

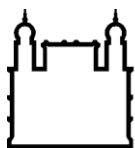
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Programa de Pós-Graduação de Biologia Parasitária

IMPACTO DA INFECÇÃO POR ZIKA EM PARÂMETROS DA HISTÓRIA
DE VIDA DE MOSQUITOS *Aedes Aegypti*

ISABELLA DIAS DA SILVEIRA

Rio de Janeiro
Março de 2018



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

ISABELLA DIAS DA SILVEIRA

Impacto da infecção por Zika em parâmetros da história de vida de mosquitos *Aedes aegypti*

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

Orientador: Dr. Rafael Maciel de Freitas

RIO DE JANEIRO

Março de 2018

Dias da Silveira, Isabella.

Impacto da infecção por ZIKV em parâmetros da história de vida de mosquitos *Aedes aegypti* / Isabella Dias da Silveira. - Rio de Janeiro, 2018.
95 f.

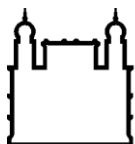
Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2018.

Orientador: Rafael Maciel de Freitas.

Bibliografia: Inclui Bibliografias.

1. *Aedes aegypti*. 2. ZIKV. 3. Capacidade vetorial. 4. fitness. 5. sobrevivência. I. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Manguinhos/ICICT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

AUTOR: ISABELLA DIAS DA SILVEIRA

**IMPACTO DA INFECÇÃO POR ZIKA EM PARÂMETROS DA HISTÓRIA DE VIDA DE
MOSQUITOS *Aedes Aegypti***

ORIENTADOR: Dr. Rafael Maciel de Freitas

Aprovada em: ____/____/____

EXAMINADORES:

Dr. Antonella Bacigalupo

Dr: José Henrique M Oliveira

Dr: Rafaela Vieira Bruno

Dr: Ademir de Jesus Martins Junior

Dr: Myrna Cristina Bonaldo

Rio de Janeiro, Março de 2018

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador e amigo Rafael Maciel de Freitas pelo enorme apoio, incentivo, e pelos incontáveis ensinamentos durante todo o período acadêmico, os quais contribuíram muito para a minha formação e para todas as etapas de aprendizado.

Aos meus queridos amigos de laboratório Aline Tátilla, Camila Pereira, Gabriela de Azambuja, Lilha Barbosa, Márcio Pavan, Mariana David, Martha Petersen, pelo suporte incondicional e por sempre estarem ao meu lado ao longo dos experimentos realizados.

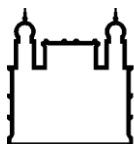
À minha mãe Solange Dias, meu pai Jonas Silveira, meus irmãos Ramon Dias e Rafaella Dias, e minha cunhada e amiga Jaciane Salustiano, agradeço por todo encorajamento para que eu seguisse adiante no caminho científico, pelas palavras de carinho sempre que foram necessárias, e pelo amparo em todos os momentos da minha vida.

Ao setor de hemoterapia da Universidade Estadual do Rio de Janeiro pelo apoio depositado nesse projeto através do fornecimento de bolsas de sangue que seriam descartadas.

À banca examinadora pelo enriquecimento teórico através dos comentários feitos, e pela contribuição no aprimoramento deste estudo.

Aos órgãos de fomento à pesquisa CAPES e FAPERJ pelo auxílio fornecido na produção deste trabalho.

Science, for me, gives a partial explanation for life. In so far as it goes, it is based on fact, experience and experiment. – Rosalind Elsie Franklin



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

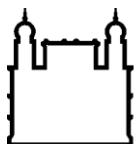
IMPACTO DA INFECÇÃO POR ZIKA EM PARÂMETROS DA HISTÓRIA DE VIDA DE MOSQUITOS *Aedes Aegypti*

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

Isabella dias da Silveira

Desde a sua introdução nas Américas em 2014, o vírus Zika tem sido alvo de vários estudos, principalmente após sua associação com complicações neurológicas, tais como a síndrome de Guillain-Barré e a microcefalia em neonatos. No Brasil, o ciclo de transmissão do vírus é mantido na natureza majoritariamente por mosquitos *Aedes aegypti*. Um aspecto que tem sido elucidado em muitos modelos envolvendo arbovírus e artrópodes é o custo no fitness do vetor causado por uma infecção viral. No geral, tem sido descrito que arbovírus podem levar a modificações no fenótipo do vetor, influenciando diretamente parâmetros fundamentais para a capacidade vetorial, como por exemplo, a sobrevivência diária, comportamento alimentar e fecundidade. Apesar desse impacto no fitness ser bem descrito para dengue (DENV) e febre do Oeste do Nilo (WNV), pouco se sabe acerca do papel do ZIKV como mediador de alterações na biologia do *Ae. aegypti*. Desta forma, este trabalho visa analisar possíveis variações no fitness do inseto, causadas por uma infecção com o ZIKV, e complementarmente avaliar os efeitos de uma superinfecção (uma nova infecção com o mesmo isolado viral). Para isso, fêmeas de *Ae. aegypti* coletadas em três distritos do RJ – Barra, Deodoro e Porto – foram submetidas à uma alimentação artificial com sangue contendo o vírus Zika. Sete dias após a primeira exposição, uma amostra dos mosquitos foi desafiada à uma nova infecção com o mesmo vírus. Parâmetros como sobrevivência diária, sucesso de oviposição e número de ovos por postura foram monitorados regularmente. No final de 60 dias, uma ANOVA revelou que a infecção não teve efeito na sobrevivência dos mosquitos. No entanto, a longevidade das fêmeas variou significativamente de acordo com as populações. Mosquitos superinfectados também apresentaram padrões de susceptibilidade variando conforme a população. Considerando o sucesso de oviposição, não houve diferenças entre mosquitos infectados e não-infectados, porém, o genótipo das populações foi novamente um determinante nos resultados observados. Para o grupo superinfectado, os indivíduos de Porto, que apresentaram longevidade menor, exibiram título viral superior nas glândulas salivares. No geral, o vírus Zika não afetou a sobrevivência e o fenótipo de oviposição das fêmeas de *Ae. aegypti*, no entanto, as diferenças entre populações parecem ser determinantes na resposta à infecção.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Impact of Zika virus infection on *Aedes aegypti* life-history

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION IN PARASITE BIOLOGY

Isabella Dias da Silveira

Since its introduction in the Americas in 2014, Zika virus has been the subject of several studies, mainly after its association with neurological complications such as Guillain-Barré syndrome and microcephaly in neonates. In Brazil, the virus transmission cycle is mostly maintained by *Aedes aegypti* mosquitoes, which are considered as the primary vector. One aspect that has been elucidated in many models involving arbovirus and arthropods is the fitness cost that an infection can induce in the vector. In general, it has been seen that arbovirus can lead to modifications in vector's phenotype, thus directly influencing essential parameters for vectorial capacity, such as daily survival, feeding behavior and fecundity. Despite this fitness impact is well described for dengue (DENV), West Nile virus (WNV), little is known about the role of ZIKV on mediating alterations in *Ae. aegypti*'s biology. Therefore, the aim of this work is focused on analyzing possible variations on mosquitoes' fitness, caused by an infection with ZIKV, and complementarily we investigated the effects of a superinfection (a new infection with the same viral isolated). For this, *Ae. aegypti* females collected through ovitraps in three districts of Rio de Janeiro - Barra, Deodoro and Porto - were submitted to an artificial feeding with blood containing Zika virus. Seven days after the first exposure, a sample of mosquitoes was challenged with a new infection with the same virus from the initial inoculum. Parameters such as daily survival, oviposition success and number of eggs per batch were monitored regularly. At the end of 60 days, the ANOVA test revealed that the treatment - presence or absence of the virus - had no effect on mosquito survival, however, females' longevity varied according to population. In addition, superinfected mosquitoes also presented distinct patterns of susceptibility, varying according to the population. Considering oviposition success, there was no difference between infected and uninfected mosquitoes, however, once again the populations' genotype was a determinant for the outcomes. Despite the variation of mortality among populations, there was not a significant distinction on viral loads in mosquitoes' abdomen at 7 and 14 dpi. For the superinfected group, Porto individuals, which exhibited a lower longevity, presented higher viral titers in the salivary glands. In general, Zika virus does not affect survival and the oviposition phenotype of *Ae. aegypti*, in the meantime, differences between populations appear to be determinant in response to infection.

ÍNDICE

1.1	Arbovírus de importância médica	11
1.1.2	<i>Dengue: Aspectos gerais</i>	11
1.1.3	<i>Chikungunya: Aspectos gerais</i>	13
1.1.3	<i>Zika: Vírus e histórico</i>	15
1.2.	Zika: Epidemiologia.....	18
1.3.	Zika: Modos de transmissão.....	23
1.3.1.	<i>Transmissão vertical e venérea</i>	24
1.3.2.	<i>Transmissão não vetorial</i>	25
1.4.	O vetor.....	27
1.4.1.	<i>Aedes aegypti</i>	27
1.5.	Capacidade vetorial.....	31
1.6.	<i>Aedes aegypti</i> x ZIKV.....	32
1.7.	<i>Culex spp</i> x ZIKV.....	33
1.8.	Interação parasito- vetor	35
2.	Justificativa:	37
3.	Objetivos.....	39
3.1.	Objetivos específicos	39
4.	Resultados	40
5.	Discussão.....	72
6.	Conclusão	79
7.	Referências bibliográficas	80
8.	Anexos.....	94

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Cocirculação de DENV, ZIKV e CHIKV pelo mundo (Ruckert et al. 2017)..	21
Figura 2. Distribuição espacial do vírus Zika pela extensão do território brasileiro entre 2014 e 2016 (Lowe et al. 2018).	22
Figura 3. Ciclo de vida de mosquitos <i>Aedes aegypti</i>	31

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ATP	Trifosfato de adenosina (Do inglês: <i>adenosine triphosphate</i>)
C	Capsídeo
CHIKV	Vírus chikungunya
CV	Competência Vetorial
DENV	Vírus dengue
E	Envelope
ECSA	Leste-Centro-Sul da África (Do inglês: <i>East-Central-South-African</i>)
INF	Infectado
JEV	Vírus da Encefalite Japonesa (Do inglês: <i>Japanese encephalitis virus</i>)
LACV	Vírus La Crosse (Do inglês: <i>La Crosse encephalitis virus</i>)
M	Membrana
mM	Micromolar
nm	Nanômetros
nM	Nanomolar
NS	Não- estruturais
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
PAHO	Organização Pan Americana de Saúde (Do inglês: <i>Pan American Health Organization</i>)
PIE	Período de incubação extrínseco
PFU	Unidade formadora de placas (Do inglês: <i>Plaque-forming units</i>)
SINF	Superinfectado
WNV	Vírus do Nilo Ocidental (Do inglês: <i>West Nile virus</i>)
YFV	Vírus da febre amarela (Do inglês: <i>yellow fever virus</i>)
ZIKV	Vírus Zika

1. INTRODUÇÃO

1.1 Arbovírus de importância médica

Os arbovírus (do inglês: “*Arthropod-borne virus*”) são vírus que predominantemente apresentam seu material genético composto por RNA. Possuem nomenclatura baseada em uma característica de seu ciclo de transmissão, uma vez que são vírus capazes de infectar artrópodes hematófagos durante a realização do repasto sanguíneo em um hospedeiro em viremia (Mellor, 2000). De modo geral, os arbovírus abrangem uma diversidade de agentes, que inclui mais de 500 espécies compreendidas nas famílias Togaviridae, Flaviviridae, Bunyaviridae, Reoviridae e Rhabdoviridae (Beckham & Kenneth, 2015). Nas últimas décadas, a expansão do vírus dengue e a emergência de outros arbovírus tais como Zika e chikungunya têm desafiado as autoridades de saúde pública em virtude do número crescente de casos registrados ao redor do mundo. Evidentemente, a prevalência destas doenças é heterogênea no planeta, sendo detectada principalmente nos países localizados nas zonas tropical e subtropical que albergam populações nativas de seus mosquitos vetores, além de apresentarem as condições climáticas e ambientais que, em conjunto com o desenfreado crescimento urbano, favorecem a propagação do vírus.

1.1.2 Dengue: Aspectos gerais

O vírus dengue (DENV) é um arbovírus da família Flaviviridae, gênero *Flavivirus*, sendo formalmente reconhecidos quatro sorotipos antigenicamente distintos, sendo estes denominados: DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4

(Guzman et al. 2010). Em 2013, um novo sorotipo do vírus foi descoberto – DENV-5 –, contudo, diferente dos demais, este é encontrado no ciclo silvestre, e teria surgido através de recombinações e eventos de gargalo genético (Mustafa et al. 2014). O genoma do vírion é constituído por uma molécula de RNA fita-simples positiva, apresentando-se na forma de uma partícula esférica, com diâmetro aproximado de 40-50nm (Guzman et al. 2010). Estudos filogenéticos revelam que os sorotipos se modificaram a partir dos seus ancestrais selvagens há estimados 1000 anos (Twiddy et al. 2003). Devido à manutenção de todos os 4 sorotipos em ciclo enzoótico na África, atribui-se que a origem do vírus DENV progenitor tenha ocorrido neste continente (Smith 1956; Powell et al. 1980; Wang et al. 2000; Diallo et al. 2005).

Nas Américas, estima-se que o vírus tenha sido introduzido originalmente por volta do ano de 1635, onde quadros sintomáticos “dengue-*like*” foram notificados em Martinique e Guadeloupe, no Caribe. Em 1699, outros episódios foram reportados, dessa vez no Panamá. Entretanto, em todos esses primeiros relatos, as epidemias não puderam ser categoricamente atribuídas ao vírus dengue, posto que a falta de detalhamento clínico como estudo aprofundado do agente patogênico era um fator limitante na época (Gubler, 1995; Schneider & Droll, 2001). Embora esses primeiros casos tenham etiologia desconhecida, em 1780, Benjamin Rush documentou a epidemia que acometeu a Filadélfia, nos Estados Unidos, e mostrou pela primeira vez que a síndrome em questão se tratava da febre do dengue (Dick et al. 2012). No século XIX, as epidemias de dengue se tornaram mais comuns, sobretudo durante a segunda guerra mundial, onde o aumento na incidência dos casos estava majoritariamente relacionado às

atividades comerciais, urbanização e deslocamento populacional (Guzman & Kouri, 2002).

No Brasil, os primeiros relatos de casos de dengue datam de 1845, com os primeiros cenários epidêmicos atingindo áreas do Rio de Janeiro e São Paulo (Schneider & Droll, 2001). Outros surtos foram registrados dentre os anos de 1851-1853 e 1916-1923 (Pinheiro & Nelson, 1997). Anos mais tarde, em 1981, após o encerramento do programa de erradicação do *Aedes aegypti* pela Organização Pan-americana de Saúde, o vírus reemergiu em Boa Vista, Roraima, onde dois sorotipos - DENV-1 e DENV-4 - co-circularam pelo o estado (Osanai et al. 1983). Desde então, as infecções pelo DENV passaram a ser um problema para a saúde pública, seguindo com surtos de DENV-1 e DENV-2 no Rio de Janeiro em 1986 e 1990, e a introdução do DENV-3 em 2000. A emergência do DENV-3 no Brasil levou à um deslocamento dos outros sorotipos, e foi responsável por uma epidemia de grande escala, com 288.245 casos notificados (Nogueira et al. 2007). Dados mais recentes estimam que no ano de 2017, aproximadamente 251.000 casos de infecção por dengue ocorreram no Brasil, com o relato da presença dos quatro sorotipos (PAHO/WHO, 2017).

1.1.3 Chikungunya: Aspectos gerais

O vírus chikungunya (CHIKV) difere-se do DENV por se tratar de um alphavirus, família Togaviridae. Seu genoma de RNA consiste numa fita-simples, de senso positivo, com aproximadamente 11,8 kilobases. O primeiro isolamento do vírus foi dado no ano de 1953 durante uma epidemia na Tanzânia, que ocorreu na tribo dos Macondes – Grupo étnico da África subsaariana – (Ross, 1956). O nome Chikungunya é advindo da língua maconde, falada por esses

povos, e tem como significado “doença que dobra as articulações”, termo utilizado para definir o aspecto dos enfermos na época (Weaver et al. 2012). Estudos filogenéticos sugerem que o vírus esteja circulando enzooticamente na África por muitos séculos. Porém, existe grande dificuldade em determinar esse intervalo de tempo com precisão, por conta de que outros agravos locais possuem sintomatologia similar (Carey, 1971; Powers et al. 2000).

Os primeiros relatos de surto se deram na Indonésia, por volta do século XVIII, onde as infecções eram meramente classificadas como CHIKV devido à sintomatologia. Pressupõe-se que o vírus tenha chegado no Sudeste Asiático através de navios mercantes de Zanzibar, costa da África Oriental, de onde vinham tanto mosquitos vetores, quanto humanos suscetíveis à transmissão (Weaver et al. 2012). A partir de então, muitos episódios de infecção pelo vírus foram notificados dentre os séculos XVIII e XIX, vários destes na Índia e em Myanmar, no continente Asiático (Carey, 1971). Em 2004 na África Oriental a emergência do vírus se tornou uma problemática, com o surgimento de epidemias nas cidades de Lamu e Mombaça, no Quênia, e a posterior dispersão para Comores, La Réunion e outras ilhas (Sang et al. 2008, Chretien et al. 2007, Powers et al. 2007). A partir de 2005, o estado epidêmico do CHIKV se estabeleceu na Índia, com a exportação de casos para diversas regiões do mundo (Arankalle et al. 2007). No Brasil, o primeiro caso diagnosticado de CHIKV no estado do Rio de Janeiro se deu em 2010, através de um paciente que procurou o serviço hospitalar após o retorno de uma viagem para Sumatra, Indonésia (Albuquerque et al. 2012). Anos mais tarde, em 2014, o CHIKV foi reportado pela primeira vez em um caso autóctone, em Feira de Santana, Bahia. Acredita-se que este caso tenha sido originado a partir da introdução do genótipo

Leste-Centro-Sul-Africano (ECSA, abreviação do inglês), oriunda da Angola. Nessa época, houve um surto de doença caracterizada como exantemática, com a circulação sobreposta de ambos zika e chikungunya no estado (Teixeira et al. 2015; Nunes et al. 2015). Em Feira de Santana, o CHIKV atingiu níveis epidêmicos, com aproximadamente 4.088 casos reportados em 2015, enquanto que em Salvador, o número de notificações no mesmo ano foi de 1.240 casos. Ainda em 2014, infecções autóctones com CHIKV foram relatadas no município de Oiapoque, Amapá, mas desta vez a cepa viral em questão se tratava do genótipo Asiático (Nunes et al. 2015). Especula-se, portanto, que o genótipo ECSA tenha invadido o país vindo diretamente da África (provavelmente pelo deslocamento de algum paciente infectado), enquanto que o genótipo Asiático chegou a partir dos países insulares caribenhos. Em 2017, um total de 121.734 casos confirmados foram reportados em todo o Brasil, o que corresponde a 99% do total de casos registrados no continente Americano (PAHO/WHO, 2017).

1.1.3 Zika: Vírus e histórico

O vírus Zika é um arbovírus de RNA fita simples positiva, com 10.794 kilobases, pertencente ao gênero *Flavivirus*, família *Flaviviridae* (Lindenbach & Rice, 2003). Assim como é visto estritamente em outros flavivírus, o genoma de RNA é responsável por codificar três genes estruturais, Capsídico (C), de membrana (M- com prM sendo o precursor) e de envelope (E), e proteínas não-estruturais - NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, 2K, NS4B e NS5 - (Lindenbach & Rice, 2003). Ademais, a arquitetura viral, quando observada por crio-microscopia eletrônica, apresenta-se de forma similar a outros vírus do mesmo gênero (i.e., Vírus do Nilo do Oeste (WNV), vírus da encefalite japonesa (JEV), e DENV). Tal

estrutura mostra-se compreendida por uma superfície mais compacta, que permite uma maior estabilidade à exposição térmica se comparado ao vírus dengue (DENV). Essa estabilidade observada nas partículas do ZIKV pode estar relacionada a uma maior tolerância do vírus a ambientes adversos, como sêmen, urina e saliva, o que pode resultar em vias de transmissão alternativas (Kostyuchenko et al. 2016).

O primeiro isolamento do ZIKV se deu em abril de 1947 durante estudos de campo na floresta de Zika, Uganda. Como extensão do programa da Fundação Rockefeller, seis macacos Rhesus sentinela foram expostos em plataformas no dossel de árvores, com o objetivo de esclarecer a alta incidência de imunidade à febre amarela em primatas não humanos na península de Entebbe, antiga capital da Uganda (Dick et al. 1952). O monitoramento da condição física dos macacos era feito diariamente, visando detectar possíveis anormalidades que atestassem uma infecção. No decorrer dos dias, um dos primatas manifestou quadro febril, sendo posteriormente levado ao laboratório, onde complicações adicionais não foram reportadas. No terceiro episódio de piroxia, uma amostra de sangue foi coletada, com subsequente inoculação do soro pelas vias intraperitoneal e/ou intracerebral em camundongos e em outro macaco até então sadio. Nenhuma alteração foi observada num período de 30 dias nos camundongos que tiveram inoculação intraperitoneal. Entretanto, aqueles inoculados intracerebralmente apresentaram sintomas 10 dias após o tratamento, o que desencadeou novas questões sobre o possível neurotropismo do vírus, então denominado Zika por ter sido isolado na floresta homônima (Dick et al. 1952).

Em janeiro de 1948, um segundo isolado de ZIKV foi obtido. Desta vez, porém, a amostra foi proveniente de mosquitos infectados encontrados na floresta de Zika. Ao todo, 86 *Aedes africanus* foram coletados em um dos lotes de captura (E/1/48) e levados ao laboratório de Entebbe, onde foram tratados para a realização de passagens em camundongos. Dentre os camundongos inoculados com a suspensão filtrada, um deles foi encontrado morto no 6º dia, e outro apresentou sinais de infecção no 14º dia. O produto viral isolado dos mosquitos – Zika E/1 – foi também inoculado no macaco rhesus 758, porém nenhuma anormalidade foi verificada durante o monitoramento. Esses episódios, por fim, alertaram para o possível ciclo silvestre endêmico que estaria acontecendo entre mosquitos e primatas não humanos na região (Dick et al. 1952).

Apenas em meados da década de 50 é que começaram a surgir os primeiros relatos de isolados de vírus Zika em humanos. Em 1954, durante uma epidemia de icterícia que atingiu a região leste da Nigéria, três casos foram erroneamente identificados como Zika em pacientes, através de isolamento viral e teste de anticorpos neutralizantes (Macnamara, 1954). Anos mais tarde, em 1956, um voluntário foi inoculado com a suposta cepa de ZIKV, e teve o vírus isolado do sangue após apresentar quadro clínico febril (Bearcroft, 1956). Por fim, em 1964, foram rompidas as especulações ao se isolar pela primeira vez o vírus Zika de humanos, onde foi destacado também que o patógeno previamente isolado por Macnamara e Bearcroft se tratava, na verdade, de um vírus similar ao ZIKV – *Spondweni virus* (Simpson 1964; Wikan & Smith, 2017).

1.2. Zika: Epidemiologia

A recente pandemia de Zika culminou em um grande alarde na vigilância das arboviroses, majoritariamente devido à importância clínica da doença para a saúde pública, e os impactos socioeconômicos causados nas regiões afetadas. O gradativo número de casos, sobretudo aqueles seguidos por complicações sintomáticas, orientaram na associação da patologia com quadros neurológicos debilitantes, e também com desordens no desenvolvimento fetal, tais como a Síndrome de Guillain-Barré e a Microcefalia, respectivamente (Brasil et al. 2016, Teixeira et al. 2016). Até a data deste trabalho, um total de 223.477 casos cumulativos confirmados de Zika foram registrados no mundo, com 61% destes notificados apenas no Brasil (PAHO, 2018). Assim como a dengue, denota-se que a Zika possui uma prevalência e incidência maior em países de clima tropical, onde as condições ambientais e urbanização favorecem o desenvolvimento de seu mosquito vetor e, conseqüentemente, acentuam a transmissão.

Antes de 2007, apenas 14 casos esporádicos de Zika haviam sido notificados em humanos no mundo, sendo estes em países da África e do Sudeste Asiático (Moore et al. 1975; Olson et al. 1981). O primeiro grande surto de Zika foi relatado em 2007 na Ilha Yap, nos Estados Federados da Micronésia, e teve a duração de 3 meses. Inúmeros quadros febris auto-limitantes, com presença de erupções cutâneas, artralgia e conjuntivite foram reportados durante este período, e embora ensaios imunes tenham detectado IgM contra Dengue, testes adicionais confirmaram a presença de ZIKV no soro dos pacientes. Ao todo, 185 casos suspeitos de Zika foram detectados, sendo 49 destes confirmados e outros 59 considerados casos prováveis (i.e., clinicamente

compatível, porém sem confirmação laboratorial). É estimado que ao todo 73% da população residente do arquipélago tenha entrado em contato com o vírus. Destes, cerca de 18% corresponderam a casos sintomáticos, sem a ocorrência de complicações adicionais ou morte (Duffy et al, 2009). Especula-se que a magnitude desta epidemia possa ser creditada à introdução de uma nova linhagem do vírus Zika, com um fitness maior, de emergência similar à novas linhagens de DENV responsáveis por surtos anteriores (Steel et al. 2010).

Posteriormente, novos casos foram documentados na Polinésia Francesa, em outubro de 2013. Os relatos tiveram início quando três membros de uma mesma família manifestaram sintomas similares a uma infecção por dengue. Após a realização de testes antigênicos (NS1) e RT-PCR, o diagnóstico laboratorial se mostrou negativo para DENV, WNV, CHIKV, e inconclusivo para ZIKV. Após esse episódio, um novo paciente apresentou sinais da mesma doença, porém desta vez, o RT-PCR foi positivo para o vírus Zika, seguido de confirmação através do sequenciamento genômico (Cao-Lormeau et al. 2014). No geral, os centros de atendimento médico polinésios registraram um total superior a 30.000 casos suspeitos, acometendo cerca de 11% da população do país (Kucharski et al. 2016). Ao final do surto, foi estimada uma taxa de 49% de soroprevalência entre participantes de uma pesquisa com o objetivo de detectar IgG em amostras sanguíneas (Aubry et al. 2017).

Em novembro de 2013, o vírus Zika chega ao arquipélago da Nova Caledônia, Oceania. Vale ressaltar que os primeiros casos registrados foram importados da Polinésia Francesa, com transmissão autóctone sendo detectada a partir de janeiro de 2014 e dando o início ao surto no país. Autoridades de saúde registraram um total de 1.385 casos de infecção por ZIKV diagnosticados

laboratorialmente (cerca de 0,8% da população). Destes, 35 foram importados da Polinésia Francesa, República de Vanuatu e Ilhas Cook (Dupont-Rouzeyrol et al. 2015). Diversos fatores podem explicar a diferença dos perfis epidêmicos observados na Nova Caledônia e na Polinésia Francesa, podendo citar aspectos como: diferenças genéticas/imunológicas entre as populações humanas residentes de cada país, diferença na fauna de culicídeos e em sua competência vetorial intrínseca ao ZIKV (*Ae. aegypti* e *Ae. polyenesiensis* mais abundantes na Polinésia Francesa, ao passo que apenas *Ae. aegypti* era encontrado na Nova Caledônia), diferentes estratégias de controle vetorial atreladas a particularidades climáticas de cada região, e também possíveis alterações genéticas que culminaram em uma linhagem viral de maior potencial epidêmico (Musso & Gubler et al. 2016).

Após atingir a África, Ásia e Oceania, o ZIKV finalmente foi introduzido nas Américas em 2014-2015, onde já circulavam outros arbovírus. Em março de 2015, inúmeros casos descritos como doença exantemática foram reportados no Brasil, principalmente em Estados do Nordeste (Campos et al. 2015). Foi neste cenário onde ocorreu a detecção da primeira transmissão autóctone do vírus Zika no Brasil, através do soro de 21 pacientes em fase sintomática aguda. Os soros foram transportados para o Laboratório de Virologia Molecular do Instituto Carlos Chagas, Paraná, e após a realização de RT-PCR foi confirmada a presença do vírus, e o sequenciamento revelou identidade muito similar ao ZIKV de linhagem Asiática (Zanluca et al. 2015).

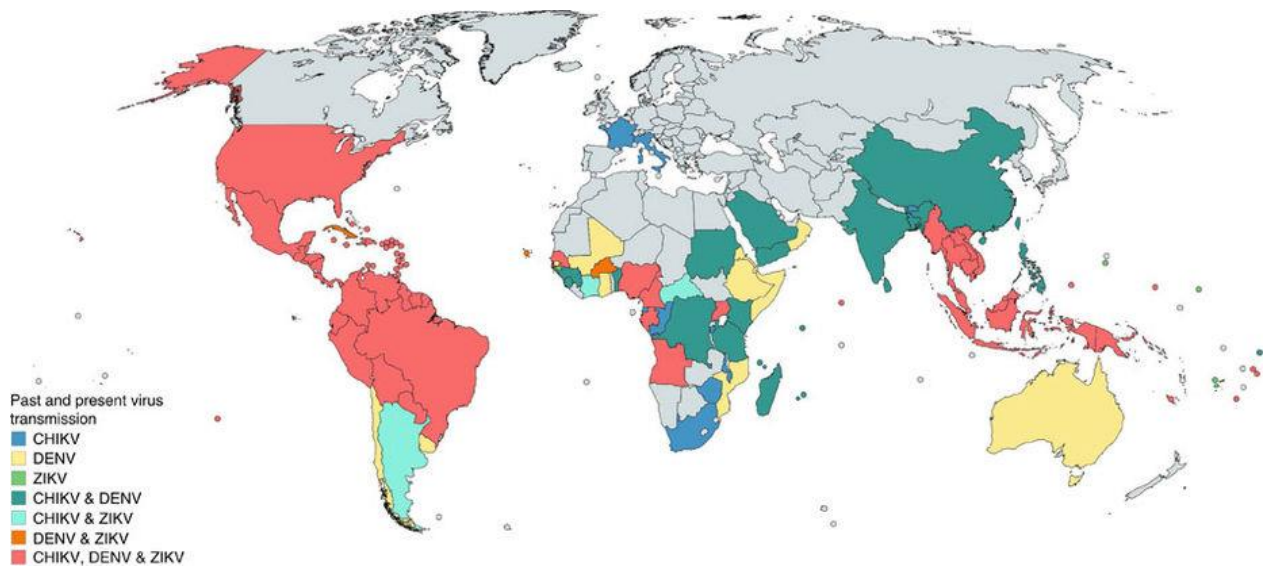


Figura 1. Cocirculação de DENV, ZIKV e CHIKV pelo mundo (Ruckert et al. 2017).

Concomitante à epidemia de Zika que se alastrou pelo território brasileiro em 2015, um grande número de casos de microcefalia em neonatos foi registrado em maternidades da região Nordeste (Teixeira et al. 2016). Especulações sobre a provável associação entre desordens fetais e infecções por ZIKV começaram a surgir, até que o Ministério da Saúde declarou a microcefalia como sendo de notificação compulsória. Em fevereiro de 2016, a Zika foi decretada pela OMS como doença de emergência para a saúde pública internacional. Até então não haviam indícios científicos concretos da sua ligação com outras complicações, embora a distribuição geográfica do vírus e dos casos de microcefalia coincidisse, dispersando-se do epicentro da região Nordeste até o Sul do país rapidamente (Lowe et al. 2018).

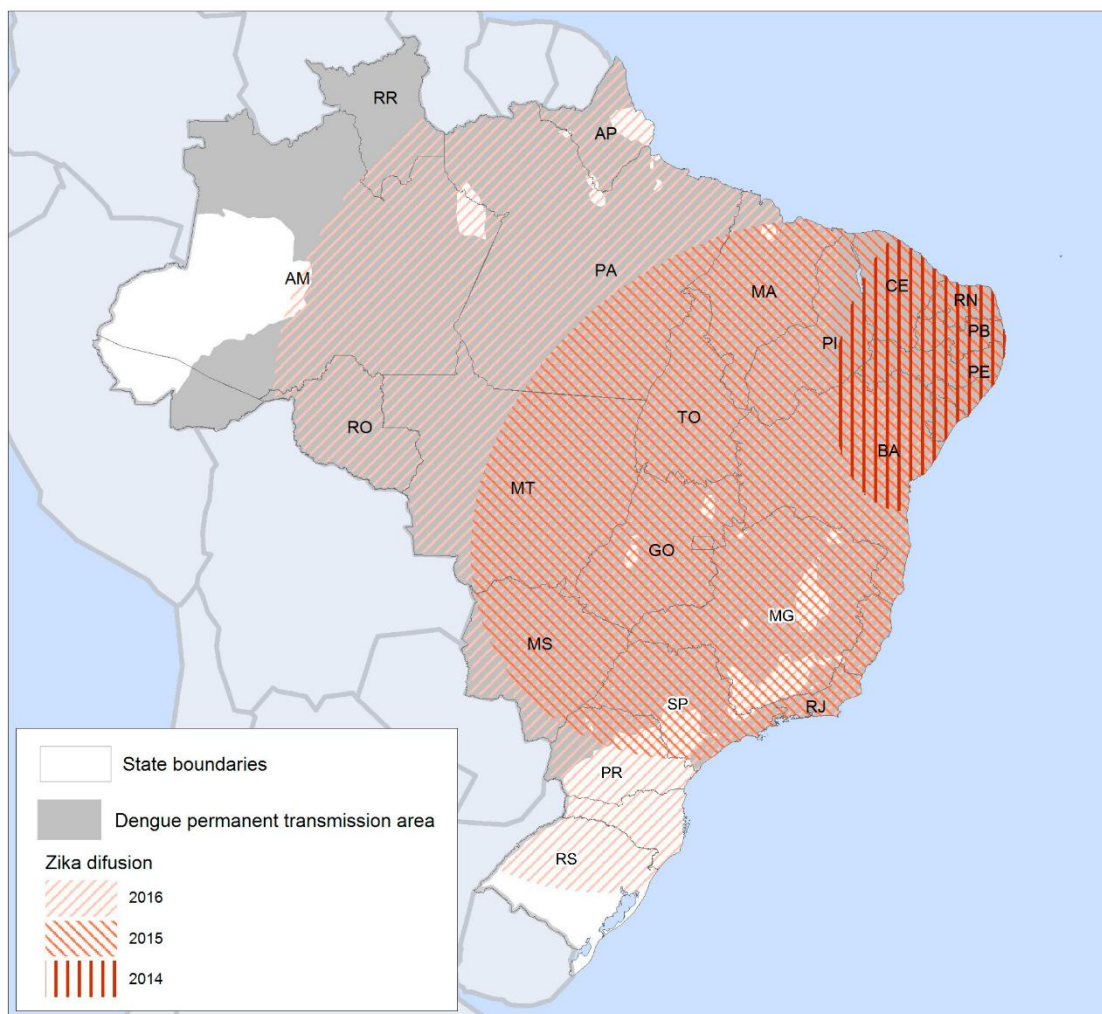


Figura 2. Distribuição espacial do vírus Zika pela extensão do território brasileiro entre 2014 e 2016 (Lowe et al. 2018).

As primeiras evidências que estimularam a associação entre a infecção por Zika com o aumento da incidência de microcefalia teve início com a detecção do vírus no líquido amniótico de mulheres grávidas, as quais os fetos apresentavam sinais de malformações no desenvolvimento cerebral (Mlakar et al. 2016). Além disso, a identificação da presença do ZIKV em tecidos cerebrais também corroborou a hipótese de associação entre as duas enfermidades (Mlakar et al. 2016). Maior certeza foi obtida através de dois trabalhos realizados no Brasil. Primeiro, num estudo de coorte com 42 mulheres grávidas, as quais

todas tinham sorologia positiva para ZIKV, 12 fetos manifestaram anormalidades congênitas, porém, em 16 mulheres negativas para a infecção, nenhum dos fetos apresentou desordens (Brasil et al. 2016). Outro estudo conduzido em Recife comprovou que, dentre 32 casos de microcefalia, em 41% houve a confirmação de infecção por ZIKV, enquanto que em 64 casos-controle nenhuma evidência da presença do vírus foi encontrada (Araújo et al. 2016). Surpreendentemente, em nenhum dos outros países que enfrentaram surtos de Zika foram detectados aumento expressivo nos casos de microcefalia ou outras malformações em neonatos. Algumas explicações plausíveis para este fato podem incluir fatores imunes do hospedeiro, ausência de diagnóstico e vigilância em áreas epidêmicas, bem como o surgimento de mutações adaptativas que propiciaram às linhagens de ZIKV a se tornarem mais neurovirulentas (Yuan et al. 2017).

1.3. Zika: Modos de transmissão

A via de transmissão primária do ZIKV se dá quando um mosquito permissivo do gênero *Aedes* realiza hematofagia em um hospedeiro em viremia. O ciclo pode ser de forma selvática, quando envolve primatas não humanos e mosquitos encontrados em regiões de floresta, assim como em sua forma urbana, ocorrendo entre mosquitos, principalmente *Ae. aegypti*, e humanos (Musso & Gubler et al. 2016). Assim como ocorre durante uma infecção por outros arbovírus, após a alimentação sanguínea, o vírus passa por sucessivas replicações no mosquito, disseminando-se pelo intestino médio, ovários, tecidos nervosos, músculos de voo e patas, até que por fim alcança a saliva, permitindo a transmissão (Epelboin et al. 2017). O primeiro registro do período de incubação extrínseco do ZIKV – intervalo de tempo que abrange o momento da infecção do

vetor, até a chegada do vírus na saliva – foi dado em 1956, onde Boorman e Porterfield detectaram o vírus no período de 15 dias após a infecção (Boorman & Porterfield et al. 1956). Dados mais recentes mostram que o PIE mínimo para o Zika é entre 7-10 dias, podendo variar conforme a temperatura, a população de *Ae. aegypti* desafiada, e linhagem viral utilizada (Roundy et al. 2017).

1.3.1. Transmissão vertical e venérea

A transmissão vertical ocorre entre os mosquitos quando uma fêmea propaga o vírus à sua prole, permitindo que parte dela nasça infectada. Um dos benefícios da transmissão vertical para os arbovírus é que em virtude desse mecanismo, eles podem permanecer na natureza mesmo quando as condições ambientais não são favoráveis. Outro aspecto importante acerca da transmissão vertical, é que o vírus se torna capaz de manter-se numa localidade, mesmo que parte dos hospedeiros vertebrados sejam refratários, tanto por imunização vacinal, ou por infecções prévias (Thangamani et al. 2016). Até o momento, tem sido evidenciado na literatura que determinados flavívirus inseto-específicos são mantidos na natureza exclusivamente devido à transmissão vertical (Bolling et al. 2015, Blitvich & Firth 2015).

Considerando o modelo ZIKV-*Aedes*, muitos estudos vêm demonstrando o potencial da transmissão vertical para a dispersão e manutenção do vírus. Ciota et al. (2017) mostrou que, para *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*, aproximadamente 1 a cada 84 larvas testadas apresentou positividade para o Zika. Além disso, outro traço observado nesse mesmo trabalho, foi que a taxa de transmissão tende a aumentar conforme o tempo/ciclo de oviposição, o que já havia sido documentado para outros vírus, como por exemplo o WNV. Outro

estudo mostrou resultados semelhantes, porém utilizando o método de infecção intratorácico, estimando-se uma taxa de positividade mínima para as larvas de 1: 290 (Thangamani et al. 2016).

Outra rota de transmissão que permite que o vírus seja amplificado entre uma população de mosquitos é a transmissão venérea. Este tipo de transmissão se dá quando um mosquito infectado, passa o vírus horizontalmente após o contato sexual. Alguns ensaios já relataram a capacidade de machos infectados a transmitirem arbovírus para as fêmeas durante a cópula, permitindo que o patógeno se propague nos oócitos em desenvolvimento (Thompson et al 1978, Tesh et al. 2016). Campos et al. (2017) concluiu através de ensaios de laboratório que mosquitos *Ae. aegypti* são igualmente aptos a transmitirem o ZIKV por inseminação. Os resultados obtidos comprovaram que, tanto machos inoculados com o Zika foram capazes de transmitir o vírus para as fêmeas, bem como fêmeas infectadas oralmente propagaram o ZIKV para machos após a cópula.

1.3.2. Transmissão não vetorial

Desde a emergência do vírus Zika, pressuposições envolvendo outras vias de transmissão começaram a ganhar espaço. Em 2008 um pesquisador residente dos Estados Unidos, ao retornar de um trabalho de campo no Senegal, apresentou sintomas de infecção por Zika. Dias depois, sua esposa, que não havia histórico de viagens recentes manifestou os mesmos sintomas, mostrando de forma inequívoca para a comunidade científica para o contágio sexual deste vírus (Foy et al. 2011). Ademais, em dezembro de 2013 durante a epidemia que circundou a Polinésia Francesa, um homem de 44 anos procurou um centro de

atendimento hospitalar, queixando-se de hematospermia. Após sucessivos exames, o RNA do vírus Zika foi identificado no sêmen e na urina através de RT-PCR, entretanto nenhuma partícula viral foi encontrada em amostras sanguíneas, o que sugere que a replicação estava restrita ao trato genital (Atkinson et al. 2016).

Além da transmissão sexual, também começaram a surgir relatos de transmissão materno-fetal, principalmente após os repetidos casos de microcefalia em neonatos. Esse tipo de contágio já foi descrito anteriormente para outros sistemas de flavivírus, como DENV (Tan et al. 2008; Basurko et al. 2009) e WNV (Stewart et al. 2013). Na Polinésia Francesa, dois casos de infecção perinatal por ZIKV foram reportados, com o RNA viral sendo isolado tanto do leite materno, quanto do soro dos bebês (Besnard et al. 2014). Durante a epidemia no Brasil, o vírus também foi detectado no líquido amniótico de mulheres grávidas, as quais os bebês apresentaram sinais de malformação cerebral, esses relatos apontaram para a via de contágio transplacentária (Calvet et al. 2016).

Outro modo de transmissão seria através de transfusões sanguíneas. Uma vez que ocorrências já foram documentadas para DENV, WNV e outras arboviroses, as autoridades de saúde implementaram protocolos visando precaver que doadores de sangue positivos para Zika viessem a transmitir o patógeno. Apesar das medidas de segurança, em dezembro de 2015 o primeiro caso relatado de transmissão através da via de transfusão foi reportado no Brasil (Musso & Gubler et al. 2016). Indubitavelmente, o fato do vírus Zika ser capaz de ser transmitido de tão diferentes maneiras acentua a complexidade de se propor mecanismos com o intuito de mitigar o número de casos desta arbovirose.

1.4. O vetor

Denomina-se de vetor o agente biológico capaz de carregar e transmitir um patógeno entre hospedeiros, ambientes ou mesmo paisagens (Wilson et al. 2017). Historicamente, tem sido observado que os vetores primários do vírus Zika são mosquitos pertencentes ao gênero *Aedes*. Como visto previamente, os primeiros isolados do vírus foram obtidos de mosquitos *Aedes (Stegomyia) africanus*, na Uganda (Hadow et al. 1964) e em *Aedes aegypti* na Península da Malásia (Marchette et al. 1969). Nas Américas, o ciclo de transmissão está relacionado majoritariamente à distribuição de duas espécies de mosquitos – *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* –, que têm demonstrado grande competência em ensaios controlados de transmissão em laboratório, sendo este primeiro considerado o vetor primário no Brasil (Li et al. 2012, Chouin-Carneiro et al. 2016, Bordi et al. 2017). Recentemente, novos relatos têm sido reportados acerca da participação dos mosquitos do gênero *Culex* no ciclo de transmissão do ZIKV (Elizondo-Quiroga et al. 2018). No entanto, a relevância dessa espécie como vetor natural do ZIKV tem sido motivo de intenso debate na comunidade acadêmica e será melhor abordado em itens subsequentes. Adicionalmente, considerando que os perfis de susceptibilidade parecem apresentar variações intraespecíficas, mais cuidado deve ser dado ao apontamento de qual(is) espécies devem ser apontadas como vetores naturais (Elizondo-Quiroga et al. 2018).

1.4.1. *Aedes aegypti*

O *Aedes aegypti* é uma espécie invasora no Brasil, oriunda do Velho Mundo, tendo sido primeiramente descrita na África. Especula-se que a introdução desse mosquito no Brasil tenha acontecido no período colonial, com

a migração forçada de escravos africanos durante o advento do tráfico negreiro (Consoli e Lourenço-de-Oliveira, 1994). Desde sua chegada, o *Ae. aegypti* tem sido alvo de medidas de controle, principalmente devido ao seu papel na transmissão de outras arboviroses, como por exemplo a febre amarela urbana (Lowy, 1990). Cabe aqui ressaltar que uma intensa campanha de controle do *Aedes aegypti*, de abrangência continental, foi executada no início do século XX em função do papel deste mosquito como vetor do ciclo urbano da febre amarela. O Rio de Janeiro, naquela época, era visto como uma cidade portuária amaldiçoada devido à alta letalidade dos marinheiros que desembarcavam em seus domínios (Lowy, 1990). Essa campanha de controle foi capitaneada inicialmente pelo próprio Oswaldo Cruz e, posteriormente, pela OPAS e pela Fundação Rockefeller (Braga & Valle, 2007). Em 1955, foi considerado erradicado, porém, países vizinhos onde o vetor estava presente contribuíram para a reintrodução do mosquito no território brasileiro em meados dos anos 60 (Consoli e Lourenço-de-Oliveira, 1994). Apesar de todos os esforços que levaram o *Ae. aegypti* a ser erradicado, não é sabido ao certo se o mosquito apenas esteve numa densidade baixa a ponto de não ser possível sua detecção em 1950 (Bracco, 2007). Atualmente, o *Ae. aegypti* tem ampla distribuição nos trópicos e subtropicais, com alta infestação temporal e espacial em todas as Unidades Federativas do Brasil (Kraemer et al. 2015).

Visualmente, o *Ae. aegypti* apresenta corpo enegrecido, com escamas de coloração clara, e um escudo ornamentado com a presença de estruturas prateadas, que formam um desenho de lira, permitindo a identificação dicotômica da espécie (Consoli & Lourenço et al. 1994). No geral, é um mosquito de hábito diurno, altamente antropofílico e endofílico, com grande preferência pelo

hospedeiro humano (Scott et al. 1993). As fêmeas frequentemente apresentam discordância gonotrófica, ou seja, realizam múltiplas alimentações sanguíneas por ciclo gonotrófico, comportamento que pode aumentar sua importância como um vetor de arbovírus caso esses repastos sejam realizados em diferentes hospedeiros (Lima-Camara et al. 2006; Braks et al. 2013).

Os criadouros preferenciais do *Ae. aegypti* são reservatórios artificiais, tais como pneus, latas, piscinas, e recipientes diversos onde é possível acumular água limpa, sem que haja o excesso de matéria orgânica (Consoli & Lourenço et al. 1994, Maciel-de-Freitas et al. 2007). Os ovos depositados nos criadouros têm uma propriedade comum a muitos Aedini, que se trata da resistência à dessecação. Essa característica promove vantagem competitiva, uma vez que os ovos podem permanecer em latência até uma nova estação pluvial, o que reforça a importância do *Ae. aegypti* na manutenção de determinados arbovírus na natureza, em especial aqueles com possibilidade de serem transmitidos verticalmente, da fêmea para ao menos parte da prole (Consoli & Lourenço et al. 1994; Honorio et al. 2009)

Os mosquitos são insetos holometábolos, possuem um ciclo de vida complexo o qual alberga sucessivas alterações morfológicas. Após entrar em contato com água por cerca de 30 minutos, se dá a eclosão do ovo. Posteriormente, as larvas se desenvolvem por quatro estádios larvares, cuja duração está estimada entre 8-12 dias a depender de condições bióticas e abióticas, em especial disponibilidade de recursos e temperatura (CDC, Mosquito Life-Cycle [Acessado: 12 de janeiro, 2018]). No período de larva, a presença do aparelho bucal mastigador facilita a raspagem de nutrientes e substratos aderidos nas paredes do reservatório ou mesmo na superfície da

água (Consoli & Lourenço et al. 1994). Após atingir determinado nível de reserva energética, inicia-se a fase de metamorfose, onde ocorre o surgimento da pupa. As pupas se caracterizam por não realizarem alimentação e estão quase sempre inertes na água. Após várias alterações fisiológicas e anatômicas, enfim há a emergência dos adultos alados que alcançam o ambiente terrestre (CDC, Mosquito Life-Cycle [Acessado: 12 de janeiro, 2018]). Na fase adulta, a alimentação de machos e fêmeas distingue-se uma da outra. As fêmeas são hematófagas, de forma a estarem aptas para obter os recursos necessários no processo de maturação dos ovários e embriogênese dos ovos (Lea et al. 1956). Os machos, por sua vez, são estritamente fitófagos, provendo-se de energia através de fontes vegetais e carboidratos, encontrados majoritariamente em seivas, flores e frutos (Consoli & Lourenço et al. 1994). Uma vez que não realizam alimentação sanguínea, a sua capacidade vetorial é nula.

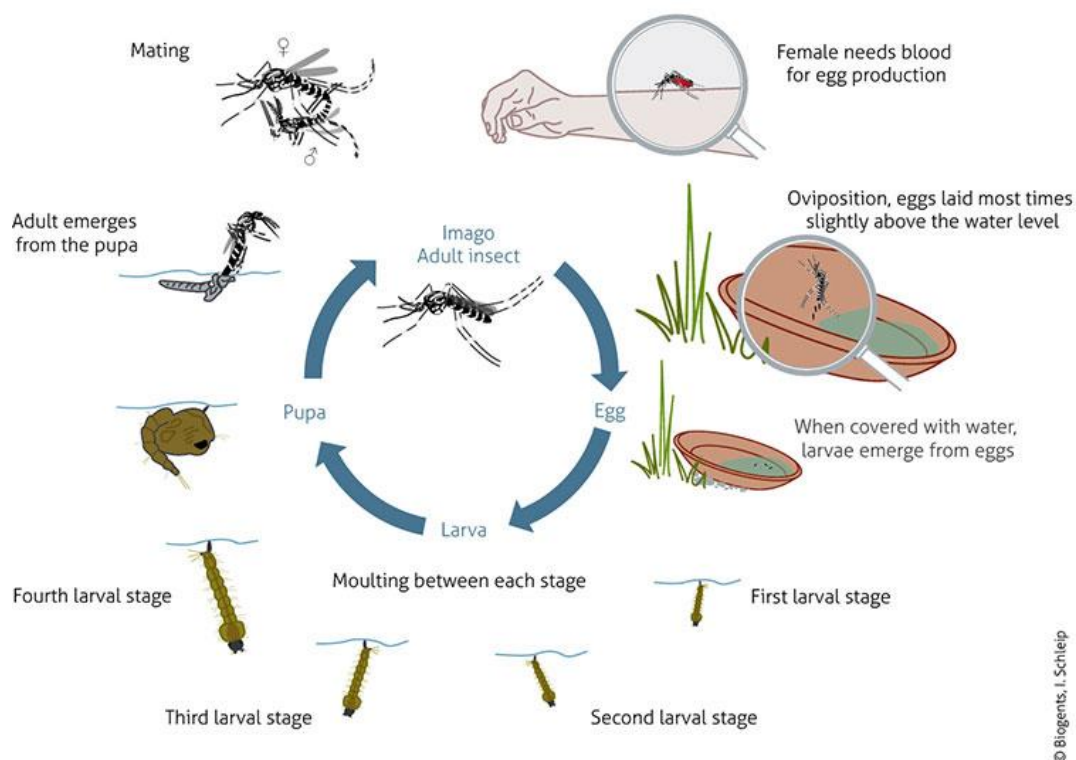


Figura 3. Ciclo de vida de mosquitos *Aedes aegypti* (Disponível em: <https://www.biogents.com/aedes-aegypti-yellow-fever-mosquitoes/>).

1.5. Capacidade vetorial

Para um melhor entendimento dos mecanismos que envolvem a transmissão de determinado patógeno, é importante considerar a definição da capacidade vetorial. Originalmente projetada para o sistema malária/*Anopheles*, essa dinâmica foi sobrepujada para inúmeras doenças transmitidas por vetores como modelo clássico entomológico (Dye 1986, 1990). Desenvolvido por Ross-MacDonald no século XX, o principal objetivo da CV é determinar o R_0 da malária, que consiste na taxa de reprodução básica. No geral, designa-se como capacidade vetorial, o número de picadas infectantes ocasionadas através de um único mosquito infectado. Em suma, podemos compreender tal conceito como a habilidade do vetor em transmitir determinado patógeno (Garret-Jones,

1964). A fórmula da capacidade vetorial pode ser representada pela seguinte razão:

$$CV = \frac{mbca^2 P^n}{-\ln(P)}$$

Com isso, compreende-se que a capacidade vetorial é constituída por variáveis que determinam a taxa de transmissão de um parasito. Sendo a representado pelo número de picadas por ser humano por dia; b é a probabilidade do mosquito infectado transmitir o parasito ao picar um hospedeiro humano susceptível; c é a probabilidade do mosquito ser infectado com o parasito ao realizar o repasto sanguíneo num hospedeiro humano portador da infecção; m é o número de fêmeas de mosquitos por pessoa; n é a duração do período de incubação extrínseco do patógeno, e P é o índice de sobrevivência diária do mosquito.

1.6. *Aedes aegypti* x ZIKV

Uma espécie de mosquito só pode ser dada como vetor efetivo, uma vez que sua capacidade vetorial seja comprovada através de ensaios de infecção em laboratório. Em suma, a habilidade de um mosquito transmitir determinado patógeno, envolve diferentes elementos, os quais englobam população do vetor, linhagem do vírus, fatores ambientais – flutuações de temperatura, pluviosidade –, dentre outros (Lowe et al. 2018). O primeiro experimento realizado o qual comprovou a capacidade vetorial do *Ae. aegypti* na transmissão do ZIKV se deu em 1956 pelos pesquisadores Boorman e Porterfield. Durante esse estudo, colônias de mosquitos de laboratório foram alimentadas com proporções iguais de suspensão viral isolada do cérebro de camundongos, e sangue. Os mosquitos

foram monitorados diariamente, e experimentos adicionais de transmissão foram realizados utilizando macacos *Rhesus*. No final de 15 dias após a infecção, foi finalmente detectada a presença do vírus no tecido dos mosquitos, o que estabeleceu o período de incubação extrínseco do Zika (Boorman & Porterfield, 1956).

No Brasil, a ocorrência de infecção natural entre mosquitos *Ae. aegypti* e o ZIKV foi recentemente detectada, o que reforçou o estabelecimento desta espécie como vetor primário no país (Ferreira-de-Brito et al. 2016). Além disso, ensaios de laboratório mostraram um padrão de susceptibilidade elevado, com uma taxa de transmissão significativa quando mosquitos são infectados com vírus simpátricos (Dutra et al. 2016, Fernandes et al. 2016). A competência do ZIKV também mostrou estar relacionada com o pareamento específico entre a população de mosquitos e o genótipo do vírus (interações G x G), uma vez que os mosquitos brasileiros desafiados com vírus isolados na Nova Caledônia apresentaram baixa competência vetorial (Chouin-Carneiro et al. 2016). Esses achados sugerem adaptação local entre arbovírus e mosquitos, e destacam disparidades na eficiência de transmissão em experimentos que utilizam populações de vírus e mosquito geograficamente isoladas.

1.7. *Culex* spp x ZIKV

Durante a epidemia de Zika ocorrida no Brasil, muitas especulações surgiram sobre o papel de outras espécies de mosquito na transmissão do vírus. Análises comparativas das sequências estruturais, e da proteína de envelope do ZIKV revelaram um arranjo similar à de outros flavivírus neurovirulentos, como o WNV e os JEVs, os quais o *Culex quinquefasciatus* é um vetor em potencial

(Kostyuchenko et al. 2016). Prontamente mosquitos do gênero *Culex* começaram a ser cotados como vetores efetivos de Zika. No entanto, ensaios que buscavam avaliar a capacidade vetorial desta espécie para o zika obtiveram resultados conflituosos. Em 2016, um estudo realizado na China, Guo et al. (2016) mostrou que fêmeas de *Cx. quinquefasciatus* eram capazes de transmitir o ZIKV após completar um PIE de 8 dias, onde observaram 80% das salivas com a presença do vírus. Tais achados vão de acordo com outros trabalhos realizados na China, que revelaram desfechos similares (Song et al. 2016, Fu et al. 2017). Mais recentemente, novos resultados comprovaram a habilidade do *Culex* como vetor do ZIKV, dentre estes, inclui-se dados de coleta de mosquitos de campo naturalmente infectados em Recife, Brasil (Guedes et al. 2017). Além disso, mosquitos experimentalmente infectados exibiram o vírus nas glândulas salivares, e posteriormente, através de cartões FTA, foi constatada a presença de partículas infectantes na saliva (Guedes et al. 2017). Ainda em 2017, mosquitos de várias espécies, incluindo *Cx. quinquefasciatus*, *Cx. coronator* e *Cx. tarsalis*, foram capturados em campo, no México, e tiveram o ZIKV isolado da glândula salivar em cultura de célula (Elizondo-Quiroga et al. 2018).

Embora as informações previamente citadas parecem fornecer evidências sobre o papel do *Culex* como vetor, muitos outros estudos contradizem esses autores e mostram resultados opostos. Em 2016, quatro populações de *Cx. quinquefasciatus* do Rio de Janeiro foram desafiadas com linhagens locais do ZIKV, e mostraram dados de competência divergentes aos de Guo et al. (2016), indicando que esses mosquitos não eram capazes de transmitir o vírus (Fernandes et al. 2016). De forma análoga, muitos outros trabalhos têm mostrado a refratariedade de *Cx. quinquefasciatus* do Brasil e de outras

localidades do mundo, o que mantém ainda desconhecido o papel destes mosquitos no ciclo de transmissão do Zika (Amraoui et al. 2016, Duchemin et al. 2017, Fernandes et al. 2017, Hart et al. 2017). No geral, sugere-se que as diferenças na habilidade do *Culex* spp em transmitir o ZIKV estejam, sobretudo, relacionadas à variabilidade genética intraespecífica das populações de vetor (Elizondo-Quiroga et al. 2018).

1.8. Interação parasito- vetor

Os arbovírus são parasitos intracelulares obrigatórios, e uma vez que infectam um artrópode suscetível, devem se estabelecer e serem capazes de replicar-se em diversos tecidos de modo que seja possível a transmissão pelas vias horizontal e/ou vertical (Leake, 1992). No geral, especula-se que o modelo simbiótico ideal para arbovírus e mosquitos esteja relacionado à coevolução em direção ao mutualismo – associação pela qual ambos os organismos envolvidos são beneficiados – (Kenney & Brault, 2014). Apesar desse pressuposto, muitos estudos têm mostrado uma variedade de alterações fenotípicas que um parasito pode causar no vetor que o alberga.

No hospedeiro, as alterações de fenótipo em resposta à infecção podem ser de natureza comportamental, morfológica e/ou fisiológica, variando de magnitude de acordo com o modelo estudado (Poulin & Thomas, 1999). No geral, alguns aspectos como sobrevivência, fecundidade e comportamento alimentar podem ser alterados com a presença do vírus. Como por exemplo, tem sido observado que mosquitos *An. stephensi* e *An. gambiae* apresentam um custo na oviposição após submetidos à infecção pelo *Plasmodium yoelii nigeriensis* (Hogg & Hurd, 1995; Jahan & Hurd 1998). Considerando o modelo

de flavivírus e *Ae. aegypti*, Maciel-de-Freitas et al. (2011) e Sylvestre et al. (2013) demonstraram que mosquitos expostos ao DENV-2 apresentavam comprometimento da fecundidade, com variações no número de ovos depositados ao longo da vida dos mosquitos.

Em 1997, Platt et al. relatou que *Ae. aegypti* infectados com DENV demandavam uma alimentação sanguínea mais demorada, e um maior tempo de prova. Mudanças de comportamento alimentar também foram observadas em *Ae. triseriatus* e *Ae. albopictus* infectados. Ao expor ambas as espécies ao vírus La Crosse (LAAC) foi visto que os mosquitos tratados exibiram uma redução na ingestão de sangue, porém, não alterando a procura por uma realimentação (Jackson et al.2012). Mais tarde, resultados similares foram verificados em *Ae. aegypti* desafiados com DENV-2. Quando comparados ao grupo controle, os mosquitos infectados exibiram motivação alimentar reduzida, no entanto, apresentaram um acréscimo na avidez (Maciel-de-Freitas et al. 2013). É importante ressaltar, que essas mudanças na biologia do vetor podem refletir diretamente na CV, aumentando ou reduzindo a eficiência de transmissão de um determinado patógeno.

2. Justificativa:

Pouco é compreendido a respeito dos mecanismos que contribuíram para o surto explosivo, e para a rápida propagação do ZIKV nas Américas. No entanto, assim como o ocorrido com o CHIKV, pressupõe-se que variáveis relacionadas a fatores virais e possíveis adaptações favoráveis à transmissão tenham facilitado, em parte, a disseminação do vírus (Tsetsarkin, 2011). Estudos recentes baseados em ensaios de competência vetorial utilizando uma cepa viral proveniente da Nova Caledônia, demonstraram baixa competência de *Ae. aegypti* de diferentes regiões do Brasil ao ZIKV (Chouin-Carneiro et al. 2016). Também foi visto que a cepa circulante nas Américas não se replica de forma mais eficiente e tem aptidão competitiva reduzida se comparada a outras linhagens (Weger-Lucarelli, 2016).

É sabido que o processo de infecção por outros flavivírus confere alterações em variáveis relacionadas ao fitness do inseto, interferindo por fim na capacidade vetorial, e na dinâmica de transmissão do vírus para hospedeiros suscetíveis. Muitos aspectos vêm sendo estudados a respeito da competência vetorial de populações de mosquito ao ZIKV, o que leva à necessidade de sobrepujar os resultados para uma análise que englobe também dados de custo da infecção na biologia do vetor. Esses dados fornecem respaldo para melhor compreender implicações que podem vir a alterar a dinâmica de transmissão do Zika.

Visto isso, nesse trabalho, fêmeas de *Aedes aegypti* de diferentes localidades do Rio de Janeiro foram desafiadas com vírus Zika isolado do mesmo estado, de forma a garantir resultados que não tenham interferência alopátrica na associação entre genótipos. Além disso, buscamos avaliar aspectos que vêm

sendo pouco analisados na literatura, tais como: sobrevivência diária de mosquitos infectados e não-infectados por ZIKV, sucesso de oviposição e fecundidade por ciclo gonotrófico. De forma complementar, também foi observado o efeito de uma superinfecção ao expor fêmeas infectadas a uma nova alimentação contendo o vírus zika, posto que, em um cenário de epidemias, uma fêmea de *Ae. aegypti* já infectada pode vir a realizar outro repasto sanguíneo infectivo, ingerindo novas partículas virais.

3. Objetivos

Avaliar parâmetros da biologia do *Aedes aegypti* que podem ser alterados após uma infecção e superinfecção com o vírus Zika.

3.1. Objetivos específicos

- Analisar o impacto do vírus Zika na sobrevivência de fêmeas de *Ae. aegypti* infectadas.

- Verificar o sucesso de oviposição e gerar dados de fecundidade por cada ciclo gonotrófico.

- Investigar os efeitos de uma segunda exposição ao vírus – superinfecção – no fenótipo de oviposição e sobrevivência dos mosquitos desafiados.

- Diferenciar a resposta de populações distintas quanto à susceptibilidade ao vírus.

- Determinar infecção e disseminação, analisando corpo, cabeça e glândula salivar dos mosquitos, e correlacionar esses dados com possíveis custos observados.

4. Resultados

Os resultados a seguir foram publicados em dezembro de 2018 na revista *Frontiers in Microbiology*, como um artigo científico.

Zika Virus infection produces a Reduction on *Aedes aegypti* Lifespan but No Effects on Mosquito Fecundity and Oviposition Success

Isabella D da Silveira¹, Martha T Petersen¹, Gabriel Sylvestre¹, Gabriela A Garcia¹, Mariana Rocha David¹, Márcio G Pavan^{1,2} and Rafael Maciel-de-Freitas^{1,2*}

¹ Laboratório de Mosquitos Transmissores de Hematozoários, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Avenida Brasil 4365, Rio de Janeiro, RJ, Brazil, 21040-360.

² Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, 21941-590.

*Corresponding author: Rafael Maciel-de-Freitas (freitas@ioc.fiocruz.br)

Abstract

A Zika virus (ZIKV) pandemic started soon after the first autochthonous cases in Latin America. Although *Aedes aegypti* is pointed as the primary vector in Latin America, little is known about the fitness cost due to ZIKV infection. We investigated the effects of ZIKV infection on the life-history traits of *Ae. aegypti* females collected in three districts of Rio de Janeiro, Brazil (Barra, Deodoro, and Porto), equidistant ~25 km each other. *Aedes aegypti* mosquitoes were classified into infected (a single oral challenge with ZIKV) and superinfected (two ZIKV-infected blood meals spaced by 7 days each other). ZIKV infection reduced *Ae. aegypti* survival in two of the three populations tested, and superinfection produced a sharper increase in mortality in one of those populations. We hypothesized higher mortality with the presence of more ZIKV copies in *Ae. aegypti* females from Porto. The number of eggs laid per clutch was statistically similar between vector populations and infected and uninfected mosquitoes. Infection by ZIKV not affected female oviposition success. ZIKV infection impacted *Ae. aegypti* vectorial capacity by reducing its lifespan, although female fecundity remained unaltered. The outcome of these findings to disease transmission intensity still needs further evaluation

Introduction

Aedes aegypti (Diptera: Culicidae) is known as the primary vector of dengue virus (DENV) and chikungunya virus (CHIKV) and was also found recently to be naturally infected with Zika virus (ZIKV), which reinforces the paramount role of this species in arthropod-borne virus transmission (Ferreira-de-Brito et al., 2016; Patterson et al., 2016). The emergence of an arbovirus followed by an outbreak depends upon several factors such as high density of primary vectors, efficient viral replication, and infectivity in vertebrate and invertebrate hosts and the presence of immunologically naïve hosts (Liu-Helmersson et al., 2014). For instance, recent studies concerning virus infectivity demonstrated that a single amino acid substitution in the NS1 gene improved the efficiency of ZIKV transmission from humans to *Ae. aegypti* and thus increasing its prevalence in mosquitoes (Liu et al., 2017; Rossi et al., 2018).

ated to the interaction between the genetic backgrounds of insect vectors and virus strains, which may influence vectorial capacity and transmission rates (Weaver and Reisen, 2010). For instance, Brazilian mosquitoes challenged with a ZIKV strain isolated from a patient in New Caledonia exhibited low vector competence (Chouin-Carneiro et al., 2016) but showed high susceptibility when infected with local ZIKV strains (Dutra et al., 2016; Fernandes et al., 2016). Therefore, it is of utmost relevance to investigate the interaction between mosquito vectors and locally isolated virus strains to provide a more realistic dataset.

The biology and behavior of infected mosquitoes have been little explored, although it is an important aspect of vector-borne diseases. Transmission models and the vectorial capacity formula often overlook that arbovirus infections may

alter the behavior and/or pose a fitness cost in life-history traits of mosquitoes and thus affect transmission [cf. Kramer and Ciota (2015) for a comprehensive discussion about this topic]. There is a series of experimental data regarding *Plasmodium* and *Anopheles* mosquitoes that could be interpreted as host behavior manipulation by the parasite to enhance its transmission (Rossignol et al., 1986; Koella et al., 1998; Schwartz and Koella, 2001; Robinson et al., 2018). However, very limited information is available regarding the biology of *Aedes* mosquitoes infected with arboviruses. A few reports have demonstrated that DENV and ZIKV are capable to alter the expression of genes potentially involved in host-seeking behavior, especially odorant-binding protein transcripts (Sim et al., 2012; Etebari et al., 2017). The first two evidences of arbovirus impact on *Ae. aegypti* biting rate came from the 1990s, but produced conflicting results. First, there was no evidence of alteration in the biting behavior of *Ae. aegypti* after intrathoracic inoculation of DENV-2 (Putnam and Scott, 1995). Later, it was observed that dengue-infected mosquitoes required more time to feed on blood than uninfected ones (Platt et al., 1997). More recently, some papers reported a negative effect of DENV-2 on *Ae. aegypti* life-history traits, such as reduced lifespan and fecundity, and also an increase in the time to complete a blood meal (Maciel-de-Freitas et al., 2011, 2013; Sylvestre et al., 2013).

Even though negative effects were revealed for dengue virus, little is known about the potential cost of ZIKV infection in vector biology. The recent ZIKV emergence and its explosive outbreak across the Pacific and Latin America caused thousands of cases in cities such as Rio de Janeiro. Therefore, it sounds reasonable to speculate that, occasionally, susceptible mosquitoes are likely to blood feed more than once in ZIKV-infected hosts during the course of an

outbreak. Beyond that, opportunities for arboviral exposure in mosquitoes already infected are considerable, since the viral infection persists throughout the insect life. This phenomenon is known as superinfection (Salas-Benito and De Nova-Ocampo, 2015). Considering adult *Ae. aegypti* females have a lifespan of 15–30 days measured by mark, release, recapture studies (Maciel-De-Freitas et al., 2007; Maciel-de-Freitas et al., 2008; David et al., 2009; Maciel-de-Freitas and Lourenço-de-Oliveira, 2009), the likelihood of ingesting blood from two infected hosts during its lifespan and its effects on mosquito-virus interactions has been receiving little attention. The present study aims to investigate the susceptibility of three field *Ae. aegypti* populations to ZIKV, and the infection effects on its life-history traits after mosquitoes were exposed to a single or two ZIKV-infected blood meals.

Materials and Methods

Mosquitoes. Eggs were collected through 80 ovitraps (Fay and Eliason, 1966) placed roughly every 25 m each other in each of three different regions in Rio de Janeiro—Barra (22°58'77" S, 43°23'41" W), Deodoro (22°51'01" S, 43°23'52" W), and Porto (22°53'43" S, 43°11'03" W), distant 15–25 km from each other. Ovitrap were installed over an extensive geographic area to assure we sampled the local *Ae. aegypti* genetic variability. *Ae. aegypti* females are considered a limited flyer with mean distance traveled inferior to 200 m (Maciel-De-Freitas et al., 2007), and thus, it is highly unlikely that a single mosquito would cross all field sites analyzed here. A minimum of 500 eggs were collected per site and were hatched in the insectary. Adults were maintained at the insectary under a relative humidity of $80 \pm 5\%$ and a temperature of $25 \pm 3^\circ\text{C}$, with *ad libitum*

access to a 10% sucrose solution. Experiments were performed with F1 generation mosquitoes. A second collection of eggs was done 5–6 months later using the same protocol, and immature mosquitoes were reared to adults to perform a second experimental infection to evaluate the effect of ZIV on *Ae. aegypti* life-history traits.

Viral Strain. Females were orally challenged with a ZIKV strain isolated from the urine of a patient in Rio de Janeiro. The ZIKV strain belongs to the Asian genotype Rio-U1 (GenBank accession number KU926309) and showed to have high infectivity to Rio *Ae. aegypti* mosquito populations (Fernandes et al., 2016). Viral titers in supernatants were previously determined by serial dilutions in Vero cells, expressed in plaque-forming unit per milliliters (PFU/ml). All the assays were performed with samples containing 3.55×10^6 PFU/ml. Viral stocks were maintained at -80°C until its use.

Oral infection with ZIKV. Two rounds of experimental infection assays were conducted, using the same protocol for mosquito superinfection. Thirty-six hours before infection, 6–7 days old inseminated *Ae. aegypti* females from each of the three populations (Barra, Deodoro, and Porto) were separated in 18 cylindrical plastic cages (70 mosquitoes/cage) for blood feeding. Sugar supply was removed 36-h before mosquitoes were challenged with the infective blood meal to increase female's avidity. The oral infection procedures were performed through a membrane feeding system (Hemotek, Great Harwood, UK), adapted with a pig-gut covering, which gives access to the defibrinated rabbit blood. The infective blood meals consisted of 1 ml of supernatant of infected cell culture, 2

ml of washed rabbit erythrocytes, and 0.5 mM of ATP as phagostimulant. The same procedure and membrane feeding apparatus were used to feed control mosquitoes, but they received a noninfectious blood meal, with 1 ml of cell culture medium replacing the viral supernatant.

Oral superinfection with ZIKV. The explosive emergence of ZIKV across the Pacific and Latin America caused thousands of cases in cities such as Rio de Janeiro. Therefore, it is feasible that mosquitoes may feed more than once on ZIKV-infected hosts during their lifespan. Herein, we simulated *Ae. aegypti* superinfection with ZIKV by offering a second infective blood meal to a fraction of the infected mosquitoes. Seven days after the first oral infection (minimum extrinsic incubation period expected for ZIKV) (Roundy et al., 2017), mosquitoes from Deodoro and Porto populations were challenged with a new infective blood meal, using the same viral strain at the same titration (herein called “superinfection”). The other groups (control and infected) received a blood meal without the virus. *Aedes aegypti* individuals from Barra were not included in this procedure, since there were not sufficient egg stocks.

Experimental Design. Those females that were visually completely engorged after oral infection assays were individualized in cylindrical plastic tubes (a height of 6.5 cm and a diameter of 3 cm) containing moistened cotton overlaid with filter paper as oviposition substrate on the bottom. Tubes were covered on the top with mosquito netting. Once a week, we offered uninfected anesthetized mice to mosquitoes to all groups as blood source. Filter papers were checked for eggs, and those were counted every third day after a blood meal,

when a new filter paper was added. Mosquito survival was checked daily at 09:00 h. Each dead mosquito was removed from the plastic tube, and wing length was measured as the distance from the axillary incision to the apical margin, excluding the fringe (Harbach and Knight, 1980).

Infected mosquitoes were kept in an incubator under an artificial photoperiodic regime of 12 h of light and 12 h of dark, with 10% sucrose solution. Temperature was maintained at 28°C, with a relative humidity of 70–80% throughout the course of experiment.

Vector competence of Field populations. In total, 3–10 mosquitoes from each population were sampled at 7 and 14 days postinfection (dpi) and on 7 days post superinfection (dpsi) to check for infection. For that, bodies and heads of 45 sampled individuals were separated before the RNA extraction procedure to assess ZIKV infection and dissemination, respectively. The 44 selected mosquitoes belonged to all three populations: Barra ($n = 3$), Porto ($n = 22$), and Deodoro ($n = 20$), from infected ($n = 24$) and superinfected ($n = 20$) groups.

Viral Quantification. Total RNA was extracted from mosquitoes with the QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Viral RNA detection and quantification were performed individually through RT-qPCR with SuperScript™ III Platinum™ One-Step qRT-PCR Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) in QuantStudio 6 Flex Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Each reaction was made with 600 nM forward primer (5'-CTTGGAGTGCTTGTGATT-3', genome position 3451–3468), 600 nM reverse primer (5'-CTCCTCCAGTGTTTCATTT-3', genome position 3637–3620), and 800

nM probe (5'FAM-AGAAG AGAATGACCACAAAGATCA-3'TAMRA, genome position 3494–3517), previously published (Ferreira-de-Brito et al., 2016). Cycling conditions were as follows: 95°C for 2 minutes, followed by 40 amplification cycles of 95°C for 15 s, 58°C for 5 s, and 60°C for 30 s. Virus copy numbers were calculated by interpolation onto an internal standard curve made up of a seven-point dilution series (10²–10⁸ copies/ml) of *in vitro* transcribed ZIKV RNA (Bonaldo et al., 2016).

Statistical Analysis. Mosquitoes from the two experimental infection assays were analyzed as belonging to three treatments: controls, which did not feed on ZIKV infectious blood; infected, which received one single infected blood meal on 6–7 days old; and superinfected, which received an additional infected blood meal on 13–14 days old.

The association among survival and ZIKV infection, population and wing length was analyzed using Cox proportional hazard regression models to obtain hazard ratios and 95% confidence intervals. First, we computed separate univariate Cox regression analyses with population (Barra, Deodoro, and Porto), treatment (control, infected, and superinfected), and wing length as covariates. Only statistically significant variables according to Wald statistic values were included in the multivariate Cox model. Kaplan-Meier (KM) survival curves were created to each mosquito population according to the different treatments (control, infected, or superinfected). We performed log-rank tests to address the global effects of treatment in each mosquito population. If significant, we confronted infected and superinfected against controls. Significance level was

adjusted for multiple comparisons with the Bonferroni criteria. Those analyses were performed in the R environment (R Development Core Team, 2011).

Fecundity was analyzed by considering the first four clutches of eggs laid, as only a small number of females laid eggs when they were more than 4 weeks old, precluding adequate numbers for analysis. We considered two aspects of fecundity: 1) oviposition success: the likelihood of laying at least one egg (at a given clutch) with a logistic analysis that included treatment, population, wing length and clutch number (i.e., age); and 2) fecundity: the egg number of the successful mosquitoes with a repeated analysis. We included clutch number as the repeat and estimated the effects of treatment, wing length and population. These analyses were carried out with the statistical software JMP v. 13.0 (SAS Institute Inc., 2007).

The abundance of RNA ZIKV was not normally distributed (Shapiro-Wilk $W = 0.4560$, $p < 0.001$) and, therefore, the three treatments were compared through Wilcoxon-Mann-Whitney tests in the R environment (R Development Core Team, 2011). Significance level was adjusted for multiple comparisons with the false discovery rate (FDR) method (Benjamini and Yekutieli, 2001). The effect size of comparisons (r) was performed with Cohen's d calculations (Cohen, 1988).

Results

Oral infection and superinfection. A total of 767 *Ae. aegypti* F1 females from three districts of Rio de Janeiro (Barra, Deodoro, and Porto), Brazil, were used in the experiments. From that, 44 individuals were used for vector competence tests, 399 females were orally infected with a local ZIKV strain (345

were infected once and 54 were superinfected, i.e., received a second infective blood meal at 7 days postinfection (dpi) with the same ZIKV strain). Of the 723 mosquitoes monitored daily during fitness cost assays, 90 belonged to Barra (60 infected and 30 controls), 308 to Deodoro (140 infected, 147 controls, and 21 superinfected), and 325 (145 infected, 147 controls, and 33 superinfected) to Porto field populations.

Vector competence Tests. A total of 45 mosquitoes confirmed the susceptibility of the three populations to the locally isolated ZIKV strain Rio-U1. From that, 44 (97.7%) mosquitoes presented ZIKV at their bodies, and 41 (91.1%) had positive heads. As expected, the number of viral copies increased in bodies and heads over time for Porto and Deodoro. Regarding ZIKV quantification in bodies, although marginal and not significant, we observed a difference between Deodoro and Porto infected mosquitoes occurred at 14 dpi, with the former population presenting more ZIKV genome copies ($W = 23$, $p = 0.032$; **Figure 1**).

However, no significant difference in the number of viral copies was detected when the heads of Porto- and Deodoro-infected mosquitoes were compared at 7 and 14 dpi (**Figure 1**). Superinfected mosquitoes from Deodoro and Porto had statistically similar viral copies in their bodies. Interestingly, superinfected *Ae. aegypti* from Porto showed significantly more ZIKV RNA loads at their heads at 7 days post superinfection (dpsi) than Deodoro population, reaching 107 copies ($W = 0$, $p = 0.007$; **Figure 1**).

Survival. Wing length had no detectable influence in mosquito survival ($W = 0.15$, $df = 1$, $p = 0.7$), while population and treatment exhibited significant effects ($W = 28.3$, $df = 2$, $p < 0.01$; $W = 13.8$, $df = 2$, $p < 0.01$, respectively) and thus were included in the multivariate analysis. The multivariate Cox model confirmed that populations exhibited different survival curves under laboratory conditions, despite the ZIKV infection (**Table 1**). In total, only eight individuals survived longer than 60 dpi, five from Deodoro and three from Porto. The median survival was 16 (95% confidence interval, CI: 15–19), 23 (95% CI: 22–25), and 20 (95% CI: 19–23) days to the Barra, Deodoro, and Porto populations, respectively. The Cox model also revealed that the treatment (i.e., exposure to ZIKV) produced a decrease in survival, regardless of population. These results suggest that ZIKV infection negatively affects the longevity of *Ae. aegypti*, with a stronger effect (i.e., a higher hazard ratio) in superinfected mosquitoes (**Table 1**).

The ZIKV infection effect on mosquito survival was further investigated with survival curves (**Figures 2A–C**) and paired comparisons between infected and control groups. The treatment did not alter the survival of Barra mosquitoes ($\chi^2 = 3.5$, $df = 1$, $p = 0.062$), but produced significant effects on *Ae. aegypti* populations from Deodoro ($\chi^2 = 8$, $df = 2$, $p = 0.01$) and Porto ($\chi^2 = 20.3$, $df = 2$, $p < 0.01$). In Deodoro, ZIKV infection (but not superinfection) altered mosquito mortality ($\chi^2 = 7.6$, $df = 1$, $p = 0.01$). However, a different trend was observed for Porto mosquitoes—only the superinfection promoted a reduction in survivorship when compared to the control group ($\chi^2 = 22.1$, $df = 1$, $p < 0.001$).

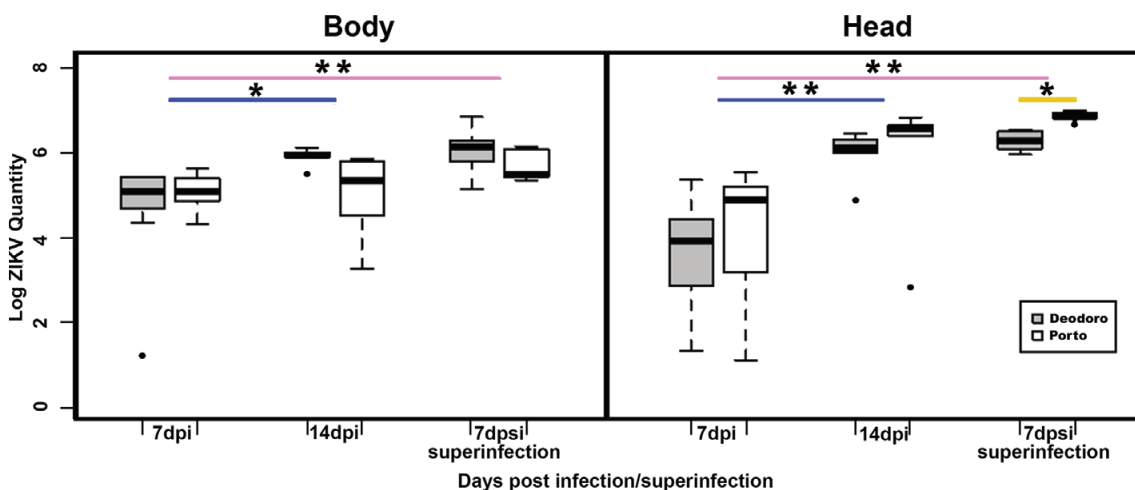
Oviposition Success. The likelihood of *Ae. aegypti* females laying at least one egg per gonotrophic cycle was strongly affected by mosquito age, with older insects having lower oviposition success (**Table 2**). Deodoro females exhibited a

significant higher oviposition success (an average of 50% considering the four first batches), while the mosquitoes from Barra and Porto exhibited lower averages (27% for both populations). On the other hand, the treatment (control, infection, or superinfection with ZIKV) not affected the oviposition success of *Ae. aegypti* (Table 2).

Table 1. Associations between mosquito survival and population (Barra, Deodoro, and Porto) and also survival and treatment (control, infected, and superinfected).

Variable	Regression coefficient	Hazard ratio (95% CI)	z	p-value
Population				
Barra	–	1.00 (reference)	–	–
Deodoro	–0.62	0.54	–4.94	<0.01
Porto	–0.42	0.65	–3.44	<0.01
Treatment				
Control	–	1.00 (reference)	–	–
Infected	0.20	1.22	2.51	0.01
Superinfected	0.42	1.53	2.85	0.004

Figure 1. The viral load in the body and head of *Aedes aegypti* mosquitoes infected and superinfected with ZIKV from Deodoro and Porto field populations.

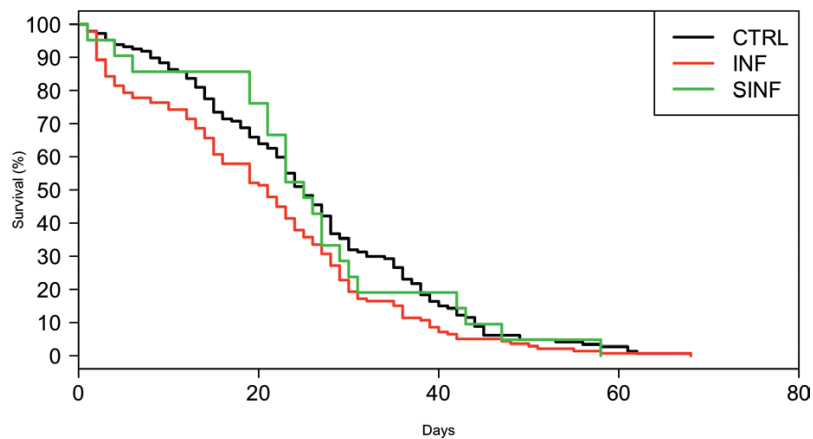
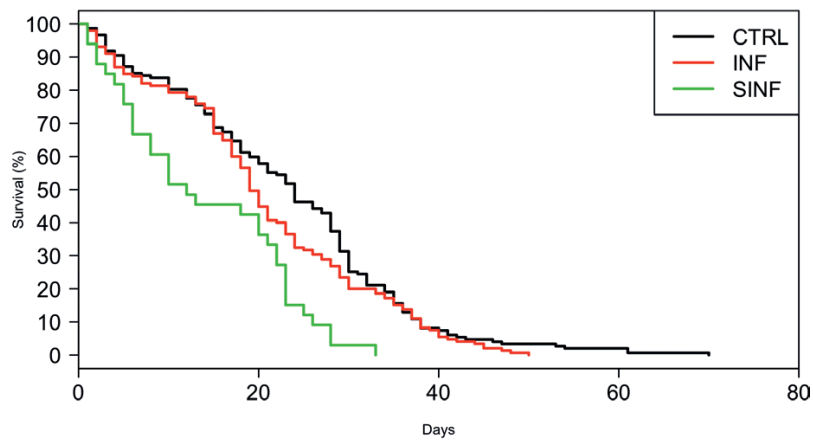
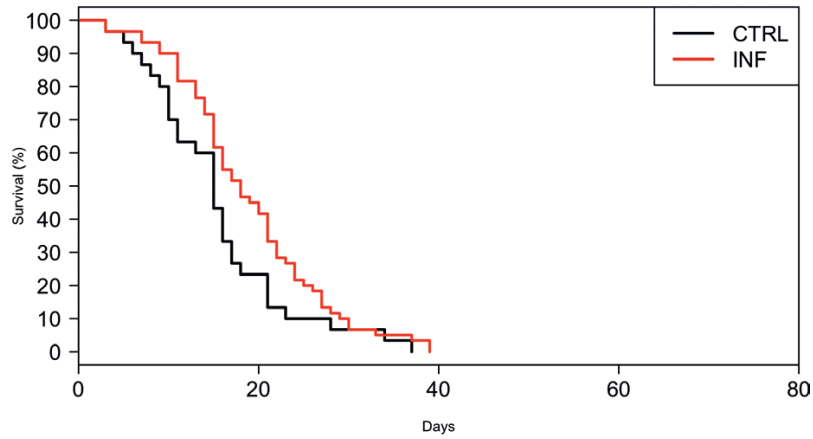


Dpi: days postinfection; dpsi: days post superinfection. * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$.

Due to low-sample sizes, Barra population data were not included in the analysis.

Figure 2. *Aedes aegypti* survival curves according to treatment (control, infected, and superinfected). Data for **(A)** Barra, **(B)** Porto, and **(C)** Deodoro populations.

CTR: control (noninfected mosquitoes); INF: infected mosquitoes; SINF: superinfected mosquitoes.



Fecundity. Fecundity analysis considered the egg number of *Ae. aegypti* females that laid at least one egg. Interestingly, the number of eggs laid by females presented a slight increase over time (i.e., with age), from 49.2 in the first clutch to 55.1 in the fourth, in average (**Table 3**). Mosquito population, treatment

and wing size had no effect on the number of eggs laid by *Ae. aegypti* females (Table 3).

Table 2. Logistic regression analysis of the mosquito population, treatment, wing size, and age when they lay eggs on the success of oviposition of *Aedes aegypti* females.

Variable(s)	df	χ^2	<i>p</i> -value
Age	9	30.52	0.0001
Wing size	3	3.56	0.312
Population	6	44.01	0.0001
Treatment	6	1.47	0.961
Population × treatment	9	0.98	0.999
Population × age	18	41.26	0.004
Population × wing size	6	0.83	0.991
Age × treatment	18	14.26	0.711
Wing size × treatment	6	4.21	0.648
Wing size × population × treatment	9	3.96	0.914

Table 3. Repeated measure analysis (with clutch taken as the repeat) of the number of eggs laid by *Aedes aegypti* females.

Variable	Num df	Den df	<i>F</i>	<i>p</i> -value
Population	6	48	1.648	0.154
Treatment	6	48	1.503	0.197
Wing size	3	24	2.63	0.073

Discussion

The vectorial capacity (VC) is defined as the entomological component of the basic reproduction rate (R_0) of vector-borne diseases such as malaria, dengue, and Zika viruses (Service, 1993). Therefore, appropriate estimates of VC parameters may provide valuable insights into disease epidemiology and also

yield the establishment of more efficient vector control activities to mitigate transmission (Brady et al., 2016). Previous studies have shown that a given pathogen can modify life-history traits of vectors and, therefore, directly influence the VC and ultimately the R_0 (Scott and Lorenz, 1998; Moncayo et al., 2000; Martin et al., 2010; Vezilier et al., 2012). This article describes the effects of a locally isolated ZIKV strain (Asian genotype Rio-U1) on the biology of three *Ae. aegypti* field populations from Rio de Janeiro. Our results showed that a single (infection) or two ZIKV infected blood meals (superinfection) posed significant effects on the longevity, but not on the fecundity of female mosquitoes. Moreover, mosquito populations differed in their response to virus infection regarding survival rates and viral loads in the body and head.

Shortened lifespan due to pathogen infection was observed in different insect models, such as *Culiseta melanura* orally challenged with Eastern equine encephalomyelitis virus, *Aedes albopictus* infected with chikungunya, and *Anopheles stephensi* mosquitoes infected with *Plasmodium berghei* (Scott and Lorenz, 1998; Dawes et al., 2009; Martin et al., 2010). Negative effects on *Ae. aegypti* longevity were also detected after challenging females with a DENV-2 strain that has never circulated in the region where mosquitoes were collected (Maciel-de-Freitas et al., 2011; Sylvestre et al., 2013). Interestingly, our study pointed that one of the three tested populations (Barra) not had any reduction in lifespan due to ZIKV infection, while the other two populations exhibited an increase in mortality when infected (Deodoro) or superinfected (Porto). However, considering that Barra had only a few mosquitoes, conclusions about this population must be taken carefully. Although we did not accessed all the variables that affect the VC, mortality rate is one of the most important entomological

parameters for its estimation (Luz et al., 2003) and thus is reasonable to assume that changes on mosquito lifespan may affect disease transmission under natural settings.

Despite distant each other less than 25 km, the response of mosquito populations to the laboratory environment and to ZIKV infection differed substantially. Deodoro mosquitoes had a higher significant lifespan than Porto and Barra populations, while Porto had a greater survival than Barra, despite the infection status. The treatment also produced different outcomes in Deodoro and Porto populations. The mortality of infected Deodoro mosquitoes decreases in comparison with the control group, while only the superinfected females from Porto had a significant decline in survival. We hypothesized that the higher mortality in superinfected *Ae. aegypti* from Porto is related to a greater viral load in the heads when contrasted to Deodoro mosquitoes. Virulence is tightly coupled to parasite load in *An. stephensi* and to higher RNA copy numbers in *Drosophilidae*, which means that the extent of the harm to a host might be partially explained by pathogen accumulation (Dawes et al., 2009; Longdon et al., 2015).

Vector competence seems to be influenced by specific interactions between mosquitoes and arbovirus genotypes. By challenging three isofemale families of field-derived *Ae. aegypti* from Thailand with three contemporaneous low-passage DENV-1 isolates, Lambrechts et al. (2009) evinced vector competence is likely governed to a large extent by virus and mosquito genetic interactions in natural populations. Moreover, the susceptibility of *Ae. aegypti* to pathogens is a highly dynamic feature, dependent on both genetic and environmental factors. Thus, it is expected that both vector competence and

fitness cost of an infection also vary among geographically close field mosquito populations (Gubler et al., 1979; Failloux et al., 2002; Tabachnick, 2013; Severson and Behura, 2016). Nuclear markers of *Aedes aegypti* populations collected in Rio de Janeiro, including areas overlapping Deodoro, Barra, and Porto, revealed multiple introductions and extensive gene flow among populations. However, a strong spatial structuring was found considering mitochondrial markers and 25 genes related to mosquito immune response and insecticide resistance (Rašić et al., 2015). Therefore, these data may explain why the populations studied here exhibited different outcomes in longevity and superinfected with ZIKV.

Regardless of the extensive studies about the immune pathways activated in mosquitoes during a single flavivirus exposure, it remains unclear whether the immune system activation through a primary virus infection has any effect on a secondary infection (Xi et al., 2008; Souza-Neto et al., 2009; Sim and Dimopoulos, 2010). In the case of the infection with phylogenetic closely related viruses (at least from the same genus) in a single specimen, a superinfection exclusion is expected (i.e., a primary virus infection inhibits a secondary infection), since common host immune factors might be formerly activated by the first infection (Bolling et al., 2012). Mosquito cells previously infected with DENV and then exposed to the four DENV serotypes displayed a reduction in the viral titer (Igarashi, 1979; Kuno, 1982). A similar outcome was observed in *Culex quinquefasciatus* mosquitoes with a persistent infection by a *Culex* flavivirus and subsequently exposed to West Nile virus (WNV) (Bolling et al., 2012). However, Kuwata et al. (2015) found no evidence of superinfection exclusion of Japanese Encephalitis virus or DENV in cells previously infected with a *Culex* flavivirus. In

the present study, no evidence of superinfection exclusion was identified, since viral titers did not decrease at 7 dpi. Indeed, mosquitoes from Porto had a sharp decline on their survival when superinfected.

One limitation of this study is the impossibility of analyzing the effect of arbovirus genotypes in the susceptibility and life-history traits of the mosquitoes, since we infected them with a single ZIKV local strain. Genomic analyses of ZIKV epidemic strains of 2016 revealed the coexistence of at least seven phylogenetically diversified virus clusters circulating in Brazil (Shi et al., 2016; Wang et al., 2017). Although there is no information available about the diversity of ZIKV in small geographic scales such as those studied here, high levels of genetic variability of the flavivirus WNV among local strains were observed in near counties of the New York State infecting *Culex* mosquitoes (Ehrbar et al., 2017). In line with the idea of vector competence being population-specific, the possible genetic variability of ZIKV strains could contribute to the prevalence and transmission on local levels.

Several papers reported the impact of pathogen infection on host fecundity, which associated with a reduction in survival rate, would negatively impact VC by reducing the offspring size (Kramer and Ciota, 2015). For instance, *An. stephensi* and *Anopheles gambiae* seem to produce smaller egg batches after infected with *Plasmodium yoelii nigeriensis* (Hogg and Hurd, 1995; Jahan and Hurd, 1998). WNV-infected *Culex tarsalis* presented smaller egg rafts, mainly in the first oviposition cycle (Styer et al., 2007). *Aedes aegypti* females exposed to DENV-2 exhibited an impairment in fecundity, which varied over mosquito lifespan. Overall, DENV-2 infection seems to interfere with mosquitoes' fecundity by both reducing egg-laying success and batch sizes (Maciel-de-Freitas et al.,

2011; Sylvestre et al., 2013). Bearing in mind that ZIKV reaches mosquito ovaries on the second day postinfection (Li et al., 2017), we sought that the virus would exert a resembling impact over fecundity traits on the first clutch onward. Surprisingly, ZIKV infection did not influence directly on the oviposition success and fecundity, although increased mortality early after infection may result in lower reproduction rates.

Aedes aegypti vector competence seems to be genetically determined, which means that coadaptation between mosquitoes and viruses in a local setting may provide a more efficient transmission by sympatric vector genotypes with lower fitness cost (Lambrechts et al., 2009). Overall, our findings suggest that ZIKV infection causes a reduction in *Ae. aegypti* survival but did not alter fecundity, different from what has been observed for DENV and other arboviruses. It is worth mentioning, however, that mosquito populations varied in their response to ZIKV infection considering survival and viral loads, highlighting that fitness outcomes may be governed by the interaction between host and parasite genotypes. For example, superinfected mosquitoes from one of the populations exhibited more ZIKV copies in the head at 7 dpi and increased mortality. These different outcomes toward field-derived *Ae. aegypti* might provide additional information regarding local epidemiological settings. In conclusion, ZIKV infection yields a reduction in *Ae. aegypti* survival but produced no effects on mosquito fecundity and oviposition success. Therefore, the presence of ZIKV negatively affected the *Ae. aegypti* vectorial capacity by reducing mosquito lifespan.

Ethical statements. ZIKV-infected and uninfected mosquitoes were blood

fed once a week on anesthetized mice. This study was carried out in accordance with the recommendations of Fiocruz Ethical Committee for Animal Use. The protocol was approved by the Fiocruz Ethical Committee for Animal Use (CEUA LW-32/14).

Author contributions. IS, GG, MGP, and RM were responsible for the conception and design of study; IS, MTP, GS, and MTP were responsible for the acquisition of data; MD, MGP, and RM performed the data analysis;

Funding. This work was supported by the Brazilian Research Councils MCTIC/ FNDCT-CNPq/MEC-CAPES/MS-Decit E14/2016 (440929/2016-4), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES, 23038.007199/2012-17 and Finance Code 001) and FAPERJ E18/2015. Funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Acknowledgements. We thank Dr. Rafaela Vieira Bruno for her valuable comments. This work was supported by the Brazilian Research Councils MCTIC/FNDCT-CNPq/MEC-CAPES/MS-Decit E14/2016 (440929/2016-4), CAPES (23038.007199/2012-17) and Faperj E18/2015. Funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

References

Benjamini, Y., and Yekutieli, D. (2001). The control of the false discovery rate in multiple testing under dependency. *Ann. Stat.* 29, 1165–1188. doi: 10.1214/ aos/1013699998

Bolling, B. G., Olea-Popelka, F. J., Eisen, L., Moore, C. G., and Blair, C. D. (2012). Transmission dynamics of an insect-specific flavivirus in a naturally infected *Culex pipiens* laboratory colony and effects of co-infection on vector competence for West Nile virus. *Virology* 427, 90–97. doi: 10.1016/j.virol.2012.02.016

Bonaldo, M. C., Ribeiro, I. P., Lima, N. S., dos Santos, A. A. C., Menezes, L. S. R., da Cruz, S. O. D., et al. (2016). Isolation of infective Zika virus from urine and saliva of patients in Brazil. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10:e0004816. doi: 10.1371/journal.pntd.0004816

Brady, O. J., Godfray, H. C., Tatem, A. J., Gething, P. W., Cohen, J. M., McKenzie, F. E., et al. (2016). Vectorial capacity and vector control: reconsidering sensitivity to parameters for malaria elimination. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 110, 107–117. doi: 10.1093/trstmh/trv113

Chouin-Carneiro, T., Vega-Rua, A., Vazeille, M., Yebakima, A., Girod, R., Goindin, D., et al. (2016). Differential susceptibilities of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from the Americas to Zika Virus. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10:e0004543. doi: 10.1371/journal.pntd.0004543

Cohen, J. (1988). *Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences*. 2nd Edn. New York: Lawrence Erlbaum Associates.

David, M. R., Lourenço-de-Oliveira, R., and De Freitas, R. M. (2009). Container productivity, daily survival rates and dispersal of *Aedes aegypti* mosquitoes in a high income dengue epidemic neighbourhood of Rio de Janeiro: presumed influence of differential urban structure on mosquito biology. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 104, 927–932. Available at:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19876569>, doi: 10.1590/S0074-02762009000600019

Dawes, E. J., Churcher, T. S., Zhuang, S., Sinden, R. E., and Basáñez, M.-G. (2009). *Anopheles* mortality is both age- and Plasmodium-density dependent: implications for malaria transmission. *Malar. J.* 8:228. doi: 10.1186/1475-2875-8-228

Dutra, H. L. C., Rocha, M. N., Dias, F. B. S., Mansur, S. B., Caragata, E. P., and Moreira, L. A. (2016). Wolbachia blocks currently circulating Zika virus isolates in Brazilian *Aedes aegypti* mosquitoes. *Cell Host Microbe* 19, 771–774. doi: 10.1016/j.chom.2016.04.021

Ehrbar, D. J., Ngo, K. A., Campbell, S. R., Kramer, L. D., and Ciota, A. T. (2017). High levels of local inter- and intra-host genetic variation of West Nile virus and evidence of fine-scale evolutionary pressures. *Infect. Genet. Evol.* 51, 219–226. doi: 10.1016/j.meegid.2017.04.010

Etebari, K., Hegde, S., Saldaña, M. A., Widen, S. G., Wood, T. G., Asgari, S., et al. (2017). Global transcriptome analysis of *Aedes aegypti* mosquitoes in response to Zika virus infection. *mSphere* 2, pii:e00456–17. doi: 10.1128/mSphere.00456-17

Failloux, A.-B., Vazeille, M., and Rodhain, F. (2002). Geographic genetic variation in populations of the dengue virus vector *Aedes aegypti*. *J. Mol. Evol.* 55, 653–663. doi: 10.1007/s00239-002-2360-y

Fay, R. W., and Eliason, D. A. (1966). A preferred oviposition site as a surveillance method for *Aedes aegypti*. *Mosq. News* 26, 531–535.

Fernandes, R. S., Campos, S. S., Ferreira-de-Brito, A., de Miranda, R. M., Barbosa da Silva, K. A., de Castro, M. G., et al. (2016). *Culex quinquefasciatus*

from Rio de Janeiro is not competent to transmit the local Zika virus. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10, 1–13. doi: 10.1371/journal.pntd.0004993

Ferreira-de-Brito, A., Ribeiro, I. P., de Miranda, R. M., Fernandes, R. S., Campos, S. S., da Silva, K. A. B., et al. (2016). First detection of natural infection of *Aedes aegypti* with Zika virus in Brazil and throughout South America. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 111, 655–658. doi: 10.1590/0074-02760160332

Gubler, D. J., Nalim, S., Tan, R., Saipan, H., and Sulianti Saroso, J. (1979). Variation in susceptibility to oral infection with dengue viruses among geographic strains of *Aedes aegypti*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 28, 1045–1052. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/507282>, doi: 10.4269/ajtmh.1979.28.1045

Harbach, R., and Knight, K. (1980). *Taxonomists' Glossary of Mosquito Anatomy*. Marlton, New Jersey: Plexus Publishing.

Hogg, J. C., and Hurd, H. (1995). Malaria-induced reduction of fecundity during the first gonotrophic cycle of *Anopheles stephensi* mosquitoes. *Med. Vet. Entomol.* 9, 176–180. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7787226>, doi: 10.1111/j.1365-2915.1995.tb00175.x

Igarashi, A. (1979). Characteristics of *Aedes albopictus* cells persistently infected with dengue viruses. *Nature* 280, 690–691. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/471048>, doi: 10.1038/280690a0

Jahan, N., and Hurd, H. (1998). Effect of *Plasmodium yoelii nigeriensis* (Haemosporidia: Plasmodiidae) on *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae) vitellogenesis. *J. Med. Entomol.* 35, 956–961. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9835686>, doi: 10.1093/jmedent/35.6.956

Koella, J. C., Sorensen, F. L., and Anderson, R. A. (1998). The malaria parasite, *Plasmodium falciparum*, increases the frequency of multiple feeding of its mosquito vector, *Anopheles gambiae*. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 265, 763–768. doi: 10.1098/rspb.1998.0358

Kramer, L. D., and Ciota, A. T. (2015). Dissecting vectorial capacity for mosquito-borne viruses. *Curr. Opin. Virol.* 15, 112–118. doi: 10.1016/j.coviro.2015.10.003

Kuno, G. (1982). Persistent infection of a nonvector mosquito cell line (TRA-171) with dengue viruses. *Intervirology* 18, 45–55. doi: 10.1159/000149303

Kuwata, R., Isawa, H., Hoshino, K., Sasaki, T., Kobayashi, M., Maeda, K., et al. (2015). Analysis of mosquito-borne flavivirus superinfection in *Culex tritaeniorhynchus* (Diptera: Culicidae) cells persistently infected with culex flavivirus (Flaviviridae). *J. Med. Entomol.* 52, 222–229. doi: 10.1093/jme/tju059

Lambrechts, L., Chevillon, C., Albright, R. G., Thaisomboonsuk, B., Richardson, J. H., Jarman, R. G., et al. (2009). Genetic specificity and potential for local adaptation between dengue viruses and mosquito vectors. *BMC Evol. Biol.* 9:160. doi: 10.1186/1471-2148-9-160

Li, C.-X., Guo, X.-X., Deng, Y.-Q., Xing, D., Sun, A.-J., Liu, Q.-M., et al. (2017). Vector competence and transovarial transmission of two *Aedes aegypti* strains to Zika virus. *Emerg. Microbes Infect.* 6:e23. doi: 10.1038/emi.2017.8

Liu-Helmersson, J., Stenlund, H., Wilder-Smith, A., and Rocklöv, J. (2014). Vectorial capacity of *Aedes aegypti*: effects of temperature and implications for global dengue epidemic potential. *PLoS One* 9:e89783. doi: 10.1371/journal.pone.0089783

Liu, Y., Liu, J., Du, S., Shan, C., Nie, K., Zhang, R., et al. (2017). Evolutionary enhancement of Zika virus infectivity in *Aedes aegypti* mosquitoes. *Nature* 545, 482–486. doi: 10.1038/nature22365

Longdon, B., Hadfield, J. D., Day, J. P., Smith, S. C. L., McGonigle, J. E., Cogni, R., et al. (2015). The causes and consequences of changes in virulence following pathogen host shifts. *PLoS Pathog.* 11:e1004728. doi: 10.1371/journal.ppat.1004728

Luz, P. M., Codeço, C. T., Massad, E., and Struchiner, C. J. (2003). Uncertainties regarding dengue modeling in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 98, 871–878. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21519709>, doi: 10.1590/S0074-02762003000700002

Maciel-De-Freitas, R., Codeço, C. T., and Lourenço-De-Oliveira, R. (2007). Daily survival rates and dispersal of *Aedes aegypti* females in Rio de Janeiro, Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 76, 659–665. doi: 10.4269/ajtmh.76.4.659 [pii]

Maciel-de-Freitas, R., Eiras, A. E., and Lourenço-de-Oliveira, R. (2008). Calculating the survival rate and estimated population density of gravid *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) in Rio de Janeiro, Brazil, *Cad. Saude Publica* 24, 2747–2754. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19082265>, doi: 10.1590/S0102-311X2008001200003

Maciel-de-Freitas, R., Koella, J. C., and Lourenço-de-Oliveira, R. (2011). 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. doi: 10.1016/j.trstmh.2011.05.006

Maciel-de-Freitas, R., and Lourenço-de-Oliveira, R. (2009). Presumed unconstrained dispersal of *Aedes aegypti* in the city of Rio de Janeiro, Brazil, *Rev. Saude Publica* 43, 8–12. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19169571>, doi: 10.1590/S0034-89102009000100002

Maciel-de-Freitas, R., Sylvestre, G., Gandini, M., and Koella, J. C. (2013). The Influence of Dengue Virus Serotype-2 Infection on *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Motivation and Avidity to Blood Feed. *PLoS One* 8:e65252. doi: 10.1371/journal.pone.0065252

Martin, E., Moutailler, S., Madec, Y., and Failloux, A.-B. (2010). Differential responses of the mosquito *Aedes albopictus* from the Indian Ocean region to two chikungunya isolates. *BMC Ecol.* 10:8. doi: 10.1186/1472-6785-10-8

Moncayo, A. C., Edman, J. D., and Turell, M. J. (2000). Effect of eastern equine encephalomyelitis virus on the survival of *Aedes albopictus*, *Anopheles quadrimaculatus*, and *Coquillettidia perturbans* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* 37, 701–706. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11004781>, doi: 10.1603/0022-2585-37.5.701

Patterson, J., Sammon, M., and Garg, M. (2016). Dengue, Zika and Chikungunya: emerging arboviruses in the new world. *West J. Emerg. Med.* 17, 671–679. doi: 10.5811/westjem.2016.9.30904

Platt, K. B., Linthicum, K. J., Myint, K. S., Innis, B. L., Lerdthusnee, K., and Vaughn, D. W. (1997). Impact of dengue virus infection on feeding behavior of *Aedes aegypti*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 57, 119–125. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9288801>, doi: 10.4269/ajtmh.1997.57.119

Putnam, J. L., and Scott, T. W. (1995). Blood-feeding behavior of dengue-2 virus-infected *Aedes aegypti*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 52, 225–227. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7694963>, doi: 10.4269/ajtmh.1995.52.225

R Development Core Team, R. (2011). R: a language and environment for statistical computing. *R Found. Stat. Comput.* 1:409. doi: 10.1007/978-3-540-74686-7

Rašić, G., Schama, R., Powell, R., Maciel-de Freitas, R., Endersby-Harshman, N. M., Filipović, I., et al. (2015). Contrasting genetic structure between mitochondrial and nuclear markers in the dengue fever mosquito from Rio de Janeiro: implications for vector control. *Evol. Appl.* 8, 901–915. doi: 10.1111/eva.12301

Robinson, A., Busula, A. O., Voets, M. A., Beshir, K. B., Caulfield, J. C., Powers, S. J., et al. (2018). Plasmodium -associated changes in human odor attract mosquitoes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* E4209–E4218. doi: 10.1073/pnas.1721610115

Rossi, S. L., Ebel, G. D., Shan, C., Shi, P.-Y., and Vasilakis, N. (2018). Did Zika Virus Mutate to Cause Severe Outbreaks? *Trends Microbiol.* 26, 877–885. doi: 10.1016/j.tim.2018.05.007

Rossignol, P. A., Ribeiro, J. M., and Spielman, A. (1986). Increased biting rate and reduced fertility in sporozoite-infected mosquitoes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 35, 277–279. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3953943>, doi: 10.4269/ajtmh.1986.35.277

Roundy, C. M., Azar, S. R., Rossi, S. L., Huang, J. H., Leal, G., Yun, R., et al. (2017). Variation in *Aedes aegypti* mosquito competence for Zika virus transmission. *Emerg. Infect. Dis.* 23, 625–632. doi: 10.3201/eid2304.161484

Salas-Benito, J. S., and De Nova-Ocampo, M. (2015). Viral interference and persistence in mosquito-borne flaviviruses. *J. Immunol. Res.* 2015, 1–14. doi: 10.1155/2015/873404

SAS Institute Inc. (2007). JMP®, Version 13.0. Available at: <http://www.jmp.com/>

Schwartz, A., and Koella, J. C. (2001). Trade-offs, conflicts of interest and manipulation in Plasmodium-mosquito interactions. *Trends Parasitol.* 17, 189–194. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11282509>, doi: 10.1016/S1471-4922(00)01945-0

Scott, T. W., and Lorenz, L. H. (1998). Reduction of *Culiseta melanura* fitness by eastern equine encephalomyelitis virus. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 59, 341–346. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9715958>, doi: 10.4269/ajtmh.1998.59.341

Service, M. W. (1993). Mosquito Ecology. Dordrecht: Springer Netherlands doi: 10.1007/978-94-015-8113-4

Severson, D. W., and Behura, S. K. (2016). Genome investigations of vector competence in *Aedes aegypti* to inform novel arbovirus disease control approaches. *Insects* 7. doi: 10.3390/insects7040058

Shi, W., Zhang, Z., Ling, C., Carr, M. J., Tong, Y., and Gao, G. F. (2016). Increasing genetic diversity of Zika virus in the Latin American outbreak. *Emerg. Microbes Infect.* 5:e68. doi: 10.1038/emi.2016.68

Sim, S., and Dimopoulos, G. (2010). Dengue virus inhibits immune responses in *Aedes aegypti* Cells. *PLoS One* 5:e10678. doi: 10.1371/journal.pone.0010678

Sim, S., Ramirez, J. L., and Dimopoulos, G. (2012). Dengue virus infection of the *Aedes aegypti* salivary gland and chemosensory apparatus induces genes that modulate infection and blood-feeding behavior. *PLoS Pathog.* 8:e1002631. doi: 10.1371/journal.ppat.1002631

Souza-Neto, J. A., Sim, S., and Dimopoulos, G. (2009). An evolutionary conserved function of the JAK-STAT pathway in anti-dengue defense. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 17841–17846. doi: 10.1073/pnas.0905006106

Styer, L. M., Meola, M. A., and Kramer, L. D. (2007). West Nile virus infection decreases fecundity of *Culex tarsalis* females. *J. Med. Entomol.* 44, 1074–1085. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18047209>. doi: 10.1093/jmedent/44.6.1074

Sylvestre, G., Gandini, M., and Maciel-de-Freitas, R. (2013). Age-dependent effects of oral infection with dengue virus on *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) feeding behavior, survival, oviposition success and fecundity. *PLoS One* 8:e59933. doi: 10.1371/journal.pone.0059933

Tabachnick, W. (2013). Nature, nurture and evolution of intra-species variation in mosquito arbovirus transmission competence. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 10, 249–277. doi: 10.3390/ijerph10010249

Vezilier, J., Nicot, A., Gandon, S., and Rivero, A. (2012). Plasmodium infection decreases fecundity and increases survival of mosquitoes. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 279, 4033–4041. doi: 10.1098/rspb.2012.1394

Wang, A., Thurmond, S., Islas, L., Hui, K., and Hai, R. (2017). Zika virus genome biology and molecular pathogenesis. *Emerg. Microbes Infect.* 6:e13. doi: 10.1038/emi.2016.141

Weaver, S. C., and Reisen, W. K. (2010). Present and future arboviral threats. *Antivir. Res.* 85, 328–345. doi: 10.1016/j.antiviral.2009.10.008

Xi, Z., Ramirez, J. L., and Dimopoulos, G. (2008). The *Aedes aegypti* toll pathway controls dengue virus infection. *PLoS Pathog.* 4:e1000098. doi: 10.1371/journal.ppat.1000098

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

5. Discussão

A capacidade vetorial (CV) é um componente entomológico que se baseia na taxa de reprodução básica (R_0) de doenças transmitidas por vetores, tais como malária, dengue e Zika (Service, 1993). Sendo assim, o estudo da CV, bem como cada um dos parâmetros que a representa, permite que os resultados sejam extrapolados para a epidemiologia, e fornece conteúdo para o estabelecimento de novas formas de controle de vetores, mitigando o potencial de transmissão (Brady et al. 2016). Na literatura já vem sendo mostrado que a presença de um patógeno pode vir a alterar aspectos da história de vida de seu hospedeiro invertebrado, e por fim, influenciar diretamente na capacidade vetorial e no R_0 (Moncayo et al. 2000, Styler et al. 2007, Martin et al. 2010, Vézilier et al. 2012). Esta dissertação descreve os principais efeitos de um isolado de Zika local (Genótipo Asiático Rio-U1) na história de vida de três populações distintas de *Aedes aegypti*, do Rio de Janeiro. No geral, os resultados obtidos sugerem uma única infecção ou duas alimentações utilizando sangue infectado pelo ZIKV (superinfecção) apresentou efeitos significativos na longevidade, mas não afetou a fecundidade e sucesso de oviposição das fêmeas de mosquito desafiadas. Além disso, as populações de mosquito estudadas diferiram em sua resposta à infecção ao considerar a taxa de sobrevivência e a carga viral presente no corpo e na cabeça.

Em diversos modelos, tem sido observado o decréscimo na sobrevivência induzido por patógenos, como por exemplo, *Culiseta melanura* infectados com vírus da encefalomielite equina oriental, *Aedes albopictus* desafiados com Chikungunya, e mosquitos *Anopheles stephensi* infectados com *Plasmodium berghei* (Scott & Lorenz 1998, Dawes et al. 2009, Martin et al. 2010). Devido a

sua importância como vetor de arboviroses, muitos estudos de fitness têm como alvo o *Aedes aegypti*. Maciel-de-Freitas et al. (2011) e Sylvestre et al. (2013) mostraram que fêmeas de *Ae. aegypti* exibiram efeitos negativos na longevidade após serem infectadas com uma cepa de DENV-2 que nunca cocirculou com mosquitos locais. Neste estudo, ao utilizar vírus e populações de mosquito de uma mesma localidade, uma das três populações testadas (Barra) não teve nenhuma redução no tempo de vida devido à infecção pelo ZIKV, no entanto, as outras duas populações exibiram um aumento na mortalidade quando infectadas (Deodoro), ou superinfectadas (Porto). Apesar disto, é importante considerar que a população de Barra contava com um número inferior de indivíduos, o que faz necessário que as conclusões sobre este grupo sejam feitas cuidadosamente. Embora não tenhamos acessado todas as variáveis que afetam a CV, a taxa de mortalidade é um dos parâmetros entomológicos mais importantes para estimá-la, (Luz et al. 2003), sendo assim, é razoável supor que as mudanças na sobrevivência dos mosquitos podem afetar a transmissão de doenças em ambientes naturais.

Neste trabalho, nós observamos em muitos aspectos que o efeito da infecção sob o hospedeiro está diretamente endereçado à combinação de ambos vírus e a população de vetor. Essa correlação já foi descrita anteriormente por Dawkins que trouxe à tona o termo de “Genótipo estendido”, o qual baseia-se no conceito de que fenótipos de hospedeiros e parasitos são resultantes da interação entre o genoma de ambos. Apesar desse mecanismo ser conhecido para muitos modelos de hospedeiro-parasito, muitos estudos negligenciam essa premissa não utilizando vírus e vetores simpátricos (Lambrechts et al. 2006). É visto para DENV, que o vírus é capaz de combinar-se com o background

genético das populações de *Ae. aegypti*, levando a uma adaptação da cepa local, e com isso, aumentando a compatibilidade com o genótipo de mosquitos locais (Chevillon & Failoux 2003). Portanto, ainda permanece elusivo se o DENV impacta negativamente o fitness de *Ae. aegypti*, uma vez que nunca foram analisados os efeitos dessa interação utilizando cepa de vírus e mosquitos simpátricos.

Neste trabalho, apesar dos distritos de coleta estarem situados a apenas 25 km de distância um do outro, as populações de mosquito diferiram significativamente ao responderem à infecção pelo Zika. Indivíduos de Deodoro apresentaram uma sobrevivência maior do que *Ae. aegypti* de Porto e Barra, enquanto Porto exibiu uma taxa de sobrevivência maior que Barra. A superinfecção também acarretou padrões de susceptibilidade diferentes para Deodoro e Porto. Enquanto a mortalidade das fêmeas superinfectadas de Deodoro não sofreu alterações quando comparadas ao controle, e ao grupo infectado uma única vez, os mosquitos de Porto apresentaram uma queda considerável na curva de sobrevivência. Pressupomos que o alto índice de mortalidade no grupo de Porto superinfectado esteja correlacionado com a elevada carga viral encontrada na cabeça e saliva, o que sugere uma maior disseminação pelos tecidos. A virulência – custo no fitness de um hospedeiro devido à uma infecção por patógeno – está fortemente associada com a quantidade de patógenos. É visto que, para *An. stephensi*, o número de parasitos reflete na biologia do vetor, e que uma maior quantidade de cópias de RNA em *Drosophilidae* também causa alterações na história de vida do inseto. Essas observações levam a crer que a extensão do dano ao hospedeiro pode ser

parcialmente explicada através do acúmulo de patógenos nos tecidos (Dawes et al. 2009, Longdon et al. 2015).

As interações específicas envolvendo o genótipo de mosquitos e arbovírus configuram diferenças capazes de alterar a competência vetorial. Ao desafiar três famílias de isofêmeas de *Aedes aegypti* de campo, da Tailândia, com três isolados contemporâneos de DENV-1, Lambrechts et al. (2009) evidenciou que a capacidade vetorial do *Ae. aegypti* pelo vírus dengue é provavelmente governada por interações G x G em populações geneticamente diversas. De fato, a susceptibilidade desses mosquitos aos patógenos é um processo dinâmico que depende de fatores genéticos e ambientais (G x G x E). Desta forma, é esperado que, além da capacidade vetorial, o custo ao fitness provocado por um patógeno varie dentre populações de mosquito geograficamente próximas (Gluber et al. 1979, Failloux et al. 2002, Tabachnick et al. 2013, Severson & Behura 2016). Marcadores nucleares de populações de *Aedes aegypti* coletadas no Rio de Janeiro, incluindo áreas sobrepostas a Deodoro, Barra e Porto revelaram múltiplas introduções e um extensivo fluxo gênico entre estas populações. Além disso, uma forte estruturação espacial foi encontrada considerando marcadores mitocondriais e 25 genes relacionados à resposta imune dos mosquitos e resistência à inseticidas (Rašić et al., 2015). Esses dados podem explicar por que as populações estudadas aqui exibiram resultados diferentes na longevidade e na superinfecção com o ZIKV.

Acerca dos estudos que têm sido realizados investigando as vias imunes dos mosquitos em infecções por flavivírus, ainda é incerto se a exposição a um vírus ativa o sistema imune, protegendo o hospedeiro contra um vírus secundário (Xi et al. 2008, Souza-Neto et al. 2009, Sim & Dimopoulos, 2010). Em vírus que

sejam muito próximos, é esperado que haja uma exclusão da superinfecção, ou seja, quando um vírus primário inibe a infecção por um secundário. Esses dados já foram relatados em células de mosquitos pré-tratadas com meio de cultura de células infectadas por DENV, reduzindo o título viral, e até mesmo acarretando resistência à superinfecção posterior com os quatro sorotipos de DENV (Igarasho 1979, Kuno 1982). Ademais, esse mesmo mecanismo também foi documentado para mosquitos *Culex quinquefasciatus* infectados com *Culex flavivirus* e Vírus do Nilo do Oeste (Bolling et al. 2012). Entretanto, Kuwata et al. (2015) não identificou a exclusão de uma superinfecção atuando sob os vírus da encefalite japonesa e dengue, em células tratadas com *Culex flavivirus*. Neste estudo, não encontramos evidências de exclusão de superinfecção, haja visto que o título viral não decresceu em 7dpi (7 dias após a superinfecção). Interessantemente, os mosquitos da população de Porto apresentaram uma redução na sobrevivência apenas quando superinfectados.

Uma limitação deste estudo foi a impossibilidade de analisar o efeito do genótipo do arbovírus na susceptibilidade e na história de vida dos mosquitos, uma vez que utilizamos para infecção apenas um ZIKV de linhagem local. Análises genômicas das linhagens epidêmicas do ZIKV revelaram a coexistência de ao menos sete agrupamentos de vírus filogeneticamente distintos circulando no Brasil (Shi et al. 2016, Wang et al. 2017). Embora não haja informações disponíveis acerca da diversidade do ZIKV em escalas geográficas menores como as aqui estudadas, foi encontrada em mosquitos *Culex* infectados, uma grande variedade genética do flavivírus WNV dentre cepas locais de municípios próximos, em Nova Iorque (Ehrbar et al. 2017). De acordo com a ideia da competência vetorial ser população-específica, a possível variabilidade genética

de cepas de ZIKV poderia contribuir para a prevalência e a transmissão em níveis locais

Considerando a presença do patógeno e as consequências no comportamento reprodutivo do hospedeiro, alguns trabalhos vêm reportando o impacto da infecção na fecundidade dos insetos. Por exemplo, *An. stephensi* e *An. gambiae* parecem produzir um número reduzido de ovos após serem infectados com o *Plasmodium yoelii nigeriensis* (Hogg & Hurd 1995, Johan & Hurd 1998). Além disso, Styler et al. (2007) demonstrou que *Culex tarsalis* infectados com WNV exibiram efeitos negativos na oviposição, associado com menores jangadas de ovos, principalmente na primeira postura. Fêmeas de *Ae. aegypti* também apresentaram um prejuízo na fecundidade ao serem submetidas ao DENV-2, o que variou conforme o tempo de vida dos mosquitos. No geral, DENV-2 interferiu com o sucesso e oviposição, e com o total de ovos depositados pelos mosquitos em cada ciclo gonotrófico (Maciel-de-Freitas et al. 2011, Sylvestre et al. 2013). Tendo em mente que o ZIKV alcança os ovários das fêmeas no segundo dia de infecção (Li et al. 2017), nós especulamos que o Zika possa exercer o mesmo impacto na fecundidade do primeiro ciclo gonotrófico em diante. Surpreendentemente, nenhuma diferença foi encontrada no sucesso de oviposição e fecundidade ao comparar mosquitos controle-negativos e ZIKV-positivos. Apesar de não influenciar diretamente nesses parâmetros, o acréscimo na mortalidade dos mosquitos, por conseguinte, pode resultar em menores taxas de reprodução.

Ao longo dos anos, pouco tem sido estudado acerca dos possíveis efeitos de uma infecção por arbovírus, e o resultado disso para a biologia dos artrópodes. Apesar disso, ainda há muito o que explorar ao considerar o modelo

mosquitos-arbovírus, uma vez que pouco se sabe dos impactos decorrentes dessa interação. Parâmetros como sobrevivência diária, fecundidade e comportamento alimentar de mosquitos infectados podem exercer grande influência na capacidade vetorial e, em última instância, na intensidade da transmissão de alguns patógenos. Entretanto, muitas vezes os desfechos são contraditórios, como os observados por Putnam et al. (1995) e Platt et al. (1997) ao avaliar alterações referidas ao repasto sanguíneo. Enquanto o primeiro observou que o DENV-2 não provocava alterações no comportamento alimentar dos mosquitos, o segundo demonstrou que o tempo demandado durante a alimentação sanguínea, bem como o tempo de prova, eram maiores em mosquitos infectados com dengue. Ressalta-se que na fórmula original da capacidade vetorial, amplamente utilizada para estudos epidemiológicos de malária, dengue e outras arboviroses, não há flexibilidade teórica para ajustes dos parâmetros em consequência de redução devido à infecção. Ou seja, a fórmula da CV assume que os patógenos não modificam sua expressão. De qualquer maneira, alguns resultados estão publicados considerando a infecção por DENV, mas ainda menos se sabe sobre a interação com ZIKV.

Devido a coadaptação/coevolução entre mosquitos e vírus em um determinado local é esperado que populações de campo possam ser tolerantes à infecção, sem que exibam custos significativos no fitness (Lambrechts & Scott 2009). No geral, nossos dados sugerem que a infecção pelo ZIKV acarreta uma redução na sobrevivência do *Ae. aegypti*, porém não altera a fecundidade, diferente do que tem sido observado para DENV e outros arbovírus. Vale a pena ressaltar que, entretanto, as populações de mosquito variaram quanto à resposta ao ZIKV considerando sobrevivência e carga viral, o que destaca que os

resultados no fitness podem ser governados pela interação entre os genótipos do hospedeiro e do parasito. Por exemplo, mosquitos superinfectados de uma das populações exibiu mais cópias de ZIKV na cabeça em 7dpi, e acréscimo na mortalidade. Esses padrões diferentes exibidos pelas populações de *Ae. aegypti* de campo podem providenciar informações importantes a respeito da configuração epidemiológica em diferentes localidades. Por fim, como a interação entre *Ae. aegypti* e o ZIKV ainda é muito recente, é necessário um tempo maior, e novos estudos para inferir acerca da coadaptação existente entre mosquito e vírus.

6. Conclusão

Nesta dissertação, foi visto que o vírus Zika, exerce efeitos negativos em fêmeas de *Ae. aegypti*, promovendo uma redução na sobrevivência dos mosquitos infectados, entretanto, os parâmetros reprodutivos não foram alterados, diferente do que é visto para outros modelos estudados. Ademais, a população dos mosquitos teve grande influência nos resultados observados, o que contribui para a ideia das interações G x G nos ensaios de custo.

Considerando o processo de superinfecção, apenas a população de Porto manifestou alterações na sobrevivência. Após realizados os testes de competência, foi visto que a carga viral no abdômen posterior à superinfecção se manteve muito parecida entre mosquitos de Porto e Deodoro. Contudo, ao quantificar o título viral nas glândulas salivares, indivíduos de Porto apresentaram um maior número de partículas virais, o que pode explicar, ao menos parcialmente, o porquê dessa população ter apresentado maior mortalidade quando infectada. Em suma, nossos resultados corroboram para um entendimento mais profundo das interações entre diferentes genótipos de *Ae.*

aegypti e vírus, e como essas combinações podem afetar o fitness do mosquito, e conseqüentemente a capacidade vetorial.

7. Referências bibliográficas

Albuquerque IG, Marandino R, Mendonça AP, Nogueira RM, Vasconcelos PF, Guerra LR, et al. Chikungunya virus infection: report of the first case diagnosed in Rio de Janeiro, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2012;45(1):128-9.

Amraoui F, Atyame-Nten C, Vega-Rúa A, Lourenço-de-Oliveira R, Vazeille M, Failloux AB. *Culex* mosquitoes are experimentally unable to transmit Zika virus. *Euro Surveill*. 2016;21(35).

Arankalle VA, Shrivastava S, Cherian S, Gunjekar RS, Walimbe AM, Jadhav SM, et al. Genetic divergence of Chikungunya viruses in India (1963-2006) with special reference to the 2005-2006 explosive epidemic. *J Gen Virol*. 2007;88(Pt 7):1967-76.

Atkinson B, Hearn P, Afrough B, Lumley S, Carter D, Aarons EJ, et al. Detection of Zika Virus in Semen. *Emerg Infect Dis*. 2016;22(5):940.

Aubry M, Teissier A, Huart M, Merceron S, Vanhomwegen J, Roche C, et al. Zika Virus Seroprevalence, French Polynesia, 2014-2015. *Emerg Infect Dis*. 2017;23(4):669-72.

Basurko C, Carles G, Youssef M, Guindi WE. Maternal and fetal consequences of dengue fever during pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2009;147(1):29-32.

Bearcroft WG. Zika virus infection experimentally induced in a human volunteer. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1956;50(5):442-8.

Beckham JD, Tyler KL. Arbovirus Infections. Continuum (Minneap Minn). 2015;21(6 Neuroinfectious Disease):1599-611.

Besnard M, Lastere S, Teissier A, Cao-Lormeau V, Musso D. Evidence of perinatal transmission of Zika virus, French Polynesia, December 2013 and February 2014. Euro Surveill. 2014;19(13).

Blitvich BJ, Firth AE. Insect-specific flaviviruses: a systematic review of their discovery, host range, mode of transmission, superinfection exclusion potential and genomic organization. Viruses. 2015;7(4):1927-59.

Bolling BG, Weaver SC, Tesh RB, Vasilakis N. Insect-Specific Virus Discovery: Significance for the Arbovirus Community. Viruses. 2015;7(9):4911-28.

Boorman JP, Porterfield JS. A simple technique for infection of mosquitoes with viruses; transmission of Zika virus. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1956;50(3):238-42.

Bordi L, Avsic-Zupanc T, Lalle E, Vairo F, Capobianchi MR, da Costa Vasconcelos PF. Emerging Zika Virus Infection: A Rapidly Evolving Situation. Adv Exp Med Biol. 2017;972:61-86.

Bracco JE, Capurro ML, Lourenço-de-Oliveira R, Sallum MA. Genetic variability of *Aedes aegypti* in the Americas using a mitochondrial gene: evidence of multiple introductions. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2007;102(5):573-80.

Braga IA, Valle D. *Aedes aegypti*: history of control in Brazil. Epidemiologia e Serviços de Saúde. 2007.

Braks MA, Honório NA, Lourenço-De-Oliveira R, Juliano SA, Lounibos LP. Convergent habitat segregation of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in southeastern Brazil and Florida. J Med Entomol.

2003;40(6):785-94.

Brasil P, Pereira JP, Moreira ME, Ribeiro Nogueira RM, Damasceno L, Wakimoto M, et al. Zika Virus Infection in Pregnant Women in Rio de Janeiro. *N Engl J Med*. 2016;375(24):2321-34.

Brasil P, Sequeira PC, Freitas AD, Zogbi HE, Calvet GA, de Souza RV, et al. Guillain-Barré syndrome associated with Zika virus infection. *Lancet*. 2016;387(10026):1482.

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.

Campos GS, Bandeira AC, Sardi SI. Zika Virus Outbreak, Bahia, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2015;21(10):1885-6.

Campos SS, Fernandes RS, Dos Santos AAC, de Miranda RM, Telleria EL, Ferreira-de-Brito A, et al. Zika virus can be venereally transmitted between *Aedes aegypti* mosquitoes. *Parasit Vectors*. 2017;10(1):605.

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.

Carey DE. Chikungunya and dengue: a case of mistaken identity? *J Hist Med Allied Sci*. 1971;26(3):243-62.

Centre d'hygiène et de salubrité publique. Note sur les investigations autour des malformations cérébrales congénitales ayant suivi l'épidémie de zika de 2013–2014 2014 [Available from: http://www.hygiene-publique.gov.pf/IMG/pdf/note_malformations_congenitales_cerebrales.pdf.

Chouin-Carneiro T, Vega-Rua A, Vazeille M, Yebakima A, Girod R,

Goindin D, et al. Differential Susceptibilities of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from the Americas to Zika Virus. PLoS Negl Trop Dis. 2016;10(3):e0004543.

Chretien JP, Anyamba A, Bedno SA, Breiman RF, Sang R, Seron K, et al. Drought-associated chikungunya emergence along coastal East Africa. Am J Trop Med Hyg. 2007;76(3):405-7.

Ciota AT, Bialosuknia SM, Ehrbar DJ, Kramer LD. Vertical Transmission of Zika Virus by *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* Mosquitoes. Emerg Infect Dis. 2017;23(5):880-2.

Consoli RAGB, Lourenço-de-Oliveira R. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. 1994. 228 p.

Araújo TVB, Rodrigues LC, de Alencar Ximenes RA, de Barros Miranda-Filho D, Montarroyos UR, de Melo APL, et al. Association between Zika virus infection and microcephaly in Brazil, January to May, 2016: preliminary report of a case-control study. Lancet Infect Dis. 2016;16(12):1356-63.

Diallo M, Sall AA, Moncayo AC, Ba Y, Fernandez Z, Ortiz D, et al. Potential role of sylvatic and domestic African mosquito species in dengue emergence. Am J Trop Med Hyg. 2005;73(2):445-9.

Dick GW, Kitchen SF, Haddock AJ. Zika virus. I. Isolations and serological specificity. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1952;46(5):509-20.

Dick BO. et al. The history of dengue outbreaks in the Americas. Am J Trop Med Hyg, v. 87, n. 4, p. 584-93, Oct 2012. ISSN 1476-1645. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23042846> >.

Duchemin JB, Mee PT, Lynch SE, Vedururu R, Trinidad L, Paradkar P. Zika vector transmission risk in temperate Australia: a vector competence study.

Virol J. 2017;14(1):108.

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.

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.

Dutra HL, Rocha MN, Dias FB, Mansur SB, Caragata EP, Moreira LA. Wolbachia Blocks Currently Circulating Zika Virus Isolates in Brazilian *Aedes aegypti* Mosquitoes. *Cell Host Microbe*. 2016;19(6):771-4.

Dye C. Vectorial capacity: must we measure all its components? *Parasitol Today*. 1986;2(8):203-9.

Dye C. Epidemiological significance of vector-parasite interactions. *Parasitology*. 1990;101 Pt 3:409-15.

Ehrbar DJ, et al. High levels of local inter- and intra-host genetic variation of West Nile virus and evidence of fine-scale evolutionary pressures. *Infect Genet Evol*, v. 51, p. 219-226, 07 2017. ISSN 1567-7257. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28411164> >.

Elizondo-Quiroga D, Medina-Sánchez A, Sánchez-González JM, Eckert KA, Villalobos-Sánchez E, Navarro-Zúñiga AR, et al. Zika Virus in Salivary Glands of Five Different Species of Wild-Caught Mosquitoes from Mexico. *Sci Rep*. 2018;8(1):809.

Epelboin Y, Talaga S, Epelboin L, Dusfour I. Zika virus: An updated review of competent or naturally infected mosquitoes. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11(11):e0005933.

Fernandes RS, Campos SS, Ferreira-de-Brito A, Miranda RM, Barbosa da Silva KA, Castro MG, et al. *Culex quinquefasciatus* from Rio de Janeiro Is Not Competent to Transmit the Local Zika Virus. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(9):e0004993.

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.

Foy BD, Kobylinski KC, Chilson Foy JL, Blitvich BJ, Travassos da Rosa A, Haddow AD, et al. Probable non-vector-borne transmission of Zika virus, Colorado, USA. *Emerg Infect Dis*. 2011;17(5):880-2.

Fu S, Song S, Liu H, Li Y, Li X, Gao X, et al. ZIKA virus isolated from mosquitoes: a field and laboratory investigation in China, 2016. *Sci China Life Sci*. 2017;60(12):1364-71.

Garret-Jones C. The human blood index of malaria vectors in relation to epidemiological assessment. *Bull World Health Organ*. 1964;30:241-61.

Gubler DJ, Clark GG. Dengue/dengue hemorrhagic fever: the emergence of a global health problem. *Emerg Infect Dis*. 1995;1(2):55-7.

Guedes DR, Paiva MH, Donato MM, Barbosa PP, Krokovsky L, Rocha SWDS, et al. Zika virus replication in the mosquito *Culex quinquefasciatus* in Brazil. *Emerg Microbes Infect*. 2017;6(8):e69.

Guo XX, Li CX, Deng YQ, Xing D, Liu QM, Wu Q, et al. *Culex pipiens quinquefasciatus*: a potential vector to transmit Zika virus. *Emerg Microbes Infect*. 2016;5(9):e102.

Guzman MG, Halstead SB, Artsob H, Buchy P, Farrar J, Gubler DJ, et al.

Dengue: a continuing global threat. *Nat Rev Microbiol.* 2010;8(12 Suppl):S7-16.

Guzmán MG, Kourí G. Dengue: an update. *Lancet Infect Dis.* 2002;2(1):33-42.

Haddow AJ, Williams MC, Woodall JP, Simpson DI, Goma LK. Twelve isolations of zika virus from *Aedes (Stegomyia) africanus* (Theobald) taken in and above a Uganda forest. *Bull World Health Organ.* 1964;31:57-69.

Hart CE, Roundy CM, Azar SR, Huang JH, Yun R, Reynolds E, et al. Zika Virus Vector Competency of Mosquitoes, Gulf Coast, United States. *Emerg Infect Dis.* 2017;23(3):559-60.

Hogg JC, Hurd H. Malaria-induced reduction of fecundity during the first gonotrophic cycle of *Anopheles stephensi* mosquitoes. *Med Vet Entomol.* 1995;9(2):176-80.

Honório NA, Castro MG, Barros FS, Magalhães MeA, Sabroza PC. The spatial distribution of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in a transition zone, Rio de Janeiro, Brazil. *Cad Saude Publica.* 2009;25(6):1203-14.

Jackson BT, Brewster CC, Paulson SL. La Crosse virus infection alters blood feeding behavior in *Aedes triseriatus* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol.* 2012;49(6):1424-9.

Jahan N, Hurd H. Effect of *Plasmodium yoelii nigeriensis* (Haemosporidia: Plasmodiidae) on *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae) vitellogenesis. *J Med Entomol.* 1998;35(6):956-61.

Kenney JL, Brault AC. The role of environmental, virological and vector interactions in dictating biological transmission of arthropod-borne viruses by mosquitoes. *Adv Virus Res.* 2014;89:39-83.

Kostyuchenko VA, Lim EX, Zhang S, Fibriansah G, Ng TS, Ooi JS, et al.

Structure of the thermally stable Zika virus. *Nature*. 2016;533(7603):425-8.

Kraemer MU, Sinka ME, Duda KA, Mylne AQ, Shearer FM, Barker CM, et al. The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*. *Elife*. 2015;4:e08347.

Kucharski AJ, Funk S, Eggo RM, Mallet HP, Edmunds WJ, Nilles EJ. Transmission Dynamics of Zika Virus in Island Populations: A Modelling Analysis of the 2013-14 French Polynesia Outbreak. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(5):e0004726.

Lea A. O., Diamond J. B., and DeLong D. N. Role of diet in egg development by mosquitoes (*Aedes aegypti*). *Science*, Wash. 1956.123, 890-891.

Leake CJ. Arbovirus-mosquito interactions and vector specificity. *Parasitol Today*. 1992;8(4):123-8.

Li MI, Wong PS, Ng LC, Tan CH. Oral susceptibility of Singapore *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (Linnaeus) to Zika virus. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(8):e1792.

Lima-Camara TN, Honório NA, Lourenço-de-Oliveira R. [Frequency and spatial distribution of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera, Culicidae) in Rio de Janeiro, Brazil]. *Cad Saude Publica*. 2006;22(10):2079-84.

Lindenbach BD, Rice CM. Molecular biology of flaviviruses. *Adv Virus Res*. 2003;59:23-61.

Lowe R, Barcellos C, Brasil P, Cruz OG, Honório NA, Kuper H, et al. The Zika Virus Epidemic in Brazil: From Discovery to Future Implications. *Int J Environ Res Public Health*. 2018;15(1).

Löwy I. Yellow fever in Rio de Janeiro and the Pasteur Institute Mission

(1901-1905): the transfer of science to the periphery. *Med Hist.* 1990;34(2):144-63.

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.

Maciel-de-Freitas R, Marques WA, Peres RC, Cunha SP, de Oliveira RL. Variation in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) container productivity in a slum and a suburban district of Rio de Janeiro during dry and wet seasons. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2007;102(4):489-96.

Macnamara FN. Zika virus: a report on three cases of human infection during an epidemic of jaundice in Nigeria. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1954;48(2):139-45.

Marchette NJ, Garcia R, Rudnick A. Isolation of Zika virus from *Aedes aegypti* mosquitoes in Malaysia. *Am J Trop Med Hyg.* 1969;18(3):411-5.

Mellor PS. Replication of arboviruses in insect vectors. *J Comp Pathol.* 2000;123(4):231-47.

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.

Moore DL, Causey OR, Carey DE, Reddy S, Cooke AR, Akinkugbe FM, et al. Arthropod-borne viral infections of man in Nigeria, 1964-1970. *Ann Trop Med Parasitol.* 1975;69(1):49-64.

Musso D, Gubler DJ. Zika Virus. *Clin Microbiol Rev.* 2016;29(3):487-524.

Mustafa MS, Rasotgi V, Jain S, Gupta V. Discovery of fifth serotype of dengue virus (DENV-5): A new public health dilemma in dengue control. *Med J*

Armed Forces India. 2015;71(1):67-70.

Nogueira RM, de Araújo JM, Schatzmayr HG. Dengue viruses in Brazil, 1986-2006. *Rev Panam Salud Publica*. 2007;22(5):358-63.

Nogueira RM, de Araújo JM, Schatzmayr HG. Dengue viruses in Brazil, 1986-2006. *Rev Panam Salud Publica*. 2007;22(5):358-63.

Nunes MR, Faria NR, de Vasconcelos JM, Golding N, Kraemer MU, de Oliveira LF, et al. Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil. *BMC Med*. 2015;13:102.

Olson JG, Ksiazek TG, Suhandiman, Triwibowo. Zika virus, a cause of fever in Central Java, Indonesia. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1981;75(3):389-93.

Osanai CH, Travassos da Rosa AP, Tang AT, do Amaral RS, Passos AD, Tauil PL. [Dengue outbreak in Boa Vista, Roraima. Preliminary report]. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1983;25(1):53-4.

PAHO, WHO. Number of Reported Cases of Chikungunya Fever in the Americas, by Country or Territory 2017 (to week noted). 2017. <Acessado em: 20 de fevereiro de 2018>.

PAHO, WHO. PLISA: Most recent reported cases on Dengue. 2017. <Acessado em: 20 de fevereiro de 2018>.

PAHO, WHO. Zika cases and congenital syndrome associated with Zika virus reported by countries and territories in the Americas, 2015-2017 cumulative cases. 2017. <Acessado em Janeiro de 2018>.

Pinheiro F, Nelson M. Re-Emergence of Dengue and Emergence of Dengue Haemorrhagic Fever in the Americas. 1997.

Platt KB, Linthicum KJ, Myint KS, Innis BL, Lerdthusnee K, Vaughn DW. Impact of dengue virus infection on feeding behavior of *Aedes aegypti*. *Am J Trop*

Med Hyg. 1997;57(2):119-25.

Poulin R, Thomas F. Phenotypic variability induced by parasites: Parasitol Today. 1999;15(1):28-32.

Powell JR, Tabachnick WJ, Arnold J. Genetics and the origin of a vector population: *Aedes aegypti*, a case study. Science. 1980;208(4450):1385-7.

Powers AM, Brault AC, Tesh RB, Weaver SC. Re-emergence of Chikungunya and O'nyong-nyong viruses: evidence for distinct geographical lineages and distant evolutionary relationships. J Gen Virol. 2000;81(Pt 2):471-9.

Powers AM, Logue CH. Changing patterns of chikungunya virus: re-emergence of a zoonotic arbovirus. J Gen Virol. 2007;88(Pt 9):2363-77.

ROSS RW. The Newala epidemic. III. The virus: isolation, pathogenic properties and relationship to the epidemic. J Hyg (Lond). 1956;54(2):177-91.

Roundy CM, Azar SR, Rossi SL, Huang JH, Leal G, Yun R, et al. Variation in *Aedes aegypti* Mosquito Competence for Zika Virus Transmission. Emerg Infect Dis. 2017;23(4):625-32.

Rückert C, Weger-Lucarelli J, Garcia-Luna SM, Young MC, Byas AD, Murrieta RA, et al. Impact of simultaneous exposure to arboviruses on infection and transmission by *Aedes aegypti* mosquitoes. Nat Commun. 2017;8:15412.

Sang RC, Ahmed O, Faye O, Kelly CL, Yahaya AA, Mmadi I, et al. Entomologic investigations of a chikungunya virus epidemic in the Union of the Comoros, 2005. Am J Trop Med Hyg. 2008;78(1):77-82.

Schneider J, Droll D. A Time Line for Dengue in the Americas to December 31, 2000 and Noted First Occurrences. Washington, DC: Pan American Health Organization; 2001. Disponível

em: www.paho.org/English/HCP/HCT/VBD/dengue_finaltime.doc.

Scott TW, Clark GG, Lorenz LH, Amerasinghe PH, Reiter P, Edman JD. Detection of multiple blood feeding in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) during a single gonotrophic cycle using a histologic technique. J Med Entomol. 1993;30(1):94-9.

Shi, W. et al. Increasing genetic diversity of Zika virus in the Latin American outbreak. Emerg Microbes Infect, v. 5, p. e68, Jul 2016. ISSN 2222-1751. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27381219> >.

Simpson DI. Zika virus infection in man. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1964;58:335-8.

Smith CE. The history of dengue in tropical Asia and its probable relationship to the mosquito *Aedes aegypti*. J Trop Med Hyg. 1956;59(10):243-51.

Song S, Li Y, Fu S, Liu H, Li X, Gao X, et al. Could Zika virus emerge in Mainland China? Virus isolation from nature in *Culex quinquefasciatus*, 2016. Emerg Microbes Infect. 2017;6(11):e93.

Steel A, Gubler DJ, Bennett SN. Natural attenuation of dengue virus type-2 after a series of island outbreaks: a retrospective phylogenetic study of events in the South Pacific three decades ago. Virology. 2010;405(2):505-12.

Stewart RD, Bryant SN, Sheffield JS. West Nile virus infection in pregnancy. Case Rep Infect Dis. 2013;2013:351872.

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.

Tabachnick WJ. Nature, nurture and evolution of intra-species variation in

mosquito arbovirus transmission competence. *Int J Environ Res Public Health*. 2013;10(1):249-77.

Tan PC, Rajasingam G, Devi S, Omar SZ. Dengue infection in pregnancy: prevalence, vertical transmission, and pregnancy outcome. *Obstet Gynecol*. 2008;111(5):1111-7.

Teixeira MG, Andrade AM, Costa MaC, Castro JN, Oliveira FL, Goes CS, et al. East/Central/South African genotype chikungunya virus, Brazil, 2014. *Emerg Infect Dis*. 2015;21(5):906-7.

Teixeira MG, Costa MaC, de Oliveira WK, Nunes ML, Rodrigues LC. The Epidemic of Zika Virus-Related Microcephaly in Brazil: Detection, Control, Etiology, and Future Scenarios. *Am J Public Health*. 2016;106(4):601-5.

Tesh RB, Bolling BG, Beaty BJ. Role of Vertical Transmission in Mosquito-borne Arbovirus Maintenance and Evolution. Caister Academic Press 2016.

Thangamani S, Huang J, Hart CE, Guzman H, Tesh RB. Vertical Transmission of Zika Virus in *Aedes aegypti* Mosquitoes. *Am J Trop Med Hyg*. 2016;95(5):1169-73.

Thompson WH, Beaty BJ. Venereal transmission of La Crosse virus from male to female *Aedes triseriatus*. *Am J Trop Med Hyg*. 1978;27(1 Pt 1):187-96.

Tsetsarkin KA, Weaver SC. Sequential adaptive mutations enhance efficient vector switching by Chikungunya virus and its epidemic emergence. *PLoS Pathog*. 2011;7(12): e1002412.

Twiddy SS, Holmes EC, Rambaut A. Inferring the rate and time-scale of dengue virus evolution. *Mol Biol Evol*. 2003;20(1):122-9.

Wang E, Ni H, Xu R, Barrett AD, Watowich SJ, Gubler DJ, et al. Evolutionary relationships of endemic/epidemic and sylvatic dengue viruses. *J*

Viol. 2000;74(7):3227-34.

Wang, A. et al. Zika virus genome biology and molecular pathogenesis. *Emerg Microbes Infect*, v. 6, n. 3, p. e13, Mar 2017. ISSN 2222-1751. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28325921> >.

Weaver SC, Osorio JE, Livengood JA, Chen R, Stinchcomb DT. Chikungunya virus and prospects for a vaccine. *Expert Rev Vaccines*. 2012;11(9):1087-101.

Weger-Lucarelli J, Rückert C, Chotiwan N, Nguyen C, Garcia Luna SM, Fauver JR, et al. Vector Competence of American Mosquitoes for Three Strains of Zika Virus. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(10):e0005101.

Wikan N, Smith DR. First published report of Zika virus infection in people: Simpson, not MacNamara. *Lancet Infect Dis*. 2017;17(1):15-7.

Wilson AJ, Morgan ER, Booth M, Norman R, Perkins SE, Hauffe HC, et al. What is a vector? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2017;372(1719).

Yuan L, Huang XY, Liu ZY, Zhang F, Zhu XL, Yu JY, et al. A single mutation in the prM protein of Zika virus contributes to fetal microcephaly. *Science*. 2017;358(6365):933-6.

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.

8. Anexos

Figura 3. Dados brutos – sucesso de oviposição dos mosquitos.

- A) Sucesso de oviposição considerando tratamento (CTRL; INF; SINIF)
- B) Sucesso de oviposição considerando as populações (Barra; Porto; Deodoro)
- C) Sucesso de oviposição considerando o ciclo gonotrófico das fêmeas/ idade.

Verde: Depositou ao menos um ovo / Vermelho: Não realizou oviposição

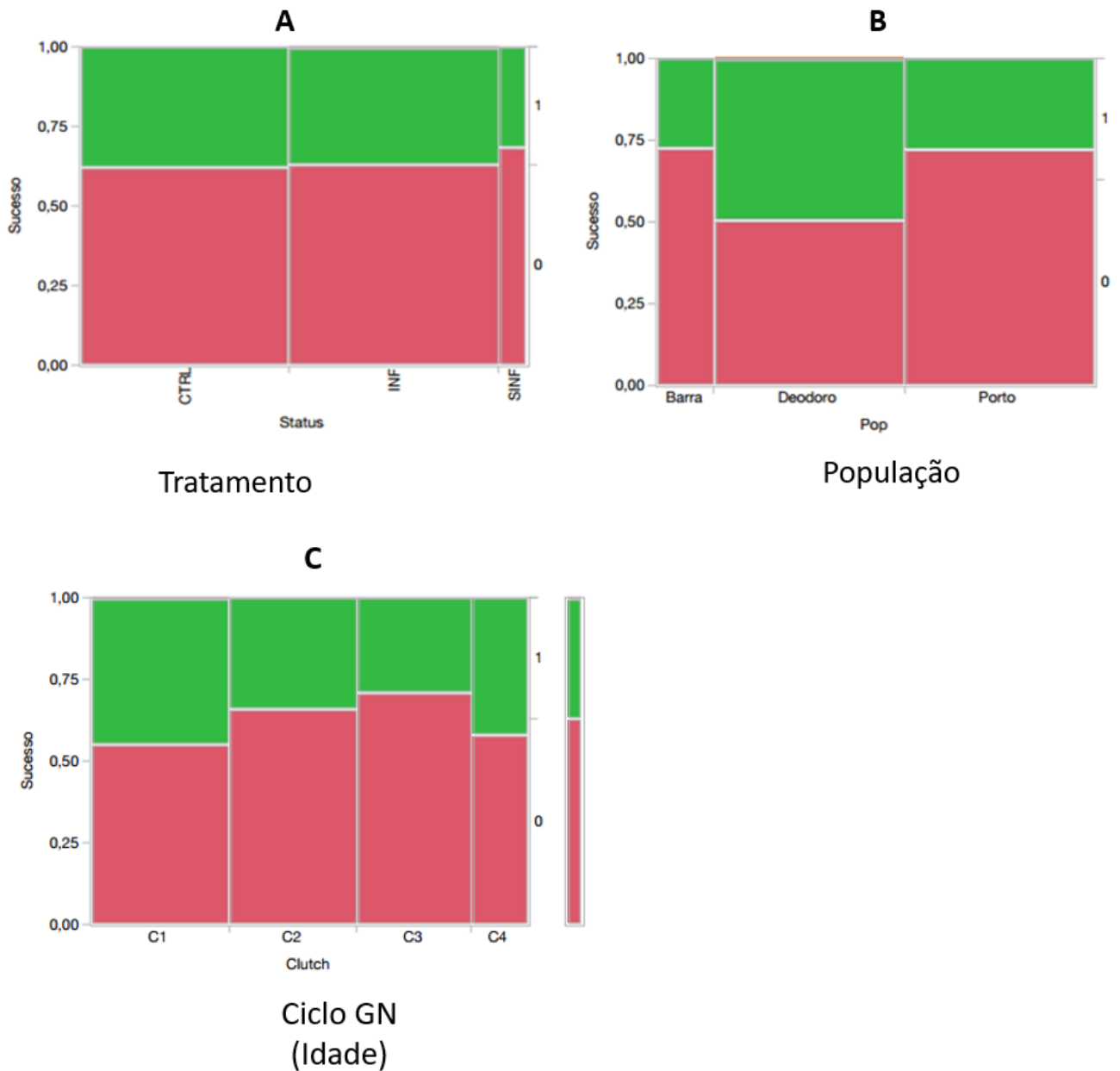


Figura 4. Dados brutos – fecundidade – Média de ovos depositados por cada mosquito.

