (RH).

Virus and mosquito oral infection. The ZIKV strain ZIKV/H.sapiens/Brazil/PE243/201 (GenBank accession number KX197192.1) and CHIKV strain BHI3745/H804709⁴ were used for oral experimental infection of *Ae. aegypti* females.

These strains were harvested in C6/36 monolayer cells flask for 7 days, in Leibovitz-15 media supplemented with 5% fetal bovine serum, triptose 2.9 g/L, 0.075% sodium bicarbonate, 0.02% L-glutamine, 1% of non-essential amino acids and 1% penicillin/streptomycin at 28 °C according to Oliveira et al.⁴⁴. Cell culture supernatant was collected and centrifuged at 1500g for 5 min. The aliquots were kept frozen – 70°C until use.

Both viral titres were determined by plaque assay in Vero cells following 10 × serial viral stock dilution and covered by a layer of DMEM media supplemented with 2% fetal bovine serum, 1% penicillin/streptomycin and 0.8% methylcellulose, incubated for 3 days at 37 °C and 5% CO₂.

The mosquitoes were orally infected with seven ('young females') or fourteen ('old females') days old by blood meal containing 10⁷ PFU/ml of CHIKV or ZIKV. The infectious blood meal was prepared by mixing 1:1 of rabbit red blood cells and virus stock and 10% of heat-inactivated rabbit plasma. The mosquitoes were artificially fed using glass artificial feeders, sealed with Parafilm-M membrane stretched, connected to a bath at 37 °C for approximately 40 min, inside a Biosafety level—2 (BSL-2) insectary. Control mosquitoes fed on a similar blood meal, but with a non-infected L15 culture medium⁴⁴. Prior to blood meals, female mosquitoes were deprived of sucrose for approximately 6 h. After blood meal, mosquitoes were cold anesthetized and only the fully engorged females were used.

Viral confirmation. Total RNA from the whole mosquitoes was extracted individually, 4 days after virus infection, using TRIzol (Life Technologies) according to manufacturer's protocol. Viral RNA detection and quantification of Zika and Chikungunya were carried out through RT-qPCR with TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) in QuantStudio 6 Flex Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). For ZIKV detection, reaction was conducted using 0.6 μM forward primer—5'-CTTGAGTGCTTGTGATT-3', genome position 3451–3468; 0.6 μM reverse primer—5'-CTCCTCCAGTGTTCATTT-3', genome position 3637–3620 and 0.8 μM probe—5'FAM-AGAAGAGAATGACCACAAAGATCA-3'TAMRA, genome position 3494–3517. For CHIKV detection, reaction was conducted using 1.1 μM forward primer 5'-TCACTCCCTGTTGGACTTGATAGA-3, genome position 6856–6879; 1.1 μM reverse primer—5'-TTGACGAACAGAGTTAGGAACATACC-3, genome position 6981–6956), and 0.2 μM probe 5'FAM-AGG TACGCGCTTCAAGTTCGGCG-3', genome position 919–6941^{45,46}. Cycling conditions for reactions were the same, as follows: 50 °C for 5 min, 95 °C for 20 s, followed by 40 amplification cycles of 95 °C for 15 s and 60 °C for 60 s.

Gonotrophic cycle assays for fecundity and fertility. For young females assays we used eggs of the first GC. Seven days-old *Ae. aegypti* females were provided with infected or uninfected blood meal as previously described. Oviposition was stimulated 4 days after blood meal as described in Farnesi et al.³⁹. About 30 females per condition, in each experiment, were individually isolated in an inverted plastic Petri dish (90 mm in diameter) with wet filter paper (Whatman No. 1) lining the lid. All females were allowed to oviposit for 90 min inside incubators (25 °C), in dark and 60–80% relative humidity conditions. After oviposition, females were released in cages, and randomly separated for posterior viral detection (at least five females per condition). Eggs were stored inside the incubators in a regimen of 12 h of light followed by 12 h of dark (L/D) until the end of embryogenesis.

For old females' assays, the eggs of the first GC of 7-days-old females were discarded as described by Padilha et al.³⁰. After that, females returned to the cages provided with sucrose 10% ad libitum until they were 14 days-old when they were fed with infected or uninfected blood meal. Then, they were individualized and stimulated to lay eggs of the second GC as described above. Eggs from second GC were used to the analyses. The eggs dried for 7 days inside incubators (LD12:12; 25 °C and 60–80% RH) and then were counted and tested for viability.

Fertility assays. All the eggs obtained from individual females were tested for viability. Briefly, to stimulate hatching 50 mL of industrial yeast extract solution 0.15% (weight/volume) were added in each Petri dish placed in incubators for 24 h (25 °C, 60–80% RH and photoperiod LD 12:12), according to Farnesi et al.³⁹. In general, the assays were made three times independently.

Oviposition efficiency. To evaluate if infection with CHIKV or ZIKV interferes in the efficiency of females to lay eggs, we assumed they were efficient when they could lay a number of eggs equal or higher than the control median, considering the control group of each age and each infection condition. The median of all controls is near to the average of egg laid described to *Ae. aegypti* species^{19,20}.

Statistical analysis. At first, all physiological data were tested for normality by Shapiro–Wilk test. We applied Mann–Whitney test for fecundity and fertility, as described in each graphic legends. For correlation analysis between fecundity and fertility, was used the Spearman coefficient. All statistical assays were executed using GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, California, EUA) and p value <0.05 was considered for significant differences.

Ethical statement. All experiments carried out on this study were approved by the institutional Research Ethics Committees IOC/FIOCRUZ #LW34/14 and CEUA-UFRJ 149/19 (for use of rabbit blood). All experiments were performed in accordance with relevant guidelines and regulations.

Data availability

The data generated and analyzed during the current study are available upon reasonable request to the corresponding author.

Received: 11 March 2020; Accepted: 27 July 2020

Published online: 12 August 2020

References

- Ross, R. W. The Newala epidemic. III. The virus: isolation, pathogenic properties and relationship to the epidemic. *J. Hyg.* **54**, 177–191. <https://doi.org/10.1017/s0022172400044442> (1956).
- Laras, K. *et al.* Tracking the re-emergence of epidemic chikungunya virus in Indonesia. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **99**, 128–141. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2004.03.013> (2005).
- Staples, J. E., Breiman, R. F. & Powers, A. M. Chikungunya fever: An epidemiological review of a re-emerging infectious disease. *Clin. Infect. Dis.* **49**, 942–948. <https://doi.org/10.1086/605496> (2009).
- Nunes, M. R. *et al.* Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil. *BMC Med.* **13**, 102. <https://doi.org/10.1186/s12916-015-0348-x> (2015).
- Honório, N. A., Câmara, D. C., Calvet, G. A. & Brasil, P. Chikungunya: An arbovirus infection in the process of establishment and expansion in Brazil. *Cad Saude Publica.* **31**, 906–908. <https://doi.org/10.1590/0102-311XPE020515> (2015).
- Freitas, L. P., Cruz, O. G., Lowe, R. & Sá Carvalho, M. Space-time dynamics of a triple epidemic: Dengue, chikungunya and Zika clusters in the city of Rio de Janeiro. *Proc. Biol. Sci.* **286**, 20191867. <https://doi.org/10.1098/rspb.2019.1867> (2019).
- Dick, G. W., Kitchen, S. F. & Haddow, A. J. Zika virus. I. Isolations and serological specificity. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **46**, 509–520 (1952).
- Duffy, M. *et al.* Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *N. Engl. J. Med.* **360**, 2536–2543. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0805715> (2009).
- Musso, D., Nilles, E. J. & Cao-Lormeau, V. M. Rapid spread of emerging Zika virus in the Pacific area. *Clin. Microbiol. Infect.* **20**, O595–596. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12707> (2014).
- Zanluca, C. *et al.* First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo. Cruz.* **110**, 569–572. <https://doi.org/10.1590/0074-02760150192> (2015).
- Musso, D. & Gubler, D. J. Zika virus. *Clin. Microbiol. Rev.* **29**, 487–524. <https://doi.org/10.1128/CMR.00072-15> (2016).
- Haddow, A. J., Williams, M. C., Woodall, J. P., Simpson, D. I. H. & Goma, L. K. H. Twelve isolations of Zika virus from *Aedes (Stegomyia) africanus* (Theobald) taken in and above a Uganda forest. *Bull. World Health Organ.* **31**, 57 (1964).
- Jupp, P. G., McIntosh, B. M., Dos Santos, I. & DeMoor, P. Laboratory vector studies on six mosquito and one tick species with chikungunya virus. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **75**, 15–19. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(81\)90005-5](https://doi.org/10.1016/0035-9203(81)90005-5) (1981).
- Boorman, J. P. T. & Porterfield, J. S. A simple technique for infection of mosquitoes with viruses. Transmission of zika virus. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **50**, 238–242. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(56\)90029-3](https://doi.org/10.1016/0035-9203(56)90029-3) (1956).
- Mangiafico, J. A. Chikungunya virus infection and transmission in five species of mosquito. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **20**, 642–645. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1971.20.642> (1971).
- Vega-Rúa, A., Zouache, K., Girod, R., Failloux, A. B. & Lourenço-de-Oliveira, R. High level of vector competence of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from ten American countries as a crucial factor in the spread of Chikungunya virus. *J. Virol.* **88**, 6294–6306. <https://doi.org/10.1128/JVI.00370-14> (2014).
- Clements, A. N. *The Biology of Mosquitoes: Volume 1: Development, Nutrition and Reproduction* (Chapman & Hall, London, 1992).
- Pant, C. P. & Yasuno, M. Field studies on the gonotrophic cycle of *Aedes aegypti* in Bangkok, Thailand. *J. Med. Entomol.* **10**, 219–223. <https://doi.org/10.1093/jmedent/10.2.219> (1973).
- Christophers, S. R. *Aedes aegypti: The Yellow Fever Mosquito: Its Life History, Bionomics And Structure* (Cambridge University Press, London, 1960).
- Valle, D., Pimenta, D. N. & da Cunha, R. V. *Dengue: teorias e práticas* (FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 2015).
- Macdonald, W. W. *Aedes Aegypti* in Malaya: II.—larval and adult biology. *Ann. Trop. Med. PH.* **50**, 399–414. <https://doi.org/10.1080/00034983.1956.11685782> (1956).
- Barata, E. A. M. *et al.* População de *Aedes aegypti* (L.) em área endêmica de dengue, Sudeste do Brasil. *Rev de Saúde Pública* **35**, 237–242. <https://doi.org/10.1590/S0034-89102001000300004> (2001).
- dos Santos Andrade, P. *et al.* Parity and gonotrophic discordance of females of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in the city of São Paulo, SP, Brazil. *J. Vector Ecol* **44**, 233–240. <https://doi.org/10.1111/jvec.12354> (2019).
- Rezende, G. *et al.* Embryonic desiccation resistance in *Aedes aegypti*: Presumptive role of the chitinized serosal cuticle. *BMC Dev. Biol.* **8**, 82 (2008).
- Farnesi, L. C., Menna-Barreto, R. F., Martins, A. J., Valle, D. & Rezende, G. L. Physical features and chitin content of eggs from the mosquito vectors *Aedes aegypti*, *Anopheles aquasalis* and *Culex quinquefasciatus*: Connection with distinct levels of resistance to desiccation. *J. Insect. Physiol.* **83**, 43–52. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2015.10.006> (2015).
- Farnesi, L. C., Vargas, H. C. M., Valle, D. & Rezende, G. L. Darker eggs of mosquitoes resist more to dry conditions: Melanin enhances serosal cuticle contribution in egg resistance to desiccation in *Aedes*, *Anopheles* and *Culex* vectors. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **11**, e0006063. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006063> (2017).
- Brown, J. E. *et al.* Worldwide patterns of genetic differentiation imply multiple “domestications” of *Aedes aegypti*, a major vector of human diseases. *Proc. Biol. Sci.* **278**, 2446–2454. <https://doi.org/10.1098/rspb.2010.2469> (2011).
- Le Coupance, A. *et al.* Co-infection of mosquitoes with chikungunya and dengue viruses reveals modulation of the replication of both viruses in midguts and salivary glands of *Aedes aegypti* mosquitoes. *Int. J. Mol. Sci.* <https://doi.org/10.3390/ijms18081708> (2017).

29. Maciel-de-Freitas, R., Koella, J. C. & Lourenço-de-Oliveira, R. Lower survival rate, longevity and fecundity of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) females orally challenged with dengue virus serotype 2. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **105**, 452–458. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2011.05.006> (2011).
30. Padilha, K. P. *et al.* Zika infection decreases *Aedes aegypti* locomotor activity but does not influence egg production or viability. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **113**, e180290. <https://doi.org/10.1590/0074-02760180290> (2018).
31. Sirisena, P. D. N. N., Kumar, A. & Sunil, S. Evaluation of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Life Table Attributes Upon Chikungunya Virus Replication Reveals Impact on Egg-Laying Pathways. *J Med Entomol.* **55**, 1580–1587. <https://doi.org/10.1093/jme/tjy097> (2018).
32. Garrett-Jones, C. The human blood index of malaria vectors in relation to epidemiological assessment. *Bull. World Health Organ.* **30**, 241–261 (1964).
33. Bruno, R. V., Farnesi, L. C. & Araripe, L. O. *The Effects of Infection on Mosquito Rhythmic Behavior. Current Topics in the Epidemiology of Vector-Borne Diseases* (IntechOpen) <https://www.intechopen.com/online-first/the-effects-of-infection-on-mosquito-rhythmic-behavior>(2019).
34. Clements, A. N. *The biology of mosquitoes. Volume 2: Sensory reception and behavior* (CABI Publishing, Wallingford, 1999).
35. Smith, D., Dushoff, J. & McKenzie, F. The risk of a mosquito-borne infection in a heterogeneous environment. *PLoS Biol.* **2**, e368. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020368> (2004).
36. Kramer, L. D. & Ciota, A. T. Dissecting vectorial capacity for mosquito-borne viruses. *Curr. Opin. Virol.* **15**, 112–118. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2015.10.003> (2015).
37. Farnesi, L. C., Barbosa, C. S., Araripe, L. O. & Bruno, R. V. The influence of a light and dark cycle on the egg laying activity of *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* <https://doi.org/10.1590/0074-02760170362> (2018).
38. Petersen, M. T. *et al.* The impact of the age of first blood meal and Zika virus infection on *Aedes aegypti* egg production and longevity. *PLoS ONE* **13**, e0200766. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200766> (2018).
39. Farnesi, L. C., Martins, A. J., Valle, D. & Rezende, G. L. Embryonic development of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): Influence of different constant temperatures. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **104**, 124–126. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762009000100020> (2009).
40. Ryckebusch, F., Berthet, M., Missé, D. & Choumet, V. Infection of a French Population of *Aedes albopictus* and of *Aedes aegypti* (Paea Strain) with Zika Virus Reveals Low Transmission Rates to These Vectors' Saliva. *Int. J. Mol. Sci.* <https://doi.org/10.3390/ijms18112384> (2017).
41. Fernandes, R. S. *et al.* *Culex quinquefasciatus* from Rio de Janeiro is not competent to transmit the local zika virus. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **10**, e0004993 (2016).
42. Angleró-Rodríguez, Y. I. *et al.* *Aedes aegypti* molecular responses to zika virus: Modulation of infection by the toll and Jak/Stat immune pathways and virus host factors. *Front. Microbiol.* **8**, 2050. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02050> (2017).
43. Vazeille-Falcoz, M., Mousson, L., Rodhain, F., Chungue, E. & Failloux, A.-B. Variation in oral susceptibility to dengue type 2 virus of populations of *Aedes aegypti* from the islands of Tahiti and Moorea, French Polynesia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **60**, 292–299. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1999.60.292> (1999).
44. Oliveira, J. H. M. *et al.* Catalase protects *Aedes aegypti* from oxidative stress and increases midgut infection prevalence of Dengue but not Zika. *PLoS Negl. Trop. Dis.* <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005525> (2017).
45. Ferreira-de-Brito, A. *et al.* First detection of natural infection of *Aedes aegypti* with Zika virus in Brazil and throughout South America. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **111**, 655–658. <https://doi.org/10.1590/0074-02760160332> (2016).
46. Lanciotti, R. S. *et al.* Chikungunya virus in US travelers returning from India, 2006. *Emerg. Infect. Dis.* **13**, 764–767. <https://doi.org/10.3201/eid1305.070015> (2007).

Acknowledgements

To Robson Costa da Silva and Maria Ignez Lima Bersot for their technical support. We would like to dedicate this paper to Dr. Alexandre Afranio Peixoto, a great scientist and friend. This study was financed in part by: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior–Brazil (CAPES)–Finance Code 001; Fundação Carlos Chagas de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro–FAPERJ; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico–CNPq and Financiadora de Estudos e Projetos—Finep.

Author contributions

L.C.F. and R.V.B. designed experiments and conceived the project. L.C.F., R.V.B., M.E.B.R. and K.P.P. discussed the data and wrote the original draft. L.C.F., R.V.B. and R.L.O. reviewed the manuscript. M.E.B.R., K.P.P. and A.P.C. carried out infected and uninfected mosquito experiments. O.A.C.T. and A.F.B. performed molecular experiments and confirmed the infections collection. R.V.B. supervised the project. All authors read and approved of the final manuscript.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Correspondence and requests for materials should be addressed to R.V.B.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2020

4 CAPÍTULO 2

Este capítulo refere-se ao objetivo específico 3 e 4 desta dissertação.

Objetivo específico 3: Investigar o efeito da infecção do ZIKV, na expressão dos genes de relógio *tim*, *vri*, *cry2* e *per* nos ovários das fêmeas de *Ae. aegypti* alimentadas e não infectadas submetidas a ciclos de claro/escuro (LD 12:12).

Objetivo específico 4: Investigar o efeito da infecção do ZIKV, na expressão dos genes de relógio *tim*, *vri*, *cry2* e *per* nos ovários das fêmeas de *Ae. aegypti* infectadas com ZIKV e submetidas a ciclos de claro/escuro (LD 12:12).

4.1 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1.1 Considerações éticas

Todos os experimentos realizados neste estudo utilizando animais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa: IOC/FIOCRUZ#LW34/14 (Laboratório de Transmissores de Hematozoários, LATHEMA/IOC, FIOCRUZ), para alimentação em camundongos e CEUA-UFRJ 149/19 (Laboratório de Bioquímica de Artrópodes Hematófagos, IBqM, UFRJ), para utilização do sangue de coelho.

4.1.2 Criação de Mosquitos

Os ovos de *Ae. aegypti* usados neste estudo são da linhagem PAEA, originária do Taiti⁹⁴ e foram cedidos em colaboração com o Dr. Ricardo Lourenço-de-Oliveira do Laboratório de Transmissores de Hematozoários (LATHEMA/IOC, FIOCRUZ). Foram colocados para eclodir em bacias contendo 1,5L de água Milli-RO e 2 comprimidos (0,8g) de levedo de cerveja (Vitalab). As larvas de primeiro instar (L1) foram separadas (300 larvas/bacia) e alimentadas com 2 comprimidos de levedo de cerveja. A água e levedo de cerveja da bacia foram trocados em dias alternados até a pupação, onde 400 pupas eram alocadas em gaiolas cilíndricas de papelão de 16,5 cm de diâmetro x 17 cm de altura. As fêmeas recém emergidas eram mantidas com solução de sacarose 10% *ad libitum* e em contato com machos por, pelo menos, 48h, para que ocorresse sua inseminação. O regime de criação foi

realizado em incubadora em regime LD12:12 (do inglês Light:dark, com 12 horas de claro seguidas de 12 horas de escuro), à temperatura constante de 25°C.

4.1.3 Vírus

O vírus utilizado para a infecção experimental das fêmeas de *Ae. aegypti* foi gentilmente cedido pelo Laboratório de Bioquímica de Insetos Hematófagos (IBqM, UFRJ). A cepa ZIKV/*H.sapiens*/Brazil/PE243/201, número de acesso GenBank KX197192.1, foi isolada de um paciente febril no estado de Pernambuco, Brasil e previamente caracterizada⁹⁵. A cepa foi mantida em células C6/36 por 7 dias, em meio de cultivo Leibovitz L15 suplementado com 5% de soro fetal bovino, 2.9 g/L de triptose, 0,075% de bicarbonato de sódio, 0,02% de L-glutamina, 1% de amino ácido não essencial e 1% penicilina/estreptomicina em temperatura de 28°C conforme Oliveira e colaboradores⁹⁶.

4.1.4 Infecção experimental com ZIKV

A infecção experimental foi realizada em colaboração com o Laboratório de Bioquímica de Insetos Hematófagos (IBqM, UFRJ). Fêmeas de cinco dias foram submetidas ao repasto artificial infeccioso (sangue de coelho infectado com a cepa viral ZIKV-PE na concentração de 10⁷ PFU/mL) por aproximadamente 40 minutos, usando sistema de membrana artificial, como em Oliveira e colaboradores⁹⁶.

O sistema consiste de pequenos funis de vidro transparentes com capacidade de 400µL que são colocados invertidos e conectados através de finos conectores de borracha para a passagem de água aquecida a 37°C. A parte inferior dos alimentadores artificiais foi revestida com uma fina camada de *parafilm* para que os mosquitos pudessem entrar em contato com o sangue infeccioso. Os mosquitos controles foram alimentados com repasto sanguíneo contendo apenas sobrenadante de cultura de células não infectadas. Adormecidas em gelo, somente as fêmeas totalmente ingurgitadas foram utilizadas e o critério de separação foi a distensão total do abdome da fêmea com a coloração vermelha.

Para a análise dos genes de relógio, as fêmeas foram colocadas em grupos de 15 espécimes em tubos cônicos de centrifugação (tipo *Falcon*) de 50mL com uma forminha de papel no fundo. Os tubos foram tampados com tule, para permitir o acesso a um algodão embebido em sacarose 10%, que era trocado duas vezes até o momento da coleta. As fêmeas eram mantidas em incubadora com fotoperíodo de

12 horas de claro e 12 horas de escuro (LD 12:12), à temperatura constante de 25°C e umidade relativa entre 60-80%.

4.1.5 Análise da expressão dos genes de relógio circadiano:

4.1.5.1 Coleta de pontos

Após alimentação infectiva as fêmeas foram mantidas em regime de claro/escuro e temperatura constante em incubadora Forlab EletroLab (LD 12:12, 25°C). No sétimo dia após a alimentação, grupos de 30 indivíduos (15 infectados e 15 controles) foram coletados a cada quatro horas ao longo de 24 horas. As primeiras amostras eram coletadas três horas após o acender das luzes, no *Zeitgeber Time* 3 (ZT 3), as seguintes eram coletadas quatro horas depois (ZT 7) e assim sucessivamente, terminando no ZT 23, que corresponde a uma hora antes do acender das luzes. Foi então coletado um total de 12 amostras por experimento, totalizando 3 experimentos independentes, nos momentos: ZT3, ZT7, ZT11, ZT15, ZT19 e ZT23. Após cada coleta, os mosquitos foram congelados em nitrogênio líquido e preservados em freezer -80°C para posterior dissecação dos ovários em *pools* de 10 pares.

4.1.5.2 Extração e quantificação do RNA

A extração do RNA total dos *pools* de 10 pares de ovários foi realizada pelo método de TRIzol (Life Technologies) de acordo com o protocolo do fabricante e o RNA obtido foi posteriormente purificado através de precipitação por cloreto de lítio 2,5M, conforme previamente estabelecido por Gentile e colaboradores⁷².

A massa de RNA total extraído foi quantificada utilizando o kit *Qubit RNA High Sensivity* (Invitrogen) segundo o protocolo do fabricante no *Qubit® 3.0 Fluorometer* (Invitrogen), utilizando-se uma alíquota de 5 µL de amostra de RNA total por amostra. As amostras tiveram suas concentrações de RNA uniformizadas e diluídas para 15 ng/µL.

4.1.5.3 Detecção molecular de ZIKV

Para detecção de ZIKV em ovários de fêmeas infectadas, foram realizados ensaios de RT-qPCR em colaboração com a Dra. Priscila Conrado do Laboratório de Imunologia Viral. Foi utilizado o kit *SuperScript III Platinum one-step qRT-PCR* (Invitrogen) segundo protocolo do fabricante, juntamente com os oligonucleotídeos

ZIKV 1086 – 5'CCGCTGCCCAACACAAG3' (posição genômica 1086 –1102), ZIKV 1162c – 5' CCACTAACGTTCTTTTGCAGACAT' (posição genômica 1162–1139) e sonda ZIKV 1107 - FAM 5'AGCCTACCTTGACAAGCAGTCAGACACTCAA3' (posição genômica 1107–1137), descritos por Lanciotti e colaboradores em 2008⁹⁷. Na tabela 1 se encontra a composição da reação utilizada. Para cada experimento, o número de cópias de RNA viral foi calculado por quantificação absoluta, utilizando curva padrão de ZIKV⁹⁸ amplificadas no termociclador *StepOne™ Real-Time PCR System* (Applied Biosystems). As amostras foram submetidas às seguintes condições de termociclagem: 50°C por 15 minutos, 95°C por 2 minutos, seguidos de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, 60°C por 60 segundos.

Tabela 1 - Reagentes utilizados na RT-qPCR: concentração e volume final dos componentes do mix de reação para cada poço.

Reagentes	Volume
Reaction Mix 2X	12,50 µL
MgSO₄ (50 mM)	1,00 µL
ZIKV 1086 (10µM)	1,00 µL
ZIKV 1162c (10µM)	1,00 µL
ZIKV 1107 (5µM)	0,50 µL
H₂O Nuclease Free	3,50 µL
SuperScript™ III RT/Platinum™ Taq Mix	0,50 µL
RNA (15ng/µL)	5,00 µL
Total	25,0 µL

4.1.5.4 Síntese de cDNA para amplificação dos genes de relógio

A síntese de cDNA foi realizada com os reagentes *TaqMan Reverse Transcription* (Thermo Fischer) nas concentrações da tabela 2 a seguir, de acordo com o protocolo de Gentile e colaboradores⁷². A transcrição reversa ocorreu nas condições: 25°C por 10 minutos, 48°C por 1 hora e 95°C por 5 minutos no termociclador *GeneAmp PCR System 9700* (Applied Biosystems).

Tabela 2 - Reagentes utilizados na síntese de cDNA: concentração e volume final dos componentes do mix de reação de qPCR para cada amostra.

Reagentes	Volume
RT Buffer 10X	1,00 µL
MgCL ₂ (25 mM)	2,20 µL
dNTP (25 mM/cada)	2,00 µL
oligo dT (50 µL)	0,50 µL
Inibidor de RNase (20U/µL)	0,20 µL
Transcriptase reversa (50U/µL)	0,25 µL
RNA Total (15ng/µL)	3,85 µL
Total	10 µL

Após a síntese, o cDNA foi quantificado com o kit *Qubit® ssDNA Assay Kit* (Invitrogen), em um *Qubit® 3.0 Fluorometer* (Invitrogen), seguindo o protocolo do fabricante para certeza da conversão de RNA para cDNA e padronização da quantidade de DNA complementar a ser utilizado no PCR tempo real. As amostras foram todas diluídas para a concentração de 1ng/µL. A diluição possibilitou gerar cDNA de uma mesma amostra suficiente para reações de PCR em tempo real para diversos genes.

4.1.5.5 PCR quantitativo em tempo real

Ensaio de PCR quantitativo em tempo real foram realizados para analisar a expressão dos genes de relógio *tim*, *vri*, *cry2*, *per* e *rp49* em ovários de fêmeas de *Aedes aegypti* infectadas ou não com ZIKV (Tabela 3). Utilizou-se o kit *GoTaq qPCR Master Mix* (Promega) e oligonucleotídeos descritos por Gentile e colaboradores (2009) em termociclador *StepOne™ Real-Time PCR System* (Applied Biosystems). O mix de reação está listado na tabela 4.

Tabela 3 - Genes e *primers* usados para análise quantitativa dos genes de relógio em ovários de fêmeas de *Ae. aegypti*. Na tabela constam os genes, e nomes e sequências dos pares de *primers* correspondente a cada gene (*forward* em cima e *reverse* embaixo).

Gene	Nome	Sequência (5'-----3')
<i>rp49</i>	5aexpRP	GCTATGACAAGCTTGCCCCCA
	3aeaquaRP1b	TCATCAGCACCTCCAGCTC
<i>tim</i>	5aegytim7	ATCGAACAACCTTTGGGAGC
	3aeexptim3	CGATCCCGTAAAACCTGTATG
<i>vri</i>	5aevri1	AACGGTTCGCCAATTAACGG
	3aeexpvri	AGCAAGGCACTGTGTGCAGG
<i>cry2</i>	5aeexpcry2	ACTTGCCGGTGCTGAAGAACT
	3aecry2	CGATGATACTTGGCCGTGCG
<i>per</i>	5aeexpper3	CGTTGAAAAGTCTCAATCAACCT
	3aegyper3	GCTGAGTGAAAGCTTCGCCG

Tabela 4 - Reagentes utilizados nas reações de qPCR: concentração e volume final dos componentes do mix de reação para cada amostra.

Reagentes	VOLUME
GoTaq® qPCR Master Mix 2X	7,5 µL
Oligo 5' (10 µM)	0,75 µL
Oligo 3' (10 µM)	0,75 µL
CXR Reference Dye (30µM)	0,15 µL
H ₂ O Nuclease Free	1,85 µL
cDNA (1ng/µL)	4 µL
Total	15 µL

Para a amplificação de cada gene, foram realizadas três réplicas técnicas de cada amostra de cDNA. As mesmas foram submetidas às condições de termociclagem: 95°C por 6 minutos, seguidos de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, 60°C por 60 segundos e uma curva de dissociação (*Melting curve*) 95°C por 15 segundos, 60°C por 60 segundos. Após a amplificação, seguiu-se a curva de dissociação, utilizada para analisar a presença de contaminantes ou formação de dímeros.

Os valores de C_T das três réplicas de cada cDNA e gene foram transformados em valores médios. Os *outliers* (réplicas que apresentavam valores muito diferentes dos valores críticos de Grubbs), foram excluídas da análise⁹⁹. O método utilizado para a quantificação foi o “Método do C_T Comparativo”^{100,101}. O gene *rp49* foi usado como normalizador endógeno¹⁰².

4.1.6 Análise estatística

Para análise estatística dos dados de expressão gênica, foi utilizado o teste ANOVA (One Way) para comparação dos pontos de coleta (ZTs) entre si e entre infectados e controles, onde foram considerados significativos valores de $p < 0,05$, com auxílio do programa *GraphPad Prism* versão 5 (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, EUA).

4.2 Resultados

4.2.1 Presença de ZIKV nos ovários de fêmeas de *Aedes aegypti*

Atráves do *RT-qPCR*, a carga viral de ZIKV foi detectada em ovários de fêmeas infectadas, utilizando como base uma curva padrão pré-estabelecida no Laboratório de Imunologia Viral onde as cargas virais de ZIKV variaram de $3,39 \times 10^1$ cópias de RNA/mL na menor detecção até $3,15 \times 10^5$ cópias de RNA/mL. O resultado obtido nessa quantificação revelou que todas as amostras infectadas, dos três experimentos independentes, foram positivas para o ZIKV e, portanto, aptas para serem utilizadas para análises de expressão gênica em comparação à condição não-infectada (Quadro 1).

Quadro 1 – Quantificação de ZIKV em ovários de fêmeas coletadas ao longo de 24 horas 7 dias pós alimentação infectiva. Na nomenclatura das amostras, os prefixos CT significam amostras controles, ou seja, fêmeas alimentadas com repasto sanguíneo não infeccioso; ND significa amostras com resultado indeterminado; C.P significa amostras que compuseram a curva padrão. Na primeira linha Ct significa cycle threshold.

Amostras	Ct	Ct Médio	Quantidade	Quantidade Média (cópias de RNA/mL)
ZT 3 Zika 10.11.16	20,93	21,35	5,12E+02	4,04E+02
ZT 3 Zika 10.11.16	21,76		2,95E+02	
ZT 7 Zika 10.11.16	11,46	16,72	2,59E+05	1,30E+05
ZT 7 Zika 10.11.16	21,99		2,55E+02	
ZT 11 Zika 10.11.16	21,80	22,94	2,88E+02	1,76E+02
ZT 11 Zika 10.11.16	24,08		6,44E+01	
ZT 15 Zika 10.11.16	23,59	20,72	8,88E+01	1,97E+03
ZT 15 Zika 10.11.16	17,86		3,85E+03	
ZT 19 Zika 10.11.16	21,85	21,86	2,79E+02	2,77E+02
ZT 19 Zika 10.11.16	21,87		2,75E+02	
ZT 23 Zika 10.11.16	19,73	18,65	1,12E+03	2,90E+03
ZT 23 Zika 10.11.16	17,56		4,68E+03	
ZT 3 Zika 01.02.17	21,02	21,02	4,83E+02	4,83E+02
ZT 3 Zika 01.02.17	ND			
ZT 7 Zika 01.02.17	25,49	25,10	2,54E+01	3,39E+01
ZT 7 Zika 01.02.17	24,71		4,25E+01	
ZT 11 Zika 01.02.17	20,32	20,59	7,63E+02	6,49E+02
ZT 11 Zika 01.02.17	20,86		5,35E+02	
ZT 15 Zika 01.02.17	19,61	19,44	1,22E+03	1,37E+03
ZT 15 Zika 01.02.17	19,27		1,53E+03	
ZT 19 Zika 01.02.17	15,17	15,19	2,25E+04	2,24E+04
ZT 19 Zika 01.02.17	15,20		2,22E+04	
ZT 23 Zika 01.02.17	17,58	16,79	4,62E+03	8,89E+03

ZT 23 Zika 01.02.17	15,99		1,31E+04	
CT de todos os ZTs 10.11.16	ND			
CT de todos os ZTs 10.11.16	ND			
CT de todos os ZTs 01.02.17	ND			
CT de todos os ZTs 01.02.17	ND			
C.P ZIKV 10⁵	13,70	13,53	100000	
C.P ZIKV 10⁵	13,36		100000	
C.P ZIKV 10⁴	16,30	15,92	10000	
C.P ZIKV 10⁴	15,54		10000	
C.P ZIKV 10³	18,38	18,99	1000	
C.P ZIKV 10³	19,61		1000	
C.P ZIKV 10²	24,52	24,21	100	
C.P ZIKV 10²	23,90		100	
C.P ZIKV 10¹	26,83	26,89	10	
C.P ZIKV 10¹	26,94		10	
ZT 3 Zika 19.11.19	27,05	26,05	9,57E+02	2,05E+03
ZT 3 Zika 19.11.19	25,67		2,39E+03	
ZT 3 Zika 19.11.19	25,43		2,81E+03	
ZT 7 Zika 19.11.19	23,55	23,05	9,69E+03	1,42E+04
ZT 7 Zika 19.11.19	ND			
ZT 7 Zika 19.11.19	22,55		1,88E+04	
ZT 11 Zika 19.11.19	18,34	18,35	3,03E+05	3,15E+05
ZT 11 Zika 19.11.19	18,93		2,05E+05	
ZT 11 Zika 19.11.19	17,78		4,38E+05	
ZT 15 Zika 19.11.19	21,04	21,05	5,08E+04	5,08E+04
ZT 15 Zika 19.11.19	21,25		4,43E+04	
ZT 15 Zika 19.11.19	20,86		5,74E+04	
ZT 19(2) Zika 19.11.19	17,65	18,58	4,78E+05	2,92E+05
ZT 19(2) Zika 19.11.19	19,54		1,37E+05	
ZT 19(2) Zika 19.11.19	18,56		2,61E+05	
ZT 23 Zika 19.11.19	21,95	22,91	2,79E+04	1,65E+04
ZT 23 Zika 19.11.19	23,31		1,14E+04	
ZT 23 Zika 19.11.19	23,47		1,02E+04	
CT do ZT 3,7,11,15 19.11.19	ND			
CT do ZT 3,7,11,15 19.11.19	ND			
CT do ZT 19(2) 19.11.19	ND			
CT do ZT 19(2) 19.11.19	ND			
CT do ZT 19(2) 19.11.19	ND			
CT ZT 23 19.11.19	ND			
CT ZT 23 19.11.19	ND			
CT ZT 23 19.11.19	ND			

C.P ZIKV 10 ⁴	ND		11400	
C.P ZIKV 10 ⁴	ND		11400	
C.P ZIKV 10 ³	27,14	26,77	1140	
C.P ZIKV 10 ³	26,39		1140	
C.P ZIKV 10 ²	30,61	30,02	114	
C.P ZIKV 10 ²	29,42		114	
C.P ZIKV 10 ¹	35,42	34,35	11,40	
C.P ZIKV 10 ¹	33,28		11,40	
C.P ZIKV 10 ⁰	36,53	36,94	1,14	
C.P ZIKV 10 ⁰	37,34		1,14	

4.2.2 Perfil de expressão dos genes de relógio em ovários

Para avaliarmos se o ZIKV afeta a expressão dos genes de relógio em ovários, o que poderia interferir consequentemente com o ritmo de oviposição, investigamos a expressão dos genes de relógio nesse tecido em fêmeas submetidas a regimes de claro/escuro.

Os genes de relógio escolhidos para as análises moleculares foram *timeless*, *vri*, *cryptochrome2* e *period*. Dos quatro genes analisados, *tim*, *vri* e *cry2* foram arrítmicos em ovários infectados (Tabela 5) e controles (Tabela 6), isto é, não apresentaram expressão cíclica. O gene *period*, aparenta ser um gene cíclico, com perfil bimodal apresentando tanto para controle quanto para infectado dois picos de expressão, um diurno no ZT 11 e outro pico de menor amplitude na fase escura no ZT 19 (Figura 10).

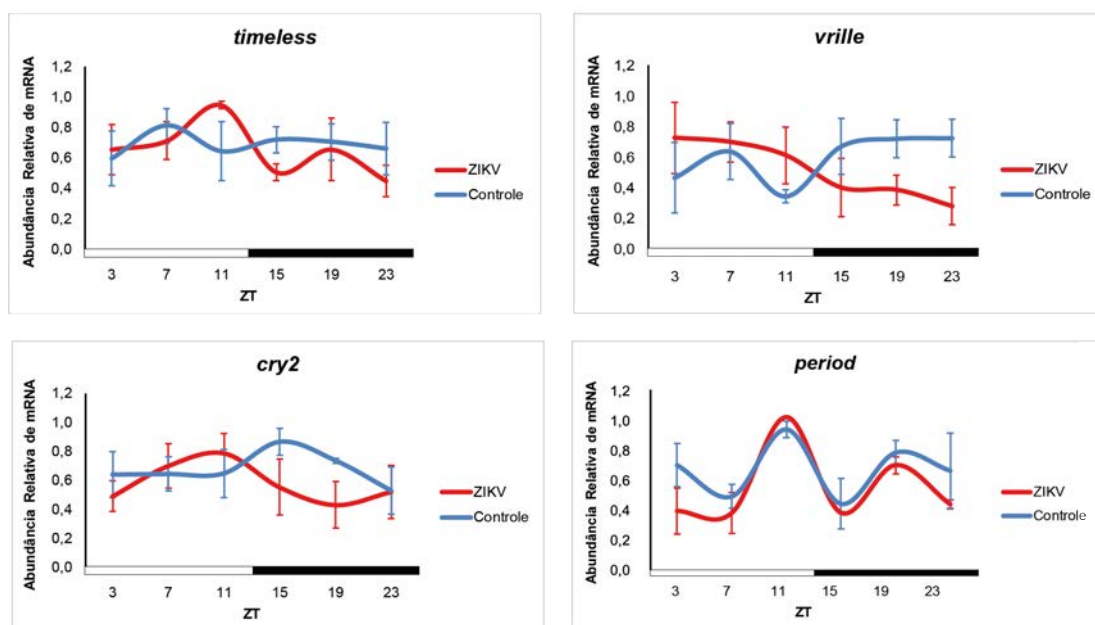


Figura 10 - Expressão dos genes *timeless*, *vrille*, *cryptochrome2* e *period* em ovários de *Aedes aegypti* infectadas e não infectadas pelo ZIKV em regime LD 12:12. Os gráficos mostram os valores de abundância relativa da expressão gênica baseados na média entre três experimentos independentes para *timeless*, *vrille* e *cryptochrome2* e dois experimentos para *period*. O eixo x representa o *Zeitgeber* (ZT) e o eixo y representa a abundância relativa de RNA mensageiro, barra branca representa a fase clara do regime claro/escuro e a barra preta a fase escura. O ZT3 indica três horas após o acender das luzes e o ZT15 três hora após o apagar das luzes. As barras verticais representam o erro padrão. A análise de dados foi realizada utilizando o teste paramétrico ANOVA One Way.

Tabela 5 – Efeito da infecção pelo ZIKV na expressão diária dos genes de relógio em ovários de *Ae. aegypti* em regime LD12:12, realizada através da análise de variância (ANOVA One-way).

Gene	F	P
<i>tim</i>	$F_{5,18}$	0.4711 (NS)
<i>vri</i>	$F_{5,18}$	0.4804 (NS)
<i>cry2</i>	$F_{5,18}$	0.7122 (NS)

NS=Não significativo (arrítmico).

Tabela 6 - Expressão diária dos genes de relógio em ovários de *Ae. aegypti* não infectadas (controles) em regime LD12:12, realizada através da análise de variância (ANOVA One-way).

Gene	F	P
<i>tim</i>	$F_{5,18}$	0.9174 (NS)
<i>vri</i>	$F_{5,18}$	0.5035 (NS)
<i>cry2</i>	$F_{5,18}$	0.6546 (NS)

NS=Não significativo (arrítmico).

5 DISCUSSÃO

Envolvido na transmissão de diversos arbovírus, entre elas o vírus Zika, o *Aedes aegypti* é um vetor de grande importância médica. Recentemente, tem sido abordados na literatura estudos com ênfase no comportamento, na fisiologia e na interação patógeno-vetor, constituindo importantes áreas da entomologia médica a serem aprofundadas, uma vez que esse vetor quando infectado por arbovírus, seu comportamento e fisiologia são alterados de maneira geral^{74,103,82}. Nesse sentido, o conhecimento de características específicas da biologia do mosquito como: comportamento de ovoposição, quantidade de ovos que a fêmea infectada pode colocar ao longo da vida e a viabilidade desses ovos, (ou seja, quantos ovos chegam a eclodir em larvas) entre outras características, podem auxiliar no conhecimento direcionado ao combate do vetor e, conseqüentemente, às doenças veiculadas pelo mesmo.

Em 2011, Maciel-de-Freitas e colaboradores¹⁰⁴ descreveram que, ao infectarem fêmeas de *Ae. aegypti* com DENV-2, observou-se uma queda na taxa de fecundidade, que variava ao longo da vida do mosquito. Além de colocarem menos ovos, fêmeas infectadas com o DENV-2 apresentavam menor longevidade.

O efeito da infecção por arbovírus na fisiologia do mosquito *Ae. aegypti* também pode ser visto quando mosquitos são infectados com CHIKV. O trabalho de Sirisena e colaboradores em 2018⁹¹ descreve o mesmo fenômeno: fêmeas alimentadas de sangue infectado com CHIKV colocavam menos ovos do que fêmeas alimentadas com sangue não infectado. Diferentemente, aqui observamos que a infecção por CHIKV não alterou a quantidade de ovos postos, mas que, no entanto, CHIKV afetou a sua viabilidade dos ovos, uma vez que as fêmeas infectadas colocaram menos ovos viáveis do que fêmeas controle. Quando correlacionamos esses dois parâmetros (quantidade de ovos e viabilidade) com a idade das fêmeas, notamos que a correlação é perdida em fêmeas mais velhas. Ou seja, notamos que um alto número de ovos não correspondia a um alto número de larvas viáveis, sendo os ovos de fêmeas mais velhas menos viáveis no grupo infectado¹⁰⁵.

Com a introdução do vírus Zika no Brasil, diversos grupos buscaram compreender os efeitos desse vírus no comportamento e fisiologia de *Ae. aegypti*. Em 2018, Petersen e colaboradores⁹² buscaram entender o impacto da cepa viral

Zika PE243/2015 na idade da fêmea, na quantidade de sangue ingerido por fêmeas previamente infectadas e na produção de ovos em mosquitos de campo oriundos da cidade do Rio de Janeiro. Foi observado que a infecção por ZIKV, bem como a idade mais avançada das fêmeas no momento de alimentação sanguínea, resultaram em fêmeas colocarem menos ovos e sobreviverem por menos tempo.

No mesmo ano, nosso grupo investigou os efeitos da infecção pela mesma cepa viral na fecundidade e fertilidade em fêmeas de *Ae. aegypti*, em linhagem de laboratório e de campo (Urca), em diferentes ciclos gonotróficos⁸². Em nossas análises, os resultados não evidenciaram diferenças significativas tanto na quantidade de ovos (fecundidade) quanto na viabilidade dos ovos (fertilidade), no segundo e terceiro ciclos gonotróficos, contrapondo com os achados de Petersen e colaboradores em 2018⁹². Apesar de não significativo, em todos os casos, os resultados de fêmeas avaliadas conjuntamente apontavam uma tendência de menor fecundidade em fêmeas infectadas (tanto de linhagem de laboratório quanto de campo)⁸¹. Silveira e colaboradores¹⁰⁶, em um estudo com diferentes populações de *Ae. aegypti* de campo do Rio de Janeiro (de diferentes bairros: Barra, Deodoro e Porto) utilizando a cepa viral de Zika Rio-U1 investigaram a sobrevivência e a fecundidade de fêmeas infectadas em laboratório. Em relação à sobrevivência, a alimentação infectiva reduziu a longevidade, com cada população exibindo diferenciadas taxas de sobrevivência e carga viral no corpo e na cabeça. No entanto, a infecção com ZIKV não rendeu efeito significativo em relação à fecundidade, corroborando nossos achados.

Essa tendência de menor fecundidade nos levou a testar no presente estudo, de maneira mais robusta e detalhada, o mesmo evento em fêmeas individualizadas, permitindo adicionalmente a análise de outros parâmetros como a sucesso de ovoposição, número de fêmeas nulas e averiguação de correlação entre fecundidade e fertilidade.

Nossos achados atuais corroboraram nosso primeiro estudo, onde a infecção por ZIKV não alterou significativamente a fecundidade e fertilidade de ovos. Entretanto, ao analisar o sucesso de ovoposição, fêmeas infectadas mostraram-se menos eficientes (menos fêmeas colocaram ovos) no segundo ciclo gonotrófico, apresentando uma diminuição de quase metade na porcentagem de eficiência. Neste estudo, consideramos as fêmeas infectadas como eficientes, aquelas que ovipuseram um valor igual ou maior que a mediana do controle não infectado, diferentemente de Petersen e colaboradores⁹², que consideraram fêmeas eficientes

as que ovipuseram pelo menos um ovo. Acreditamos que nossa maneira de avaliar, quantitativamente, foi a mais representativa de uma fêmea que consegue perpetuar a espécie, visto que ao avaliarmos a correlação da fecundidade com a fertilidade de ovos, verificamos que quanto menos ovos as fêmeas colocam maior é a tendência dos ovos serem inviáveis. Vale ressaltar que essa correlação foi mantida independentemente da idade e da fêmea (Figura 3 B e B' do Capítulo 1, página 29 do artigo).

Ao investigarmos a ocorrência de fêmeas nulas (que não colocam nenhum ovo), apesar de não significativo, percebemos um aumento de 2.1% para 6.8%, diretamente proporcional à idade (o número de nulas aumentou quanto mais velhas eram as fêmeas). Apesar de sugerir que a infecção por ZIKV tenha aumentado a infertilidade em fêmeas mais velhas, a taxa de eclosão de larvas desses ovos não foi significativamente diferente do controle.

A segunda parte dessa dissertação consistiu em uma análise do efeito da infecção de fêmeas de *Ae. aegypti* pelo ZIKV no relógio circadiano periférico destas fêmeas. Avaliamos o efeito da infecção nos ovários em nível molecular ao longo de 24 horas. Os ritmos circadianos regulam diferentes comportamentos de insetos vetores que estão ligados a aspectos importantes da capacidade vetorial como a oviposição, reprodução e hematofagia^{13,56,107} que interferem na dinâmica da transmissão de patógenos para os seres humanos. Resolvemos investigar se os genes de relógio, que controlam os ritmos de oviposição, seriam afetados quando infectados pelo vírus Zika.

Os genes do relógio central são essenciais para os ritmos comportamentais, mas a função e o perfil de expressão desses genes em relógios periféricos específicos não são bem compreendidos. O pouco que se sabe é como esses genes são modulados no relógio periférico geral, sem informações muito precisas de como ele funciona em determinados órgãos, como os ovários ou corpos gordurosos, por exemplo. No geral, vários órgãos periféricos específicos, aparentam ter o mecanismo e componentes moleculares parecidos ao relógio central¹⁰⁸⁻¹¹⁰. No entanto, já foi observado que estes relógios apresentam funções específicas do tecido em que estão localizados e com um certo grau de autonomia. Por exemplo, o relógio do sistema reprodutor masculino de *D. melanogaster* regula a liberação e a maturação de esperma¹¹¹. Um outro exemplo se dá no ovário de *D. melanogaster*, em que osciladores periféricos, e não o relógio central, estariam envolvidos na regulação da ovogênese¹¹¹.

Em insetos vetores, Meireles-Filho e colaboradores¹¹² observaram a expressão de *period*, *timeless*, *Clock* e *cycle* no corpo de fêmeas de flebotomíneos, com o mesmo padrão de ciclagem e amplitude para *Clock* na cabeça. Já para *timeless*, os picos de expressão na cabeça e no corpo estavam em fase oposta e para *period* e *cycle* a expressão estava constitutiva no corpo das fêmeas^{78,112}.

O perfil de expressão dos genes de relógio no mosquito *Ae. aegypti* foi descrito por Gentile e colaboradores em 2009⁷², em cabeça de fêmeas virgens. Os genes *period* e *timeless* têm seu pico de expressão na fase escura e os genes *Clock* e *cycle* em fase clara. Os genes *vriille* e *Pdp1* apresentam seus picos de expressão em fases distintas. Além de descrever esses genes no relógio central, Gentile (2007)¹¹³ descreveu o perfil de expressão dos genes *period*, *timeless*, *cycle* e *Clock* no corpo de fêmeas de *Ae. aegypti*. Observou que todos, exceto por *period*, apresentavam-se arrítmicos e que o pico de expressão de *period* era na fase escura, semelhante ao encontrado nas cabeças das fêmeas.

Estudos como de Gentile e colaboradores⁷⁵ observaram a expressão dos genes de relógio em corpos de fêmeas de *Ae. aegypti* virgem/não alimentada, inseminada/não alimentada, virgem/alimentada e inseminada/alimentada, de onde se concluiu que a alimentação sanguínea era suficiente e significativa para impactar na diminuição da expressão dos genes *per*, *tim*, *cyc* e *Clock* no corpo. A hematofagia é uma característica importante do comportamento, visto que é o mecanismo principal que propicia que patógenos sejam transmitidos para humanos¹¹⁴. Escassos são os estudos sobre o impacto da alimentação sanguínea no padrão de expressão gênica de insetos vetores.

Os resultados sobre a expressão dos genes de relógio em corpos de fêmeas de flebotomíneos foram muito diferentes daqueles vistos no corpo das fêmeas de *Ae. aegypti*. O corpo engloba vários tipos de tecidos como ovário, intestino, corpo gorduroso, no qual os genes de relógio podem ser expressos com perfis particulares, mas que, na média, podem subestimar a expressão diferenciada de determinados genes num tecido específico.

Avaliamos se a infecção pelo ZIKV poderia chegar aos ovários, alterando o perfil de expressão de genes do relógio circadiano que estão envolvidos nos processos de ovogênese e embriogênese em outras espécies de dípteros, além de entendermos melhor a interação entre o relógio e a infecção por patógenos. Escolhemos avaliar a expressão dos genes *timeless*, *vriille*, *cryptochrome2* e *period*. Em ovários de *D. melanogaster*, *timeless* é um gene expresso de forma constante,

ou seja, não cicla e sua proteína não é degradada pela luz, como ocorre no relógio central desta mosca. No mesmo trabalho que descreveu estas características de *tim* nos ovários, foi observado que *per* e *tim* atuam no processo de ovogênese e que os mutantes desses genes produzem menos ovócitos maduros e podem estar envolvidos nas etapas iniciais do desenvolvimento folículoar88. Já o gene *vrille*, além de sua função no relógio central63, tem também função materno-dominante no tecido reprodutivo, atuando no desenvolvimento embrionário93. Finalmente, decidimos estudar a expressão de *cry2* nos ovários porque é um gene que não está presente em *Drosophila* mas está presente em outros dípteros, como culicíneos e anofelinos, além de insetos de outras ordens, como Lepidóptera73.

Nossos resultados mostraram que, assim como na cabeça e no corpo de *Ae. aegypti*, *period* em ovários de fêmeas controle e infectadas com ZIKV aparentou ser rítmico. Contudo, em ovários, *period* aparentou apresentar um padrão bimodal com um pico de expressão durante a fase clara no ZT11 e outro pico de menor amplitude durante a fase escura, no ZT19. Na cabeça e no corpo de mosquitos esse pico de expressão ocorre somente por volta do ZT17 e ZT21 respectivamente, ou seja, somente durante a fase escura de um ciclo claro/escuro113,72. Os genes *vrille*, *timeless* e *cry2* diferentemente do que é observado no relógio central é arritmico em ovários. A arritmidade de *timeless* foi igualmente notada no corpo de fêmeas de *Ae. aegypti* virgens113.

Beaver e colaboradores88 ao analisarem a expressão de *per* e *tim* em ovários de *D. melanogaster*, observaram que esses genes eram arrítmicos e que a expressão de PER e TIM em células do folículo ovariano é regulada diferentemente do que no marca-passo central. A expressão de *per* e *tim* nos ovários sugere que esses genes podem ter funções relacionadas à reprodução. Para testar isso, copularam fêmeas com *per* (*per*⁰¹) e *tim* (*tim*⁰¹) sem função com machos selvagens. As fêmeas com essas mutações, geraram significativamente menos descendentes devido a menores taxas de maturação dos ovos, ou seja, são menos férteis do que as moscas selvagens. Mais profundamente, descobriram que *per* e *tim* causavam esse efeito na fertilidade, por meio do seu papel no processo de ovogênese.

Nos ovários de mosquito, independente dos genes analisados apresentarem perfis rítmicos ou arrítmicos, a alimentação infectiva pareceu não impactar diretamente o relógio periférico de fêmeas de *Ae. aegypti*. Essa observação junto com os resultados fisiológicos, onde a infecção por ZIKV não alterou a fecundidade

e fertilidade de ovos, pode nos indicar que os genes de relógio não parecem estar sendo modulados pela infecção pelo ZIKV.

6 CONCLUSÃO

- O vírus Zika não afeta diretamente a taxa de fecundidade e nem de fertilidade das fêmeas de *Ae. aegypti*.
- A infecção por ZIKV aumenta o número de fêmeas nulas de *Ae. aegypti* à medida que ficam mais velhas.
- Em *Ae. aegypti* existe uma correlação positiva e significativa entre eficiência de oviposição de fêmeas e viabilidade dos ovos, independente da infecção pelo ZIKV.
- Os genes *timeless*, *vriille* e *cryptochrome2*, apresentaram um perfil de expressão arritmico em ovários de *Ae. aegypti* infectadas e não infectadas por ZIKV, em regime LD 12:12.
- A análise preliminar da expressão de *period* em ovários de fêmeas de *Ae. aegypti* mostra expressão bimodal, independente da infecção pelo ZIKV.

7 PERSPECTIVA

- Analisar os níveis de expressão dos genes *tim*, *vrille*, *cry2* e *per* de maneira comparativa entre controle e infectado com ZIKV no 1º ciclo gonotrófico;
- Estabelecer o perfil de expressão destes genes em ovário de *Ae. aegypti* no 2º ciclo gonotrófico infectadas e não infectadas pelo ZIKV em regime de claro e escuro (LD) a 25°C.
- Estabelecer o perfil de expressão dos outros genes de relógio em ovário de *Ae. aegypti* infectadas e não infectadas pelo ZIKV nos 1º e 2º ciclos gonotróficos em regime de claro e escuro (LD) a 25°C.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Consoli R, Lourenço-de-Oliveira R. Principais mosquitos de importância sanitária do Brasil. Rio de Janeiro: Fiocruz; 1994.
2. Lambrechts L. Quantitative genetics of *Aedes aegypti* vector competence for dengue viruses: towards a new paradigm?. Trends in parasitology. 2011 Mar 1;27(3):111-4
3. Kraemer MU, Sinka ME, Duda KA, Mylne A, Shearer FM, Brady OJ, et al. The global compendium of *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* occurrence. Scientific data. 2015 Jul 7;2(1):1-8.
4. Lourenço-de-Oliveira R. Biologia e comportamento do vetor. In: Valle D, Pimenta DN, Cunha RVd, editors. Dengue: Teorias e Práticas. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 2015
5. Christophers SR. *Aedes aegypti*: the yellow fever mosquito: CUP Archive; 1960.
6. Borror, D. J., Triplehorn, C. A., & Johnson, N. F. An introduction to the study of insects (No. Ed. 6). Saunders college publishing. 1989.
7. Forattini, O. P. Culicidologia Médica: Identificação, Biologia, Epidemiologia Vol. 2. Edusp. 1996.
8. Edman JD, Strickman D, Kittayapong P, Scott TW. Female *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Thailand rarely feed on sugar. Journal of medical entomology. 1992 Nov 1;29(6):1035-8.
9. Ponlawat A, Harrington LC. Blood feeding patterns of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Thailand. Journal of medical entomology. 2005 Sep 1;42(5):844-9.
10. Pant CP & Yasuno M. Field studies on the gonotrophic cycle of *Aedes aegypti* in Bangkok, Thailand. *J Med Entomol*. 1973 10, 219-223.
11. Farnesi LC, Martins AJ, Valle D, Rezende GL. Embryonic development of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): influence of different constant temperatures. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009;104(1):124-6.
12. Farnesi LC, Barbosa CS, Araripe LO, Bruno RV. The influence of a light and dark cycle on the egg laying activity of *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae). Mem Inst Oswaldo Cruz. 2018;113(4):e170362.
13. Clements AN. The biology of mosquitoes: development, nutrition and reproduction: Chapman & Hall London; 1992.

14. Chapman RF. The insects: Structures and function. 5 ed. New York: Cambridge University Press; 1998. 770 p.
15. Li JS, Li J. Major chorion proteins and their crosslinking during chorion hardening in *Aedes aegypti* mosquitoes. *Insect Biochem Mol Biol*. 2006;36(12):954-64.
16. Bicout D, Chalvet-Monfray K, Sabatier P. Infection persistence time of *Aedes* breeding habitats. *Physica A: Statistical Mechanics and its Applications*. 2002:597-603.
17. Rezende G, Martins A, Gentile C, Farnesi L, Pelajo-Machado M, Peixoto A, et al. Embryonic desiccation resistance in *Aedes aegypti*: presumptive role of the chitinized serosal cuticle. *BMC Dev Biol*. 2008;8:82.
18. Vargas HC, Farnesi LC, Martins AJ, Valle D, Rezende GL. Serosal cuticle formation and distinct degrees of desiccation resistance in embryos of the mosquito vectors *Aedes aegypti*, *Anopheles aquasalis* and *Culex quinquefasciatus*. *J Insect Physiol*. 2014;62:54-60.
19. Farnesi LC, Vargas HCM, Valle D, Rezende GL. Darker eggs of mosquitoes resist more to dry conditions: Melanin enhances serosal cuticle contribution in egg resistance to desiccation in *Aedes*, *Anopheles* and *Culex* vectors. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11(10):e0006063.
20. Juliano SA, Ribeiro GS, Maciel-de-Freitas R, Castro MG, Codeço C, Lourenço-de-Oliveira R, et al. She's a femme fatale: low-density larval development produces good disease vectors. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2014;109(8):1070-7.
21. Dick GW, Kitchen SF, Hadow AJ. Zika virus. I. Isolations and serological specificity. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1952;46(5):509-20.
22. Kuno G, Chang GJ. Full-length sequencing and genomic characterization of Bagaza, Kedougou, and Zika viruses. *Arch Virol*. 2007;152(4):687-96.
23. Faye O, Freire CC, Iamarino A, de Oliveira JV, Diallo M, Zanotto PM, et al. Molecular evolution of Zika virus during its emergence in the 20(th) century. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(1):e2636.
24. Shi Y, Gao GF. Structural Biology of the Zika Virus. *Trends Biochem Sci*. 2017;42(6):443-56.
25. Musso D, Gubler DJ. Zika Virus. *Clin Microbiol Rev*. 2016;29(3):487-524.
26. Macnamara FN. Zika virus: a report on three cases of human infection during an epidemic of jaundice in Nigeria. *Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene*. 1954 Mar 1;48(2):139-45..
27. Sampathkumar P, Sanchez JL, editors. Zika virus in the Americas: a review for clinicians *In*Mayo Clinic Proceedings 2016 Apr 1 (Vol. 91, No. 4, pp. 514-521). Elsevier.

28. Duffy MR, Chen TH, Hancock WT, Powers AM, Kool JL, Lanciotti RS, et al. Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *N Engl J Med*. 2009;360(24):2536-43.
29. Cao-Lormeau VM, Roche C, Teissier A, Robin E, Berry AL, Mallet HP, et al. Zika virus, French polynesia, South pacific, 2013. *Emerg Infect Dis*. 2014;20(6):1085-6.
30. Dupont-Rouzeyrol M, O'Connor O, Calvez E, Daurès M, John M, Grangeon JP, et al. Co-infection with Zika and Dengue Viruses in 2 Patients, New Caledonia, 2014. *Emerg Infect Dis*. 2015;21(2):381-2.
31. Tognarelli J, Ulloa S, Villagra E, Lagos J, Aguayo C, Fasce R, et al. A report on the outbreak of Zika virus on Easter Island, South Pacific, 2014. *Arch Virol*. 2016;161(3):665-8.
32. Musso D, Nilles EJ, Cao-Lormeau VM. Rapid spread of emerging Zika virus in the Pacific area. *Clin Microbiol Infect*. 2014;20(10):O595-6.
33. Campos GS, Bandeira AC, Sardi SI. Zika Virus Outbreak, Bahia, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2015;21(10):1885-6.
34. Zanluca C, Melo VC, Mosimann AL, Santos GI, Santos CN, Luz K. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2015;110(4):569-72.
35. Iosifidis S, Mallet HP, Leparc Goffart I, Gauthier V, Cardoso T, Herida M. Current Zika virus epidemiology and recent epidemics. *Med Mal Infect*. 2014;44(7):302-7.
36. Calvet G, Aguiar RS, Melo ASO, Sampaio SA, de Filippis I, Fabri A, et al. Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. *Lancet Infect Dis*. 2016;16(6):653-60.
37. Mlakar J, Korva M, Tul N, Popović M, Poljšak-Prijatelj M, Mraz J, et al. Zika Virus Associated with Microcephaly. *N Engl J Med*. 2016;374(10):951-8.
38. Oliveira Melo AS, Malinger G, Ximenes R, Szejnfeld PO, Alves Sampaio S, Bispo de Filippis AM. Zika virus intrauterine infection causes fetal brain abnormality and microcephaly: tip of the iceberg? *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2016;47(1):6-7.
39. Costello A, Dua T, Duran P, Gülmezoglu M, Oladapo OT, Perea W, et al. Defining the syndrome associated with congenital Zika virus infection. *Bull World Health Organ*. 2016;94(6):406-A.
40. França GV, Schuler-Faccini L, Oliveira WK, Henriques CM, Carmo EH, Pedi VD, et al. Congenital Zika virus syndrome in Brazil: a case series of the first 1501 livebirths with complete investigation. *Lancet*. 2016;388(10047):891-7.

41. Meaney-Delman D, Oduyebo T, Polen KN, White JL, Bingham AM, Slavinski SA, et al. Prolonged Detection of Zika Virus RNA in Pregnant Women. *Obstet Gynecol.* 2016;128(4):724-30.
42. Weaver SC. Emergence of Epidemic Zika Virus Transmission and Congenital Zika Syndrome: Are Recently Evolved Traits to Blame? *MBio.* 2017;8(1).
43. Heymann DL, Hodgson A, Sall AA, Freedman DO, Staples JE, Althabe F, et al. Zika virus and microcephaly: why is this situation a PHEIC? *Lancet.* 2016;387(10020):719-21.
44. Vasilakis N, Weaver SC. Flavivirus transmission focusing on Zika. *Curr Opin Virol.* 2017;22:30-5.
45. Haddow AJ, Williams MC, Woodall JP, Simpson DIH, Goma LKH. Twelve isolations of Zika virus from *Aedes (Stegomyia) africanus* (Theobald) taken in and above a Uganda forest. *Bulletin of the World Health Organization.* 1964;31(1):57.
46. Haddow AD, Schuh AJ, Yasuda CY, Kasper MR, Heang V, Huy R, et al. Genetic characterization of Zika virus strains: geographic expansion of the Asian lineage. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012;6(2):e1477.
47. Ferreira-de-Brito A, Ribeiro IP, Miranda RM, Fernandes RS, Campos SS, Silva KA, et al. First detection of natural infection of *Aedes aegypti* with Zika virus in Brazil and throughout South America. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2016;111(10):655-8.
48. Beerntsen BT, James AA, Christensen BM. Genetics of mosquito vector competence. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2000;64(1):115-37.
49. Halstead SB. Dengue virus-mosquito interactions. *Annu Rev Entomol.* 2008;53:273-91.
50. Moore-Ede MC, Sulzman FM, Fuller CA. *The clocks that time us: physiology of the circadian timing system: Harvard Univ Pr; 1982.*
51. Marques N, Menna-Barreto LC. *princípios e aplicações. São Paulo: Edusp. 2003.*
52. Bruno R.V, Lima-Camara T.N., Peixoto A.A. *Ritmos biológicos em seus insetos vetores e seu controle molecular. Tópicos Avançados em Entomologia Molecular. INCT-EM. 2012.*
53. Pittendrigh CS. Temporal organization: reflections of a Darwinian clock-watcher. *Annual review of physiology.* 1993 Mar;55(1):17-54.
54. Pittendrigh CS. On temperature independence in the clock system controlling emergence time in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1954;40(10):1018.

55. Konopka RJ, Benzer S. Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1971 1;68(9):2112-6
56. Saunders DS, Steel CGH, Vafopoulou X, R.D L. *Insect Clocks*. Third ed: Elsevier; 2002. 576 p.
57. Boothroyd CE, Young MW. The in (put) s and out (put) s of the *Drosophila* circadian clock. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2008;1129(1):350-7.
58. Hardin PE. Molecular genetic analysis of circadian timekeeping in *Drosophila*. *Advances in genetics*. 2011;74:141.
59. Stanewsky R. Genetic analysis of the circadian system in *Drosophila melanogaster* and mammals. *Journal of neurobiology*. 2003 ;54(1):111-47.
60. Allada R, Chung BY. Circadian organization of behavior and physiology in *Drosophila*. *Annual review of physiology*. 2010. 17;72:605-24.
61. Stanewsky R, Kaneko M, Emery P, Beretta B, Wager-Smith K, Kay SA, et al. The cryb mutation identifies cryptochrome as a circadian photoreceptor in *Drosophila*. *Cell*. 1998 25;95(5):681-92.
62. Emery P, So WV, Kaneko M, Hall JC, Rosbash M. CRY, a *Drosophila* clock and light-regulated cryptochrome, is a major contributor to circadian rhythm resetting and photosensitivity. *Cell*. 1998;95(5):669-79; 0092-8674.
63. Cyran SA, Buchsbaum AM, Reddy KL, Lin M-C, Glossop NRJ, Hardin PE, et al. vrille, Pdp1, and dClock form a second feedback loop in the *Drosophila* circadian clock. *Cell*. 2003;112(3):329-41; 0092-8674.
64. Glossop NRJ, Houl JH, Zheng H, Ng FS, Dudek SM, Hardin PE. VRILLE feeds back to control circadian transcription of Clock in the *Drosophila* circadian oscillator. *Neuron*. 2003;37(2):249-61; 0896-6273.
65. Zheng X, Koh K, Sowcik M, Smith CJ, Chen D, Wu MN, et al. An isoform-specific mutant reveals a role of PDP1 ϵ in the circadian oscillator. *Journal of Neuroscience*. 2009;29(35):10920-7; 0270-6474.
66. Rutila JE, Suri V, Le M, So WV, Rosbash M, Hall JC. CYCLE is a second bHLH-PAS clock protein essential for circadian rhythmicity and transcription of *Drosophila* period and timeless. *Cell*. 1998;93(5):805-14; 0092-8674.
67. Kadener S, Stoleru D, McDonald M, Nawathean P, Rosbash M. Clockwork Orange is a transcriptional repressor and a new *Drosophila* circadian pacemaker component. *Genes & development*. 2007;21(13):1675-86; 0890-9369.
68. Lim C, Chung BY, Pitman JL, McGill JJ, Pradhan S, Lee J, et al. Clockwork orange encodes a transcriptional repressor important for circadian-clock amplitude in *Drosophila*. *Current Biology*. 2007;17(12):1082-9; 0960-9822.

69. Matsumoto A, Ukai-Tadenuma M, Yamada RG, Houl J, Uno KD, Kasukawa T, et al. A functional genomics strategy reveals clockwork orange as a transcriptional regulator in the *Drosophila* circadian clock. *Genes & development*. 2007;21(13):1687-700; 0890-9369.
70. Jaumouillé E, Almeida PM, Stähli P, Koch R, Nagoshi E. Transcriptional regulation via nuclear receptor crosstalk required for the *Drosophila* circadian clock. *Current Biology*. 2015;25(11):1502-8; 0960-9822.
71. Kumar S, Chen D, Jang C, Nall A, Zheng X, Sehgal A. An ecdysone-responsive nuclear receptor regulates circadian rhythms in *Drosophila*. *Nature communications*. 2014;5(1):1-12; 2041-1723.
72. Gentile C, Rivas GB, Meireles-Filho AC, Lima JB, Peixoto AA. Circadian expression of clock genes in two mosquito disease vectors: *cry2* is different. *J Biol Rhythms*. 2009;24(6):444-51.
73. Yuan Q, Metterville D, Briscoe AD, Reppert SM. Insect cryptochromes: gene duplication and loss define diverse ways to construct insect circadian clocks. *Molecular biology and evolution*. 2007;24(4):948-55; 1537-719.
74. Lima-Camara TN, Bruno RV, Luz PM, Castro MG, Lourenço-de-Oliveira R, Sorgine MH, et al. Dengue infection increases the locomotor activity of *Aedes aegypti* females. *PLoS One*. 2011;6(3):e17690.
75. Gentile C, Rivas GB, Lima JB, Bruno RV, Peixoto AA. Circadian clock of *Aedes aegypti*: effects of blood-feeding, insemination and RNA interference. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2013;108 Suppl 1:80-7.
76. Lima-Camara TN, Lima JB, Bruno RV, Peixoto AA. Effects of insemination and blood-feeding on locomotor activity of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) females under laboratory conditions. *Parasit Vectors*. 2014;7:304.
77. Rivas GBS, Teles-de-Freitas R, Pavan MG, Lima JBP, Peixoto AA, Bruno RV. Effects of Light and Temperature on Daily Activity and Clock Gene Expression in Two Mosquito Disease Vectors. *J Biol Rhythms*. 2018;33(3):272-88.
78. Meireles-Filho ACA, da S. Rivas GB, Gesto JSM, Machado RC, Britto C, de Souza NA, et al. The biological clock of an hematophagous insect: locomotor activity rhythms, circadian expression and downregulation after a blood meal. *Febs Letters*. 2006;580(1):2-8; 0014-5793.
79. Das S, Dimopoulos G. Molecular analysis of photic inhibition of blood-feeding in *Anopheles gambiae*. *BMC physiology*. 2008;8(1):23; 1472-6793.
80. Rund SSC, Hou TY, Ward SM, Collins FH, Duffield GE. Genome-wide profiling of diel and circadian gene expression in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011;108(32):E421-E30; 0027-8424.

81. Rund SSC, Gentile JE, Duffield GE. Extensive circadian and light regulation of the transcriptome in the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *BMC genomics*. 2013;14(1):218; 1471-2164.
82. Padilha KP, Resck MEB, Cunha OATD, Teles-de-Freitas R, Campos SS, Sorgine MHF, et al. Zika infection decreases *Aedes aegypti* locomotor activity but does not influence egg production or viability. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2018;113(10):e180290.
83. Ito C, Tomioka K. Heterogeneity of the peripheral circadian systems in *Drosophila melanogaster*: a review. *Frontiers in physiology*. 2016;7:8,1664-042.
84. Plautz JD, Kaneko M, Hall JC, Kay SA. Independent photoreceptive circadian clocks throughout *Drosophila*. *Science*. 1997;278(5343):1632-5; 0036-8075.
85. Giebultowicz JM. Molecular mechanism and cellular distribution of insect circadian clocks. *Annual review of entomology*. 2000;45(1):769-93; 0066-4170.
86. Patke A, Young MW, Axelrod S. Molecular mechanisms and physiological importance of circadian rhythms. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2019:1-18; 1471-0080.
87. Hardin PE. Analysis of period mRNA cycling in *Drosophila* head and body tissues indicates that body oscillators behave differently from head oscillators. *Molecular and cellular biology*. 1994;14(11):7211-8; 0270-7306.
88. Beaver LM, Rush BL, Gvakharia BO, Giebultowicz JM. Noncircadian regulation and function of clock genes period and timeless in oogenesis of *Drosophila melanogaster*. *Journal of biological rhythms*. 2003;18(6):463-72; 0748-7304.
89. Sandrelli F, Costa R, Kyriacou CP, Rosato E. Comparative analysis of circadian clock genes in insects. *Insect molecular biology*. 2008;17(5):447-63; 0962-1075.
90. Day JF. Mosquito Oviposition Behavior and Vector Control. *Insects*. 2016 Dec;7(4):65.
91. Sirisena PDNN, Kumar A, Sunil S. Evaluation of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Life Table Attributes Upon Chikungunya Virus Replication Reveals Impact on Egg-Laying Pathways. *J Med Entomol*. 2018;55(6):1580-7.
92. Petersen MT, Silveira IDD, Tátilla-Ferreira A, David MR, Chouin-Carneiro T, Van den Wouwer L, et al. The impact of the age of first blood meal and Zika virus infection on *Aedes aegypti* egg production and longevity. *PLoS One*. 2018;13(7):e0200766.
93. George H, Terracol R. The vrille gene of *Drosophila* is a maternal enhancer of decapentaplegic and encodes a new member of the bZIP family of transcription factors. *Genetics*. 1997 Aug 1;146(4):1345-63.

94. Vazeille-Falcoz M, Mousson L, Rodhain F, Chungue E, Failloux A-B. Variation in oral susceptibility to dengue type 2 virus of populations of *Aedes aegypti* from the islands of Tahiti and Moorea, French Polynesia. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1999 1;60(2):292-9.
95. Coelho SVA, Neris RLS, Papa MP, Schnellrath LC, Meuren LM, Tschoeke DA, et al. Development of standard methods for Zika virus propagation, titration, and purification. *J Virol Methods*. 2017;246:65-74.
96. Oliveira JHM, Talyuli OAC, Goncalves RLS, Paiva-Silva GO, Sorgine MHF, Alvarenga PH, et al. Catalase protects *Aedes aegypti* from oxidative stress and increases midgut infection prevalence of Dengue but not Zika. *PLoS neglected tropical diseases*. 2017, 5;11(4):e0005525.
97. Lanciotti RS, Kosoy OL, Laven JJ, Velez JO, Lambert AJ, Johnson AJ, et al. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. *Emerg Infect Dis*. 2008;14(8):1232-9.
98. Bonaldo MC, Ribeiro IP, Lima NS, Dos Santos AA, Menezes LS, da Cruz SO, et al. Isolation of Infective Zika Virus from Urine and Saliva of Patients in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(6):e0004816.
99. Sokal RR, Rohlf FJ. *Biometry: the principles and practice of statistics in biological research* 3rd ed Freeman. New York, NY. 1995.
100. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ $\Delta\Delta$ CT method. *methods*. 2001 Dec 1;25(4):402-8.
101. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*. 2001 May 1;29(9):e45-.
102. Gentile C, Lima JBP, Peixoto AA. Isolation of a fragment homologous to the rp49 constitutive gene of *Drosophila* in the Neotropical malaria vector *Anopheles aquasalis* (Diptera: Culicidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2005 Oct;100(6):545-7.
103. Sylvestre G, Gandini M, Maciel-de-Freitas R. Age-dependent effects of oral infection with dengue virus on *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) feeding behavior, survival, oviposition success and fecundity. *PLoS One*. 2013;8(3):e59933.
104. Maciel-de-Freitas R, Koella JC, Lourenço-de-Oliveira R. Lower survival rate, longevity and fecundity of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) females orally challenged with dengue virus serotype 2. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2011;105(8):452-8.
105. Resck MEB, Padilha KP, Cupolillo AP, Talyuli OAC, Ferreira-de-Brito A, Lourenço-de-Oliveira R et al. Unlike Zika, Chikungunya virus interferes in the viability of *Aedes aegypti* eggs, regardless of females' age. *Sci Rep*. Aug 2020; 10, 13642.

106. Silveira ID, Petersen MT, Sylvestre G, Garcia GA, David MR, Pavan MG, et al. Zika virus infection produces a reduction on *Aedes aegypti* lifespan but no effects on mosquito fecundity and oviposition success. *Frontiers in microbiology*. 2018; 9, 3011.
107. Meireles-Filho ACA, Kyriacou CP. Circadian rhythms in insect disease vectors. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2013;108:48-58.
108. Giebultowicz JM. Peripheral clocks and their role in circadian timing: insights from insects. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*. 2001 Nov 29;356(1415):1791-9.
109. Glossop NRJ, Hardin PE. Central and peripheral circadian oscillator mechanisms in flies and mammals. *Journal of Cell Science*. 2002 Sep 1;115(17):3369-77.
110. Kotwica J, Larson MK, Bebas P, Giebultowicz JM. Developmental profiles of PERIOD and DOUBLETIME in *Drosophila melanogaster* ovary. *Journal of insect physiology*. 2009 May 1;55(5):419-25.
111. Beaver LM, Gvakharia BO, Vollintine TS, Hege DM, Stanewsky R, Giebultowicz JM. Loss of circadian clock function decreases reproductive fitness in males of *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2002 Feb 19;99(4):2134-9.
112. Meireles-Filho AC, Amoretty PR, Souza NA, Kyriacou CP, Peixoto AA. Rhythmic expression of the cycle gene in a hematophagous insect vector. *BMC molecular biology*. 2006;7(1):38.
113. Gentile C. Genética molecular dos ritmos circadianos em mosquitos vetores (Diptera: Culicidae). PhD diss., 2007.
114. Lehane MJ, Lehane MJ. *The biology of blood-sucking in insects*: Cambridge University Press; 2005.
115. Rombi F, Bayliss R, Tuplin A, Yeoh S. The journey of Zika to the developing brain. *Molecular Biology Reports*. 2020 Mar 3:1-9.
116. Chouin-Carneiro T, dos Santos FB. Transmission of Major Arboviruses in Brazil: The Role of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* Vectors. *Biological Control of Pest and Vector Insects*. 2017; 5:231.
117. Amoretty PR, Padilha KP, Freitas RT, Bruno RV. Uso de *Drosophila melanogaster* como modelo para o estudo do relógio circadiano em insetos vetores. 2013.
118. Rivas GBDS. Análise comparativa dos ritmos de atividade locomotora e expressão circadiana de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* PhD diss., 2010.