

Ministério da Saúde

FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz

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

**Gabriel Sylvestre Ribeiro**

**Impacto da infecção com o vírus dengue 2 no comportamento  
alimentar, longevidade e fecundidade de fêmeas de *Aedes*  
*aegypti***

Dissertação de mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação  
em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz  
para obtenção do grau de Mestre em ciências.  
Área de concentração: Ecologia e Epidemiologia.

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

**RIO DE JANEIRO**

2012

i

Trabalho realizado no período de março de 2010 a março de 2012,  
no Laboratório de Transmissores de Hematozoários,  
Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz,  
sob a orientação do Prof. Dr. Rafael Maciel de Freitas

Ficha catalográfica elaborada pela

Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

R484

Ribeiro, Gabriel Sylvestre.

Impacto da infecção com o vírus dengue 2 no comportamento alimentar, longevidade e fecundidade de fêmeas de *Aedes aegypti* /

Gabriel Sylvestre Ribeiro. – Rio de Janeiro, 2012.

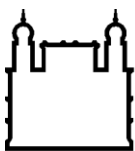
xi, 80 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2012.

Bibliografia: f. 70-80

1. *Aedes aegypti*. 2. Vírus dengue. 3. Comportamento Alimentar.  
4. Sobrevivência. 5. Longevidade. 6. Fecundidade. I.Título.

CDD 616.91852



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

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

**AUTOR: Gabriel Sylvestre Ribeiro**

Impacto da infecção com o vírus dengue 2 no comportamento  
alimentar, longevidade e fecundidade de fêmeas de *Aedes*  
*aegypti*

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

**EXAMINADORES:**

**Presidente:** Prof. Dr. Marcos Henrique Ferreira Sorgine  
Prof. Dr. Luciano Andrade Moreira  
Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>a</sup>. Denise Valle  
Prof. Dr. Jayme Augusto de Souza Neto  
Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>a</sup>. Flávia Barreto dos Santos

Rio de Janeiro, 23 de março de 2012.

“A dúvida é o principio da sabedoria”

Aristóteles

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador e amigo Rafael Freitas pelo enorme apoio na criação, desenvolvimento e finalização desta dissertação, pela constante, agradável e enriquecedora convivência, pela credibilidade e confiança em mim depositadas, por me incentivar e me fazer acreditar no meu futuro profissional.

Ao meu sempre orientador e amigo Ricardo Lourenço pela confiança e credibilidade a mim conferidas, pelos incontáveis e nunca recusados momentos de ensinamento, consultoria e ajuda, por fazer do Laboratório de Transmissores de Hematozoários um excelente local de trabalho e por ser simplesmente meu maior exemplo profissional.

À minha noiva Patrícia Oliveira por ser quem ela é. Por estar mais do que presente em absolutamente todos os momentos não só do mestrado, mas da minha vida e por ser a pessoa que mais me incentiva a alcançar meus objetivos e realizar meus sonhos.

Aos meus colegas de laboratório e amigos Bianca Pimenta, Lilha Barbosa, Maycon Neves, Mariana David, Reginaldo Rego e Roberto Peres por estarem sempre presentes e disponíveis nos momentos de alegria e necessidade, pelo apoio irrestrito no desenvolvimento dos desgastantes e complexos experimentos que desenvolvemos durante o mestrado e principalmente pela convivência praticamente familiar que construímos ao longo do tempo.

Aos amigos Edson Dantas, Marcelo Celestino, Renato Carvalho e Trajano Porto pelos momentos de descontração e apoio.

Ao apoio e suporte dado pela equipe do Laboratório de Imunologia Viral (IOC/Fiocruz RJ), especialmente por Mariana Gandini, Amanda Torrentes, Cíntia Marinho, Raimundo Júnior e Claire Kubelka, que me acolheram sem restrições e com muito carinho.

À minha família que, por mais que se preocupe em demasiado com o meu futuro, não deixou de acreditar no meu potencial.

A Deus, por tudo.

## ÍNDICE

RESUMO	x
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Dengue: a doença e o vírus	1
1.2. O vetor	4
1.2.1. Aspectos básicos de sua biologia	4
1.2.2. Hábito alimentar	6
1.2.2.1. Larvas e pupas	6
1.2.2.2. Adultos	7
1.2.2.2.1. Machos	7
1.2.2.2.2. Fêmeas	7
1.3. Perspectiva evolutiva da interação parasito-hospedeiro	9
1.4. Capacidade Vetorial	11
1.5 <i>Aedes aegypti</i> x DENV	12
2. JUSTIFICATIVA	16
3. OBJETIVO	18
3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
4. MATERIAIS E MÉTODOS	19
4.1. Obtenção dos mosquitos	19
4.2. Criação dos mosquitos em laboratório	20
4.3. Obtenção do vírus	20
4.3.1. Cepa viral	21
4.3.2. Vírus ultracentrifugado	21
4.3.3. Titulação do estoque viral	22
4.4. Competência às quatro amostras do vírus dengue	22
4.5. Infecção oral com vírus dengue para estudo do comportamento alimentar	23
4.6. Detecção do vírus dengue nos mosquitos por imunofluorescência indireta	24
4.7. Comportamento alimentar de <i>Ae. aegypti</i>	25
4.7.1. Análise dos dados (comportamento alimentar)	27
4.8. Monitoramento da sobrevivência diária	28
4.8.1. Análise dos dados (sobrevivência)	29
4.9. Fecundidade e quantificação da alimentação sanguínea	30
4.9.1. Análise dos dados (fecundidade)	32
5. RESULTADOS	33
5.1. Obtenção do vírus	33
5.2. Comportamento alimentar	34
5.2.1. Tempo de início	36
5.2.2. Número de provas	38
5.2.3. Tempo de prova	39
5.2.4. Tempo de ingestão	40
5.2.5. Tempo total	42
5.3. Sobrevivência	44
5.4. Fecundidade	51
6. DISCUSSÃO	60
7. CONCLUSÃO	68
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.1</b>	<b>4</b>
<b>Figura 1.2</b>	<b>13</b>
<b>Figura 1.3</b>	<b>14</b>
<b>Figura 4.1</b>	<b>24</b>
<b>Figura 4.2</b>	<b>28</b>
<b>Figura 4.3</b>	<b>31</b>
<b>Figura 5.1</b>	<b>36</b>
<b>Figura 5.2</b>	<b>37</b>
<b>Figura 5.3</b>	<b>38</b>
<b>Figura 5.4</b>	<b>39</b>
<b>Figura 5.5</b>	<b>40</b>
<b>Figura 5.6</b>	<b>41</b>
<b>Figura 5.7</b>	<b>42</b>
<b>Figura 5.8</b>	<b>43</b>
<b>Figura 5.9</b>	<b>44</b>
<b>Figura 5.10</b>	<b>46</b>
<b>Figura 5.11-A</b>	<b>47</b>
<b>Figura 5.11-B</b>	<b>47</b>
<b>Figura 5.12-A</b>	<b>48</b>
<b>Figura 5.12-B</b>	<b>48</b>
<b>Figura 5.12-C</b>	<b>49</b>
<b>Figura 5.13</b>	<b>51</b>
<b>Figura 5.14</b>	<b>55</b>
<b>Figura 5.15</b>	<b>55</b>
<b>Figura 5.16</b>	<b>57</b>
<b>Figura 5.17</b>	<b>58</b>
<b>Figura 5.18</b>	<b>58</b>



## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 5.1</b>	<b>34</b>
<b>Tabela 5.2</b>	<b>35</b>
<b>Tabela 5.3</b>	<b>45</b>
<b>Tabela 5.4</b>	<b>50</b>
<b>Tabela 5.5</b>	<b>53</b>
<b>Tabela 5.6</b>	<b>56</b>
<b>Tabela 5.7</b>	<b>59</b>

## RESUMO

O vírus da dengue é transmitido nas Américas por mosquitos *Aedes aegypti*. Este é adquirido através da picada em um hospedeiro em viremia e passa por intensa replicação em diferentes tecidos do inseto até tornar-se transmissível, após as partículas virais atingirem a luz das glândulas salivares. A partir deste momento o vírus pode ser inoculado, juntamente com a saliva, em todos os hospedeiros suscetíveis nos quais a fêmea se alimentar. Supõe-se que o vírus da dengue gere efeitos negativos sobre a biologia do mosquito, diminuindo o fitness dos indivíduos infectados. Apesar dos avanços recentes no conhecimento acerca de sua capacidade vetorial, ainda existem muitas lacunas na interação mosquito-vírus no par *Ae. aegypti*/dengue. Desta maneira, nosso objetivo é avaliar o impacto da infecção por DENV-2 no hábito alimentar do mosquito *Ae. aegypti* e, adicionalmente, monitorar a sobrevivência, longevidade, sucesso de oviposição e fecundidade de insetos infectados e controles. Duas populações foram testadas: Paea, confinada em laboratório desde 1994, e uma população de campo, coletada com o uso de ovitrampas em Tubiacanga (RJ). Fêmeas das duas populações foram aleatoriamente selecionadas para receber sangue infectado com  $2 \times 10^{-8}$  partículas de DENV-2 ou sangue com sobrenadante de cultura de célula livre de vírus, constituindo o grupo controle. Após a infecção oral, as fêmeas que estavam visualmente ingurgitadas foram confinadas individualmente em tubos de plástico. Ao longo de cinco semanas monitoramos aspectos de sua biologia e capacidade vetorial, tais como sua sobrevivência, fecundidade e cinco parâmetros do comportamento alimentar: tempo de início, o tempo gasto na localização do hospedeiro (camundongo anestesiado); o número de provas, quantas vezes a fêmea insere e retira sua probóscide do corpo do hospedeiro; tempo de prova, que termina quando notamos a inflação abdômen; o tempo de ingestão, que vai até a repleção total e retirada da probóscide do corpo do hospedeiro; tempo total de alimentação, a soma dos tempos de início, prova e ingestão. Utilizando uma análise de risco, fomos capazes de observar que a infecção pelo DENV-2 não modificou o hábito alimentar das fêmeas de *Ae. aegypti*. Por outro lado, a sobrevivência e a fecundidade foram menores quando a fêmea estava infectada com DENV-2. Através de uma ANOVA, observamos a influência da infecção na longevidade ( $F = 20,75$ ,  $gl = 1$ ,  $P = 0,0001$ ). A curva de sobrevivência das fêmeas infectadas apresentou queda significativamente mais intensa que a dos seus pares não-infectados ( $\chi^2 = 16,5$ ,  $gl = 1$ ,  $P < 0,001$ ). Em relação à fecundidade, fêmeas infectadas têm menor sucesso de oviposição, ou seja, menor probabilidade de colocar ovos ( $\chi^2 = 14,40$ ,  $gl = 3$ ,  $p = 0,0024$ ). Além disso, as fêmeas infectadas fazem a postura de um número significativamente menor de ovos do que seus pares não infectados.

## ABSTRACT

Dengue virus is transmitted in the Americas by *Aedes aegypti* mosquitoes. This virus is acquired from an infected host through the bite and undergoes intense replication in different tissues of the insect becoming transmissible only after the viral particles reach the lumen of salivary glands. From this moment on the virus can be inoculated with saliva into all susceptible hosts the female will eat. It is assumed that the dengue virus generates negative effects on the mosquito's biology, decreasing the fitness of infected individuals. Despite recent advances in knowledge of the *Ae. aegypti* vectorial capacity, there are still many gaps in the knowledge of the interaction between *Ae. aegypti* / dengue. Thus, our goal is to evaluate the impact of infection with DENV-2 in the feeding habits of the mosquito *Ae. aegypti* and additionally monitor the survival, longevity, oviposition success and fecundity of infected and control insects. Two populations were tested: Paean, confined in the laboratory since 1994, and one from the field, collected using ovitraps in Tubiacanga (RJ). Females of both populations were randomly selected to receive blood infected with  $2 \times 10^8$  particules of DENV-2 or blood culture supernatant from virus-free cells, constituting the control group. After oral infection, the visually engorged females were separated individually in plastic tubes. We have monitored, over five weeks, aspects of their biology and vectorial capacity, such as survival, fecundity and five parameters of their feeding behavior: start time, the time spent in locating the host (anesthetized mice); the number of probes, how many times the female inserts and takes off her proboscis; probing time, that ends when we notice the abdomen inflation; ingestion time, that goes until the total repletion and proboscis withdrawal from the mouse's body; total feeding time, the sum of start, probing and ingestion times. Using a failure-time analysis, we were able to observe that infection with DENV-2 did not change the feeding habits of *Ae. aegypti*. Moreover, the survival and fecundity were lower when the female was infected with DENV-2. Using an ANOVA, we observed the influence of infection on longevity ( $F = 20.75$ ,  $df = 1$ ,  $P = 0.0001$ ). The survivorship of infected females showed a significantly more intense mortality than that of their non-infected counterparts ( $\chi^2 = 16.5$ ,  $df = 1$ ,  $P < 0.001$ ). Regarding fecundity, infected females had a low oviposition success, i.e., they were less likely to lay eggs ( $\chi^2 = 14.40$ ,  $df = 3$ ,  $p = 0.0024$ ). Moreover, the postures of infected females had significantly lower numbers of eggs than the ones from their uninfected peers.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Dengue: a doença e o vírus

A dengue é considerada uma das doenças infecciosas mais relevantes no cenário mundial da saúde pública, causando grandes impactos sociais e econômicos nas regiões endêmicas (Gubler 2004). Estima-se que aproximadamente 40% da população mundial, ou cerca de 2 bilhões de pessoas, vivam em áreas de risco, havendo registro de 50 a 100 milhões de casos e mais de 24.000 óbitos por ano por dengue ao redor do mundo (WHO 1997, Halstead 2008). A dengue apresenta maior incidência e prevalência em zonas tropicais, onde em muitas regiões há crescimento urbano desordenado e condições climáticas e ambientais adequadas para a manutenção do seu ciclo de transmissão.

O vírus dengue é um arbovírus de RNA fita simples positiva que pertence à família Flaviviridae, gênero *Flavivirus* e apresenta quatro sorotipos antigenicamente distintos – DENV-1, -2, -3 e -4 (Gubler e Kuno 1997). A dengue pode manifestar-se sob diferentes quadros, desde o Dengue Clássico, com infecções assintomáticas ou febris, até as reações hemorrágicas, que caracterizam a Febre Hemorrágica do Dengue, podendo culminar em choque hipovolêmico, conhecida como Síndrome de Choque do Dengue (WHO 1997). Estes sintomas podem acontecer com a infecção de qualquer um dos quatro sorotipos virais, sendo a gravidade da infecção resultante de diversos fatores como genótipo e carga viral, sistema imune do hospedeiro e interação vírus-célula em humanos e mosquitos (Martina et al. 2009).

As primeiras epidemias reportadas de dengue ocorreram ainda no século XVIII, no ano de 1779 na Ásia e um ano depois já na América, na Filadélfia (EUA) (Pontes e Ruffino Netto 1994). No Brasil, os primeiros relatos de doença febril com sintomas semelhantes aos da dengue

ocorreram no período de 1846 a 1853, quando ocorreram epidemias em São Paulo e no Rio de Janeiro (Barreto e Teixeira 2008). As primeiras publicações que citam estas epidemias datam de 1916 (Meira 1916), na cidade de São Paulo, e em Niterói, no ano de 1923 (Pedro 1923). Em 1928, um navio francês com casos suspeitos esteve em Salvador, Bahia, mas não houve circulação do vírus na população dessa capital (Soares 1928, Barreto e Teixeira 2008). A primeira epidemia brasileira nos anos recentes foi registrada em 1981, quando os sorotipos 1 e 4 co-circularam na cidade de Boa Vista, estado de Roraima. Neste momento, uma intensa ação de controle conseguiu conter o avanço e posterior dispersão do sorotipo -4 para as demais regiões do Brasil. Anos mais tarde, em 1986, registrou-se uma epidemia de DENV1 na cidade do Rio de Janeiro que rapidamente atingiu a região Nordeste do país (Braga e Valle 2007, Osanai 1984). Não se sabe se os casos registrados de DENV-1 no Rio de Janeiro em 1986 estão epidemiologicamente relacionados aos casos de Boa Vista em 1981, mas é fato que depois que o vírus dengue alcançou a capital fluminense, daqui não mais foi erradicado. Em 1990 ocorreu a primeira epidemia do sorotipo 2 na cidade do Rio de Janeiro (Nogueira et al. 1990) e em 2000, em Nova Iguaçu (RJ), registrou-se uma epidemia do sorotipo 3 (Nogueira et al. 2001). Notadamente, depois de detectados em Municípios do Estado do Rio de Janeiro, os sorotipos DENV-1, -2 e -3 foram disseminados para diversas regiões do Brasil, provavelmente de forma passiva (Hemme et al. 2010). Recentemente, o Brasil experimentou a reintrodução do sorotipo DENV-4, detectado primeiramente na cidade de Boa Vista, Roraima, em 2010 (Temporão et al. 2011, Maciel-de-Freitas et al. submetido para publicação). Rapidamente, este sorotipo se espalhou pelo Brasil e já foi detectado em pelo menos 13 Estados brasileiros (MS 2011). Contudo, tem sido especulado se esses casos de DENV-4 pelo Brasil são referentes ao mesmo genótipo observado em Roraima ou se resultado de diferentes introduções, hipótese esta especulada por Souza et al. (2011).

O processo de transmissão do vírus dengue se inicia quando um mosquito susceptível do gênero *Aedes* ingere, através da picada, sangue de um hospedeiro durante o período de viremia. No mosquito, o vírus passa por intensa replicação em diferentes tecidos, tanto de origem germinativa quanto somática, como o epitélio do intestino médio, ovários, tecidos nervosos, glândulas salivares, músculos do vôo e até mesmo nas patas (Salazar et al. 2007). Nos ovários das fêmeas infectadas pode ocorrer elevada replicação viral, permitindo assim que parte da prole nasça infectada (Gubler e Kuno 1997). Somente após as partículas virais alcançarem a luz das glândulas salivares, a fêmea do mosquito pode ser apontada como vetor efetivo do dengue, pois a partir deste momento o vírus poderá ser inoculado, junto a saliva, em todo hospedeiro susceptível no qual a fêmea venha a se alimentar. Este período, decorrido em dias, do momento de ingestão do sangue contendo DENV até que as partículas virais atinjam as glândulas salivares das fêmeas e possam ser re-transmitidas é conhecido como período de incubação extrínseco (PIE) e é estimado como sendo de 10 a 14 dias (Figura 1.1). Acredita-se ainda que depois que a fêmea se torna um vetor efetivo de dengue, ela mantém esse papel pelo resto de sua vida (Gubler e Kuno 1997). Sendo assim, após a infecção do mosquito, o vírus dengue se dissemina por diversos órgãos e tecidos do corpo do inseto, o que permite que o vírus seja transmitido horizontalmente, entre vetor e o hospedeiro vertebrado e durante a cópula dos mosquitos, e/ou verticalmente, quando uma fêmea transmite o vírus para parte de sua prole (Thensmozhi et al. 2000). Apesar de possível, a relevância epidemiológica da transmissão horizontal através da cópula e da transmissão vertical para parte de prole ainda permanece desconhecida. Acredita-se que estas duas modalidades de transmissão sejam importantes apenas para manutenção do vírus dengue em ambientes naturais em momentos desfavoráveis, como durante intensas campanhas de controle vetorial ou frio intenso, por exemplo.

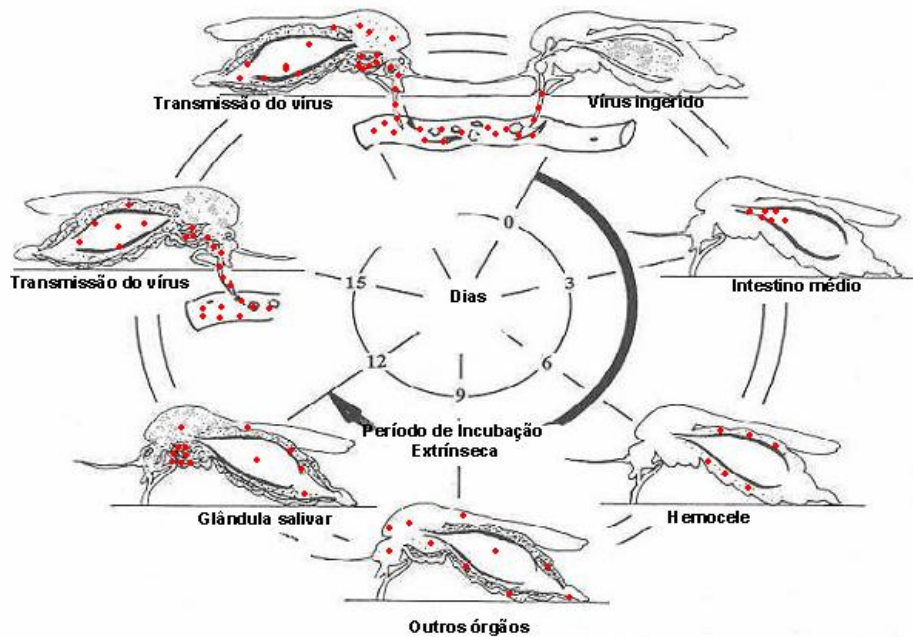


Figura 1.1. Período de incubação extrínseco do vírus dengue no mosquito *Aedes aegypti*. Pontos vermelhos representam partículas virais. Fonte: The Biology of Disease Vectors (1996) (modificado por Gabriel Sylvestre).

## 1.2. O vetor

### 1.2.1. Aspectos básicos de sua biologia

O vírus dengue tem como vetores mosquitos do gênero *Aedes*. Nas Américas, a transmissão do dengue é associada exclusivamente ao *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), embora em áreas rurais do continente asiático, por exemplo, mosquitos da espécie *Aedes albopictus* apresentem relevante papel na transmissão do dengue. No Brasil, o papel do *Ae. albopictus* na transmissão do dengue ainda permanece desconhecido. Em condições de laboratório, esta espécie apresenta grande competência ao vírus dengue (Lourenço-de-Oliveira et al. 2003), mas uma fêmea adulta

de *Ae. albopictus* infectada com o vírus dengue ainda não foi coletada em campo no Brasil, apesar de alguns relatos neste sentido (Serufo et al. 1993, Cecílio et al. 2009).

Originalmente descrito na África, o *Ae. aegypti* foi provavelmente introduzido no Brasil e em outros países da América durante o período colonial, através do tráfico negreiro (Consoli e Lourenço-de-Oliveira 1994). Por vezes chegou-se a declarar sua erradicação, como na década de 1950, porém imagina-se que a espécie tenha sido re-introduzida anos mais tarde, por volta de 1970 e desde então as campanhas não foram capazes de repetir o feito (Consoli e Lourenço-de-Oliveira 1994, Schatzmayr 2000, Bracco et al. 2007). Ainda hoje permanecem dúvidas se o mosquito foi realmente erradicado nos anos 1950 ou esteve numa densidade baixa a ponto de não ser possível sua detecção (Bracco 2007). Seja como for, hoje esse mosquito está amplamente distribuído pelos 27 Estados da Federação e mais de 3.794 municípios (Pimenta 2005). Como consequência natural desta infestação em níveis nacionais, o Brasil é responsável por cerca de 60% das notificações de dengue nas Américas (Câmara et al. 2007). Atualmente, pode-se dizer que esta espécie possui ampla distribuição geográfica, sendo encontrada com maior frequência e abundância em áreas urbanas de zonas tropicais e subtropicais do mundo, entre os paralelos 45° N e 35° S. (Rigau-Pérez et al. 1998, Braks et al. 2003).

Os mosquitos são insetos holometábolos, ou seja, apresentam metamorfose num momento de seu ciclo de vida. Passam pelas fases de ovo, larva, pupa e adulto ao longo de seu desenvolvimento. O estágio de larva é composto por quatro estádios larvares cuja duração varia de acordo com uma série de fatores. Dentre os mais importantes estão temperatura e disponibilidade de recursos alimentares, mas podemos dizer que o desenvolvimento de ovo a pupa dure 8-10 dias em condições satisfatórias (Service 1993, Consoli e Lourenço-de-Oliveira 1994, Braks et al. 2004). O estágio de pupa, no qual ocorre a metamorfose, dura cerca de 2 dias, e após esse período surge o alado. Esse ciclo de vida apresenta grande vantagem evolutiva aos



holometábolos, pois permite que as formas imaturas (aquáticas) e adultas (aladas) ocupem nichos distintos, não havendo competição por recursos espaciais e alimentares (Service 1993, Braks et al. 2004).

Nos nematóceros, a alimentação sanguínea é exclusividade de fêmeas adultas. As fêmeas utilizam o sangue obtido através da picada primariamente para a maturação de seus ovários (Lea 1956). Cerca de 3-5 dias após o repasto sanguíneo, as fêmeas de *Ae. aegypti* procuram criadouros para a realização da postura de seus ovos, que são postos próximos à lâmina d'água na superfície vertical do depósito (Consoli e Lourenço-de-Oliveira 1994). Cerca de 2-3 dias após a oviposição o desenvolvimento embrionário estará completo e, mesmo que o reservatório venha a secar, alguns ovos permanecerão viáveis por até 450 dias, pois são resistentes à dessecação (Rezende et al. 2008). Ao eclodir quando imerso em água, o ovo libera uma larva diminuta, dando prosseguimento ao ciclo de vida do mosquito.

## **1.2.2. Hábito alimentar**

### **1.2.2.1. Larvas e pupas**

Larvas de *Aedes aegypti* usam mandíbulas e maxilas modificadas para obter alimento depositado no substrato do criadouro, através de raspagem ou até mesmo ingestão de material em suspensão (Clements 1999). São detritívoras caracterizadas como filtradoras-coletoras, alimentando-se de material orgânico em decomposição, algas, fungos, bactérias ou até mesmo carcaças de outros insetos (Merritt et al. 1992, Matthew et al. 2000). No estágio de pupa, o mosquito não se alimenta, aguardando apenas que a metamorfose para o adulto se complete.

Quando esta se completa, o imaturo aumenta a pressão interna com a aspiração de ar atmosférico que facilita a emergência do adulto com o rompimento da cutícula da pupa.

#### **1.2.2.2. Adultos**

Os mosquitos em sua fase adulta podem obter recursos energéticos tanto através da alimentação sanguínea quanto de fontes açucaradas. Para *Ae. aegypti*, assim como para diversas outras espécies de dípteros vetores, a hematofagia é restrita às fêmeas, enquanto ambos os sexos podem obter energia a partir de fontes vegetais como flores e frutos (Van Handel et al. 1972).

##### **1.2.2.2.1. Machos**

Os machos são exclusivamente fitófagos, obtendo energia para sua sobrevivência, metabolismo e vôo apenas a partir de fontes vegetais, sendo a frutose presente em flores e frutos, o carboidrato mais encontrado na sua dieta (Van Handel et al. 1972).

##### **1.2.2.2.2. Fêmeas**

Fêmeas de *Aedes aegypti* recorrem às alimentações sanguíneas para obter a energia necessária ao processo de maturação dos ovários e embriogênese dos ovos (Lea et al. 1956). Apesar de serem aptas a obter recursos alimentares em fontes açucaradas e/ou sanguíneas, foi observado na Tailândia que fêmeas raramente se alimentam de açúcar vegetal (Edman et al. 1992). Entretanto, ainda restam dúvidas se a utilização do sangue como fonte de recursos metabólicos é influenciada pelo nível de cobertura vegetal e densidade humana numa localidade.

De modo geral, foi observado em ensaios controlados em laboratório que fêmeas que se alimentam apenas de açúcar, ou de açúcar e sangue, são mais longevas e têm menor fecundidade do que aquelas que têm apenas sangue como recurso (Day et al. 1994).

Quando uma fêmea recorre a alimentações açucaradas imagina-se que, após a ingestão dos carboidratos, uma pequena parte destes açúcares dirija-se diretamente ao intestino médio, mas a maior parte seja desviada no intestino anterior e armazenada no divertículo esofágico (“crop”). O divertículo é um compartimento formado a partir de uma expansão do sistema digestivo localizado no tórax e restrito ao mesmo em caso de pouca alimentação de carboidratos; quando cheio, dilata-se até o abdome. Tal mecanismo de triagem de alimento permite que o intestino médio seja preenchido com sangue e o divertículo com açúcar (Clements 1999).

A digestão dos glicídios inicia-se no divertículo, sendo uma porção dos açúcares descarregada periodicamente no intestino médio, onde são rapidamente absorvidos em até 24h após sua ingestão. O carboidrato ingerido pode ser armazenado como glicogênio nos músculos alares, podendo ser utilizado como fonte rápida de energia no processo de vôo, ou como lipídeo, o qual é armazenado nos corpos gordurosos e apresenta processamento mais lento, durante sua utilização na  $\beta$ -oxidação, que degrada lipídios gerando alto saldo de ATP e diversos intermediários utilizados em outros ciclos (ciclo de Krebs, ciclo anabólico de aminoácidos e de proteínas) (Clements 1999). Acredita-se que microrganismos que ocorrem no citado divertículo esofágico, como a bactéria *Serratia* sp, tenham participação nos processos de metabolismo de açúcares nesta espécie de vetor (Gusmão et al. 2007).

Idealmente, o sangue ingerido pelas fêmeas de mosquito seria direcionado para a maturação dos ovários e embriogênese dos ovos. Contudo, em algumas condições, alguns indivíduos podem necessitar de mais de uma alimentação sanguínea para realizar a postura de ovos viáveis, fenômeno conhecido como discordância gonotrófica. A ocorrência de discordância gonotrófica

em *Ae. aegypti* está intimamente associada ao histórico do desenvolvimento de cada indivíduo. Por exemplo, fêmeas oriundas de criadouros com intensa competição intra ou interespecífica apresentam tamanhos menores do que aquelas vindas de ambientes sem ou com pouca competição (Braks et al. 2003). Fêmeas menores, por sua vez, necessitam realizar alimentações sanguíneas mais frequentemente, uma vez que possuem baixas reservas energéticas (Scott et al. 1993a). De fato, a ocorrência de múltiplas alimentações sanguíneas por ciclo gonotrófico em *Ae. aegypti* apresenta grande relevância epidemiológica, pois ao exercer múltiplas alimentações, aumenta-se a probabilidade de um mosquito adquirir e transmitir o vírus dengue para hospedeiros susceptíveis (Scott et al. 1993a, 1993b, 2000a, 2000b).

### **1.3. Perspectiva evolutiva da interação parasito-hospedeiro**

O parasitismo é uma relação interespecífica baseada numa interação ecológica onde um indivíduo, o parasita, se beneficia à custa de outro organismo, o hospedeiro. A importância do parasitismo como agente transformador de ambientes naturais tem recebido muita atenção, principalmente no campo da filosofia da ciência e divulgação científica (Ridley 1993, Poulin 2007). Como exemplo pode-se mencionar a Teoria da Rainha Vermelha (Van Valen 1973), hipótese evolutiva baseada na corrida da Rainha de Copas no livro *Alice Através do Espelho*, de autoria do britânico Lewis Carroll. De acordo com essa teoria, é preciso haver um desenvolvimento contínuo para manter a aptidão relativa aos demais organismos com o qual se está a co-evoluir. Assim, essa hipótese visa explicar dois fenômenos distintos: as vantagens da reprodução sexuada no nível do indivíduo como geradora de variabilidade e a busca pela vantagem evolutiva nas interações ecológicas, mais conhecida como uma “corrida armamentista”. Dessa forma, discute-se o parasitismo sob a ótica evolutiva da Rainha Vermelha,

onde parasitas buscam novas ferramentas para colonizar e explorar seus hospedeiros, enquanto estes desenvolvem mecanismos para aprimorar sua defesa contra os parasitas. Nesta “corrida armamentista”, o sucesso das estratégias empregadas por parasitas e hospedeiros é avaliado pela implacável força da seleção natural.

Há muito tempo discute-se o efeito comportamental que parasitas podem gerar em seus hospedeiros. Esta interação pode resultar em aumento da taxa de transmissão do parasita em uma população de hospedeiros susceptíveis, sejam definitivos ou intermediários. Apesar de muitos exemplos estarem descritos na literatura, é necessário ressaltar que a maioria das modificações geradas por parasitas em seus hospedeiros não maximizam o sucesso de transmissão do parasita, mas impactam negativamente a viabilidade dos hospedeiros, comprometendo parâmetros de sua história de vida (Poulin 1994). Quando a alteração não é benéfica para o parasita, mas prejudicial ao fitness do hospedeiro, os resultados observados podem ser classificados como efeito colateral da infecção (Thomas et al. 2005). Um exemplo clássico de efeito colateral sem custo para o parasita é a infecção de pulgas *Xenopsylla cheopis* pela bactéria *Yersinia pestis*, microrganismo associado à peste bubônica que, por proliferar-se na porção anterior do tubo digestivo da pulga, força o inseto a regurgitar a massa de bactérias no corpo do hospedeiro enquanto se alimenta, infectando-o (Bacot e Martin 1914). Em geral, classifica-se como manipulação do comportamento do hospedeiro pelo parasita apenas quando a alteração observada pode aumentar a probabilidade do parasita ser transmitido a um novo hospedeiro suscetível.

É sabido que mosquitos adultos podem abrigar diversos parasitas, alguns dos quais com capacidade de manipular seu comportamento para maximizar sua taxa de transmissão, como microsporídios e protozoários do gênero *Plasmodium*. Um destes exemplos relaciona a alteração comportamental de *Ae. aegypti* infectados com *P. gallinaceum*, infecção que reduz a atividade da enzima apirase, de atividade anticoagulante, nas glândulas salivares do mosquito (Rossignol et al.

1986). Assim, o inseto passa a levar mais tempo para completar a alimentação sanguínea em um hospedeiro, uma vez que a ingestão de sangue torna-se menos eficiente. Este aumento no número de provas ou aumento do tempo de localização da fonte sanguínea no hospedeiro aumenta a probabilidade de transmissão do agente infeccioso, já que estes agentes são liberados junto à saliva no momento da picada.

#### 1.4. Capacidade Vetorial

Proposto inicialmente para vetores da malária, o conceito de capacidade vetorial foi mais tarde extrapolado para o modelo *Ae. aegypti* – vírus dengue. É definida pela habilidade de um vetor em transmitir um determinado patógeno, podendo esta ser expressa através de uma fórmula matemática, onde são considerados parâmetros diretamente envolvidos na transmissão (Garret-Jones 1964):

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

Onde  $a$  é o número de picadas por ser humano por dia;  $b$  é a probabilidade que um mosquito infectado tem de transmitir o parasito ao picar um hospedeiro humano susceptível;  $c$  é a probabilidade que um mosquito tem de se infectar com o parasito enquanto pica um hospedeiro humano infectado;  $m$  é o número de fêmeas de mosquito por pessoa,  $n$  é a duração do período de incubação extrínseco do parasito;  $P$  é a taxa de sobrevivência diária do mosquito e  $CV$  é sua capacidade vetorial.

Como visto, o comportamento alimentar do vetor está inserido no modelo da capacidade vetorial, uma vez que um dos seus componentes é a taxa de picada. Obviamente, um aumento na taxa de picada teria impacto epidemiológico, pois aumentaria o contato vetor-hospedeiro e assim a probabilidade de veiculação do patógeno cresceria. É importante ressaltar que o número de picadas aparece na equação elevada ao quadrado, pois para que ocorra a transmissão horizontal (mosquito–humano pela picada do inseto, modo mais comum de transmissão) são necessários dois eventos de picada: a primeira para adquirir o vírus de um hospedeiro em viremia e a segunda para transmitir o vírus para um hospedeiro susceptível. Diferentemente da malária, onde não há transmissão vertical, algumas fêmeas de *Ae. aegypti* não necessitam realizar duas alimentações para adquirir o vírus dengue, pois o herdaram de sua geração parental. Apesar disso, não se costuma levar em consideração essa diferença na transmissão da malária e dengue, sendo utilizada em ambos os casos os mesmos conceitos e fórmula para determinação da capacidade vetorial. Independente disso, é evidente que eventuais alterações comportamentais decorrentes da infecção pelo patógeno podem gerar alterações significativas na dinâmica de transmissão da doença.

### **1.5. *Aedes aegypti* x DENV**

Um fator de grande relevância a ser considerado na dinâmica da infecção do mosquito *Ae. aegypti* pelo vírus dengue é o tropismo viral no corpo do inseto. O artigo de Salazar et al. (2007) foi muito importante nessa questão por apontar através de técnicas distintas como RT-PCR, qRT-PCR e imunofluorescência a localização do vírus dengue nos diversos tecidos em função do tempo pós-infecção. Após a ingestão do vírus dengue pela picada do *Ae. aegypti* em um hospedeiro vertebrado, as partículas virais alcançam o intestino médio. Estima-se que a partir do

segundo dia após a ingestão de sangue contendo partículas virais seja possível encontrar vírus no intestino de fêmeas de *Ae. aegypti*, onde se inicia o processo de digestão do sangue com secreção de enzimas digestivas e alteração do pH (Woodring et al. 1996, Salazar et al. 2007) (Figura 1.2).

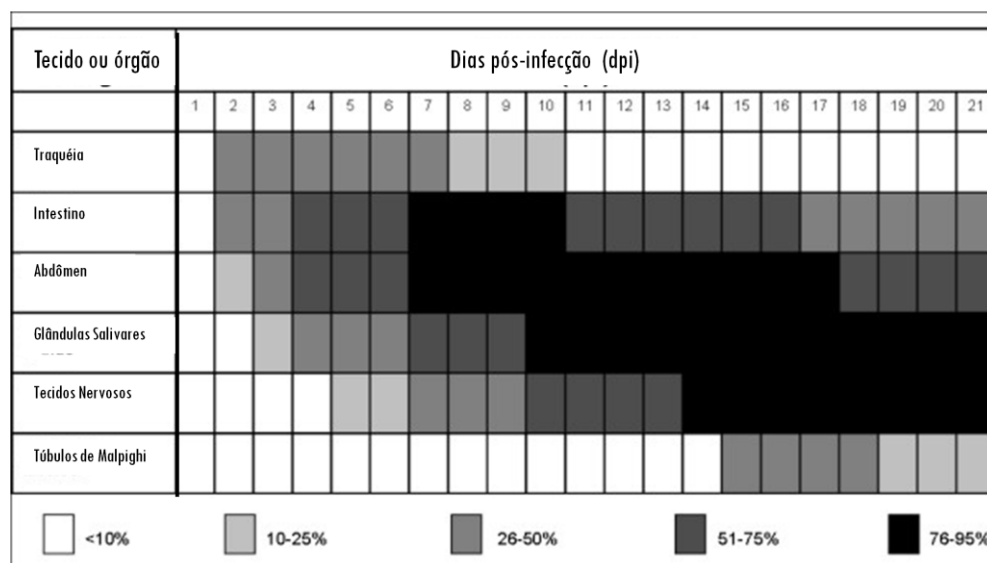


Figura 1.2. Disseminação de DENV-2 pelos diferentes tecidos de *Aedes aegypti* ao passar dos dias pós-infecção (Modificado de Salazar 2007).

Ainda no intestino médio do mosquito, o vírus dengue se liga a receptores celulares em células-alvo no epitélio do intestino do inseto. É relevante notar que a matriz peritrófica não parece constituir uma barreira física para a adesão do vírus dengue, uma vez que esta estrutura só estará completamente formada mais de um dia após a ingestão do sangue, quando a maioria dos vírus já aderiu às células epiteliais (Yazi-Mendoza et al. 2002, Lourenço-de-Oliveira 2005). Após evadir do intestino médio, o vírus dengue alcança a hemocele, por onde se dissemina para o corpo do inseto. Historicamente, tem se estimado que após 10-14 dias o vírus dengue é capaz de alcançar a glândula salivar do *Ae. aegypti*, completando-se assim o Período de Incubação Extrínseco (Watts et al. 1987). Contudo, no artigo de Salazar et al. (2007), foi visto que a chegada do vírus nas glândulas salivares começa a acontecer já no 3º dia pós infecção, um



resultado surpreendente que possui sérias implicações para a transmissão de dengue em condições naturais. É sabido que o vírus dengue apresenta grande capacidade de disseminação pelos tecidos de *Ae. aegypti*, tanto em tecidos somáticos quanto germinativos (Figura 1.3). Desta forma, acredita-se que a presença das partículas virais e as respostas celulares e humorais do mosquito podem influenciar a fisiologia e metabolismo destes insetos, e assim afetar parâmetros de sua capacidade vetorial (Salazar et al. 2007).

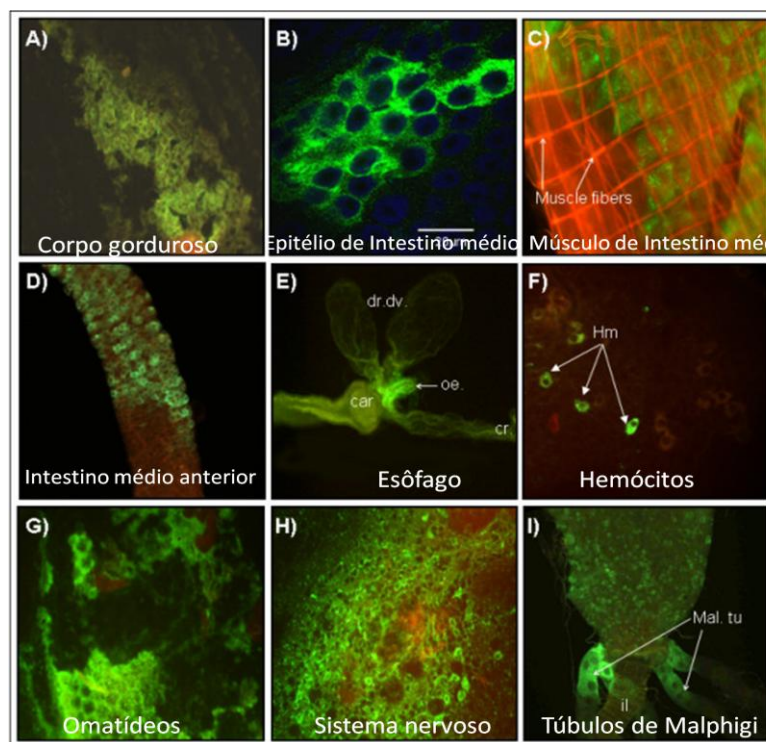


Figura 1.3. Imunofluorescência de diferentes tecidos de *Aedes aegypti* infectados com DENV-2 (Salazar 2007).

De um modo geral, assume-se que o vírus dengue apresenta um efeito negativo na biologia de *Ae. aegypti*, diminuindo o fitness dos indivíduos infectados (Maciel-de-Freitas et al. 2011). Foi observado que indivíduos não infectados apresentaram, em média, longevidade de 43 dias, enquanto os infectados pelo DENV-2 permaneceram vivos por não mais do que 26 dias em média. Na fecundidade, as fêmeas infectadas apresentaram menor número de ovos por desova

que as fêmeas controle, mas essa diferença só pôde ser observada a partir do terceiro ciclo de oviposição (Maciel-de-Freitas et al. 2011). Contudo, pouco se sabe sobre o impacto da infecção pelo dengue no comportamento hematofágico de *Ae. aegypti*. De fato, as poucas avaliações disponíveis apresentam métodos pouco naturais de infecção e, talvez por isso, mostram resultados um tanto quanto conflitantes. Putnam e Scott (1995) não observaram alteração no comportamento alimentar, especificamente na localização do hospedeiro e na ingestão do sangue, quando fêmeas de *Ae. aegypti* foram infectadas via intratorácica com DENV-2. Posteriormente, infectando mosquitos também via intratorácica, mas com DENV-3, foi visto que o tempo de prova e o tempo requerido para alimentação pelos mosquitos infectados era significativamente maior do que o requerido pelas fêmeas não infectadas (Platt et al. 1997).

## 2. JUSTIFICATIVA

Recentemente foi observado que o modo de transmissão dos arbovírus pode influenciar aspectos da biologia dos vetores, em especial sua sobrevivência e fecundidade (Lambrechts e Scott 2009). Nosso grupo observou que a infecção pelo vírus dengue apresentou um impacto negativo tanto na fecundidade quanto na longevidade de *Ae. aegypti* (Maciel-de-Freitas et al. 2011), importantes parâmetros na dinâmica de transmissão e manutenção do vírus dengue na natureza (Dye 1990, Focks et al. 1995, 2000). Perdas no *fitness* do vetor devido à infecção por arbovírus já foram detectadas em infecções de *Ae. triseriatus* por vírus La Crosse (Grimstad et al. 1980), *Culiseta melanura* por vírus da encefalite eqüina do leste (Scott e Lorenz 1998) e em *Culex tarsalis* infectados por vírus da encefalite eqüina do oeste (Lee et al. 2000), para citar algumas. Após reunir dados disponíveis na literatura relacionando a sobrevivência e longevidade de artrópodes infectados com arbovírus, Lambrechts e Scott (2009) mostraram, através de uma meta-análise, que estes vírus reduzem a sobrevivência de mosquitos adultos. Contudo, a magnitude do efeito depende do sistema mosquito/vírus em questão e do modo de infecção, se horizontal ou vertical. Na meta-análise realizada foram analisadas quatro famílias de arbovírus (Flavivirus, Bunyavirus, Phlebovirus e Alphavirus), cinco gêneros de insetos (*Culex*, *Aedes*, *Anopheles*, *Culiseta* e *Coquillettidia*) e três meios de infecção (alimentação oral, inoculação intratorácica e transmissão vertical), com suas possíveis combinações. Mosquitos do gênero *Aedes* e de todos os demais gêneros em questão tiveram sua sobrevivência reduzida por arbovírus de forma geral. Mais especificamente, relatou-se o impacto pela infecção de *Aedes aegypti* por DENV-3 inoculado intratoracicamente na sobrevivência das fêmeas, tendo havido aumento da mortalidade das mesmas (Joshi et al. 2002) . Como Lambrechts e Scott (2009) mostraram, o meio de transmissão pode influenciar a mortalidade do vetor induzida pelo vírus. O conhecimento teórico

sugere que o nível ótimo de virulência, quando há maximização da transmissão do patógeno sem perda no *fitness* do hospedeiro, depende da frequência relativa de transmissão vertical e horizontal, sendo que maior mortalidade geralmente está associada a transmissões horizontais (Ebert e Herre 1996).

Devido ao grande poder de disseminação do vírus dengue pelo corpo do mosquito, é razoável supor que a infecção cause danos a parâmetros da história de vida do *Ae. aegypti*, possivelmente comprometendo sua capacidade vetorial. A influência negativa da infecção pelo vírus dengue na sobrevivência e fecundidade de *Ae. aegypti* foi observada recentemente (Maciel-de-Freitas et al. 2011), mas seu impacto no hábito alimentar dessa espécie permanece duvidoso. Existem duas observações contraditórias na literatura envolvendo o hábito hematofágico de *Ae. aegypti* infectados (Putnam e Scott 1995, Platt et al. 1997). Ambas utilizam a técnica de inoculação intratorácica como modo de infecção dos espécimes, método invasivo, artificial e que pode gerar efeitos não naturais e exacerbados na dinâmica do vírus dengue no mosquito (Lambrechts e Scott 2009). Vale ressaltar que, quando um mosquito é infectado via inoculação intratorácica, as partículas virais são depositadas diretamente na hemocele do mosquito, sobrepassando o gargalo natural que é o intestino médio, com a secreção de enzimas digestivas, mudança de pH e ligação a receptores nas células epiteliais.

Sendo assim, buscamos investigar a influência da infecção pelo vírus dengue em aspectos associados ao hábito hematofágico, mortalidade e fecundidade de fêmeas de *Ae. aegypti* infectadas oralmente com o vírus dengue sorotipo 2.

### **3. OBJETIVO**

Avaliar a possível influência de uma amostra de vírus dengue sorotipo-2 em aspectos do comportamento alimentar, sobrevivência e fecundidade de *Aedes aegypti* em função de sua idade.

#### **3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Avaliar a susceptibilidade da população Paea a diferentes amostras de DENV.
- Avaliar o impacto da infecção por DENV-2 sobre a biologia de duas populações de *Ae. aegypti*.
- Testar o efeito da idade no comportamento alimentar de *Ae. aegypti*

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Obtenção dos mosquitos.

Os experimentos foram desenvolvidos com duas populações de *Ae. aegypti* de diferentes origens: uma de laboratório e outra de campo. O racional em escolher duas populações distintas foi baseado na observação de Maciel-de-Freitas et al. (2011), que observou que o impacto do vírus dengue na sobrevivência e fecundidade podem ser dependentes da população. Foi observado, por exemplo, que à medida que o título viral aumenta, percebe-se maior mortalidade dos indivíduos da população de campo, fato não observado para a população de laboratório (Maciel-de-Freitas 2011). A população Paea, oriunda do Tahiti na Polinésia Francesa, e mantida confinada em laboratório no Instituto Pasteur (França) por 18 anos, apresenta alta susceptibilidade ao vírus DENV-2 em condições experimentais (Vazeille-Falcoz et al. 1999). Usamos como população de campo mosquitos da geração F1, cujos parentes foram coletados em Tubiacanga (Ilha do Governador), uma localidade do Rio de Janeiro com histórico de intensa transmissão de dengue. Em Tubiacanga, a geração parental foi obtida a partir da instalação de 40 ovitrampas homoganeamente distribuídas pela área, que tem aproximadamente 8,6 hectares (Maciel-de-Freitas et al. 2007). Devido ao seu histórico de confinamento, é razoável supor que a população Paea apresente menor variabilidade genética que uma população de campo. Acreditamos que a diferente variabilidade genética pode influenciar a resposta dos mosquitos de cada população ao desafio com o vírus dengue.

## 4.2. Criação dos mosquitos em laboratório.

Os mosquitos foram criados seguindo o protocolo descrito por Consoli e Lourenço-de-Oliveira (1994). Os ovos aderidos em fitas de papel filtro são colocados em bacias plásticas com aproximadamente 1,5 litro de água desclorada por 24h para que todos tenham tempo para eclodir. As larvas de primeiro estágio são transferidas em número de 100 larvas por bacia onde também são adicionados aproximadamente 250 mg de levedo de cerveja seco a cada 2 dias como alimento. As pupas são transferidas para gaiolas cúbicas de 30 cm de lado, onde emergirão os adultos. Machos e fêmeas são mantidos em temperatura de  $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$  e umidade relativa de  $80 \pm 5\%$  por cerca de 2-3 dias, com alimentação açucarada 10% *ad libitum*, sendo permitida a cópula até 24h antes da infecção.

## 4.3. Obtenção do vírus

A susceptibilidade de *Ae. aegypti* a quatro amostras de DENV-2, mantidas congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  com diferentes históricos de passagem em cultura de células e títulos virais foi testada antes de se iniciar o experimento. Os mosquitos foram infectados oralmente com cada uma das cepas e após 14 dias, para se completar o período de incubação extrínseco no inseto, a cabeça e glândula salivar dos mosquitos foram analisadas por ensaio de imunofluorescência indireta (IFI) para detecção de partículas virais. Três destas amostras são oriundas da cepa original, descrita a seguir, diferem apenas no número de passagens em cultura de células e título viral e a quarta foi obtida por ultra-centrifugação, técnica que concentra as partículas virais fazendo com que o título aumente em até duas ordens de grandeza.

#### **4.3.1. Cepa viral**

A cepa DENV-2 padrão internacional de origem asiática (16681), cedida pelo Dr. Scott Halstead do Instituto Militar de Pesquisa Walter Reed, Maryland/EUA ao Laboratório de Imunologia Viral-IOC, foi utilizada nos ensaios de infecção. O vírus foi crescido e inicialmente ativado em células embrionárias do clone C6/36 de larvas de mosquito *Ae. albopictus* (Singh 1967). A cultura foi mantida a 28°C, com observação diária de 7 a 10 dias para verificação do efeito citopático (CPE). Quando observado mais de 50% de CPE na cultura, o sobrenadante foi recolhido, posto em aliquotas de 50 ml e posteriormente congelado a -80 °C.

#### **4.3.2. Vírus Ultracentrifugado**

O sobrenadante de garrafas (30 ml) de cultura de células C6/36 de *Ae. albopictus* infectadas com o vírus supracitado é coletado e aliqotado em tubos Falcon de 50 ml. Estes são centrifugados a 1000g por 10 minutos a 4°C para decantar células e restos celulares, que são descartados e o sobrenadante retirado. São adicionados 10% de soro fetal bovino e a solução passa por nova centrifugação, agora a 100.000g (30.000 rpm) por 1 hora a 4°C. Desta vez, o pellet é ressuspendido com meio de cultura sem soro fetal bovino (RPMI) e o sobrenadante descartado. Dessa forma, o pellet passa a ser 20 vezes mais concentrado. Neste ponto faz-se um pool dos sobrenadantes concentrados, que são armazenados a 4°C e depois filtrados em membrana de 0,22 µM, usando seringas de 5 ml. São feitas alíquotas de 0,5 ml que ficam armazenadas a -80°C até o momento de sua utilização.



### 4.3.3. Titulação do estoque viral

Para a titulação viral do DENV-2, foram utilizadas microplacas de 96 poços contendo camada confluyente de células C6/36 que recebem o vírus a ser titulado em diluição seriada ( $10^{-1}$  até  $10^{-11}$ ). A cultura foi mantida por um período de 7 a 10 dias em estufa a 28°C, com observação diária para verificação da presença de CPE. Quando observado mais de 50% de CPE na cultura, parte do sobrenadante foi descartado e a cultura celular, com cada diluição do vírus, ressuspendida e depositada em lâminas fixadas com acetona por 5 min. Estas foram marcadas com anticorpo primário anti-dengue 1/100 e secundário anti-IgG de camundongo marcado com FITC 1/50. A leitura das lâminas foi feita em microscópio óptico de fluorescência. Para o cálculo do título viral, foi utilizada a fórmula de Reed e Munch (1938).

Fórmula de Reed & Muench:

$$\frac{(\text{n}^\circ \% \text{ imediatamente acima de } 50\%) - (\% \text{ abaixo } 50\%)}{\text{dose imediatamente acima de } 50\% - \text{dose imediatamente abaixo } 50\%} = \frac{50 - (\% \text{ imediatamente abaixo } 50\%)}{X - \text{dose imediatamente abaixo } 50\%}$$

### 4.4. Competência às quatro amostras do vírus dengue.

Para se avaliar a susceptibilidade, ou de competência vetorial, de *Ae. aegypti* às quatro amostras de vírus dengue sorotipo-2 usamos a população Paea devido à sua notória susceptibilidade a esse arbovírus (Vazeille-Falcoz et al. 1999). Quatro grupos com cerca de 20 fêmeas com 3-5 dias de idade foram inoculadas intratoracicamente com 0,017  $\mu\text{l}$ . As fêmeas foram mantidas em estufas B.O.D. em temperatura constante de 28°C e umidade relativa de 75% por 14 dias, tempo necessário para que o vírus dengue alcance a glândula salivar das fêmeas.

Após esse período, as fêmeas que porventura ainda estiverem vivas são anestesiadas em gelo e mantidas a temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$  até o momento da imunofluorescência indireta para detecção de infecção viral.

#### **4.5. Infecção oral com vírus dengue para estudo do hábito alimentar.**

O processo de infecção experimental para o estudo do hábito alimentar de *Ae. aegypti* seguiu o mesmo método descrito acima, sendo a principal diferença o seu manuseio após a alimentação com sangue contendo o vírus. Neste caso, foi oferecido às fêmeas sobrenadante de culturas de células contendo o vírus DENV-2 Halstead 16681 misturado a hemácias de coelho na razão 1:2 ml através de um alimentador artificial (Rutledge 1964) (Figura 4.1). As fêmeas que visualmente estavam completamente ingurgitadas foram separadas e mantidas em estufas B.O.D. por 24h. Após esse período foram isoladas em pequenos tubos plásticos (6 x 2,5 cm), para monitoramento individual do hábito alimentar, sobrevivência e fecundidade.

Durante a infecção oral para estudo do hábito alimentar, utilizamos mosquitos das mesmas populações como controle. Estes foram alimentados da mesma forma. Porém, ao contrário da metodologia anteriormente descrita, lhes foi oferecido sangue contendo meio de cultura com sangue de coelho livre de DENV-2, na mesma diluição mencionada acima (1:2, sendo 1 ml de meio de cultura de célula e 2 ml de sangue de coelho ).



Figura 4.1. Alimentador artificial. Equipamento que permite a circulação de água a 37°C externamente à câmara de sangue, aquecendo-o.

#### **4.6. Detecção do vírus dengue nos mosquitos por imunofluorescência indireta**

As cabeças e parte do tórax, onde se encontra o tecido nervoso central e as glândulas salivares das fêmeas, foram cortadas com o auxílio de um bisturi e maceradas entre duas lâminas para microscopia óptica. Estas lâminas são fixadas em acetona por 20 minutos a 4°C e armazenadas a -20°C até o momento da marcação e leitura. Cada orifício da lâmina correspondente a uma fêmea analisada recebe uma marcação inicial com 20µl de anticorpo primário anti-dengue na diluição de 1/100 em solução de lavagem (BSA 1%, Azida 1% e PBS 1x). As amostras são incubadas por 90 minutos a 37°C em câmara úmida e, após passarem por duas lavagens de 5 minutos cada em PBS (tampão fosfato de pH 7,4), são deixadas sobre a bancada para secagem. A seguir recebem a segunda marcação, esta é feita com anticorpo secundário anti-IgG de camundongo marcado com FITC na diluição de 1/50, também em solução de lavagem. Passam agora por incubação a 37°C por uma hora em câmara úmida e novamente

por duas lavagens com PBS, como citado anteriormente. Uma vez secas, as lâminas são lidas em microscópio ótico de fluorescência, onde os orifícios que apresentarem partículas virais aparecerão marcados em verde.

#### **4.7. Comportamento alimentar de *Ae. aegypti***

Aos mosquitos infectados e não infectados que foram individualizados nos tubos plásticos, era oferecido, uma vez por semana, um camundongo anestesiado (de acordo com o protocolo CEUA L-0007/09) para alimentação hematofágica. Como o número de mosquitos diminuía em função da morte de alguns indivíduos, nossas análises estatísticas em relação ao hábito alimentar foram restritas até a terceira alimentação pós-infecção, algo o que corresponde em média a cerca de 21 dpi. Entre as alimentações, os mosquitos foram mantidos com solução açucarada, retirada sempre 24 horas antes da alimentação experimental. Sendo assim, podemos realizar inferências a respeito dos efeitos da idade e estágio da infecção no comportamento alimentar de *Ae. aegypti*. Desta maneira, os seguintes parâmetros foram cronometrados e anotados durante cada um dos três processos de alimentação:

- 1) **Tempo de início:** tempo decorrido entre o contato do tubo plástico com o camundongo até o momento em que o inseto insere sua probóscide pela primeira vez no corpo do hospedeiro. Pretendemos avaliar a percepção do hospedeiro vertebrado pelo mosquito e testar a hipótese que o vírus dengue pode afetar a avidez destes mosquitos na localização do mesmo.

- 2) **Número de provas:** quantas vezes uma fêmea insere e retira sua probóscide até completar a ingestão de sangue. Epidemiologicamente, esse parâmetro talvez seja o mais relevante, pois o aumento do número de provas nos mosquitos infectados levaria a um aumento direto da transmissão do vírus, quando em condições naturais. Dessa forma, pretendemos testar se o DENV-2 altera o número de provas dos infectados em relação aos controle
  
- 3) **Tempo de prova:** tempo decorrido entre a primeira e a enésima prova até que se perceba sinal de inflação do abdômen. Pretendemos, assim, avaliar se indivíduos infectados são aptos a iniciar a alimentação sanguínea mais rapidamente.
  
- 4) **Tempo de ingestão:** tempo decorrido do início da alimentação ao término desta, que se caracteriza pela retirada da probóscide do corpo do camundongo. Aqui, pretendemos avaliar se indivíduos infectados se alimentariam até a repleção em um intervalo de tempo menor que indivíduos do grupo controle, favorecendo a transmissão do vírus, uma vez que quanto maior o tempo gasto na ingestão do sangue, maior a probabilidade de ser morto pelo comportamento defensivo do hospedeiro.
  
- 5) **Tempo total de alimentação:** soma dos tempos de início, prova e ingestão.

#### 4.7.1. Análise dos dados (comportamento alimentar)

Para analisar se os tempos de início, prova, início da ingestão, ingestão e total variaram entre as duas populações estudadas e entre indivíduos infectados e não-infectados, usaremos uma ferramenta estatística conhecida como análise de risco (*failure-time analysis*). Neste tipo de análise, mensura-se o tempo em que determinado evento ocorre, ou seja, com quantos segundos cada mosquito marcou seus tempos de início, prova, ingestão e total. Gera-se uma curva descendente, como uma curva de sobrevivência, com o eixo x sendo os segundos e o eixo y o número de mosquitos, ou seja, a curva declina em função da ocorrência dos eventos medidos (cada um dos tempos observados). Desta forma, temos um gráfico contendo quatro curvas considerando as interações entre população e infecção: Paea controle, Paea infectado, Campo controle e Campo infectado, por parâmetro por semana. Posteriormente, comparações entre as curvas dentro de cada tempo medido por semana foram realizadas por meio do teste Log-rank. Se as curvas dos quatro grupos não fossem similares, comparações pareadas eram realizadas utilizando o mesmo teste, mas com correção do p-valor pelo método de Bonferroni (Morettin e Bussab 2010).

O Log-rank é um teste de hipótese não-paramétrico utilizado para comparar a distribuição da sobrevivência ou, em nosso caso, de um evento temporal, que seria o momento em que cada mosquito teve o comportamento que estava sendo medido (Carvalho et al. 2005).

O número de provas, por sua vez, não pode ser analisado perante uma análise de risco devido ao fato de um único evento (prova) poder acontecer inúmeras vezes. Assim, avaliamos primeiramente se a distribuição desta variável apresentava uma distribuição normal. O teste de Shapiro-Wilk nos mostrou que esta variável não apresenta distribuição normal e as transformações realizadas não mudaram o panorama original ( $W = 0,668$ ,  $P < 0,001$ ). Desta

maneira, comparações a respeito do número de provas foram feitas utilizando o teste de Mann-Whitney entre as populações e seus respectivos pares infectados semana a semana. As análises de risco dos parâmetros do hábito alimentar e o teste Log-rank foram feitas no software R 2.13.0. (2011). A ANOVA foi realizada no software JMP 9.0 (2010).

#### 4.8. Monitoramento da sobrevivência diária

Uma vez que os mosquitos infectados eram mantidos isoladamente em tubos plásticos ao longo de sua vida e morriam naturalmente, avaliamos também a sua longevidade e o seu padrão de sobrevivência. Para isso, foi necessário realizar monitoramento diário visando determinar o dia exato da morte de cada indivíduo. Quando se detectava a morte de uma fêmea, esta era retirada do tubo plástico e tinha o comprimento de asa registrado na lupa com auxílio de uma lâmina milimetrada. Para isso, a medição das asas foi feita a partir da álula até a extremidade da asa, não considerando a franja (conforme pode ser observado no exemplo da Figura 4.2), de acordo com a metodologia descrita por Harbach e Knight (1980).



Figura 4.2. Metodologia de medição da asa de *Aedes aegypti* utilizando uma lâmina milimetrada.

Nosso principal objetivo neste tópico foi avaliar o efeito que a infecção pelo vírus dengue pode ter em cada população, comparando nossos resultados com o obtido anteriormente por Maciel-de-Freitas et al. (2011).

#### **4.8.1. Análise dos dados (sobrevivência)**

Inicialmente, a longevidade dos mosquitos, ou seja, o dia em que cada indivíduo morreu, não apresentou distribuição normal ( $W = 0,9079$ ,  $P < 0,001$ ). Para melhor analisar os dados, seria importante que estes apresentassem distribuição normal. Dessa maneira, a longevidade de cada mosquito foi transformada para a base log, de modo que agora os dados se comportassem de maneira normal ( $W = 0,996$ ,  $P = 0,08$ ). A influência da população (variável categórica: Paea ou Campo), da infecção (variável categórica: Infectado ou Controle) e do tamanho da asa (variável contínua) na longevidade média dos insetos foi analisada separadamente por variável e comparados estatisticamente através de um teste t de Student com correção de Welch para desvios-padrões desiguais. Posteriormente, observamos o efeito de todas as variáveis e suas respectivas interações na longevidade média dos mosquitos através de uma análise de variância (ANOVA), nos permitindo avaliar se um ponto da distribuição da mortalidade, nesse caso a média da distribuição, difere entre os grupos estudados.

Ao registrar o dia de morte de cada indivíduo observamos também o padrão de sobrevivência do *Ae. aegypti*, levando em consideração sua população e infecção. Para isso, o padrão de sobrevivência foi analisado a partir da elaboração de curvas de sobrevivência com o método de Kaplan-Meier e teste Log-rank. Posteriormente, caso as quatro curvas geradas (Paea Controle, Paea Infectado, Campo Controle e Campo Infectado) não fossem estatisticamente similares, investigamos qual(is) delas era(m) diferente(s) a partir de comparações pareadas



utilizando o mesmo teste com correção do p-valor pelo método de Bonferroni (Bussab e Morettin 2010).

As análises de sobrevivência foram feitas nos softwares R 2.13.0 (2011) e JMP 9.0. (2010).

#### **4.9. Fecundidade e quantificação da alimentação sanguínea**

Os aspectos reprodutivos dos mosquitos foram avaliados sob uma perspectiva semanal. Ao longo de um período de 5-7 dias, era oferecido aos mosquitos o camundongo anestesiado, se a fêmea se alimentasse eram medidos os tempos de alimentação descritos anteriormente, as fezes das fêmeas eram recolhidas 2-3 dias depois para posterior quantificação do sangue ingerido e, 5-6 dias depois da alimentação sanguínea, o substrato de oviposição nos tubos plásticos foi removido para contagem e pesagem dos ovos.

Maciel-de-Freitas et al. (2011) observou que fêmeas infectadas com o vírus dengue apresentam, a partir do 3º ciclo de oviposição, menor fecundidade que fêmeas não expostas ao vírus. Ou seja, há uma perda quantitativa da fecundidade, traduzida pela redução da prole. De um modo geral, em ecologia de vetores avalia-se fecundidade apenas como uma variável quantitativa, onde é analisado apenas o número de ovos por fêmea por ciclo de oviposição. Pretendemos investigar além da perda quantitativa, também uma eventual perda qualitativa na desova das fêmeas. Decidimos fazer isto porque, para pequenos mamíferos, por exemplo, é sabido que, em situações adversas como intensa pressão climática, regime de chuvas anormal, elevada densidade, etc, fêmeas investem mais energia na prole, podendo inclusive manipular a razão sexual ou o número de filhotes por ninhada (Austad e Sunquist 1986, Frank 1990).

Para mosquitos, nunca foi descrita a relação entre variáveis associadas ao investimento reprodutivo das fêmeas, explorando a potencial correlação e/ou dependência e/ou co-

variabilidade de variáveis como: tamanho do mosquito, tamanho da alimentação sanguínea ingerida, número de ovos e peso do ovo.

Como dito, o tamanho da asa do mosquito foi medido com o uso de uma lâmina milimetrada e o número de ovos contado por ciclo. A pesagem dos ovos foi feita através do método desenvolvido por Frankino e Juliano (1999), no qual os autores pesam um determinado número de ovos e divide o peso total pelo número de ovos pesados. Assim, têm-se um valor aproximado do peso individual do ovo. A alimentação sanguínea foi quantificada a partir do método desenvolvido por Briegel (1980), onde se obtém a quantidade de sangue ingerida a partir da quantidade de hematina observada nas fezes, método empregado para estudos de ecologia vetores (Yan 1997). O substrato de cada tubo plástico foi diluído em carbonato de lítio, com leitura em espectrofotômetro a 387nm (Briegel 1980). Para obtermos o padrão de concentração de hematina, uma alíquota de sangue de camundongo, o animal utilizado nos experimentos, passou por uma diluição seriada nas concentrações de 0 a 4 µg/ml. A seguir é exposto o gráfico obtido (Figura 4.3).

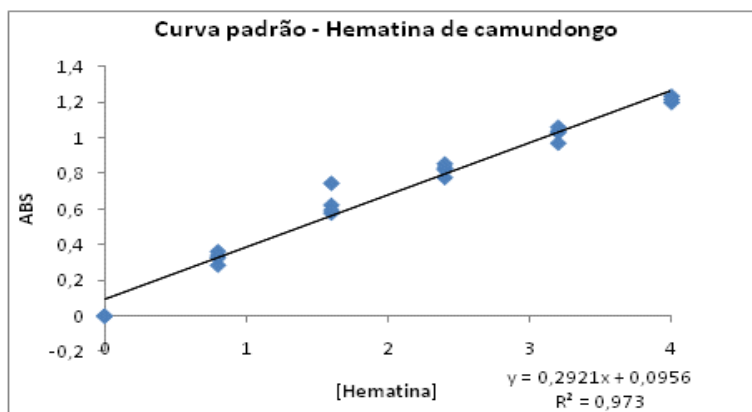


Figura 4.3. Curva padrão de Hematina de camundongo. O eixo das abscissas contém as concentrações de hematina e o eixo das ordenadas os valores de absorbância obtidos na leitura em espectrofotômetro (387nm).

#### **4.9.1. Análise dos dados (fecundidade)**

A análise da fecundidade de *Ae. aegypti* foi dividida em duas etapas. Primeiramente, realizamos uma regressão logística para avaliar o sucesso de oviposição das fêmeas. Nessa etapa, avaliamos se a população, infecção, tamanho da asa e idade (baseada no nº do ciclo de oviposição) influenciaram a probabilidade das fêmeas realizarem a postura de ao menos um ovo, ou seja, o sucesso de oviposição. Nesta análise utilizamos os dados das quatro primeiras desovas.

Outra etapa foi baseada na comparação do número de ovos posto por ciclo de oviposição por fêmea pertencente a um dos quatro grupos População\*Infecção possíveis. Esta etapa baseou-se em uma múltipla análise de variância para medidas repetidas (MANOVA). Esta análise é particularmente recomendada quando se tem dados contínuos e dependentes entre os tempos amostrais. Ou seja, assumimos que o número de ovos que uma fêmea ovipõe num ciclo pode tanto ter sido influenciado pela desova anterior quanto influenciar a desova seguinte. Nesta análise, utilizamos os dados das três primeiras desovas, uma vez que o teste de medidas repetitivas requer maior número de observações.

Por empregar análises estatísticas complexas para observar relações de causa efeito entre variáveis inter-dependentes (como em Frankino e Juliano 1999), a interpretação dos resultados referentes aos aspectos reprodutivos das fêmeas será realizado posteriormente, em momento mais oportuno. Desta maneira, os resultados aqui apresentados versarão apenas sobre aspectos quantitativos da fecundidade, e não os qualitativos.

## 5. RESULTADOS

Um total de 173 fêmeas de *Aedes aegypti* foi isolado nos pequenos tubos plásticos para observação de seu hábito alimentar e monitoramento da sobrevivência e fecundidade. Destas, 123 foram infectadas com DENV-2 (71 indivíduos pertencendo à população de campo e 52 à Paea) e 50 receberam sangue sem vírus e foram classificadas como controle (25 fêmeas para cada população).

Um único banco de dados foi montado e, ao final dos experimentos, passou a apresentar todas as informações referentes a cada fêmea, dos quatro diferentes grupos (Paea controle ou infectado; Campo controle ou infectado) distribuídas em linhas e os respectivos parâmetros do comportamento alimentar, fecundidade e sobrevivência em colunas. Apresento a partir deste ponto os resultados alcançados para cada uma das etapas.

### 5.1. Obtenção do vírus

Quatro amostras de DENV-2 foram testadas para sua capacidade de infectar os mosquitos usados nos experimentos. Cerca de 80 mosquitos Paea, divididos em quatro grupos de 20 fêmeas foram inoculados intratoracicamente com essas diferentes amostras, sendo que três delas foram oriundas da mesma semente viral com diferentes títulos virais e número de passagens em células C6/36. Outra amostra viral (4) passou pela metodologia de ultracentrifugação descrita anteriormente para concentração das partículas virais. A partir das titulações realizadas e da porcentagem de fêmeas que se infectaram com as amostras de dengue inoculadas, percebeu-se a diferença na capacidade das amostras virais de infectar os mosquitos quando comparamos o título mais baixo e o mais alto (Tabela 5.1). Como pode ser visto a seguir, o vírus ultracentrifugado

(amostra 4) foi o único vírus capaz de infectar 100% dos mosquitos inoculados, passou-se, portanto a utilizá-lo nos experimentos subseqüentes.

<b>Amostra</b>	<b>Título viral</b>	<b>Número</b>	<b>Fêmeas infectadas</b>
<b>DENV</b>	<b>(TCID50)</b>	<b>de passagens</b>	<b>(%)</b>
<b>1</b>	$2 \times 10^{-5}$	7	0
<b>2</b>	$1,37 \times 10^{-7}$	7	40
<b>3</b>	$2 \times 10^{-6}$	6	50
<b>4</b>	$2 \times 10^{-8}$	7	100

Tabela 5.1. Porcentagem de fêmeas infectadas pelas diferentes amostras de DENV-2 testadas, seus títulos e número de passagens em células C6/36.

## 5.2. Comportamento Alimentar

Na tabela 2 abaixo, podemos observar os tempos gastos em cada etapa do hábito alimentar das fêmeas de *Ae. aegypti* nas três semanas posteriores à infecção (Tabela 5.2). Notadamente, os tempos apresentam grandes desvios-padrões, mostrando grande heterogeneidade dos dados e dificultando sua comparação. Um exemplo claro dos grandes desvios encontrados é que, freqüentemente, a subtração do desvio-padrão à média resultaria em valores inteiros, mas não lógicos, ou seja, tempos negativos.

	1ª semana		2ª semana		3ª semana		
	Paea	Campo	Paea	Campo	Paea	Campo	
<b>Tempo de início</b>	<b>Controle</b>	62,06 ± 130,8	76,53 ± 92,41	68 ± 104,8	34,91 ± 45,47	128,8 ± 208,9	226 ± 192,8
	<b>Infectado</b>	38,32 ± 88,4	72,19 ± 108,1	136,9 ± 218,5	63,94 ± 71,8	17,5 ± 10,38	126,2 ± 127,5
<b>Número de provas</b>	<b>Controle</b>	2,33 ± 1,81	1,73 ± 1,04	1,63 ± 1,28	2,90 ± 3,56	1,66 ± 1,21	3,33 ± 2,51
	<b>Infectado</b>	1,45 ± 1,23	2,43 ± 1,92	1,85 ± 1,57	2,55 ± 1,72	2,5 ± 1,29	1,16 ± 0,4
<b>Tempo de prova</b>	<b>Controle</b>	84,78 ± 87,23	132,6 ± 186,3	143,4 ± 179,7	198,6 ± 252,7	161,5 ± 168,7	240,7 ± 291,5
	<b>Infectado</b>	118,1 ± 120,4	173,1 ± 131,6	78,43 ± 102,2	220 ± 189,6	141,5 ± 95	86,5 ± 66,27
<b>Tempo de ingestão</b>	<b>Controle</b>	222,4 ± 128,4	190,7 ± 138,6	210,2 ± 149	145,1 ± 110,6	179,3 ± 136	431,7 ± 359,1
	<b>Infectado</b>	217,2 ± 145,7	175,4 ± 111,5	397 ± 188,2	218,6 ± 175	131,8 ± 85,62	402,2 ± 339,6
<b>Tempo total</b>	<b>Controle</b>	369,2 ± 214,1	399,8 ± 272,7	402,5 ± 280	365,5 ± 294,8	469,7 ± 347,2	898,3 ± 373,8
	<b>Infectado</b>	359,6 ± 206,8	413,9 ± 199,9	442,1 ± 439,6	490,4 ± 280,3	290,8 ± 90,94	614,8 ± 315,4

Tabela 5.2. Análise exploratória dos parâmetros de avaliação do impacto da infecção por DENV-2 no comportamento alimentar das populações de campo e laboratório de *Aedes aegypti*. Os valores mencionados estão na escala de segundos e são referentes às médias obtidas para cada parâmetro ao longo de três semanas de experimentação seguidos de seus respectivos desvios-padrão (média ± DP).

### 5.2.1 Tempo de Início

De um modo geral, os mosquitos apresentaram tendência a iniciar sua alimentação rapidamente, logo após entrar em contato com o hospedeiro (Figura 5.1). Entretanto, alguns indivíduos demoraram mais do que cinco minutos para iniciar a alimentação. Ao longo das três semanas, tivemos dados tão heterogêneos que variaram entre 3 e 625 segundos, mínimo e máximo de tempo, até se iniciar o processo de alimentação.

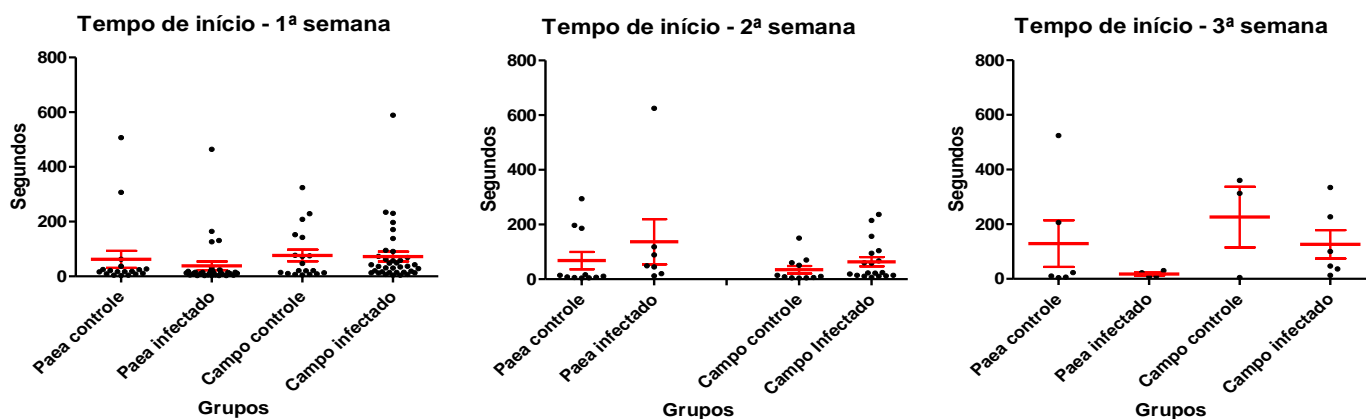


Figura 5.1. Gráficos gerados a partir da análise exploratória dos dados do tempo de início obtidos para os quatro grupos analisados: Paea controle, Paea infectado, Campo controle e Campo infectado. As barras de maior espessura representam os valores médios e as flanqueadoras os erros-padrão médios obtidos.

Na primeira semana, o tempo de início dos quatro grupos não se mostrou similar, o que nos fez recorrer a comparações pareadas entre as curvas para esta semana ( $\chi^2 = 9.7$ ,  $gl = 3$ ,  $p = 0.0213$ ) (Figura 5.2). Notadamente, comparamos as curvas par a par e observamos que os insetos das duas populações do grupo controle gastam a mesma quantidade de segundos para iniciar a

alimentação ( $\chi^2 = 0.5$ ,  $gl = 1$ ,  $p = 0.491$ ), porém houve diferença significativa entre as duas populações quando estas estavam infectadas ( $\chi^2 = 8.3$ ,  $gl = 1$ ,  $p = 0.004$ ). Quando comparadas aos respectivos controles, não se notou impacto da infecção sobre o parâmetro analisado: Campo ( $\chi^2 = 0$ ,  $gl = 1$ ,  $p = 0.863$ ) e Paea ( $\chi^2 = 1.9$ ,  $gl = 1$ ,  $p = 0.171$ ).

Para as semanas subsequentes, não houve qualquer alteração no tempo gasto para inserir a probóscide no camundongo (segunda semana:  $\chi^2 = 4.2$ ,  $GL = 3$ ,  $p = 0.241$ ; terceira semana:  $\chi^2 = 3.6$ ,  $GL = 3$ ,  $p = 0.308$ ).

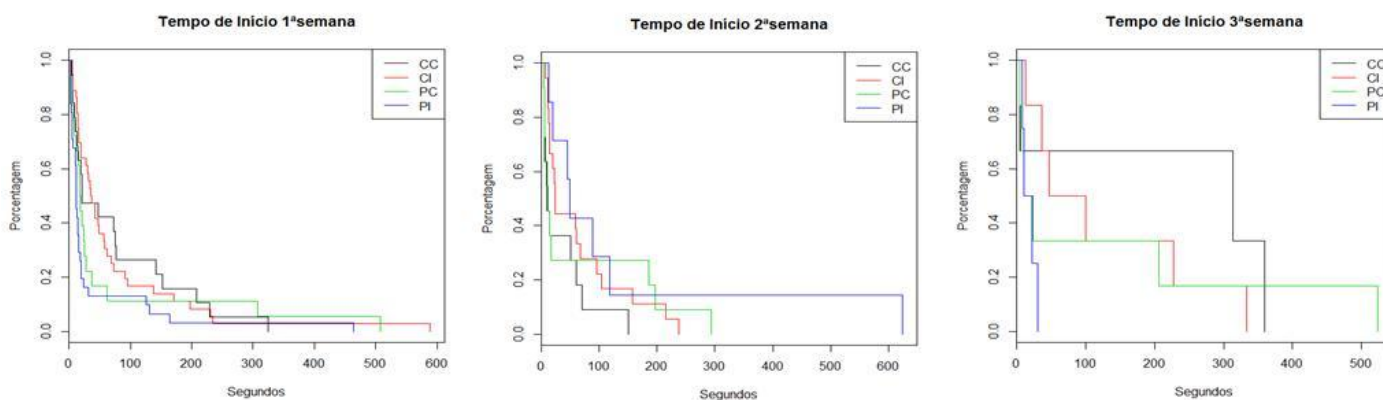


Figura 5.2. Gráficos gerados a partir da análise de risco feita para os dados do tempo de início obtidos para os quatro grupos analisados: Paea controle (PC – curva verde), Paea infectado (PI – curva azul), Campo controle (CC – curva preta) e Campo infectado (CI – curva vermelha).

A análise dos dados mostra que na primeira semana Campo Infectado iniciou a alimentação significativamente depois que Paea Infectado, mas gastando um tempo semelhante ao seu controle. Desta forma, podemos dizer que o DENV-2 não apresentou influência na localização do hospedeiro vertebrado para iniciar a alimentação.



## 5.2.2 Número de provas

Do ponto de vista da transmissão, o número de vezes que a fêmea do *Ae. aegypti* insere a probóscide no hospedeiro é o parâmetro mais importante de seu comportamento alimentar. Podemos observar que a maior parte das fêmeas realiza sua alimentação sanguínea inserindo uma única vez sua probóscide o hospedeiro, mas em algumas situações, como para o grupo Campo controle na semana 2, uma fêmea provou mais do que 10 vezes cada uma para completar a alimentação (Figura 5.3).

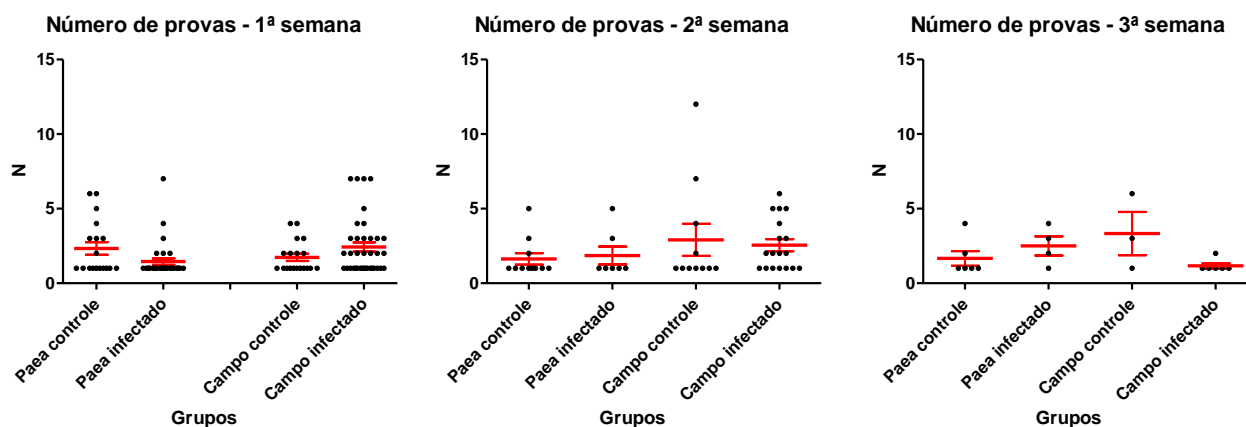


Figura 5.3. Gráficos gerados a partir da análise exploratória dos dados do número de provas obtidos para os quatro grupos analisados: Paea controle, Paea infectado, Campo controle e Campo infectado. As barras de maior espessura representam os valores médios e as flangeadoras os erros-padrão médios obtidos.

Na primeira semana, o número de provas foi semelhante entre as populações de campo e Paea e seus respectivos pares infectados (Campo:  $U = 1114,5$ ,  $P = 0,297$ ; Paea:  $U = 697,5$ ,  $P = 0,10$ ). Desta forma, não foi observada nenhuma influência da infecção no número de provas de *Ae. aegypti* nas duas populações testadas.

O mesmo padrão foi observado na segunda semana, quando novamente não foi detectada influência do vírus dengue no número de picada realizado pelas fêmeas, tanto para Campo ( $U = 286$ ,  $P = 0,492$ ) quanto para Paea ( $U = 103$ ,  $P = 0,929$ ).

Para a terceira semana também não foi observado mudança no número de provas quando Paea estava infectado ( $U = 28$ ,  $P = 0,3542$ ), tampouco em Campo ( $U = 24,5$ ,  $P = 0,1667$ ).

### 5.2.3 Tempo de Prova

Assim como para as demais medidas, grandes desvios padrões foram observados, mostrando, uma vez mais, grande heterogeneidade entre os indivíduos. Como pode ser observado na Figura 5.4, os dados relacionados ao tempo de prova se mostraram bastante dispersos, gerando, conseqüentemente, grandes desvios-padrões.

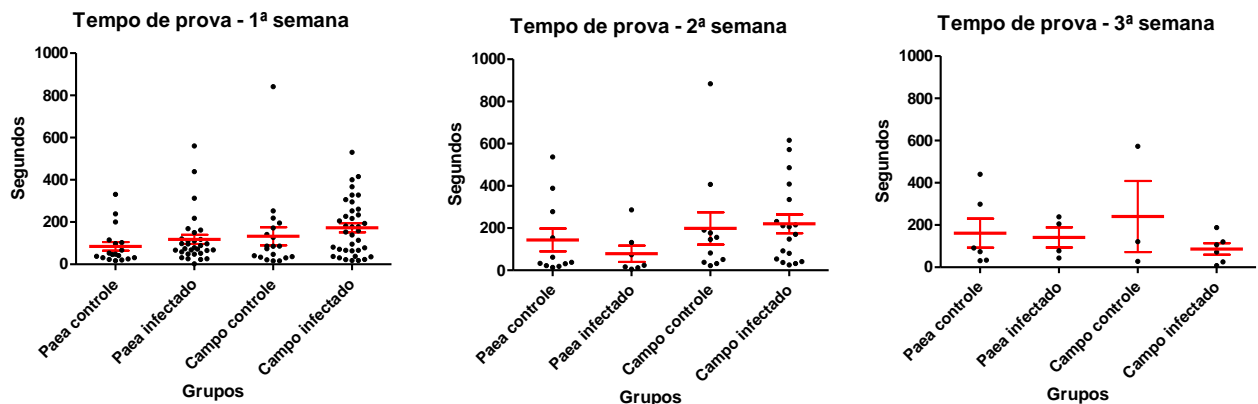


Figura 5.4. Gráficos gerados a partir da análise exploratória dos dados do tempo de prova obtidos para os quatro grupos analisados: Paea controle, Paea infectado, Campo controle e Campo infectado. As barras de maior espessura representam os valores médios e as flanqueadoras os erros-padrão médios obtidos.

Talvez devido a essa grande plasticidade na resposta, o tempo de prova entre os quatro grupos se mostrou similar nas três semanas avaliadas (Primeira semana:  $\chi^2 = 6,6$ ,  $gl = 3$ ,  $p = 0.087$ ; Segunda semana:  $\chi^2 = 6,2$ ,  $gl = 3$ ,  $p = 0.101$ ; Terceira semana:  $\chi^2 = 2,6$ ,  $gl = 3$ ,  $p = 0.449$ ). De fato, mesmo visualmente, as curvas relacionadas ao tempo de prova apresentam grande sobreposição (Figura 5.5).

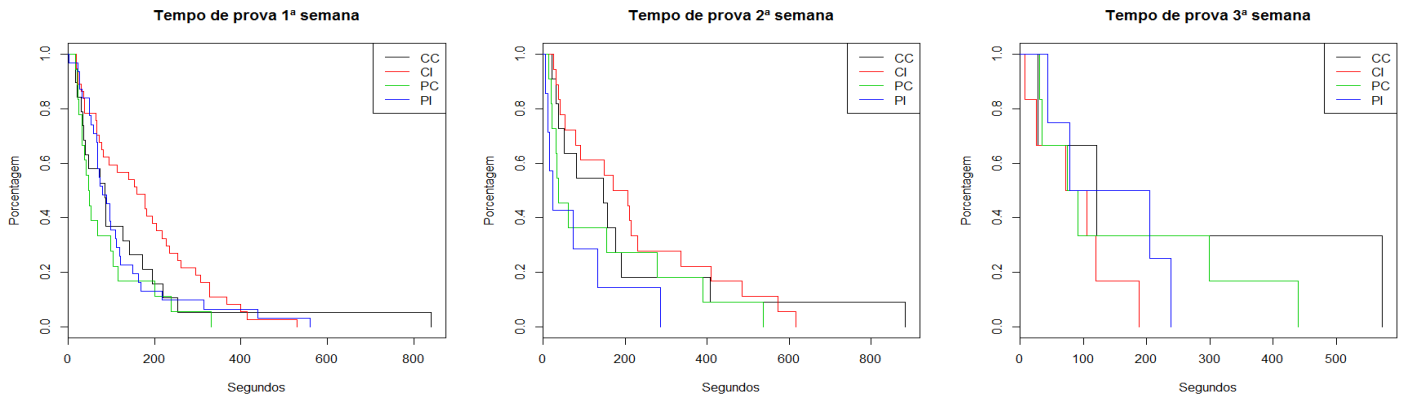


Figura 5.5. Gráficos gerados a partir da análise de risco feita para os dados do tempo de prova obtidos para os quatro grupos analisados: Paea controle (PC – curva verde), Paea infectado (PI – curva azul), Campo controle (CC – curva preta) e Campo infectado (CI – curva vermelha).

Desta forma, podemos concluir que a infecção pelo vírus DENV-2 não parece influenciar no tempo empregado pelos mosquitos a iniciar a alimentação sanguínea.

### 5.2.4 Tempo de ingestão

Dentre os parâmetros do comportamento alimentar, o tempo de ingestão foi aquele que apresentou o menor coeficiente de variação entre as populações. Notadamente, percebe-se no gráfico referente à primeira semana do experimento pouca variabilidade entre os grupos, fato que não se repetiu nas semanas seguintes (Figura 5.6):

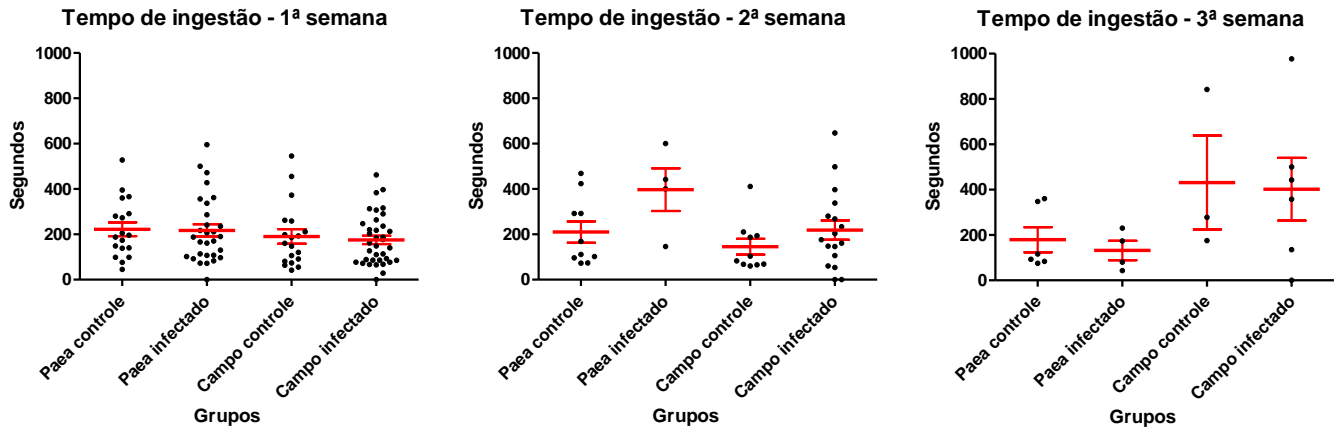


Figura 5.6. Gráficos gerados a partir da análise exploratória dos dados do tempo de ingestão obtidos para os quatro grupos analisados: Paea controle, Paea infectado, Campo controle e Campo infectado. As barras de maior espessura representam os valores médios e as flanqueadoras os erros-padrão médios obtidos.

Não foi observada nenhuma diferença entre os grupos nas duas primeiras semanas de observação do comportamento alimentar dos mosquitos, apesar de visualmente o tempo de ingestão do grupo Campo Controle na 3ª semana ter sido elevado (Primeira semana:  $\chi^2 = 2,4$ , gl = 3,  $p = 0.498$ ; Segunda semana:  $\chi^2 = 6,5$ , gl = 3,  $p = 0.091$ ).

Na terceira semana as curvas do tempo de ingestão dos quatro grupos não foram semelhantes ( $\chi^2 = 9,0$ , gl = 3,  $p = 0.029$ ). Dessa forma, foi necessário recorrer a comparações pareadas para determinar qual delas apresentava-se diferente das demais. Não houve diferença entre o tempo de ingestão gasto entre os mosquitos controle e seus pares infectados tanto para Paea ( $\chi^2 = 0.6$ , GL = 1,  $p = 0.443$ ) quanto para a população de campo ( $\chi^2 = 0.2$ , GL = 1,  $p = 0.638$ ). Dessa forma, eventuais diferenças podem ser consideradas espúrias e não explicadas pela infecção ou tampouco pela população (Figura 5.7).

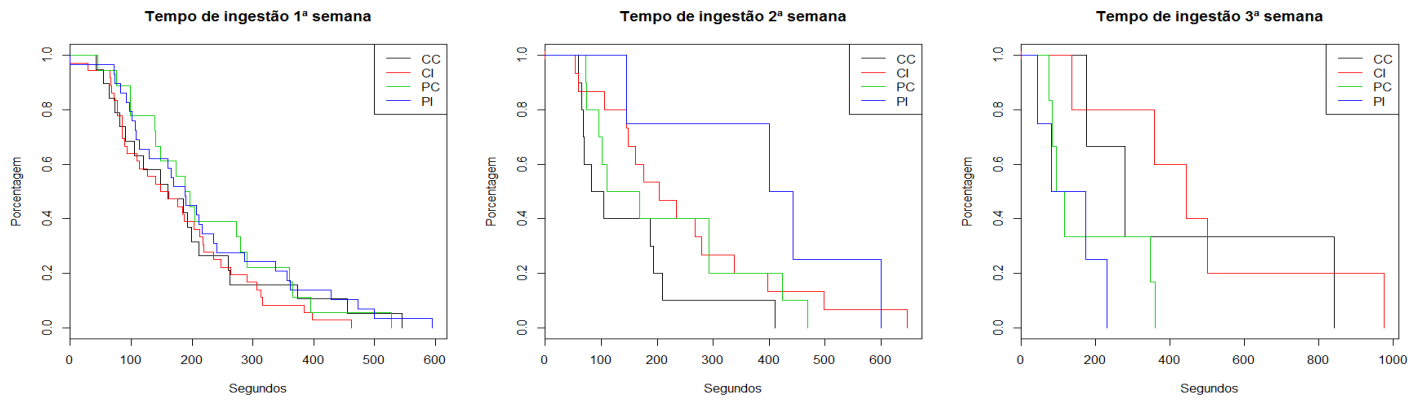


Figura 5.7. Gráficos gerados a partir da análise de risco feita para os dados do tempo de ingestão obtidos para os quatro grupos analisados: Paea controle (PC – curva verde), Paea infectado (PI – curva azul), Campo controle (CC – curva preta) e Campo infectado (CI – curva vermelha).

Dessa forma, tendo em vista os resultados referentes ao tempo de ingestão, podemos dizer que a infecção pelo vírus dengue não influencia o tempo empregado na ingestão de sangue de *Ae. aegypti*.

### 5.2.5 Tempo total

Uma vez que cada um dos tempos mensurados apresentou grandes desvios, é natural esperar que o tempo total, que é a soma de cada um dos tempos, também apresentasse elevados desvio da média. Podemos observar que, enquanto alguns mosquitos terminam toda a sua alimentação em 24 segundos, outros podem demorar mais de 20 minutos no processo. A grande variabilidade observada no tempo total da alimentação sanguínea pode ser vista na Figura 5.8:

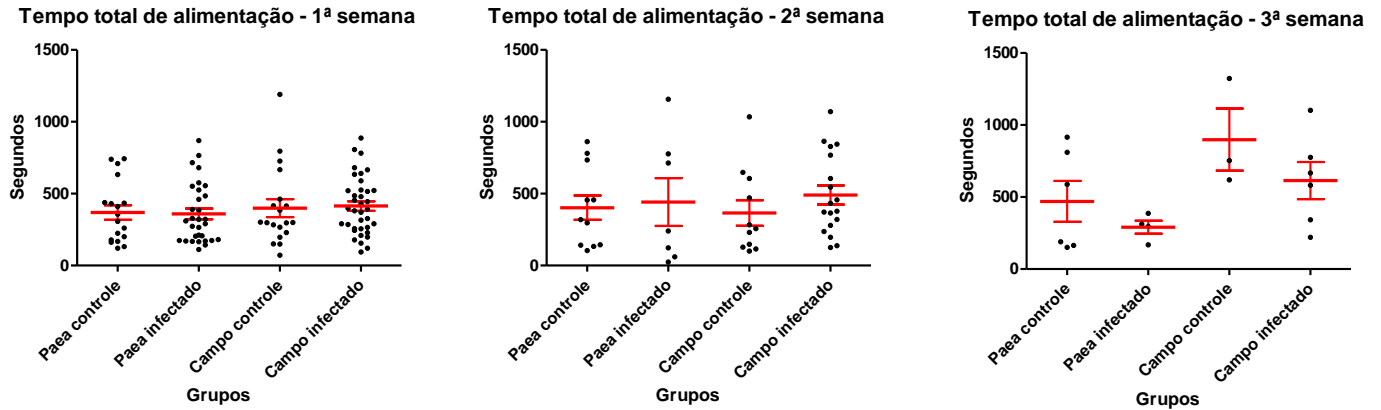


Figura 5.8. Gráficos gerados a partir da análise exploratória dos dados do tempo total de alimentação obtidos para os quatro grupos analisados: Paea controle, Paea infectado, Campo controle e Campo infectado. As barras de maior espessura representam os valores médios e as flangeadoras os erros-padrão médios obtidos

Talvez devido aos grandes desvios, o tempo total de alimentação dos quatro grupos foi similar nas três semanas avaliadas: (Primeira semana:  $\chi^2 = 1,1$ , gl = 3, p = 0.780; Segunda semana:  $\chi^2 = 1,4$ , gl = 3, p = 0.707; Terceira semana:  $\chi^2 = 6,2$ , gl = 3, p = 0.103). De fato, principalmente nas duas primeiras semanas, há grande sobreposição das curvas dos quatro grupos (Figura 5.9).

De um modo geral, nossos dados não suportam a hipótese de que a infecção pelo vírus dengue pode alterar o comportamento alimentar de fêmeas de *Ae. aegypti* nas três semanas pós infecção.

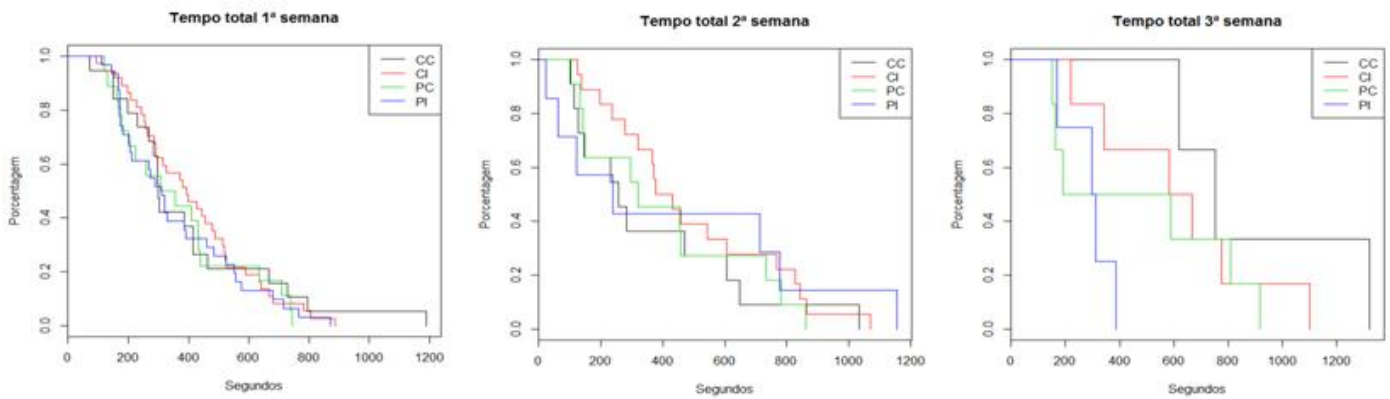


Figura 5.9. Gráficos gerados a partir da análise de risco feita para os dados do tempo total de alimentação obtidos para os quatro grupos analisados: Paea controle (PC – curva verde), Paea infectado (PI – curva azul), Campo controle (CC – curva preta) e Campo infectado (CI – curva vermelha).

### 5.3. Sobrevivência

A infecção oral das fêmeas de *Ae. aegypti* parece ter reduzido a sobrevivência tanto da população de campo quanto da população de laboratório. Apesar do grande desvio-padrão observado para todas as interações População\*Infecção, a média e a mediana dos infectados foi sempre inferior à dos seus pares não infectados (Tabela 5.3). Outro aspecto que favorece a interpretação que a infecção pelo DENV-2 é maléfica para os mosquitos pode ser visto no percentual de fêmeas vivas 14 dias pós-infecção, uma vez que até 3x mais fêmeas estavam vivas no grupo controle do que no experimental (Tabela 5.3). Contudo, a longevidade máxima observada entre os grupos foi semelhante (Tabela 5.3).

	<b>Paea controle</b>	<b>Paea infectado</b>	<b>Campo controle</b>	<b>Campo infectado</b>
<b>Média</b>	20,12	10,42	20,76	14,25
<b>Desvio padrão</b>	10,09	7,16	10	10,66
<b>Mediana</b>	16	9	19	13
<b>Longevidade (max)</b>	38	37	43	43
<b>% vivos 14 dpi</b>	76	25	72	46,5
<b>CV %</b>	50,15	68,71	47,59	74,81
<b>Curtose</b>	2,028	6,2105	2,4878	3,4167
<b>Simetria</b>	0,2876	1,7125	0,6385	0,9952

Tabela 5.3. Análise exploratória gerada a partir dos dados do monitoramento diário da sobrevivência dos quatro grupos analisados (Dados expressos em dias pós-infecção)

Como pode ser observado na Figura 5.10, houve maior dispersão no dia da morte dos indivíduos para os insetos do grupo controle do que para os seus pares infectados, que tiveram mortalidade concentrada até o dia 10 pós-infecção.



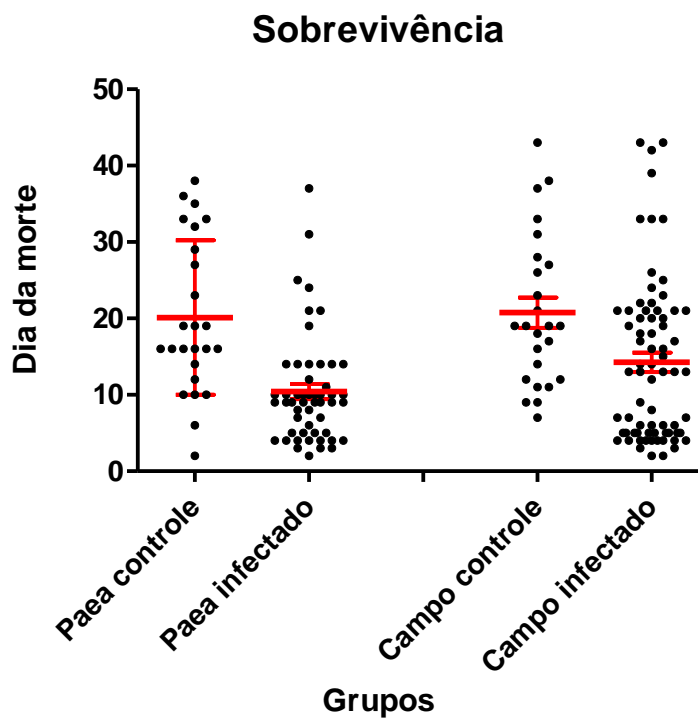


Figura 5.10. Distribuição dos dados de sobrevivência dos grupos. Os pontos representam os indivíduos, a barra de maior espessura a sobrevivência média de cada grupo e as barras flaqueadoras seus desvios-padrão.

Quando analisamos o efeito de cada uma das variáveis na longevidade das fêmeas de *Ae. aegypti* podemos observar que parece ter havido pouca influência da população ( $t = 1,14$ ,  $gl = 171$ ,  $P = 0,256$ ), desconsiderando o tamanho destas e se os mosquitos estavam ou não infectados (Figura 5.11-A). Por outro lado, podemos observar na Figura 5.11-B que os indivíduos infectados apresentaram menor longevidade que os do grupo controle, independente de sua população e tamanho de asa ( $t = 5,19$ ,  $gl = 171$ ,  $P < 0,001$ ).

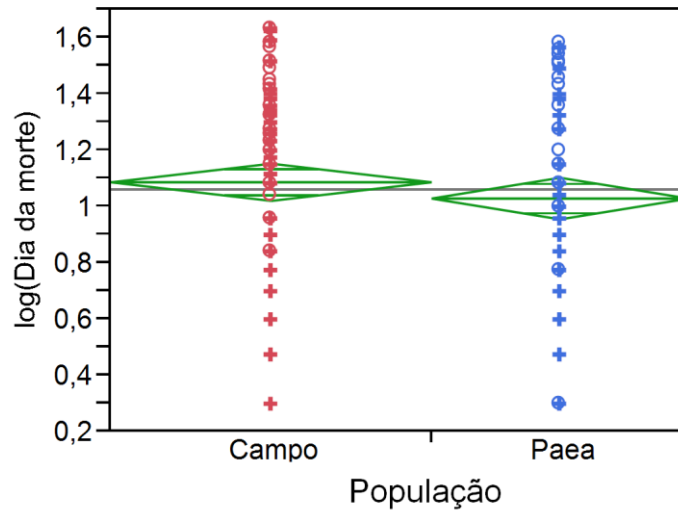


Figura 5.11-A. Comparação gráfica da longevidade das populações analisadas.

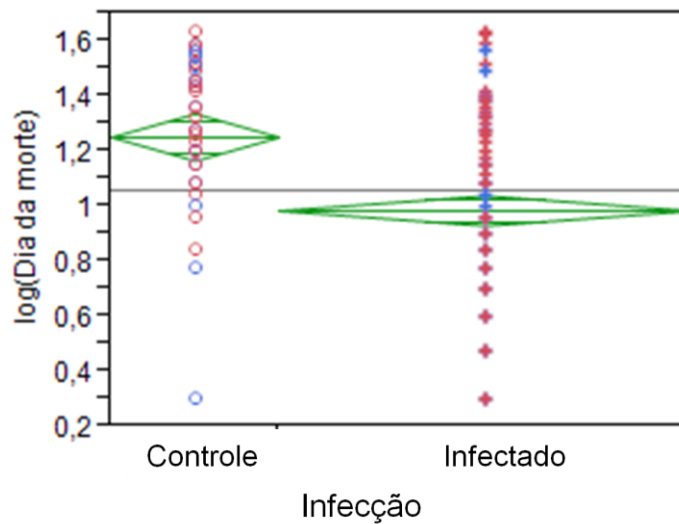


Figura 5.11-B. Impacto da infecção pelo vírus dengue na sobrevivência das populações analisadas. Comparação entre grupos controle (Paea e Campo) e grupos infectados (Paea e Campo). As populações são representadas por diferentes símbolos.

Por fim, houve uma tendência de que os mosquitos de maior tamanho apresentassem menor longevidade, independente de sua população e se estavam infectados (Figura 5.12-A). Contudo, ao adicionarmos de forma independente as retas referentes à população (Figura 5.12-B) e ao status de infecção (Figura 5.12-C), podemos observar que os insetos da população de campo e os infectados apresentaram mortalidade mais intensa com o aumento da asa do que os Paea e os controles, respectivamente.

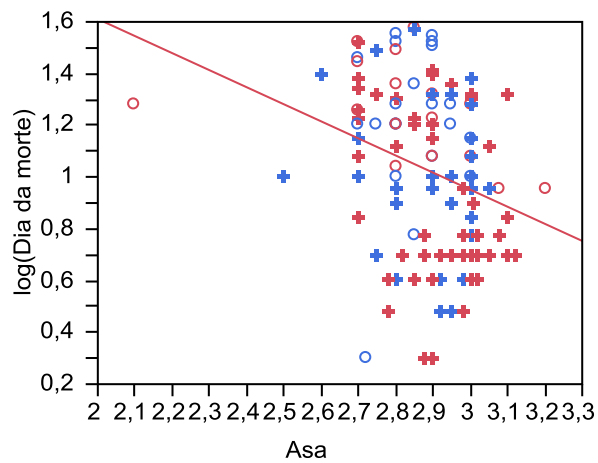


Figura 5.12-A. Relação do tamanho das fêmeas dos quatro grupos analisados e sua sobrevivência.

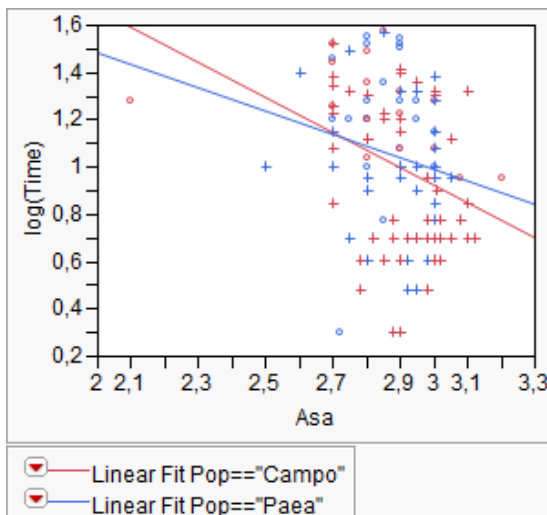


Figura 5.12-B. Relação entre a origem da população e o tamanho das fêmeas sobre sua sobrevivência.

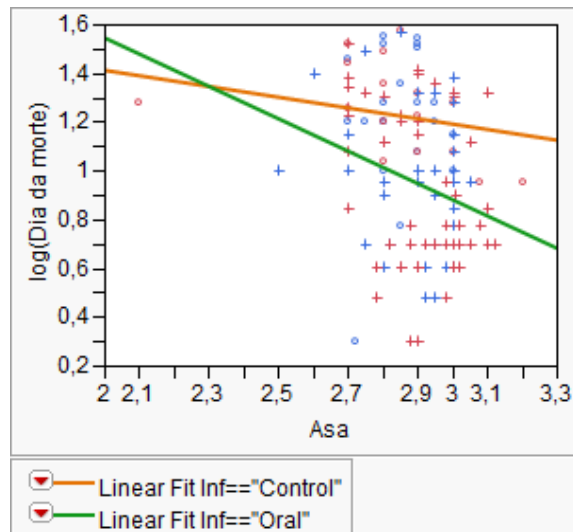


Figura 5.12-C. Impacto da infecção e tamanho das fêmeas de ambas as populações sobre sua sobrevivência.

Ao estudar o modelo completo, com suas três variáveis e suas respectivas interações através de uma ANOVA, obtivemos uma confirmação dos resultados já mostrados (Tabela 5.4). De acordo com a ANOVA, a variável infecção influenciou significativamente a longevidade média de *Ae. aegypti* ( $F = 20,75$ ,  $gl = 1$ ,  $P < 0,0001$ ). Ou seja, a infecção por DENV-2 reduziu a sobrevivência das fêmeas de *Ae. aegypti*, mas foi um fenômeno observado para as duas populações, uma vez que tanto a variável População quanto a interação População\*Infecção não se mostraram significativas (População:  $F = 0,0041$ ,  $gl = 1$ ,  $P = 0,825$ ; População\*Infecção:  $F = 0,000056$ ,  $gl = 1$ ,  $P = 0,979$ ). Por outro lado, as demais variáveis, assim como suas interações, não explicaram a variabilidade observada na longevidade média dos mosquitos.

Fonte	gl	F	p > F
População	1	0,04	0,82
Infecção	1	20,75	< ,0001 *
Asa	1	1,67	0,19
População*Infecção	1	0,0007	0,97
População*Asa	1	1,65	0,20
Infecção*Asa	1	2,08	0,15
População*Infecção*Asa	1	0,09	0,75

Tabela 5.4. Resultado da ANOVA do modelo completo que inclui a avaliação da influência da população, status de infecção por DENV-2, tamanho das fêmeas e combinação dos fatores sobre a sobrevivência de *Aedes aegypti*.

O teste de Log-rank nos mostrou que as curvas de sobrevivência dos quatro grupos (Paea Controle, Paea Infectado, Campo Controle e Campo Infectado) não são similares ( $\chi^2 = 22,7$ , gl = 3, P < 0,001). Dessa forma, passamos para uma investigação par a par com o intuito de determinar qual curva difere das demais. Desconsiderando a população, os mosquitos infectados sobreviveram menos que os do grupo controle ( $\chi^2 = 5,4$ , gl = 1, P = 0,02).

Quando infectada, a população de campo não teve sua sobrevivência reduzida pela infecção ( $\chi^2 = 3,4$ , gl = 1, P = 0,063), apesar do comportamento das curvas serem graficamente distintas (Figura 5.13). Por outro lado, os mosquitos da população Paea sobreviveram menos quando infectados ( $\chi^2 = 16,5$ , gl = 1, P < 0,001). Os dados referentes aos grupos controle se comportaram de forma muito semelhante ( $\chi^2 = 0,1$ , gl = 1, p = 0,75), uma vez que sem o DENV a sobrevivência das populações Paea e Campo foram semelhantes. Esses resultados corroboram a hipótese de que a infecção é nociva aos mosquitos, mas é importante ressaltar que esses efeitos foram mais notáveis na população Paea.

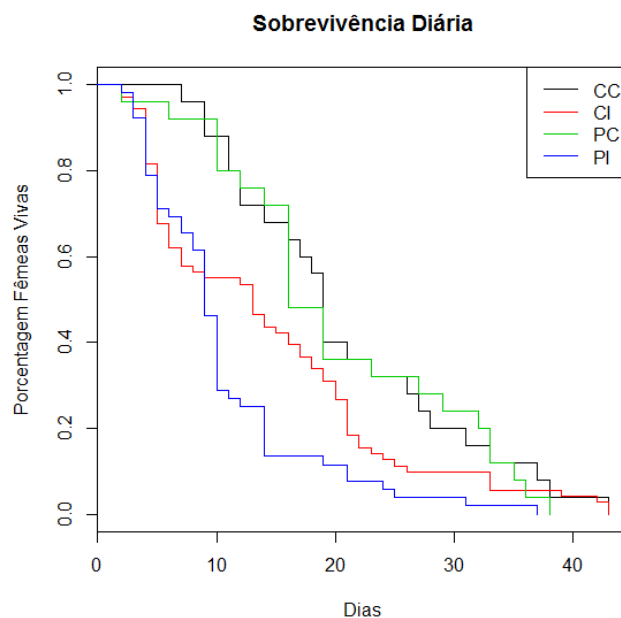


Figura 5.13. Curva da função de distribuição da sobrevivência diária dos grupos analisados (Campo Controle (CC – curva preta), Campo Infectado (CI – curva vermelha), Paea Controle (PC – curva verde) e Paea Infectado (PI – curva azul).

#### 5.4. Fecundidade

Devido à alta mortalidade observada nas fêmeas de *Ae. aegypti*, o número de ovos por desova foi analisado somente até o quarto ciclo de oviposição. Podemos observar que o número de fêmeas que efetivamente desovaram diminui sensivelmente ao longo deste intervalo de tempo, fato que impossibilitou a inclusão da quinta e sexta coleta de ovos nas análises. Dessa maneira, para avaliar o número de ovos posto por fêmea e por grupo, usamos apenas os dados dos três primeiros ciclos de oviposição, enquanto para avaliar o sucesso de oviposição fizemos uso das quatro primeiras desovas.

O monitoramento da fecundidade teve início com a retirada da primeira desova de todas as fêmeas dos quatro grupos analisados, desova esta associada à ingestão do sangue infectivo no momento da infecção ou do sangue contendo meio de cultura, no caso dos grupos controle. As desovas subsequentes são referentes às alimentações experimentais em camundongo anestesiado e foram retiradas sempre 24 horas antes das avaliações do comportamento alimentar dos mosquitos, ou seja, nos dias 6, 13, 20 e 27 pós infecção. Nestes momentos de retirada das desovas, registrou-se o número de fêmeas vivas, quantas dessas desovaram e o número de ovos postos a cada ciclo. Portanto, temos o número médio de ovos postos por grupo (Paea controle, Paea infectado, Campo controle e Campo infectado) por semana (Tabela 5.5).

Grupos	Alimentação infectiva (6 dpi)				1ª Semana (13 dpi)		
	Nº de fêmeas	Nº de fêmeas	Nº de fêmeas que	Ovos	Nº de fêmeas	Nº de fêmeas que	Ovos
	inicial	vivas (%)	desovaram (%)	Média (±DP)	vivas (%)	desovaram (%)	Média (±DP)
<b>Paea controle</b>	25	23 (92)	18 (78)	87,44 (± 28,47)	23 (92)	11 (48)	94,91 (± 33,36)
<b>Paea infectado</b>	52	51 (98)	35 (68)	105,1 (± 31,41)	32 (61)	15 (47)	88,2 (± 48,41)
<b>Campo controle</b>	25	24 (96)	23 (95)	95,17 (± 47,07)	24 (96)	16 (67)	83,44 (± 57,8)
<b>Campo infectado</b>	71	59 (83)	59 (100)	113,6 (± 38,5)	41 (58)	33 (80)	118 (± 42,42)

Grupos	2ª Semana (20 dpi)				3ª Semana (27 dpi)		
	Nº de fêmeas	Nº de fêmeas	Nº de fêmeas que	Ovos	Nº de fêmeas	Nº de fêmeas que	Ovos
	inicial	vivas (%)	desovaram (%)	Média (±DP)	vivas (%)	desovaram (%)	Média (±DP)
<b>Paea controle</b>	25	12 (48)	9 (75)	102,2 (± 22,76)	9 (36)	4 (44)	76,25 (± 36,84)
<b>Paea infectado</b>	52	7 (13)	4 (57)	100 (± 21,34)	4 (8)	2 (50)	94 (± 59,4)
<b>Campo controle</b>	25	16 (64)	10 (63)	87,7 (± 52,86)	9 (36)	1 (11)	15 (± 0)
<b>Campo infectado</b>	71	29 (41)	10 (34)	72,5 (± 37,66)	14 (20)	2 (14)	82,5 (± 4,95)

Tabela 5.5. Análise descritiva da fecundidade dos quatro grupos (linhas). Nas colunas apresentam-se o número de fêmeas vivas no momento da retirada das desovas, quantas destas desovaram e o número médio (± desvio-padrão) de ovos postos ao longo das quatro semanas de experimentação.



De maneira descritiva, podemos avaliar o sucesso de oviposição por ciclo para as fêmeas de *Ae. aegypti* do grupo controle e do grupo infectado. A Figura 5.14 representa o sucesso reprodutivo das fêmeas do grupo controle (ambas as populações) e a Figura 5.15 mostra os mosquitos infectados (novamente ambas as populações). A parte azul de ambos os gráficos representa a porcentagem de indivíduos que puseram ao menos 1 ovo e a parte vermelha aqueles que não depositaram nenhum ovo. A análise mostra uma tendência de redução do sucesso de oviposição ao longo das semanas, mas em especial para os mosquitos infectados. Para as fêmeas do grupo controle, podemos observar que aproximadamente 90% delas ainda realizaram postura no terceiro ciclo de oviposição, enquanto que para os infectados há uma redução gradual no sucesso de oviposição, sendo que no terceiro ciclo mais da metade das fêmeas não ovipuseram sequer um ovo. Nossos dados mostram que, no terceiro ciclo, o sucesso de oviposição das fêmeas infectadas é significativamente menor que o das fêmeas do grupo controle ( $\chi^2 = 15,03$ , gl = 3, p = 0,0016).

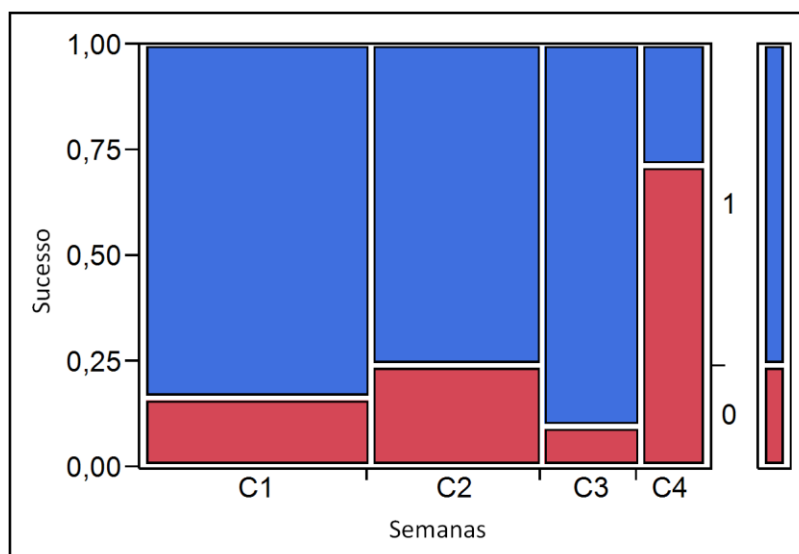


Figura 5.14. Análise de contingência do sucesso de oviposição de fêmeas de *Aedes aegypti* dos grupos controle (ambas as populações). A parte vermelha do gráfico representa o percentual dos indivíduos que não desovaram e a parte azul representa aqueles que depositaram ao menos 1 ovo no papel filtro em cada semana: 1ª (C1), 2ª (C2), 3ª (C3) e 4ª semana (C4).

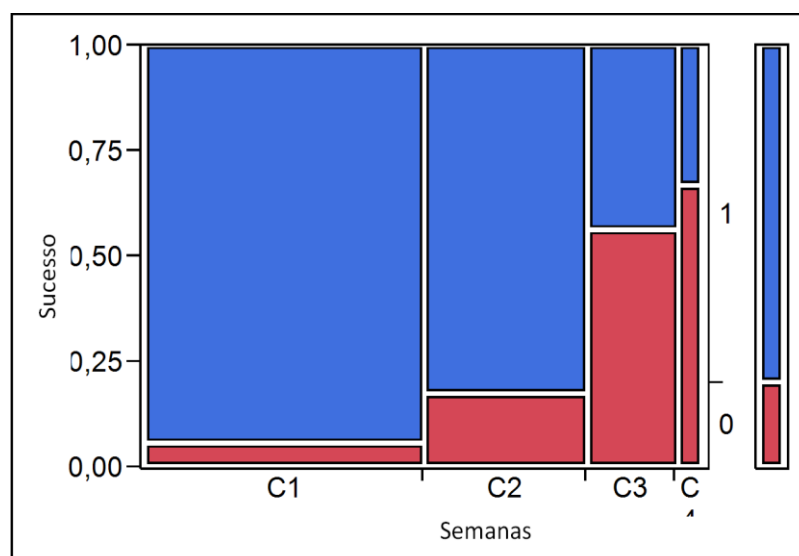


Figura 5.15. Análise de contingência do sucesso de oviposição de fêmeas de *Aedes aegypti* dos grupos infectados (ambas as populações). A parte vermelha do gráfico representa o percentual dos indivíduos que não desovaram e a parte azul representa aqueles que depositaram ao menos 1 ovo no papel filtro em cada semana: 1ª (C1), 2ª (C2), 3ª (C3) e 4ª semana (C4).

Pela regressão logística, podemos perceber diferença significativa no sucesso de oviposição no decorrer das semanas ( $\chi^2 = 9,03$ , gl = 3, p = 0,0289), ou seja, mosquitos mais velhos não colocam ovos com mais frequência que mosquitos jovens. Da mesma forma, também houve influência da interação entre ciclo e infecção sobre o sucesso de oviposição ( $\chi^2 = 14,40$ , gl = 3, p = 0,0024), e entre ciclo e população ( $\chi^2 = 9,030$ , gl = 3, p = 0,029). A interação entre Idade\*População mostra que o sucesso de oviposição de Campo e Paea foi diferente ao longo da idade. De maneira semelhante, o sucesso de oviposição dos infectados e controle também variou de forma não similar em função da idade da fêmea de *Ae. aegypti*. Ou seja, o sucesso de oviposição diminui significativamente em função da população, de seu status de infecção e de sua idade (Tabela 5.6).

Fonte	DF	L-R ChiSquare	Prob>ChiSq
Idade	3	15,3051508	0,0016*
População	1	0,02543486	0,8733
Infecção	1	0,13583026	0,7125
Asa	1	1,33446722	0,2480
Idade*Pop	3	9,03334077	0,0289*
Idade*Inf	3	14,4052192	0,0024*
Idade*Asa	3	2,63940841	0,4506
Pop*Asa	1	0,00263259	0,9591
Pop*Inf	1	0,91451404	0,3389
Inf*Asa	1	0,18646216	0,6659

Tabela 5.6. Regressão logística do sucesso de oviposição de fêmeas de *Ae. aegypti*. O asterisco marca as variáveis e suas interações que influenciaram de maneira significativa o sucesso de oviposição dos insetos.

A segunda etapa de análise da fecundidade dos grupos baseou-se na comparação do número de ovos postos pelas fêmeas por ciclo de oviposição. A média de ovos postos por todos os grupos ao longo das três semanas de observação mostra uma tendência de queda do número de ovos em função da idade (Figura 5.16).

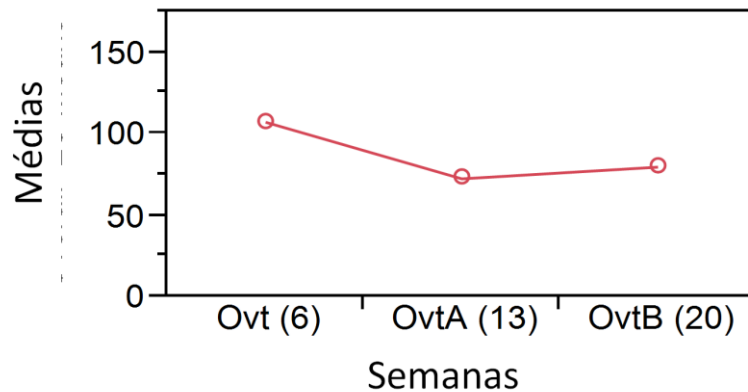


Figura 5.16. Gráfico das médias de ovos postos por todos os grupos (Paea controle, Paea infectado, Campo controle e Campo infectado) por semana de experimentação: 1ª semana (Ovt (5), 2ª semana (OvtA) e 3ª semana (OvtB))

Repetindo o mesmo racional, fizemos a distinção do número de ovos por fêmea, mas separando-as por população (Figura 5.17). Os dados mostraram um padrão aleatório, tornando difícil o fechamento de uma conclusão. Fêmeas de Paea colocam mais ovos no primeiro e terceiro ciclos, enquanto fêmeas do Campo tem maior fecundidade na segunda semana.

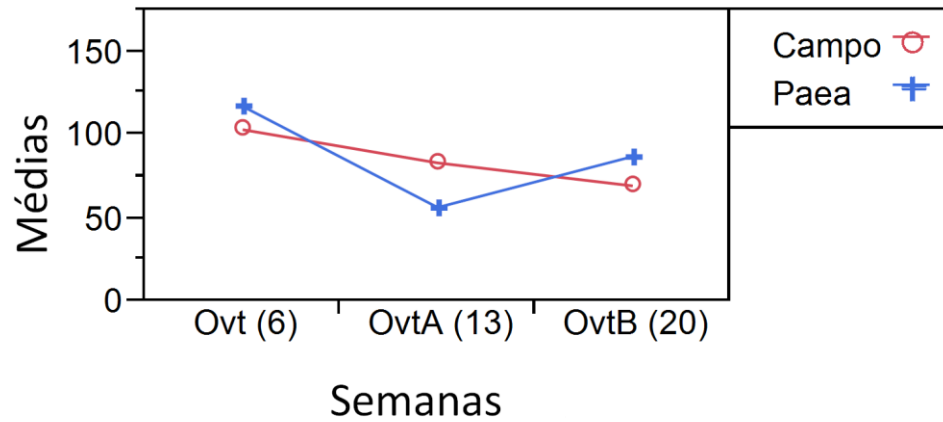


Figura 5.17. Gráfico das médias de ovos postos por semana pelos indivíduos das duas populações analisadas: linha vermelha (Campo controle e infectado) e linha azul (Paea controle e infectado).

Ao fazer a separação das fêmeas entre infectadas e não-infectadas, podemos notar um padrão bastante interessante (Figura 5.18). Nas duas primeiras semanas, o número de ovos colocados pelas fêmeas infectadas e não-infectadas se manteve semelhante. Contudo, no terceiro ciclo de oviposição, as fêmeas infectadas colocaram significativamente menos ovos que as fêmeas não infectadas.

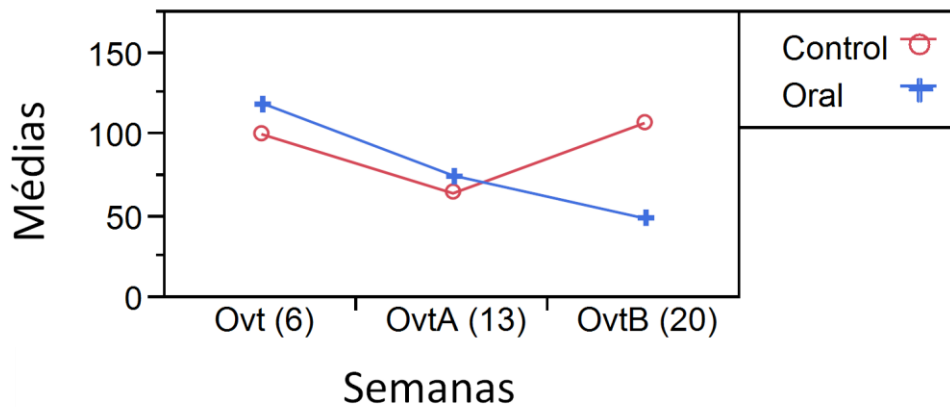


Figura 5.18: Gráfico das médias de ovos postos por semana pelos grupos controle (Paea controle e Campo controle) representados pela linha vermelha e infectados (Paea infectado e Campo infectado), por sua vez representados pela linha azul.

O teste realizado mostrou a influência da infecção sobre o número de ovos postos na terceira semana de amostragem ( $F = 1,17$ ,  $gl = 2$ ,  $p = 0,01$ ), independentemente da população ( $F = 0,17$ ,  $gl = 2$ ,  $p = 0,42$ ), do tamanho das fêmeas ( $F = 0,29$ ,  $gl = 2$ ,  $p = 0,23$ ) ou da semana de amostragem ( $F = 0,28$ ,  $gl = 2$ ,  $p = 0,25$ ) (Tabela 5.7).

Fonte	gl	F	Prob>F
Idade	2	0,2847397	0,2521
Idade*Pop	2	0,1687804	0,4241
Idade*Inf	2	1,168625	0,0142*
Idade*Asa	2	0,2965206	0,2397

Tabela 5.7. Resultado da Análise de variância para medidas repetidas (Manova). A infecção mostrou-se como a única variável influenciadora do número de ovos postos pelos grupos analisados.

Ao analisar de forma conjunta os dados de fecundidade, podemos destacar duas coisas, sendo que ambas acontecem no terceiro ciclo de oviposição. Neste momento, o sucesso de oviposição das fêmeas infectadas é significativamente menor que o das fêmeas do grupo controle. Além disso, fêmeas infectadas também colocam menos ovos que as não-infectadas nesse ciclo. Assim, nossos dados sugerem que o vírus dengue apresenta influência negativa na fecundidade das fêmeas de *Ae. aegypti*.

## 6. DISCUSSÃO

Nesta dissertação buscamos elucidar o impacto desencadeado pela infecção pelo vírus dengue sorotipo 2 em alguns aspectos da biologia do mosquito *Aedes aegypti*. Avaliamos seu comportamento alimentar, sobrevivência e fecundidade, aspectos relevantes para a dinâmica de transmissão do dengue na natureza, uma vez que a variação destes parâmetros pode impactar a capacidade vetorial dos mosquitos.

Primeiramente, testamos a susceptibilidade de *Aedes aegypti* a quatro diferentes amostras de DENV-2 para a obtenção de um vírus capaz de infectar os mosquitos. Quatro grupos de vinte fêmeas cada foram inoculadas intratoracicamente com cada uma das amostras de vírus e chegou-se a relação de aumento da proporção de infecção à medida que aumentava-se o título viral da amostra. Apenas uma das amostras, a de maior título, foi capaz de infectar 100% das fêmeas inoculadas. Vazeille et al. (1999) mostrou a relação do título viral e a taxa de infectividade dos mosquitos. Pequenas reduções no título viral oferecido no momento da infecção experimental geraram grandes decréscimos nas taxas de infectividade. Claramente, a infecção de 100% das fêmeas é um fenômeno pouco natural, mas que se justifica pelo fato de diminuir o número de fêmeas a serem manipuladas caso o sucesso de infecção fosse diferente do apresentado.

Uma discussão bastante recente trata da idéia de que diversas interações parasita-hospedeiros parecem ser moduladas pela relação genótipo-genótipo do sistema. Lambrechts (2011) discute esta hipótese também para *Aedes aegypti*/DENV, onde a competência vetorial é relacionada à combinação específica dos genótipos do vírus e do mosquito. No experimento em questão, testou-se a interação de três linhagens de mosquitos e três de vírus. Percebeu-se claramente a variação na susceptibilidade em função dos pares (vírus/mosquito) combinados, chegando-se a conclusão que esta é uma característica extremamente influenciada pela

combinação específica do genótipo do vetor e do isolado viral. Esta situação traz à tona diversos questionamentos acerca das possibilidades de extrapolação dos resultados em experimentos de competência viral. Desta maneira, estudos que relacionem a competência vetorial de um inseto a um dado microorganismo devem majoritariamente ser realizados com mosquitos e vírus que co-circulem numa mesma localidade (Lambrechts 2011). Desta maneira, a interpretação de nossos resultados deve levar este argumento em consideração, mesmo sendo uma das populações confinada em laboratório há quase 20 anos.

É conhecido o forte tropismo do vírus dengue pelos tecidos nervosos de *Ae. aegypti*, sendo este inclusive um dos poucos tecidos a acumular antígenos virais mesmo após 21 dpi. De certa maneira, à exceção das glândulas salivares, os demais tecidos apresentam redução na infectividade com o passar do tempo (Linthicum et al. 1996, Salazar et al. 2007). A presença e replicação viral nos tecidos nervosos de insetos é uma potencial causa de alterações comportamentais, uma vez que é visto em *Drosophila* e em outros dípteros que a atividade locomotora é regulada por genes do relógio circadiano expressos na região cerebral (Saunders 2002, Hall 2003).

Não encontramos nenhuma evidência de alteração comportamental do hábito alimentar gerada por DENV-2 em *Aedes aegypti* de campo e laboratório infectados via oral. Nenhum dos parâmetros analisados foi significativamente diferente para os pares testados (controles e infectados). Nem mesmo a idade e o nível de disseminação do vírus no corpo das fêmeas mostraram-se fatores importantes na alteração comportamental das fêmeas. Em Putnam e Scott (1995), fêmeas de *Ae. aegypti* de laboratório foram infectadas de uma maneira invasiva e artificial, através de inoculação direta do vírus no seu tórax, e os autores também não detectaram nenhuma alteração comportamental gerada pela infecção. Vale ressaltar o fato deste desenho experimental ter incluído um número reduzido de parâmetros cronometrados e também ter feito a



comparação dos grupos em apenas um dia (14 dpi). Os autores relacionam tal situação à possibilidade de a seleção natural não ter favorecido a fixação de características comportamentais relacionadas ao número de provas, por exemplo. Naturalmente, mesmo não infectados, mosquitos *Ae. aegypti* realizam diversos repastos sanguíneos por ciclo gonotrófico mantendo elevado contato vetor-hospedeiro e conseqüentemente também elevada a taxa de transmissão do vírus em uma população de hospedeiros susceptíveis. Portanto, alterações comportamentais não seriam consideradas mudanças adaptativas para serem selecionadas naturalmente, uma vez que o fitness do vírus, sua taxa de transmissão e manutenção em uma população de hospedeiros não são alterados. Já Platt et al. (1997), infectando uma população de campo também via intratorácica, porém com um sorotipo distinto (DENV-3), relatou impacto significativo gerado pela infecção no comportamento alimentar das fêmeas de *Ae. aegypti*, com aumento do tempo de prova e do tempo total de alimentação. Ou seja, a infecção pelo DENV-3 foi prejudicial ao mosquito, pois uma vez que aumenta o tempo de prova e o tempo total de ingestão, as fêmeas estão mais sujeitas a serem mortas pelo comportamento defensivo do hospedeiro. Interessantemente, nossos resultados somam-se aos de Putnam e Scott (1995) ao infectar mosquitos com DENV-2, mas também em não observar qualquer alteração no hábito alimentar dos insetos infectados. Tal fato permite especular que os efeitos no mosquito podem ser sorotipo-específicos, hipótese ainda desconhecida. De fato, nada se sabe sobre o efeito e impacto que cada sorotipo de dengue pode ter na biologia do mosquito e em seu comportamento. Em humanos, é senso comum que determinados sorotipos são mais virulentos ou mais graves do que outros (Martina et al. 2009). Uma pergunta pertinente é se os sorotipos/genótipos virais que apresentam maior virulência em humanos, com maior mortalidade e morbidade, têm o poder de serem tão ou mais prejudiciais aos seus mosquitos vetores. Como esses vírus de diferentes sorotipos interagem com o mosquito ainda requer maior investigação.

Além do comportamento alimentar, buscamos avaliar e corroborar a idéia de redução do *fitness* de fêmeas de *Ae. aegypti* quando infectadas com DENV. Para isso, algumas análises foram desenvolvidas com os dados da observação diária da sobrevivência dos grupos analisados. Os resultados obtidos mostram relevante e significativo aumento da mortalidade das fêmeas quando infectadas. A análise exploratória dos dados mostra que tanto a média quanto a mediana e o percentual de fêmeas vivas ao 14º dia pós-infecção foram inferiores para ambas as populações quando infectadas, que tiveram sua mortalidade concentrada até o 10º dpi. Portanto, ressalta-se o impacto negativo do vírus dengue na sobrevivência dos indivíduos desta espécie.

Testamos a influência de algumas variáveis sobre a longevidade das fêmeas de *Ae. aegypti*. O fato de os indivíduos pertencerem a duas diferentes populações, uma de campo e outra de laboratório, não influenciou a sobrevivência dos mesmos quando infectados. Parece portanto que a origem da população não influencia a taxa de mortalidade das fêmeas infectadas. Observamos também a relação do tamanho dos mosquitos com sua taxa de sobrevivência e percebemos uma tendência de que com o aumento da asa, os indivíduos da população de campo apresentam maior mortalidade do que aqueles de laboratório e também os infectados em relação aos controles. Um aumento da mortalidade das fêmeas em função do aumento do seu tamanho poderia ser relacionado à maior ingestão de sangue infectivo, com a ingestão de uma maior concentração de partículas virais, que por sua vez pode ser responsável por um maior impacto sobre a fisiologia e *fitness* dos insetos. Da mesma maneira, seria interessante avaliar aspectos como longevidade, sobrevivência e fecundidade, ou seja, aspectos relacionados ao *fitness*, em mosquitos infectados com o mesmo sorotipo/genótipo viral, mas com diferentes títulos.

Ao se considerar o modelo completo, confirmou-se o significativo impacto da infecção por DENV-2 na sobrevivência de fêmeas de *Aedes aegypti*, mas não houve diferenças significativas quando parâmetros como população, tamanho da asa e as combinações possíveis entre estes

foram considerados. Ou seja, nossos dados sugerem que a infecção pelo DENV-2 afeta diretamente a sobrevivência de *Ae. aegypti* enquanto as outras variáveis não apresentaram efeito claro sobre os mosquitos, reforçando as observações de Maciel-de-Freitas et al. (2011), que a infecção resulta em efeitos negativos para o mosquito.

Apesar de algumas barreiras físicas no intestino médio do vetor serem consideradas relevantes no bloqueio da disseminação viral e modulação da infecção (Gubler e Kuno 1997), a infecção pelo DENV desencadeia respostas imunológicas capazes de modular a infecção no organismo do mosquito. No modelo *Ae. aegypti*/DENV esta ativação do sistema imune parece estar relacionada à produção de *small interfering RNA* (siRNA), que são capazes de degradar o mRNA do vírus (Sparks et al. 2008, Sánchez-Vargas et al. 2009). Somando-se à utilização de RNA de interferência, insetos fazem uso do sistema imune inato na defesa contra diversos vírus, sendo a microbiota presente no trato digestivo destes insetos essencial na manutenção de um nível basal de estímulos para a via Toll de resposta a patógenos (Xi et al. 2008). Mosquitos *Ae. aegypti* também utilizam a via de sinalização JAK-STAT para controlar a infecção pelo dengue, agindo independentemente das respostas por RNAi ou pela via Toll (Souza-Neto et al. 2009).

Sim e Dimopoulos (2010) mostraram que o vírus dengue é capaz de suprimir respostas imunológicas nas células que ele infecta, aumentando a replicação viral e exacerbando ainda mais as respostas desencadeadas, fato que pode acarretar consequências importantes na dinâmica de transmissão do vírus e na fisiologia do inseto. Schmid-Hempel (2005) mostrou, para outros sistemas, que a resposta imune desencadeada pela entrada de diferentes patógenos é capaz de debelar a infecção, porém o fitness do hospedeiro é impactado negativamente. Em um exemplo extremo, Moret e Schmid-Hempel (2000) observaram que operários de mamangava desafiados com lipopolissacarídeos e microcápsulas de látex tiveram maior mortalidade que os insetos do

grupo controle. Ironicamente, a ativação do sistema imune de *Bombus terrestris* teve um custo energético tão alto que foi prejudicial para o próprio inseto.

Desta forma, parece que a ativação do sistema imune e conseqüente desencadeamento de suas respostas acabam por requerer energia metabólica, havendo assim um trade-off energético que favorece a alocação de energia no combate à infecção, prejudicando processos vitais. O novo balanço energético gerado pela infecção compromete parâmetros relevantes da biologia do inseto, como sua sobrevivência (Moret e Schmid-Hempel 2000, Maciel-de-Freitas 2011), fecundidade (Yan et al. 1997, Maciel-de-Freitas 2011) e tempo de desenvolvimento (Ferdig et al. 1993). Partindo dessa premissa, é provável que a infecção pelo vírus dengue 2 reduza a sobrevivência das fêmeas de *Aedes aegypti* devido ao alto custo metabólico/energético necessário à formação de respostas celulares e humorais ao vírus.

Ainda pensando no impacto da infecção por DENV-2 no fitness de *Ae. aegypti*, avaliamos também a fecundidade dos indivíduos analisados. Buscamos avaliar tal impacto sob duas diferentes abordagens e, de maneira geral, percebemos o impacto da infecção também sobre a fecundidade do vetor. A primeira delas tratou do sucesso de oviposição por ciclo das fêmeas dos grupos estudados. Tal análise mostrou tendência de redução do sucesso de oviposição com o passar das semanas de amostragem, especialmente para o grupo dos mosquitos infectados. No terceiro ciclo, o sucesso de oviposição das fêmeas infectadas é significativamente menor que o das fêmeas do grupo controle, onde mais de 50% das fêmeas infectadas não realizaram a postura de sequer um ovo, enquanto aproximadamente 90% dos mosquitos não-infectados o fizeram.

Quando analisamos a fecundidade geral dos grupos, percebemos o efeito idade-dependente no sucesso de oviposição: mosquitos mais velhos colocam ovos com menor frequência que mosquitos jovens. Esta relação não foi a mesma para as duas populações analisadas, no entanto ao analisarmos o gráfico gerado, percebemos elevado grau de aleatoriedade, não permitindo

nenhuma conclusão acerca da diferença de fecundidade entre as populações de campo e laboratório ao longo das semanas. Quando separamos os mosquitos em dois grupos, infectados e controles, a redução no sucesso de oviposição foi significativamente diferente, mostrando o impacto da infecção sobre a fecundidade das fêmeas. Logo, o sucesso de oviposição diminuiu significativamente em função da idade das fêmeas, origem da população e seu status de infecção. Até onde buscamos, não encontramos nenhum artigo anterior que observou diminuição do sucesso de oviposição associado à infecção com o DENV-2.

A segunda abordagem baseou-se na comparação do número de ovos postos pelas fêmeas por ciclo de oviposição. Quando todos os quatro grupos foram analisados em conjunto, percebemos a queda do número médio de ovos postos ao longo das três semanas de observação. Ou seja, percebemos uma tendência de queda da produtividade de ovos em função da idade, desconsiderando-se o tamanho, status de infecção ou população das fêmeas. Quando todas as variáveis foram consideradas, percebemos na terceira semana de amostragem o impacto da infecção sobre a fecundidade das fêmeas. Quando as populações foram comparadas, não percebemos redução significativamente diferente, nem mesmo quando consideramos o tamanho dos indivíduos. Então, além de uma maior proporção de indivíduos não oviporem na terceira semana de amostragem quando infectados, a média do número de ovos postos pelos mosquitos infectados também é significativamente menor neste momento. De maneira similar, Maciel-de-Freitas et al. (2011), ao observar a fecundidade em mosquitos infectados e não-infectados ao longo de cinco semanas, também observou que os desafiados com DENV-2 apresentavam menor fecundidade que os controle, mas somente a partir da terceira semana. O vírus dengue 2 parece portanto impactar negativamente a fecundidade de fêmeas de *Aedes aegypti*, sendo este impacto significativo a partir da terceira semana de amostragem, por volta de 20 dias pós-infecção. Após este tempo, praticamente todos os tecidos do mosquito já estão tomados pelo vírus (Salazar et al.

2007) e portanto quando espera-se que o impacto sobre a fisiologia do inseto possa ser mais intenso.

É sabido que a fecundidade de insetos dípteros infectados por outros arbovírus é impactada negativamente pela infecção. Lambrechts e Scott (2009) relacionaram tal impacto a variáveis como a família do vírus, o gênero do inseto ou o meio de transmissão e sua influência sobre o fitness destes insetos. Assim, assumimos que perdas na sobrevivência e fecundidade de fêmeas de *Ae. aegypti* infectadas com DENV-2 são causadas pelo desequilíbrio no trade-off energético ocasionado pela infecção, cujo combate favorece as respostas imunológicas em detrimento de funções vitais, como o metabolismo basal e a produção e deposição de ovos (Scott e Lorenz 1998, Joshi et al. 2002, Mahmood et al. 2004, Styer et al. 2007). Desta maneira, a interação do mosquito *Ae. aegypti* com o vírus dengue e a resposta imune criada em resposta à infecção, assim como o custo energético e seu impacto na viabilidade do mosquito são aspectos que deverão ser explorados no futuro.

## 7. CONCLUSÃO

A discussão acerca do impacto que parasitas geram em seus hospedeiros ocorre há muito tempo, porém são poucos os trabalhos que tratam da relação do vírus dengue e mosquitos *Aedes aegypti*. Os dois grupos que buscaram avaliar o impacto da infecção sobre o comportamento alimentar do vetor trazem resultados contraditórios. Putnam et al. (1995) infectaram fêmeas de *Ae. aegypti* com DENV-2 via inoculação intratorácica e não detectaram nenhuma diferença no comportamento alimentar das fêmeas infectadas. Platt et al. (1997), usando o mesmo modo de infecção, porém com DENV-3, viram que o tempo de prova e o tempo requerido para alimentação pelos mosquitos infectados foram significativamente maiores. Nesta dissertação, buscamos avaliar o impacto da infecção oral, método mais próximo ao natural, por DENV-2 em parâmetros do hábito alimentar de *Ae. aegypti*, e chegamos à conclusão de que o vírus não altera, em nenhum aspecto, os parâmetros analisados. Tal conclusão pode ser devido à grande heterogeneidade na resposta dos mosquitos aos padrões observados, camuflando possíveis alterações comportamentais geradas pela infecção. Além disso, mais interessante, seria observar se a alteração no hábito alimentar de *Ae. aegypti* é um fenômeno sorotipo-específico.

Buscamos também avaliar o impacto da infecção na sobrevivência e fecundidade dos indivíduos avaliados ao longo de mais de 40 dias pós-infecção. A longevidade não foi muito diferente. A taxa de mortalidade dos grupos infectados foi maior, corroborando a idéia do impacto negativo da infecção na fisiologia dos mosquitos e comprometimento de suas funções vitais. A fecundidade também mostrou ser impactada pela infecção. Vimos que o número médio de ovos por fêmea diminui com o passar das semanas e este decréscimo é mais acentuado para o grupo dos mosquitos infectados. Na terceira semana, quando o vírus dengue encontra-se disseminado nos tecidos do mosquito, fêmeas infectadas têm menor sucesso de oviposição

(probabilidade de colocar ovos) e colocam significativamente menos ovos que fêmeas do grupo controle.

Nossas conclusões mostram o significativo impacto da infecção pelo vírus dengue 2 no fitness de *Aedes aegypti*. Não detectamos alterações relevantes no comportamento alimentar das populações avaliadas, mas corroboramos a imagem de redução do fitness dos mosquitos infectados, tendo havido prejuízo para sua sobrevivência e fecundidade, aspectos de fundamental relevância em sua capacidade vetorial. Pretendemos continuar investigando aspectos da interação mosquito-vírus para avançar no conhecimento sobre a epidemiologia da doença e controle do vetor.



## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Austad SN, Sunquist ME 1986. Sex-ratio manipulation in the common opossum. *Nature* 324: 58-60.
- Bacot AW, Martin CJ 1914. Observations on the mechanism of the transmission of plague by fleas. *Journal of Hygiene, Plague Supplement* 3: 423-39.
- Barreto ML, Teixeira MG 2008. Dengue no Brasil: situação epidemiológica e contribuições para uma agenda de pesquisas. *Estudos avançados* 22 (64): 53-72.
- Bracco JE, Lara MC, Lourenço-de-Oliveira R 2007. Genetic variability of *Aedes aegypti* in the Americas using a mitochondrial gene: evidence of multiple introductions. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 102 (5): 573-580.
- Braga IA, Valle D 2007. *Aedes aegypti*: histórico do controle no Brasil. *Epidemiol Serv. Saúde* 16 (4): 113-118.
- Braks MAH, Honório NA, Lourenço-de-Oliveira R, Juliano SA, Lounibos LP 2003. Convergent habitat segregation of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in southeastern Brazil and Florida, USA. *J Med Entomol* 40:785-794.
- Braks MAH, Honório NA, Lounibos LP, Lourenço-de-Oliveira R, Juliano AS 2004. Interspecific competition between two invasive species of container mosquitoes, *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Brazil. *Ann Entomol Soc Am* 97: 130-139.
- Briegel H 1980. Determination of uric acid and hematin in a single sample of excreta from blood-fed insects. *Experientia* 36: 1428.
- Câmara FP, Theophilo RLG, Teixeira-dosSantos G, Pereira SFRG, Câmara DCP, de Matos RRC 2007. Estudo retrospectivo (histórico) da dengue no Brasil: características regionais e dinâmicas. *Rev Soc Bras Med Trop* 40 (2): 192-196.

Carvalho MS, Andreozzi VL, Codeço CT, Barbosa MTS, Shimakura SE 2005. Análise de sobrevivência: teoria e aplicações em saúde. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz.

Cecilio AB, Campanelli ES, Souza KPR, Figueiredo LB, Resende MC 2009. Natural vertical transmission by *Stegomyia albopicta* as dengue vector in Brazil. Brazilian Journal of Biology 69: 123-127.

Clements AN 1999. The Biology of Mosquitoes, Vol. 1: Development, nutrition and reproduction. London, Chapman & Hall.

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

Day JF, Edman JD, Scott TW 1994. Reproductive fitness and survivorship of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) maintained on blood, with field observations from Thailand. J Med Entomol 31: 611-617.

Dye C 1990. Epidemiological significance of vector-parasite interactions. Parasitol 101: 409-415.

Ebert D, Herre EA 1996. The evolution of parasitic diseases. Parasitology Today 12: 96-101.

Edman JD, Strickman D, Kittayapong P, Scott TW 1992. Female *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Thailand rarely feed on sugar. J Med Entomol 29: 1035-1038.

Ferdig MT, Beerntsen BT, Spray FJ, Li J, Christensen BM 1993. Reproductive costs associated with resistance in a mosquito-filarial worm system. Am J Trop Med Hyg 49: 756-762.

Focks DA, Daniels E, Haile DG, Keesling JE 1995. A simulation model of the epidemiology of urban dengue fever: literature analysis, model development, preliminary validation, and samples of simulation results. Am J Trop Med Hyg 53: 489-506.

Focks DA, Brenner RJ, Hayes J, Daniels E 2000. Transmission thresholds for dengue in terms of *Aedes aegypti* pupae per person with discussion of their utility in source reduction efforts. *Am J Trop Med Hyg* 62: 11-18.

Frank AS 1990. Sex allocation theory for birds and mammals. *Ann Rev Ecol Syst* 21: 13-55.

Frankino WA, Juliano SA 1999. Costs of reproduction and geographic variation in the reproductive tactics of the mosquito *Aedes triseriatus*. *Oecologia* 120: 59-68.

Garret-Jones C 1964. The human blood index of malaria vectors in relation to epidemiological assessment. *Bull Wld Hlth Org* 30: 241-261.

Grimstad PR, Ross QE, Craig GB 1980. *Aedes triseriatus* (Diptera: Culicidae) and La Crosse virus. II. Modification of mosquito feeding behavior by virus infection. *J Med Entomol* 31: 1-7.

Gubler DJ, Kuno G 1997. Dengue and dengue hemorrhagic fever. CAB International, Wallingford, 498pp.

Gubler DJ 2004. The changing epidemiology of yellow fever and dengue 1900 to 2003: full circle? *Comp Immun Microbiol Infect Dis* 27: 319-330.

Gusmão DS, Santos AV, Marini DC, Russo ES, Peixoto AMD, Bacci M Jr, Berbert-Molina MA, Lemos FJA 2007. First isolation of microorganisms from the gut diverticulum of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): new perspectives for an insect-bacteria association. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 102: 919-924.

Hall JC 2003. Genetics and molecular biology of rhythms in *Drosophila* and other insects. *Adv Genet* 48: 1-280.

Halstead SB 2008. Dengue virus – Mosquito interactions. *Ann Rev Entomol* 53: 273-291.

Harbach RE, Knight KL 1980. Taxonomist's glossary of mosquito anatomy. Plexus Publications Co., Marlton, NJ: 1-54.

Hemme RR, Thomas CL, Chadee D, Severson DW 2010. Influence of urban landscapes on population dynamics in a short-distance migrant mosquito: evidence for the dengue vector *Aedes aegypti*. *Plos Negl Trop dis* 4 (3): e634.

Joshi V, Mourya DT, Sharma RC 2002. Persistence of dengue-3 virus through transovarial transmission passage in successive generations of *Aedes aegypti* mosquitoes. *Am J Trop Med Hyg* 67: 158–161.

JMP 9.0.0. 2010. Statistical discovery. Copyright SAS Institute Inc.

Lambrechts L, Scott TW 2009. Mode of transmission and the evolution of arbovirus virulence in mosquito vectors. *Proc R Soc B* 276: 1369-1378.

Lambrechts L 2011. Quantitative genetics of *Aedes aegypti* vector competence for dengue viruses: towards a new paradigm? *Trends in Parasitology*. *Cell Press* 27 (3): 111-114.

Lea AO, Dimond JB, DeLong DM 1956. Role of diet in egg development by mosquitoes (*Aedes aegypti*). *Science* 123: 890-891.

Lee JH, Rowley WA, Platt KB 2000. Longevity and spontaneous flight activity of *Culex tarsalis* (Diptera: Culicidae) infected with western equine encephalomyelitis virus. *J Med Entomol* 37: 187-193.

Lima-Camara TN, Bruno RV, Luz PM, Castro MG, Lourenço-de-Oliveira R, Sorgine MHF, Peixoto AA 2011. Dengue infection increases the locomotor activity of *Aedes aegypti* females. *Plos One* 6 (3): e17690.

Linthicum KJ, Platt K, Myint KS, Lerdthusnee K, Innis BL, Vaughn DW 1996. Dengue 3 virus distribution in the mosquito *Aedes aegypti*: an immunocytochemical study. *Med Vet Entomol* 10: 87–92.

Lourenço-de-Oliveira R, Vazeille M, Filippis AMB, Failloux AB 2003. Large genetic differentiation and low variation in vector competence for dengue and yellow fever viruses of

*Aedes albopictus* from Brazil, the United States, and the Cayman Islands. *Am J Trop Med Hyg* 69 (1): 105-14.

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

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

Maciel-de-Freitas R, Koella JC, Lourenço-de-Oliveira R 2011. Lower survival rate and fecundity of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) females orally challenged with dengue virus. *TRSTMH* 105: 452-458.

Maciel-de-Freitas R, Avendanho FC, Santos R, Sylvestre G, Araujo SC, Lima JBP, Martins AJ, Coelho GE, Valle D 2012. Re-emergence of dengue virus serotype 4 in Brazil after 28 years of absence: effectiveness of vector control interventions. Submitted.

Mahmood F, Reisen WK, Chiles RE, Fang Y 2004. Western equine encephalomyelitis virus infection affects the life table characteristics of *Culex tarsalis* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* 41: 982-986.

Martina BEE, Koraka P, Osterhaus ADME 2009. Dengue Virus Pathogenesis: an Integrated View. *Clinical Microbiology Reviews* 22 (4): 564-581.

Matthew P, Daugherty MP, Alto BW, Juliano SA 2000. Invertebrate carcasses as a resource for competing *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* 37(3): 364-372.

Meira 1916. "Urubaca" gripe ou dengue? *Dengue. Clínica Médica. Gráfica O Estado de São Paulo*, 273-285.

Merritt RW, Dadd RH, Walker ED 1992. Feeding behavior, natural food, and nutritional relationships of larval mosquitoes. *Annu Rev Entomol* 37: 349–376.

Ministério da Saúde 2011. Coordenação Geral do Programa Nacional de Controle da Dengue – Balanço Dengue. Semana Epidemiológica 1 a 39 de 2011. [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/informe\\_dengue\\_2011\\_37\\_39.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/informe_dengue_2011_37_39.pdf).

Moret Y, Schmid-Hempel P 2000. Survival for immunity: the price of immune system activation for bumblebee workers. *Science* 290: 1166-1168.

Morettin PA, Bussab WO 2010. *Estatística Básica*. 6a Edição. São Paulo: Saraiva.

Nogueira RMR, Miagostovich MP, Lampe E 1990. Isolation of dengue virus type 2 in Rio de Janeiro. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 85 (2): 253.

Nogueira RMR, Miagostovich MP, Filippis AMB, Pereira MAS, Schatzmayr HG 2001. Dengue virus type 3 in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 96: 925-926.

Nogueira RMR, Araújo JMG, Schatzmayr HG 2007. Dengue viruses in Brazil, 1986-2006. *Pan Am J Public Health* 22: 358-363.

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

Pedro A 1923. O dengue em Nictheroy. *Brazil-Médico* 1 (13): 173-7.

Pimenta Jr FG 2005. Instrumento para avaliar a implantação do Programa Nacional de Controle do Dengue no âmbito municipal, Dissertação de Mestrado Escola Nacional de Saúde Pública. Rio de Janeiro, RJ.

Platt BK, Linthicum KJ, Myint KSA, Innis BL, Lerdthusnee K, Vaughn DW 1997. Impact of dengue virus infection on feeding behavior of *Aedes aegypti*. *Am J Trop Med Hyg* 57: 119-125.

- Pontes RJS, Ruffino-Netto A 1994. Dengue in urban locality of Southeastern, Brazil: Epidemiological aspects. *Rev. Saúde Pública* 28 (3): 218-227.
- Poulin R 1994. The evolution of parasite manipulation of host behavior - a theoretical-analysis. *Parasitology* 109: 109-118.
- Poulin R 2007. *Evolutionary ecology of parasites*. Princeton University Press: 332p.
- Putnam JL e Scott TW 1995. Blood-feeding behavior of dengue-2 virus-infected *Aedes aegypti*. *Am J Trop Med Hyg* 52: 225-227.
- R 2.13.0 2011. A language and environment for statistical computing. R Development Core Team. <http://www.R-project.org>.
- Reed LJR, Muench NA 1938. Simple method of estimating fifty percent end-point. *Amer J Hyg* 27: 493-97.
- Rezende GL, Martins AJ, Gentile C, Farnesi LC, Pelajo-Machado M, Peixoto AA, Valle D 2008. Embryonic desiccation resistance in *Aedes aegypti*: presumptive role of the chitinized serosal cuticle. *BMC Developmental Biology* 8: 82.
- Ridley M 1993. *The red queen: Sex and the evolution of human nature*. Harper Perennial: 288p.
- Rigáu-Perez JG, Clark GG, Gubler DJ, Reiter P, Sanders EJ, Vorndan AV 1998. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *The Lancet* 352: 971-977.
- Rossignol PA, Ribeiro JMC, Spielman A 1986. Increased biting and reduced fertility in sporozoite-infected mosquitoes. *Am J Trop Med Hyg* 35: 277-279.
- Rutledge LC, Ward RA, Gould DJ 1964. Studies on the feeding response of mosquitoes to nutritive solutions in a new membrane feeder. *Mosq News* 24: 407-419.

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

Sánchez-Vargas I, Scott JC, Poole-Smith BK, Franz AWE, Barbosa-Solomieu V, Wilusz J, Olson KE, Blair CD 2009. Dengue virus type 2 infections of *Aedes aegypti* are modulated by the mosquito's RNA interference pathway. PLoS Pathog 5: e1000299.

Saunders DS 2002. Insect Clocks. Amsterdam: Elsevier Science. 280 p.

Schatzmayer HG 2000. Dengue Situation in Brazil by Year 2000. Mem Inst Oswaldo Cruz 95: 179-181.

Schmid-Hempel P 2005. Evolutionary ecology of insect immune defenses. Annu Rev Entomol 50: 529-551.

Scott TW, Clark GG, Amerasinghe PH, Lorenz LH, Reiter P, Edman JD 1993a. Detection of multiple blood feeding patterns in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) during a single gonotrophic cycle using a histological technique. J Med Entomol 30: 94-99.

Scott TW, Chow E, Strickman D, Kittayapong P, Wirtz RA, Lorenz LH, Edman JD 1993b. Blood-feeding patterns of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) collected in a rural Thai village. J Med Entomol 30: 922-927.

Scott TW, Lorenz LH 1998. Reduction of *Culiseta melanura* fitness by eastern equine encephalomyelitis virus. Am J Trop Med Hyg 59: 341-346.

Scott TW, Amerasinghe PH, Morrison AC, Lorenz LH, Clark GG, Strickman D, Kittayapong P, Edman JD 2000a. Longitudinal studies of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Thailand and Puerto Rico: Blood feeding frequency. J Med Entomol 37: 89-101.



Scott TW, Morrison AC, Lorenz LH, Clark GG, Strickman D, Kittayapong P, Zhou H, Edman JD 2000b. Longitudinal studies of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Thailand and Puerto Rico: Population dynamics. *J Med Entomol* 37: 77-88.

Serufu JC, Oca HM, Tavares VA, Souza AM, Rosa RV, Jamal MC, Lemos JR, Oliveira MA, Nogueira RM, Schatzmayr HG 1993. Isolation of dengue virus type 1 from larvae of *Aedes albopictus* in Campos Altos city, State of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 88:503-504.

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

Sim S, Dimopoulos G 2010. Dengue virus inhibits immune responses in *Aedes aegypti* cells. *PLoS One* 5: e10678.

Singh KRP 1967. Cell cultures derived from larvae of *Aedes albopictus* (Skuse) and *Aedes aegypti* (L). *Current science* 36 (19): 506-508.

Soares P 1928. Etiologia Symptomatologia e Prophylaxia da dengue – a epidemia do aviso francês “Antarès” no porto da Bahia. Salvador: Arquivo do Hospital de Isolamento em Mont’Serrat.

Souza RP, Rocco IM, Maeda AY, Spenassato C, Bisordi I, Suzuki A 2011. Dengue virus type 4 phylogenetics in Brazil 2011: Looking beyond the veil. *PLoS Negl Trop Dis*. 5: 1439.

Souza-Neto JA, Sim S, Dimopoulos G 2009. An evolutionary conserved function of the JAK-STAT pathway in anti-dengue defense. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 17841-17846.

Sparks WO, Bartholomay LC, Bonning BC 2008. Beckage NE ed. Insect immunity to viruses. Oxford: Elsevier 2008, 209-242.

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

Temporão JG, Penna GO, Carmo EH, Coelho GE, do Socorro Silva Azevedo R, Teixeira Nunes MR, da Costa Vasconcelos PF 2011. Dengue virus serotype 4, Roraima State, Brazil. *Emerg Infect Dis* 17 (10): 1979-80.

The biology of disease vectors. University Press of Colorado: 632 pp.

Thensmozhi V, Tewari SC, Manavalan R, Balasubramanian A, Gajanana A 2000. Natural vertical transmission of dengue viruses in *Aedes aegypti* in southern India. *TRSTMH* 94: 507.

Thomas F, Adamo S, Moore J 2005. Parasitic manipulation: where are we and where should we go?. *Behavioral process* 68: 185-199.

Van Handel E 1972. The detection of nectar in mosquitoes. *Mosq. News* 32: 458.

Van Valen L 1973. A new evolutionary law. *Evolutionary theory* 1 (1): 1-30.

Vazeille-Falcoz M, Mousson L, Rodhain F, Chungue E, Failloux AB 1999. Variation in oral susceptibility to dengue type 2 virus of populations of *Aedes aegypti* from the islands of Tahiti and Moorea, French Polynesia. *Am J Trop Med Hyg* 60: 292-299.

Watts DM, Burke DS, Harrison BA, Whitmire RE, Nisalak A 1987. Effect of temperature on the vector efficiency of *Aedes aegypti* for dengue 2 virus. *Am J Trop Med Hyg* 36: 143-152.

Woodring JL, Higgs S, Beaty BJ 1996. Natural cycles of vector-borne pathogens: 51-72. In: Beaty BJ, Marquardt WC 1996. *The biology of disease vectors*. University Press of Colorado: 632 pp.

World health organization (WHO) 1997. *Dengue hemorrhagic fever: Diagnosis, treatment, prevention and control*. Geneva.

Xi Z, Ramirez JL, Dimopoulos G 2008. The *Aedes aegypti* toll pathway controls dengue virus infection. *PLoS Pathog* 4: e1000098.

Yan G, Severson DW, Christensen BM 1997. Costs and benefits of mosquito refractoriness to malaria parasites: Implications for genetic variability of mosquitoes and genetic control of malaria. *Evolution* 51(2): 441-450.

Yazi-Mendoza M, Salas-Benito JS, Lanz-Mendoza H, Nernández-Martínez S, Del Angel RM 2002. A putative receptor for dengue virus in mosquito tissues: localization of a 45-kDa glycoprotein. *Am J Trop Med Hyg* 67: 76-84.