Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

# AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA *Wolbachia* NA INFECÇÃO E TRANSMISSÃO VERTICAL DO VÍRUS DENGUE EM MOSQUITOS *Aedes aegypti*

**por**

**ETIENE CASAGRANDE PACIDÔNIO**

Belo Horizonte
Fevereiro/2015

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

# AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA *Wolbachia* NA INFECÇÃO E TRANSMISSÃO VERTICAL DO VÍRUS DENGUE EM MOSQUITOS *Aedes aegypti*

**por**

**ETIENE CASAGRANDE PACIDÔNIO**

Dissertação apresentada com vistas à obtenção do título de Mestre em Ciências na área de concentração de Biologia Celular e Molecular.

Orientação: Dr. Luciano Andrade Moreira
Co-orientação: Dr. Eric Pearce Caragata

Belo Horizonte
Fevereiro/2015

Catalogação-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do CPqRR
Segemar Oliveira Magalhães CRB/6 1975

P117a 2015

Pacidônio, Etiene Casagrande.

Avaliação da influência da *Wolbachia* na infecção e transmissão vertical do vírus dengue em mosquitos *Aedes aegypti* / Etiene Casagrande Pacidônio. – Belo Horizonte, 2014.

xviii, 97 f.: il.: 210 x 297 mm.

Bibliografia: 107-115

Dissertação (mestrado) – Tese para obtenção do título de Mestre em Ciências pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

1. Dengue/transmissão 2. *Aedes*/parasitologia 3. *Wolbachia*/patogenicidade I. Título. II. Moreira, Luciano Andrade (Orientação). Caragata, Eric Pearce (Co-orientação).

CDD – 22. ed. – 616.918 52

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

**"AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA *Wolbachia* NA INFECÇÃO E TRANSMISSÃO VERTICAL DO VÍRUS DENGUE EM MOSQUITOS *Aedes aegypti*"**

por

ETIENE CASAGRANDE PACIDONIO

Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Luciano Andrade Moreira (Presidente)
Prof. Dr. João Trindade Marques
Prof. Dr. Marcos Henrique Ferreira Sorgine
Suplente: Dr. José Manuel Latorre Estivalis

Dissertação defendida e aprovada em: 27/02/2015

“Há um tempo em que é preciso abandonar as roupas usadas, que já tem a forma do nosso corpo, e esquecer os nossos caminhos, que nos levam sempre aos mesmos lugares. É o tempo da travessia: e, se não ousarmos fazê-la, teremos ficado, para sempre, à margem de nós mesmos”.

**Fernando Pessoa**

## AGRADECIMENTOS

Penso que agradecimentos compõem o nosso cotidiano, nas ajudas diárias nos abraços apertados. Porém, sempre é bom relembra o quão importante as pessoas foram ao longo do nosso caminho:

Ao meu orientador, Luciano Moreira, meus sinceros agradecimentos pelo constante estímulo em continuar, sobrepondo a minha vontade de mudar. Obrigada por abrir as portas da ciência para mim, e mais do que isso, sempre acreditar no meu trabalho;

Ao meu co-orientador, Eric, pela dedicação imensa ofertada na realização deste trabalho. Pelo interesse e disponibilidade, desde o início e que com certeza não acabam com esse trabalho. Por muitas horas dedicadas, inclusive até altas horas da noite, nos feriados, férias, natal, ano novo, finais de semana... E acima de tudo, mesmo com tantas atribuições, obrigada pela preocupação com o meu aprendizado e minha opinião acerca de todos os âmbitos deste trabalho. Obrigada pela amizade e conselhos para a vida.... Sem você, absolutamente, este trabalho não seria o mesmo;

A “família insetário”, por incondicionalmente tornarem os meus momentos agradáveis e amigáveis. Pela união do grupo, pelas palavras de carinho e também pelas árduas. Obrigado “meninas do insetário” pela amizade e apoio constante em continuar. Especialmente, à Débora, pela disponibilidade imediata em aceitar trabalhar sob um cronograma tão apertado imposto por mim e por, definitivamente, colocar a “mão na massa” nos meus experimentos. A Marcele, pelas dosagem de RNA e suporte com os vírus. Meninas a ajuda de vocês foi necessária para a finalização deste trabalho. Ao Thiago pela disponibilidade em revisar o trabalho. Enfim, não consigo citar todos os nomes mais com certeza, cada pessoa teve o seu papel fundamental nessa relação, e já recebeu o meu “muitoooo obrigada”;

A todos do LAMAL pelo carinho e momentos de descontração. Ao pessoal do café, do almoço, das reuniões no “Cú de Foca”. A Alice, pelo gerenciamento do nosso projeto;
Ao pessoal do Lab. De RNAi, pelas reuniões divertidas e pela troca de informações cientificas necessárias para a evolução do trabalho. Obrigada pelas trocas e empréstimos da vida: reagentes, estoque de vírus, mosquitos, nanoinjetor... Ao Dr. João Marques, pela disponibilidade e interesse coletivo.

A toda minha família que sempre foi o alicerce da minha vida, que apesar de não entenderem exatamente o meu trabalho, o porque eu deveria trabalhar fora do horário de serviço e ir a congressos...me apoiaram incondicionalmente. Em especial meus pais: com seus conselhos maduros e exemplos de dignidade; e irmãs: pela amizade imensurável e ajuda diária. Pela compreensão nos momentos ausentes e força emocional nas horas de maior fraqueza;

Ao meu namorado, pelo constante estímulo em tornar-me uma futura pesquisadora. Pelo amor, carinho e também compreensão nos muitos momentos em que o estudo foi prioridade (e estes momentos foram muitos). Obrigada pelo apoio, na realização de experimentos em horários inusitados, e por sempre...sempre...sempre... colocar as minhas prioridades com as suas. Obrigada pela complacência com meus momentos de raiva e por ser meu porto-seguro.

Aos amigos que estiveram presentes e se empenharam em me fazer esquecer os problemas. Obrigada por entenderem os meus longos momentos de ausência;

E sobretudo a Deus, fonte de fé e esperança inesgotável, que proporcionou essa oportunidade e me guiou nessa jornada impondo dificuldades que foram essenciais para meu desenvolvimento pessoal e espiritual.

Enfim, gostaria de deixar meu MUITO OBRIGADA a todos que contribuíram de formas específicas com a conclusão deste trabalho.

## AGRADECIMENTOS AS INSTITUIÇÕES FINANCIADORAS

Aos financiadores nacionais, ao Ministério da Saúde (Secretaria de Vigilância em Saúde/ SVS e Departamento de Ciência e Tecnologia da Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos\DECIT/SCTIE), ao Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (CNPq) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelos recursos financeiros que permitiram o desenvolvimento deste projeto.

À Fundação Oswaldo Cruz, ao Centro de Pesquisas René Rachou e ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde pela oportunidade ofertada, além de excelente infraestrutura no que diz respeito a reagentes e equipamentos necessários para trabalho e recursos humanos.

Aos financiadores internacionais, a Universidade de Monash, obtida pela Foundation for the National Institutes of Health (FNIH, dos Estados Unidos) por meio do programa Controle de Doenças Transmitidas por Vetores: Pesquisa para Descoberta (Vector\ Based Transmission of Control: Discovery Research\ VCTR) da Iniciativa Grandes Desafios em Saúde Global (Grand Challenges in Global Health Initiatives) da Fundação Bill & Melinda Gates. O projeto contou, ainda, com recursos diretos da Fundação Bill & Melinda Gates.

**SUMÁRIO**

**LISTA DE FIGURAS** ..... XII
**LISTA DE TABELAS** ..... XV
**LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS** ..... XVI
**RESUMO** ..... XVII
**ABSTRACT** ..... XVIII

**1 INTRODUÇÃO** ..... 19
1.1 Visão geral da dengue ..... 19
1.2 Dengue no Brasil ..... 20
1.3 O vírus dengue ..... 21
1.4 Vetores da dengue ..... 22
1.4.1 Aspectos biológicos dos vetores ..... 23
1.5 Transmissão e infecção do vírus dengue ..... 24
1.5.1 Competência vetorial ..... 25
1.5.1.1 Período de Incubação Extrínseco ..... 27
1.6 Transmissão vertical ..... 28
1.6.1 A transmissão vertical do vírus dengue ..... 29
1.7 Controle e prevenção da dengue ..... 31
1.8 A bactéria *Wolbachia pipientis* ..... 34
1.8.1 Interação *Wolbachia*-hospedeiro ..... 35
1.8.1.1 Alterações reprodutivas ..... 35
1.8.1.2 Interferência à patógenos promovida pela *Wolbachia* ..... 37
1.8.1.3 Mecanismos associados a interferência à patógenos ..... 39
1.8.2 *Wolbachia* como estratégia de controle da dengue ..... 40

**2 JUSTIFICATIVA** ..... 42

**3 OBJETIVO** ..... 45
3.1 Objetivo Geral ..... 45
3.2 Objetivos específicos ..... 45

**4 MÉTODOS** ..... 46
4.1 Mosquitos ..... 46

4.1.1 Manutenção das colônias ..... 46
4.1.2 Retrocruzamentos para inserção de *Wolbachia* em *A. aegypti* brasileiros 47
4.2 Confirmação da presença de *Wolbachia* nos mosquitos da colônia ..... 48
4.2.1 Extrações de DNA ..... 48
4.2.2 Detecção de *Wolbachia* via PCR em tempo real ..... 49
4.3 Obtenção de linhagem livre de *Wolbachia* ..... 50
4.4 Vírus dengue ..... 51
4.5 Ensaios de transmissão vertical ..... 52
4.5.1 Ensaios de infecção oral ..... 52
4.5.2 Ensaios de infecção artificial ..... 55
4.6 Detecções do vírus dengue nos ovários ..... 56
4.7 Detecção do vírus dengue através de RT-qPCR ..... 57
4.7.1 Extração de RNA ..... 57
4.7.2 Síntese de cDNA para utilização na RT-qPCR como controle positivo de amostra 58
4.7.3 Plasmídeos DENV ..... 58
4.7.4 RT-qPCR *One step* ..... 60
4.8 Análises estatísticas ..... 61

**5 RESULTADOS** ..... 62
5.1 Obtenção de linhagem livre de *Wolbachia* ..... 62
5.2 Transmissão vertical ..... 63
5.2.1 Infecção oral ..... 63
5.2.2 Infecções artificiais ..... 69
5.2.2.1 Nanoinjeções com o vírus dengue 1 ..... 70
5.2.2.2 Nanoinjeções com o vírus dengue 3 ..... 73
5.2.2.3 Nanoinjeções com o vírus dengue 4 ..... 75
5.2.2.4 Carga viral dos pools positivos por nanoinjeções ..... 80
5.2.2.5 Nanoinjeções em *A. albopictus* com o vírus Dengue 3 e 4 ..... 80
5.3 Detecção de vírus dengue nos ovários ..... 84
5.3.1 Ovários na infecção oral ..... 85
5.3.2 Ovários na infecção artificial ..... 90

**6 DISCUSSÃO** ..... 92
6.1 Metodologias utilizadas ..... 92

6.2 Fecundidade e fertilidade ..... 92
6.3 Infecção dos mosquitos e carga viral ..... 94
6.4 Detecção do vírus dengue nos pools de larvas ..... 97
6.5 A transmissão vertical em mosquitos *A. albopictus* ..... 100
6.6 Detecção de vírus dengue nos ovários ..... 101
6.7 Visão geral da *Wolbachia* na transmissão vertical ..... 104

**7 CONCLUSÕES** ..... 106

**8 REFERÊNCIAS** ..... 107

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1**: Distribuição global de risco da dengue (Adaptado de WHO, 2012). .....20

**Figura 2:** Tratamentos com tetraciclina na colônia *w*MelBr, de *A. aegypti*, para a eliminação de *Wolbachia*. .....63

**Figura 3:** Fecundidade dos mosquitos *A. aegypti* infectados oralmente com o DENV-4 (Experimento 1).....64

**Figura 4:** Fertilidade dos mosquitos *A. aegypti* infectados oralmente com o DENV-4 (Experimento 1).. .....65

**Figura 5:** Suscetibilidade entre os mosquitos *A. aegypti* Tet e Mel ao vírus dengue por infecção oral. .....66

**Figura 6:** Carga viral do vírus dengue nos dois grupos de mosquitos *A. aegypti,* Tet e Mel, da geração parental (Experimento 1).. .....67

**Figura 7:** Pools de larvas provenientes de fêmeas *A. aegypti*, Tet e Mel, infectadas oralmente com DENV-4, 20 após a infecção.....68

**Figura 8:** Carga viral de pools de larvas de *A. aegypti* positivos para dengue, infectados oralmente com DENV-4.. .....68

**Figura 9:** Fecundidade dos mosquitos *A. aegypti* infectados por nanoinjeções com DENV-1.. .....70

**Figura 10:** Fertilidade dos mosquitos *A. aegypti* infectados por nanoinjeções com o DENV-1. .....71

**Figura 11:** Carga viral do vírus dengue nos grupos de mosquitos *A. aegypti*, Tet e Mel, da geração parental.....72

**Figura 12:** Pools de larvas provenientes de fêmeas *A. aegypti*, Tet e Mel, infectadas por nanoinjeções intratorácicas com DENV-1, de 11 a 13 após a infecção. .....72

**Figura 13:** Fecundidade dos mosquitos *A. aegypti* infectados por nanoinjeções com DENV-3. .....73

**Figura 14:** Fertilidade dos mosquitos *A. aegypti* infectados por nanoinjeções com o DENV-3. .... 74

**Figura 15:** Carga viral do vírus dengue nos grupos de mosquitos *A. aegypti*, Tet e Mel, da geração parental.....74

**Figura 16:** Pools de larvas provenientes de fêmeas *A. aegypti*, Tet e Mel, infectadas por nanoinjeções intratorácicas com DENV-3, de 11 a 13 dias após a infecção.....75

**Figura 17:** Fecundidade dos mosquitos *A. aegypti* infectados por nanoinjeções com DENV-4 em 3 experimentos independentes.. .....76

**Figura 18:** Fertilidade dos mosquitos *A. aegypti* infectados por nanoinjeções com DENV-4 em 3 experimentos independentes. .....77

**Figura 19:** Carga viral do vírus dengue nos grupos parentais de mosquitos *A. aegypti*, Tet e Mel, em 3 experimentos independentes. .....78

**Figura 20:** Pools de larvas provenientes de fêmeas *A. aegypti*, Tet e Mel, infectadas por nanoinjeções intratorácicas com DENV-4, de 11 a 13 dias após a infecção, experimento 1.....79

**Figura 21:** Pools de larvas provenientes de fêmeas *A. aegypti*, Mel, infectadas por nanoinjeções intratorácicas com DENV-4, de 11 a 13 dias após a infecção, experimento 2.....79

**Figura 22:** Pools de larvas provenientes de fêmeas *A. aegypti*, Tet e Mel, infectadas por nanoinjeções intratorácicas com DENV-4, de 11 a 13 dias após a infecção, experimento 3.....79

**Figura 23:** Carga viral de pools de larvas de *A. aegypti* positivos para dengue, infectados através de nanoinjeções com DENV-1, -3 e -4. .....80

**Figura 24:** Fertilidade e fecundidade dos mosquitos *A. albopictus* infectados por nanoinjeções com o DENV-3 e -4. .....82

**Figura 25:** Carga viral do vírus dengue nos grupos parentais de mosquitos *A. albopictus*, em 2 experimentos independentes.. .....83

**Figura 26:** Pools de larvas provenientes de fêmeas *A. albopictus*, infectadas por nanoinjeções intratorácicas com DENV-3 e -4, de 11 a 13 dias após a infecção.....84

**Figura 27**: Carga viral de pools de larvas de *A. albopictus* positivos para dengue, infectados através de nanoinjeções com DENV-3 e -4. .....84

**Figura 28:** Suscetibilidade entre os ovários de mosquitos *A. aegypti*, Tet e Mel, ao DENV-3 infectado através de infecção oral.....85

**Figura 29**: Carga viral do vírus dengue nos ovários de mosquitos *A. aegypti*, Tet e Mel, infectados oralmente com o vírus dengue 3.. .....86

**Figura 30:** Suscetibilidade entre os ovários de mosquitos *A. aegypti*, Tet e Mel, ao DENV-4 infectado através de infecção oral.. .....87

**Figura 31:** Carga viral do vírus dengue nos ovários de mosquitos *A. aegypti*, Tet e Mel, infectados oralmente com o vírus dengue 4. .....87

**Figura 32**: Ovários de mosquitos *A. aegypti* com *Wolbachia*. **A)** Ovários sem infecção com vírus dengue, imaturos (sem repasto sanguíneo) e maduros (72 horas após repasto sanguíneo) e **B)** Ovários com alterações morfológicas, visualizadas 20 dias após repasto infectante com DENV-4.....89

**Figura 33:** Carga viral do vírus dengue nos ovários de mosquitos *A. aegypti*, Tet e Mel, infectados por injeções com o vírus dengue 1.....90

**Figura 34:** Carga viral do vírus dengue nos ovários de mosquitos *A. aegypti,* Tet e Mel, infectados por injeções com o vírus dengue 4.....91

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1:** Relação de sorotipos utilizados informando a origem do vírus, a cepa, o título em PFU/mL, a dose injetada em 69nl e a concentração final do vírus no sangue. .....51

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

µg – Micrograma

µL – Microlitro

ºC – graus Celsius

ATCC - American Type Culture Collection (Coleção de Microrganismos Norte Americanas)

cDNA – DNA complementar

DNA - Deoxyribonucleic Acid (ácido desoxirribonucleico)

dNTPs – Desoxirribonucleotídeos trifosfatados

EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético

EIP – Período de incubação extrínseco

MgCl2- Cloreto de magnésio

mL – Mililitro

Mm – milímetros

mM – Milimolar

N – Número de indivíduos

NaCl – Cloreto de sódio

ng - nanogramas

pb – pares de bases

PBS - Phosphate Buffered Saline (Tampão fosfato-salino)

PCR - Polimerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase)

qPCR – Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa (em tempo real)

q.s.p. – quantidade suficiente para (indica volume)

RNA - Ribonucleic Acid (ácido ribonucleico)

RPM – Rotações Por Minuto

RT-qPCR – PCR em tempo real utilizando a enzima Transcriptase Reversa.

pH – Potencial hidrogeniônico

wsp - Proteína de superfície de Wolbachia

## RESUMO

A dengue é um problema médico crescente em países subtropicais e tropicais. A dengue é uma infecção viral que apresentem quatro sorotipos distintos, DENV-1 a -4, sendo recentemente relatado o quinto sorotipo, DENV-5, na Malásia. Estes são transmitidos pela picada de mosquitos infectados do gênero *Aedes,* sendo o *Aedes aegypti* o principal vetor. Atualmente, a prevenção e controle da dengue dependem exclusivamente de medidas de combate ao vetor, e estas apresentam-se ineficientes, principalmente em países em desenvolvimento. Nesse contexto, há a necessidade da busca de novas estratégias que possam ser utilizadas concomitantemente com as formas de controle já existentes. A *Wolbachia* é uma bactéria intracelular, amplamente conhecida por promover o fenótipo de bloqueio do vírus dengue em mosquitos *A. aegypti*. Apesar disto, não se conhece se a *Wolbachia* é capaz de interferir na infecção da progênie de mosquitos infectados com o vírus dengue, fenômeno conhecido como transmissão vertical. A transmissão vertical pode estar associada com a manutenção do vírus em períodos inter-epidêmicos ou em locais nos quais a transmissão ativa está diminuída. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar se a *Wolbachia* introduzida na linhagem brasileira de *A. aegypti* influencia a transmissão vertical da dengue. Duas metodologias de infecção foram utilizadas: infecção oral e nanoinjeção intratorácica, onde utilizou-se o DENV-4 e DENV-1,-3 e -4, respectivamente. Para estes experimentos, foram comparados mosquitos com *Wolbachia* (Mel) e uma linhagem de mosquitos tratada com antibiótico e portanto, livre da bactéria (Tet). Os ovos dos mosquitos infectados foram coletados em um período de 20 e 11 dias após a infecção, oral e injeções, respectivamente. A fecundidade e fertilidade, de forma geral, foram diminuídas na co-infecção da *Wolbachia* com o vírus dengue. Em todos os mosquitos infectados, não se observou diferenças na suscetibilidade ao vírus, porém a carga viral foi diminuída pela *Wolbachia* no DENV-4, em ambas as formas de infecção. Foi possível a detecção de pools positivos independente da forma de infecção, demonstrando que a transmissão vertical do vírus dengue ocorreu, porém a proporção de pools positivos entre os grupos Mel e Tet não foi alterada. Entretanto, pudemos observar uma diminuição da carga viral nos pools positivos Mel. Os ovários na infecção oral, interessantemente, tiveram uma forte diminuição da suscetibilidade conferida pela *Wolbachia.* A carga viral dos ovários foi diminuída em DENV-1 e DENV-4, em ambas as formas de infecção. Os dados obtidos nestes experimentos apontam que a transmissão vertical do vírus dengue ocorreu em pequenas taxas. Independente da forma de infecção utilizada, as taxas não variaram, mostrando que os mecanismos que regulam a ocorrência da transmissão vertical precisam ser explorados. Concluímos que, a *Wolbachia* pode potencialmente ser responsável pela redução da transmissão vertical em campo. Isto é considerado um grande avanço no controle da dengue, se realmente for comprovada que a transmissão vertical é a responsável pela manutenção do vírus em períodos inter-epidêmicos.

## ABSTRACT

Dengue is a growing medical problem in subtropical and tropical countries. Dengue is a viral infection which is known four distinct serotypes, DENV-1 to -4, recently being reported the fifth serotype DENV-5 in Malaysia. These are transmitted by the bite of infected mosquitoes of the genus Aedes, being the main vector Aedes aegypti. Currently, prevention and control of dengue rely solely on anti-vector measures, and these have to be inefficient, especially in developing countries. In this context, there is the need to search for new strategies that can be used concurrently with the forms of existing control. Wolbachia is an intracellular bacterium The widely known for promoting the virus lock phenotype in dengue mosquitoes A. aegypti. Despite this, it is not known if the Wolbachia is able to interfere in the progeny of infected mosquitoes, known as vertical transmission. Vertical transmission may be associated with the maintenance of the virus in inter-epidemic periods or active sites that transmission is decreased. The objective of this study was to evaluate whether Wolbachia introduced in the Brazilian strain of A. aegypti influences the vertical transmission of dengue. Two methods were used for infection: Oral nanoinjeção intrathoracic infection and, where used DENV-4 and DENV-1, -3 and -4 respectively. For these experiments, mosquitoes were compared with Wolbachia (Mel) and a strain of mosquitoes treated with antibiotics and therefore free of bacteria (Tet). The eggs of infected mosquitoes were collected over a period of 20 and 11 days after infection, orally and injections, respectively. The fecundity and fertility, in general, were reduced in the co-infection of Wolbachia with the dengue virus. In all infected mosquitoes, no differences were observed in susceptibility to the virus, but the viral load was reduced by Wolbachia in DENV-4 in both forms of the infection. Independent positive pools of detection was possible the form of infection, demonstrating that vertical transmission of dengue virus occurred, but the proportion of positive pools between Mel and Tet group was unchanged. However, we observed a decrease in viral load in positive pools Mel. Ovaries in the oral infection, interestingly, had a strong decrease in susceptibility conferred by Wolbachia. The viral load in the ovaries was decreased DENV-1 and DENV-4 in both forms of the infection. The data from these experiments indicate that vertical transmission of dengue virus occurred in small fees. Independent of the infection used, the rates did not change, showing that the mechanisms that regulate the occurrence of vertical transmission need to be explored. We conclude that the Wolbachia could potentially be responsible for the reduction of vertical transmission in the field. This is considered a major breakthrough in dengue control, if it is really proven that vertical transmission is responsible for virus maintenance in inter-epidemic periods.

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Visão geral da dengue

A dengue é um problema de saúde pública crescente em países subtropicais e tropicais atingindo zonas urbanas e semiurbanas, representando um importante ônus econômico e social. A doença é uma pandemia emergente mundial abrangendo desde regiões pobres com pouca estrutura médico-sanitária até regiões mais estruturadas com melhores situações econômicas. A incidência da dengue vem aumentando comparando-se com os últimos 50 anos, sendo considerada a mais importante arbovirose em todo o mundo, estimando-se cerca de 100 milhões de novos casos a cada ano, onde mais de 100 países se encontram em áreas endêmicas, representando quase metade da população mundial em áreas de risco (WHO, 2012). Atualmente, há regiões endêmicas na África, nas Américas, no Mediterrâneo Oriental, no Sudeste Asiático e no Pacífico Ocidental. Os países da América se destacam no cenário mundial, contribuindo com 2,35 milhões de casos notificados em 2013 (WHO, 2014).

A dengue é uma doença infecciosa viral onde se conhece quatro sorotipos distintos, denominados: DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 e recentemente, foi relatado um quinto sorotipo, DENV-5, na Malásia (NORMILE, 2013; VASILAKIS, 2013). Estes são transmitidos pela picada de mosquitos infectados que possuem partículas virais na glândula salivar, e ao realizarem o repasto sanguíneo transmitem o vírus através de sua saliva (transmissão horizontal). A infecção causa sintomas gripais, constituindo a forma clássica da doença. Porém, em algumas situações, o quadro clínico pode se agravar desenvolvendo uma forma potencialmente letal, caracterizada como dengue grave, anteriormente chamada de dengue hemorrágica (WHO, 2014). A infecção por um sorotipo apenas, não confere imunidade aos outros sorotipos e infecções sequenciais, com sorotipos diferentes, podem predispor ao desenvolvimento da dengue grave.

A transmissão da dengue se dá pela picada de mosquitos infectados do gênero *Aedes,* sendo todo o ciclo de transmissão do vírus ocorrendo com o mosquito como

o vetor e os humanos como principal reservatório da infecção. Apesar de outros hospedeiros vertebrados poderem ser reservatórios do vírus, apenas em humanos foi demonstrada a manifestação da doença (VASILAKIS et al., 2012).

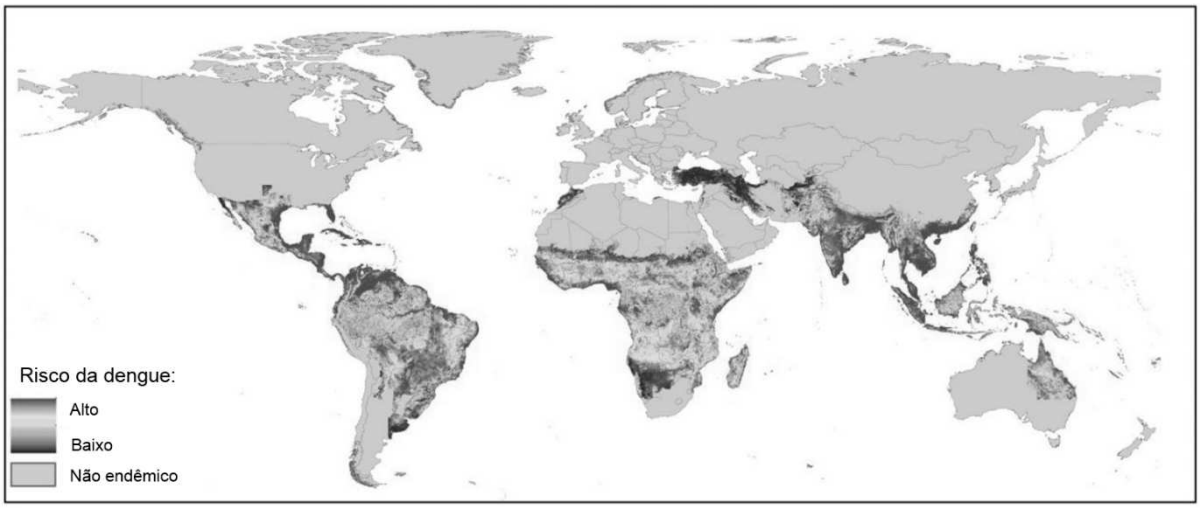


**Figura 1**: Distribuição global de risco da dengue (Adaptado de WHO, 2012).

## 1.2 Dengue no Brasil

A dengue no Brasil constitui-se um sério problema de saúde pública, onde as condições ambientais favorecem o desenvolvimento e a disseminação do vetor. Esse problema é potencializado por macrofatores: socioeconômicos, políticos e sociais; e por microfatores: o genótipo do vírus circulante, as características biológicas dos vetores e da população afetada (OPAS, 2014). O vetor foi declarado erradicado do Brasil em 1958 (VALLE; BRAGA, 2007) . Em 1967, ocorre a primeira reintrodução do *A. aegypti* no país, sendo em seguida eliminado em 1973. Em 1976, o vetor foi reintroduzido no país no Rio Grande do Norte e Rio de Janeiro, onde, a partir da década de 1980, iniciou-se um processo de intensa proliferação viral, e casos de epidemias alarmantes têm atingido diversas regiões desde então (SCHATZMAYR, 2000).

No Brasil, a primeira epidemia de dengue foi em 1982, em Boa Vista (RO). A disseminação se deu através dos estados e culminou com um novo surto no Rio de Janeiro em 1986. Em 2002 ocorreu a grande epidemia, com mais de 800 mil casos notificados, o que representou cerca de 80% das ocorrências do continente

americano (BARRETO; TEIXEIRA, 2008). O Informe Epidemiológico da Dengue atualizado até outubro de 2014 notificou mais de 556 mil casos em todo o país, com 379 mortes, no ano de 2014 (Ministério da Saúde, 2014).

## 1.3 O vírus dengue

O vírus da dengue é um vírus de RNA, pertencentes à família *Flaviviridae* do gênero *Flavivirus.* O seu genoma é composto por uma fita única de RNA, polaridade positiva, com um tamanho de aproximadamente 11 kb e 40-60 nanômetros de diâmetro. O genoma possui uma janela aberta de leitura única que codifica 10 proteínas virais que são clivadas por proteases, após a tradução da poliproteína. O capsídeo (C), a membrana (M) e o envelope (E), são as proteínas estruturais, que em múltiplas cópias formam a estrutura do vírus. O vírus é cercado pelo nucleocapsídeo e coberto pelo envelope lipídico contendo as proteínas de membrana. Além das proteínas estruturais, outras 7 proteínas não estruturais (NS), são formadas, sendo estas: NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5, que estão associadas com a replicação viral e patogênese da doença (HUANG et al., 2014; LEITMEYER et al., 1999). A poliproteína é flanqueada por regiões não codificantes, UTR (do inglês *untranslated region)*, 5' e 3', que são conservadas entre os sorotipos, e por isso, tem sido alvo para o desenvolvimento de várias técnicas de detecção e distinção entre os sorotipos (ALM et al., 2014).

Além da variabilidade genética existente entre os sorotipos, diferentes genótipos têm sido identificados dentro de cada grupo, levando a um aumento da variabilidade genética e caracterizando comportamentos diferentes frentes às infecções. (LARA-RAMÍREZ et al., 2014). Todos os genótipos podem potencialmente causar a doença sendo estes associados a patogenia e gravidade, de acordo com as características biológicas de cada indivíduo (VAUGHN et al., 2000). Por exemplo, o DENV-2, é filogeneticamente agrupado em 4 genótipos. Um estudo demonstrou que, o genótipo americano (AM) tem sido endêmico no hemisfério ocidental e ilhas do Pacífico Sul por cinco décadas. Durante este período, não houveram relatos de casos de dengue hemorrágica, mesmo após ocorrências de infecções secundárias. Por outro lado, o genótipo do Sudeste Asiático (SEA) foi detectado pela primeira vez nas Américas

durante uma epidemia em Cuba, em 1981, com milhares de casos de dengue hemorrágica documentados. Desde então, houve a substituição do genótipo AM para o SEA, e a ocorrência de casos hemorrágicos mantêm-se constante (ANDERSON; RICO-HESSE, 2006).

Outro ponto interessante, é como o genótipo pode influenciar na multiplicação, replicação e disseminação no vetor. Em outro estudo, também com DENV-2, o genótipo SEA infectou e disseminou numa maior taxa de mosquitos *A. aegypti*, quando comparado ao genótipo AM (ARMSTRONG; RICO-HESSE, 2001).

## 1.4 Vetores da dengue

O principal vetor da dengue, febre amarela e Chikungunya é o mosquito *A. aegypti,* uma espécie originária de florestas africanas que se tornou intimamente associado com as habitações humanas em todo o mundo, sendo assim altamente sinantrópico (GUBLER et al., 1997). O mosquito *Aedes albopictus,* constitui o vetor primário da dengue apenas em algumas localidades (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994).

O mosquito *A. aegypti* possui uma distribuição global, espalhado em todos os continentes, com exceção da Antártica, em áreas tropicais e subtropicais. Sua alta competência vetorial é caracterizada por sua preferência alimentar por sangue humano, alta suscetibilidade pelos quatro sorotipos da dengue e por sua capacidade em colonizar ambientes urbanos (sinantropia) (MURRAY et al., 2013). O *A. aegypti* é um vetor doméstico encontrado no intra e peridomicílio, realizando a cópula, repasto sanguíneo e postura dos ovos nos arredores de ambientes domiciliares. Este ambiente constitui um fácil local de colonização pela disponibilidade de recipientes com águas limpas para a postura dos ovos e por seu hábito preferencialmente diurno de realização do repasto sanguíneo (MORRISON et al., 2008).

A forte preferência desses mosquitos por sangue humano e seu hábito típico de não voarem longas distâncias permanecendo nos arredores do local de sua emergência (quando possui oferta de hospedeiros), (MACIEL-DE-FREITAS et al., 2007), aumentam o seu potencial para adquirir e transmitir o vírus da dengue

(CARRINGTON; SIMMONS, 2014). Além da capacidade de transmitir o DENV, o *A. aegypti* também é considerado um vetor eficiente por sua habilidade de realizar repastos sanguíneos parciais, em diferentes hospedeiros, antes de se tornar completamente ingurgitado. Este é um provável mecanismo de sobrevivência, onde, sutis movimentos provocados pelo hospedeiro podem causar a interrupção do repasto sanguíneo, forçando o vetor a procurar um novo hospedeiro (ESTEVA; VARGAS, 2000).

Nas últimas décadas o *A. albopictus* tem se espalhado de florestas do sudeste da Ásia para numerosas áreas do Sul da Europa, países da América do Sul, África e a invasão na Austrália constitui uma ameaça significativa (CARRINGTON; SIMMONS, 2014). É um culicídeo eclético com relação à alimentação, realizando repastos em humanos, outros mamíferos e aves. Por ser uma espécie de grande valor adaptativo, abrange uma variedade de habitats como ambientes urbanos, suburbanos e rurais. Durante décadas, foi considerado menos efetivo quanto à capacidade vetorial quando comparado ao *A. aegypti,* entretanto, alguns estudos mostram que não existem diferenças entre as espécies quanto à competência em transmitir o vírus da dengue, pelo menos em condições laboratoriais. No entanto, na natureza esse quadro pode ser diferente, dado que o mosquito *A. aegypti* possui uma incidência e prevalência maior em áreas urbanas e por maior nível de sinantropia (BUCKNER et al., 2013; CARRINGTON; SIMMONS, 2014; MURRAY et al., 2013).

Outros vetores também foram reportados para dengue, como *Aedes polynesiensis, Aedes japonicus, Aedes mediovittatus* e várias espécies do complexo *Aedes scutellaris,* porém a contribuição desses mosquitos na transmissão da dengue não é considerada significativa (BARRERA et al., 2012; CARRINGTON; SIMMONS, 2014; GUBLER et al., 1997).

### 1.4.1 Aspectos biológicos dos vetores

Sobre a biologia do gênero *Aedes,* quanto ao ciclo de vida, eles apresentam 4 estágios distintos, sendo estes: ovo, larva, pupa e adulto. O desenvolvimento dos três primeiros estágios ocorre na água (podendo ser o ovo em ambiente parcialmente seco). O ovo eclode na água, após o período de desenvolvimento embrionário, geralmente em ambiente seco, sendo a larva liberada. A fase larval é caracterizada por 4 estádios de amadurecimento (L1, L2, L3 e L4), onde as larvas se alimentam de microrganismos e matéria orgânica contida na água. Após o estádio L4 ocorre a metamorfose da larva em pupa (empupamento), que não se alimenta e passa por uma série de mudanças fisiológicas e anatômicas originando um inseto adulto alado, o mosquito. A fase adulta caracteriza-se pelo voo ativo em busca de alimento, no qual, as fêmeas hematófagas, buscam sangue para iniciar o ciclo gonotrófico e realizar a postura de ovos. Tanto os machos quanto as fêmeas, buscam néctar de plantas, como fonte de água e carboidratos, substâncias necessárias para a realização de suas atividades biológicas. Todo o ciclo na fase aquática possui uma duração de 8-10 dias, em média, sendo este período influenciado pela temperatura, umidade, densidade larval e a disponibilidade de alimento (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994).

Quanto ao comportamento, os mosquitos do gênero *Aedes,* possuem hábitos diurnos, onde o repasto sanguíneo é realizado nas primeiras horas da manhã e ao entardecer. Os ovos podem ser depositados tanto em criadouros naturais como folhas de plantas e vãos de rochas, quanto em criadouros artificiais, como caixas d'água, pneus, latas, garrafas e descartes em geral. Os ovos são depositados na parede interna do recipiente contendo água ou outros substratos úmidos, e podem resistir a desidratação por até 12 meses em campo (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994).

## 1.5 Transmissão e infecção do vírus dengue

As arboviroses, vírus transmitidos por artrópodes, são mantidas naturalmente através de ciclos realizados por repastos sanguíneos entre os hospedeiros vertebrados. Os vetores podem se infectar por diferentes mecanismos, como a ingestão de sangue em hospedeiros contendo o vírus, pela transmissão transovariana ou vertical e transmissão venérea durante a cópula (MARQUARDT et

al., 2005). No caso da dengue, a transmissão horizontal, é a forma clássica e, por este motivo, é a forma mais bem caracterizada. Uma combinação de diferentes fatores dos hospedeiros (humanos e mosquitos), características dos vírus e fatores ambientais como temperatura e umidade, definem, em conjunto, a propagação da infecção e distribuição do vírus em diferentes ambientes (visto a seguir).

Os fatores humanos que podem influenciar na transmissão do DENV são: o título viral no plasma, variando entre os sorotipos de 6,29 a 7,52 log10 cópias de RNA/mL; o tempo de duração da infecciosidade, onde os humanos podem ser infecciosos para mosquitos de 1,5 até cerca de 5 dias após o início dos primeiros sintomas; e o tipo da infecção, se é sintomática ou assintomática, onde pacientes sintomáticos possuem níveis virêmicos que podem torná-los mais infecciosos aos mosquitos (CARRINGTON; SIMMONS, 2014).

### 1.5.1 Competência vetorial

A competência vetorial é caracterizada pela permissividade de um vetor à infecção, replicação e transmissão de um patógeno, ou seja, a habilidade intrínseca de um vetor de transmitir um agente infeccioso. A capacidade vetorial está associada a suscetibilidade à infecção, permissividade da replicação viral e a duração do período de incubação extrínseca do patógeno (ANDERSON; RICO-HESSE, 2006). Nesta última, os aspectos que influenciam a capacidade vetorial são, os hábitos alimentares do vetor, sua sobrevivência e o tempo requerido para o agente patogênico desenvolver a infecciosidade, denominado o período de incubação extrínseco (Seção 1.5.1.1).

As barreiras anatômicas contidas no vetor, como a barreira de infecção no intestino (MIB), a barreira de escape no intestino (MEB) e as barreiras das glândulas salivares, influenciam diretamente na capacidade vetorial. Vetores que possuem por exemplo, a MIB mais seletiva, o vírus não consegue infectar ou a infecção é dificultada nas células epiteliais do intestino. O intestino consiste na barreira primária à infecção, onde o vírus necessita infectar e replicar em suas células epiteliais. Ultrapassando a MIB, o vírus necessita ultrapassar a MEB, para sua disseminação

para outros tecidos e finalmente, alcançar as glândulas salivares. Após ultrapassar as barreiras deste órgão, o vírus se dispersa na saliva e pode ser transmitido (BOSIO et al., 1998). Essa resistência conferida pelas barreiras pode estar relacionada com a incompatibilidade dos receptores de superfície da célula do mosquito com os receptores utilizados pelo vírus para infectar a célula. As barreiras com forte bloqueio as infecções, atrasam o tempo de transmissão do vírus, influenciando dessa forma na capacidade vetorial. As barreiras de infecção podem amplamente variar entre populações de *A. aegypti* acarretando em diferentes níveis de competência vetorial (BENNETT et al., 2002).

Outro fator que influencia diretamente na competência vetorial é a microbiota intestinal, que assim como as barreiras intestinais e enzimas digestivas, constituem papel fundamental no sucesso da infecção (CHARAN et al., 2013; CIRIMOTICH et al., 2011). Estudos utilizando a microbiota como ferramenta de controle de doenças transmitidas por vetores vem sendo conduzidos, pelo fato de patógenos e bactérias interagirem no mesmo ambiente dentro do mosquito (o intestino). Muitos dos mecanismos de interação entre a microbiota e o patógeno, dentro do intestino dos artrópodes, ainda são desconhecidos, mas estudos tem mostrado que estas interações envolvem a ativação de fatores do sistema imune dos insetos, com lecitinas, peptídeos antimicrobianos, enzimas digestivas e óxido nítrico. Ramirez e colaboradores, em 2012, demonstraram a interação entre a microbiota natural de mosquitos de campo e sua importância na ativação do sistema imune basal, refletindo na diminuição da suscetibilidade ao DENV-2 (RAMIREZ et al., 2012). Atualmente, há um especial interesse na caracterização da microbiota intestinal para abordagens em paratransgênese (o emprego de bactérias geneticamente modificadas que carreiam moléculas anti-parasitárias) para controlar doenças transmitidas por vetores (RIEHLE; JACOBS-LORENA, 2005).

A imunidade inata é um importante componente fisiológico para suprimir a replicação viral no mosquito. Há a expressão de alguns genes relacionados a imunidade inata em múltiplas vias de sinalização antivirais como a via Toll, JAK-STAT e vias do RNA de interferência, que podem ser expressas após a ingestão de repastos sanguíneos virêmicos (HUANG et al., 2014). Análises do transcriptoma em linhagens suscetíveis

e refratárias de *A. aegypti* sugerem que a expressão de genes associados com vias específicas do metabolismo podem contribuir com a suscetibilidade ou refratariedade dos mosquitos dentro de 24 horas após o repasto sanguíneo virêmico. Apesar desse estudo revelar um extensa rede de genes que atuam modulando as respostas contra DENV ainda é pouco conhecida essa relação (BEHURA et al., 2011). As análises do transcriptoma ajudam a expandir o entendimento sobre as respostas dos mosquitos frente às infecções com DENV. Porém ainda existem muitas lacunas sobre a interação vírus-mosquito, principalmente no que diz respeito aos diferentes sorotipos e genótipos de DENV. Por exemplo, um estudo demonstrou que diferentes genótipos dentro de um mesmo sorotipo de DENV-2 podem corresponder a fenótipos de infecção e disseminação diferentes entre mosquitos *A. aegypti* (ARMSTRONG; RICO-HESSE, 2003).

#### 1.5.1.1 Período de Incubação Extrínseco

A temperatura é um fator ambiental amplamente estudado, pois influencia na competência vetorial e na dinâmica de infecção do vírus. Entre as alterações que a temperatura pode ocasionar na transmissão do vírus da dengue, o mecanismo mais claramente entendido é o efeito na sobrevivência e no período de incubação extrínseca (EIP) do vírus no mosquito (BRADY et al., 2014; CHAN; JOHANSSON, 2012). O EIP, consiste no intervalo entre a aquisição do agente infeccioso, por um vetor, e a habilidade de transmissão a um hospedeiro vertebrado suscetível. Ou seja, é o período entre a ingestão de sangue contendo o agente infeccioso até a capacidade de transmissão deste por meio de um novo repasto (MARQUARDT et al., 2005). A transmissão só é permitida, quando a longevidade do vetor excede o EIP do vírus da dengue, por isso é fundamental conhecer esse parâmetro quando se quer determinar o risco de ocorrência de dengue em uma determinada região.

Durante o EIP, o vírus invade e se replica em células epiteliais do intestino e se dissemina na hemolinfa, para infectar novos alvos. Uma vez que os ductos salivares contidos nas glândulas salivares se tornam infectados, o vetor é capaz de transmitir o vírus por toda sua vida. No caso da dengue, o EIP é “temperatura-dependente”, ou seja, o período que o vírus gasta para ultrapassar a barreira do intestino, replicar e

atingir as glândulas salivares é diretamente influenciado pela temperatura. Em baixas temperaturas o EIP é maior e, por outro lado, temperaturas mais altas acarretem em um menor EIP (CHAN; JOHANSSON, 2012; LAMBRECHTS et al., 2011; TJADEN et al., 2013; XIAO et al., 2014).

Um estudo que reuniu 146 trabalhos, considerando *A. aegypti* e *A. albopictus*, e não levando em conta o sorotipo do vírus, o EIP variou de 5 a 33 dias à 25ºC e 2 a 15 dias à 30ºC. Além da temperatura, a concentração do vírus no sangue durante o repasto foi diretamente proporcional à duração do EIP, onde baixos títulos virais resultaram em uma extensão do EIP (acima de 25 dias) comparado a altos títulos que duraram apenas 12 dias, ambos à 30ºC utilizando DENV-2 (CARRINGTON; SIMMONS, 2014).

## 1.6 Transmissão vertical

A partir da infecção e replicação nas células epiteliais do intestino e posterior disseminação do vírus através da hemolinfa para diferentes órgãos e tecidos do mosquito, os ovários podem ser infectados e o vírus ser transmitido para a progênie no próximo ciclo gonotrófico, processo denominado transmissão vertical ou transovariana. Portanto, a transmissão vertical, é a transferência de um agente infeccioso de um organismo parental à sua progênie (CLEMENTS, 2012). Existem três formas da transmissão vertical ocorrer: 1) transmissão transovariana, ocasionada por agentes infeciosos que invadem gametas femininos, ou pela entrada em células germinativas primordiais ou com a inserção nos oócitos antes deles tornarem-se fechados pelo córion; 2) transmissão transovo, que ocorre quando um agente infeccioso invade os oócitos corionados durante a ovulação enquanto estes estão dentro dos ductos genitais da fêmea; 3) contaminação da superfície do oócito, quando os agentes infecciosos aderem ao córion e permanecem lá durante toda a oviposição, até a eclosão dos ovos e infecção das larvas recém emergidas (CLEMENTS, 2012). Neste trabalho considera-se como transmissão vertical, todas as formas acima citadas, independente do mecanismo subjacente.

A transmissão vertical já foi registrada em diversos arbovírus, incluindo o vírus da febre amarela, dengue vírus, vírus da encefalite Japonesa, vírus do Oeste do Nilo (*Flavivirus);* vírus Chikungunya (*Alphavirus);* vírus LaCrosse (*Orthobunyavirus);* e vírus da estomatite vesicular (*Phlebovirus)* (LEQUIME; LAMBRECHTS, 2014).

### 1.6.1 A transmissão vertical do vírus dengue

Em várias regiões do mundo, as condições ambientais não favorecem a reprodução dos mosquitos por todo o ano. Por exemplo, durante a estação seca, em áreas tropicais, e a estação de frio, nas regiões temperadas, a baixa densidade de mosquitos não é suficiente para a manutenção da transmissão horizontal (LEQUIME; LAMBRECHTS, 2014). Nestas regiões, muitas vezes endêmicas, a transmissão horizontal não está ocorrendo e mesmo após um longo período sem nenhum ou poucos casos de dengue reportados, o DENV pode persistir (BUCKNER et al., 2013). Especula-se que a transmissão vertical seja um dos mecanismos que pode permitir que o vírus DENV seja mantido nesses ambientes. Por isso, acredita-se que esta via de transmissão, tem grande papel ou potencial epidemiológico na manutenção da dengue em períodos inter-epidêmicos, onde a transmissão mosquito-homem-mosquito é baixa.

Alternativamente, alguns outros fatores têm sido propostos, para explicar a permanência do vírus em condições desfavoráveis a sobrevivência do mosquito. Um deles é a manutenção do vírus em hospedeiros não humanos que atuam como reservatório do vírus. Ou, adicionalmente, um alto nível de imunidade coletiva é adquirida pela comunidade endêmica, através de frequentes exposições ao vírus, onde um número mínimo do título viral é necessário para que ocorra a transmissão horizontal (LEQUIME; LAMBRECHTS, 2014). Porém, nenhum desses fatores foram correlacionados com a persistência do vírus em condições desfavoráveis ao mosquito, permanecendo assim, a transmissão vertical como principal forma alternativa de transmissão.

A transmissão vertical do vírus dengue já foi demonstrada em laboratório e em campo (ANGEL; JOSHI, 2008b; ARUNACHALAM et al., 2008; JOSHI et al., 2002; LE

GOFF et al., 2011), e inclusive com o vetor *A. albopictus,* demonstrando maiores taxa de transmissão vertical quando comparado ao *A. aegypti* (BUCKNER et al., 2013; CASTRO et al., 2004; LEE; ROHANI, 2005). Em outros vetores também já foram relatados a transmissão vertical da dengue, como o *A. mediovittatus* (BARRERA et al., 2012) e o *A. vittatus* (ANGEL; JOSHI, 2008b; CECÍLIO et al., 2009).

A taxa da transmissão vertical pode ser muito variável ou, em alguns casos, não detectada, dependendo da região de estudo, das características genéticas do vetor e do sorotipo e genótipo circulante na região (GÜNTHER et al., 2007). Muitos outros fatores podem influenciar na ocorrência da transmissão vertical, como a fecundidade da fêmea, que é fortemente influenciada pelo seu tamanho corporal, que por sua vez influencia o volume de sangue ingerido. Além disso, a fertilidade pode ser influenciada negativamente pela interação do hospedeiro com patógenos como já demonstrado nas infecções com o DENV (BUCKNER et al., 2013; JOSHI et al., 2002; MACIEL-DE-FREITAS; KOELLA; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 2011).

Outro aspecto importante no que diz respeito a transmissão vertical é que a evolução dos ensaios e técnicas de detecção de vírus tem influenciado diretamente na capacidade de detecção do vírus na progênie. De acordo com Lequime e Lambrechts, em 2014, o aumento da sensibilidade, especificidade e o melhor desempenho das técnicas laboratoriais estão associadas com as maiores taxas de transmissão vertical. Portanto, muitos são os desafios para a confirmação e detecção da transmissão vertical, visto que, sabe-se que é um evento raro, altamente variável de acordo com o sorotipo, genótipo e vetor em estudo. Por isso, as análises devem ser feitas de forma crítica e cautelosa levando em conta as características ambientais, biológicas do hospedeiro e o método utilizado.

A transmissão vertical do vírus dengue também, pode contribuir com a re-emergência de surtos de dengue em áreas previamente expostas, podendo adicionalmente, contribuir com o agravamento da incidência da dengue durante surtos e epidemias. Um estudo que acompanhou a sazonalidade da transmissão vertical do vírus dengue sugere que durante o inverno, onde a transmissão ativa do

DENV é baixa, mosquitos *A. albopictus* apresentaram a maior taxa de transmissão vertical, quando comparado as outras estações do ano. Portanto, o monitoramento de infecções em mosquitos de campo, pode ser usado como uma importante ferramenta de predição de risco e re-emergência em regiões endêmicas (ANGEL; JOSHI, 2008b; JOSHI et al., 2002).

## 1.7 Controle e prevenção da dengue

São inúmeras razões pelas quais a transmissão da dengue é contínua e muitos fatores são globais e incontroláveis. Exemplos disso são o crescimento populacional, a rápida urbanização, crescentes viagens humanas internacionais, mudanças climáticas, alterações no meio ambiente, inadequação no armazenamento de água e a falha nas políticas públicas. Por esses motivos, o controle e prevenção da dengue muitas vezes se torna um problema constante, agravando as epidemias e tornando a dengue uma doença persistente em determinadas regiões (GUBLER, 2011).

A forma ideal para o controle, seria o desenvolvimento de uma vacina viável, eficaz e segura contra os 4 sorotipos da dengue. Porém, durante anos, pesquisadores trabalham em prol do desenvolvimento da vacina, e apesar de já se ter obtido alguns avanços, ainda não foi possível a obtenção desta, com cobertura e eficácia aceitáveis. De forma simplificada, a grande dificuldade na produção, está no fato de que existem quatro sorotipos distintos para a dengue, e as vacinas existentes apenas conferem proteção duradoura contra a reinfeção do mesmo sorotipo ao passo que, é conferida uma proteção transiente contra uma infecção secundária de outros sorotipos diferentes. Isto implica no fato de que, a infecção heterotípica secundária está associada a um risco aumentado de desenvolvimento da forma grave da doença. Desta forma, ainda não se foi possível obter uma vacina tetravalente, eficaz e segura, resultando em respostas imunes exacerbadas frente a infecção pelo sorotipo em que a vacina não imunizou (THISYAKORN; THISYAKORN, 2014; VAUGHN et al., 2000).

Outro grande foco de investimento das indústrias farmacêuticas é a produção de anti-virais eficientes no tratamento da dengue. Mas alguns aspectos tornam essa produção inviável, como: a dificuldade em se obter um diagnóstico laboratorial

preciso, onde a patogênese, em alguns casos, não é claramente entendida e a capacitação médica para o diagnóstico da doença ainda se faz necessária. Além disso, não se tem um modelo *in vivo* apropriado para testes desses medicamentos. Ainda assim, o desenvolvimento de medicamentos anti-virais não resolveria o problema da dengue, apenas reduziria o número de óbitos pela doença e auxiliaria na rapidez do tratamento (WHITEHORN et al., 2014).

Deste modo, atualmente o controle da dengue é focado na diminuição da densidade do vetor. O manejo integrado de vetores é a abordagem estratégica para o controle de vetores da dengue preconizado pela Organização Mundial da Saúde (WHO). Esse programa é definido como "um processo de tomada de decisão racional para a utilização otimizada de recursos para o controle de vetores". São cinco elementos tidos como princípios básicos do processo de gestão, sendo estes: 1) mobilização social e legislação; 2) colaboração do setor da saúde com outros setores; 3) abordagem integrada: integração de métodos de controle de vetores químicos e não-químicos e utilização de outras medidas de controle da doença; 4) tomada de decisão baseada em evidências: adaptação de estratégias e intervenções de acordo com a ecologia do vetor local e aspectos epidemiológicos, guiada por pesquisas operacionais; e 5) capacitação: desenvolvimento de infra-estruturas essenciais, recursos financeiros e humanos adequados aos níveis nacionais e locais, para gerir programas com base em uma análise da situação. Atualmente, o principal objetivo do programa é de reduzir a densidade das populações de vetores o máximo possível e fazer a manutenção desses níveis (WHO, 2009).

Para selecionar o método mais adequado, ou uma combinação destes, deve-se levar em conta a ecologia local, aspectos da biologia do vetor, os recursos disponíveis para a implementação, o contexto cultural, o tempo para implantação, a cobertura e extensão desejada. Os métodos de controle vetorial empregados podem ser: a eliminação de habitats para as larvas, utilização de larvicidas ou agentes biológicos e a aplicação de adulticidas (WHO, 2009). Diante disso, pode-se observar que as ações para o controle da dengue são descentralizadas, abrangendo vários órgãos e gestores, e ainda possuem estratégias variáveis para cada contexto cultural, político e geográfico. Assim, muitas são as dificuldades em controlar a

doença, principalmente em países em desenvolvimento, que possuem, também, outras limitações, como por exemplo a dificuldade em se obter recursos financeiros necessários para o controle, prevenção e monitoramento da doença.

O controle da dengue atualmente se baseia inteiramente na redução dos vetores na natureza. Atividades para o controle da transmissão possuem como alvo o *A. aegypti* em seu habitat natural, sendo feito o controle das formas imaturas (larvas e pupas) e estágio adulto (WHO, 2009). A proliferação ocorre em ambientes naturais ou artificiais, que acumulam água. Alguns exemplos são: terrenos abandonados, edifícios em construção, locais de armazenamento de água para uso doméstico, estruturas de decoração, plantas, lixo, pneus, latas, garrafas ou qualquer outra estrutura que possa armazenar água. Os habitats são eliminados através da prevenção do acesso do mosquito por frequentes esvaziamentos e limpezas desses; ou pela utilização de inseticidas e agentes de controles biológicos ou ainda pela combinação destes diferentes métodos (WHO, 2009).

Em conjunto com as formas de controle tradicionais várias outras abordagens têm sido desenvolvidas com diferentes enfoques. A utilização da via natural de RNAi, produzindo mosquitos que expressam cópias inversas do RNA viral DENV-2 ativando a via e, protegendo o vetor da colonização viral (FRANZ et al., 2006); manipulações da microbiota dos mosquitos para aumentar a resistência ao DENV (RAMIREZ et al., 2012); técnicas de produção de mosquitos machos estéreis, para a redução de populações de mosquitos em áreas endêmicas (DISEASES et al., 2010); insetos machos carregando um gene letal dominante, que ao copularem com as fêmeas, transmitem o transgene para a prole provocando a morte desta (WISE DE VALDEZ et al., 2011); e diversas outras técnica, têm aumentado nos últimos anos.

Em resumo, essas técnicas desenvolvidas utilizando a engenharia genética para modificar o *A. aegypti* podem ser aplicadas em conjunto, oferecendo abordagens alternativas para o controle e prevenção da doença. É importante enfatizar que, a probabilidade de sucesso com o uso de uma única estratégia de controle é muito pequena. Portanto, a utilização conjunta de estratégias diversificadas é atualmente

considerada a melhor opção par que ocorra o controle do mosquito *A. aegypti* (HUANG et al., 2014). Uma outra abordagem que vem sendo proposta é a utilização da bactéria *Wolbachia,* como forma alternativa de controle.

## 1.8 A bactéria *Wolbachia pipientis*

Bactérias do gênero *Wolbachia* são membros da família *Rickettsiaceae*, gram-negativas. A *Wolbachia* é uma bactéria endossimbionte encontrada em vários tecidos do hospedeiro, incluindo órgãos reprodutivos (ovários e testículos), onde estima-se que ela esteja presente em cerca de 40% de artrópodes e vários nematóides em todo mundo, sendo considerada a bactéria intracelular mais abundante do planeta (ZUG et al., 2012). Atualmente a *Wolbachia* tem atraído um considerável interesse devido a sua extensa distribuição em artrópodes e pelos efeitos causados em seus hospedeiros, como as alterações reprodutivas e a potencial de aplicação no controle de doenças transmitidas por vetores (WERREN et al., 2008).

Possivelmente, a única espécie do gênero, a *Wolbachia pipientis*, foi inicialmente descrita em mosquitos *Culex pipiens* por Hertig e Wolbach em 1924 (HERTIG; WOLBACH, 1924). Análises moleculares do rDNA 16S demonstraram a existência de grupos que divergiam em apenas 2% na sequência do DNA ribossomal, sendo assim as cepas foram agrupadas em supergrupos. Foram criados oito supergrupos de acordo com suas características filogenéticas. Os dois principais, A e B, são os que englobam maior número de cepas, sendo mais comum a ocorrência em insetos; as cepas do grupo C e D são comumente encontradas em nematóides (*Onchocerca volvulus, Brugia malayi, Wuchereria bancrofti, Dirofilariinae immitis*) que causam a filariose (MCNULTY et al., 2012), o supergrupo F é comum a artrópodes e nematoides; e, por fim, o G engloba as cepas de *Wolbachia* detectadas em aracnídeos. Um amplo debate discute se todas as bactérias deveriam ser designadas como a espécie *W. pipientis* ou se outras nomenclaturas para novas espécies deveriam ser aplicadas. Portanto pela ausência de uma descrição formal as bactérias são designadas comumente apenas pelo gênero *Wolbachia* (WERREN et al., 2008).

Normalmente, a *Wolbachia* é herdada de forma vertical através da linhagem materna usando a maquinaria do fuso na divisão celular para se transmitir eficientemente nas células germinativas. Entretanto apenas a transmissão vertical não explica a vasta distribuição da bactéria em organismos filogeneticamente diferentes. Então tem sido demonstrado através de análises filogenéticas que a transmissão também ocorre de forma lateral ou horizontal (intertáxons) entre as espécies hospedeiras (ZUG et al., 2012). As análises utilizam três marcadores principais: o DNA nuclear do hospedeiro, o DNA mitocondrial e o genoma da *Wolbachia*. Foi constatado que a transmissão horizontal de genes entre a *Wolbachia* e o hospedeiro pode ocorrer. Por exemplo, observou-se a presença de um gene da bactéria no cromossomo X do coleóptero *Callosobruchus chinensis* (KONDO et al., 2002).

A *Wolbachia* é capaz de causar numerosas alterações reprodutivas em seus hospedeiros promovendo uma vantagem seletiva que favorece sua disseminação na população. Estas alterações incluem a Incompatibilidade Citoplasmática (CI), a indução da partenogênese, a feminização genética dos machos e a morte dos machos durante a embriogênese. Algumas cepas podem também inibir o desenvolvimento de patógenos em insetos vetores (WERREN et al., 2008).

### 1.8.1 Interação *Wolbachia*-hospedeiro

Uma característica fundamental da *Wolbachia* é a sua capacidade de manipular os processos celulares e reprodutivos de seus hospedeiros invertebrados. Cada uma das alterações reprodutivas é uma característica que propicia o aumento do número de fêmeas infectadas pela bactéria na população (WERREN et al., 2008).

#### 1.8.1.1 Alterações reprodutivas

A incompatibilidade citoplasmática (IC) é a alteração fenotípica mais frequentemente induzida pela *Wolbachia*. O cruzamento de machos infectados e fêmeas não infectadas ou infectadas com uma cepa diferente de *Wolbachia*, não é capaz de produzir uma progênie viável tendo como resultado a não eclosão dos ovos

(HOFFMANN; TURELLI, 1988). Pouco se conhece sobre os mecanismos bioquímicos utilizados pela *Wolbachia* para prover a IC, porém várias manifestações citológicas semelhantes foram descritas em vários hospedeiros, resultando em uma precoce mitose embrionária. A *Wolbachia* presente nos testículos dos machos induz uma modificação no espermatozoide durante a espermatogênese e essa modificação é recuperada no ovo em embriões infectados pela mesma cepa da bactéria. Caso a bactéria não esteja presente no embrião o desenvolvimento embrionário é interrompido, caracterizando a IC. O cruzamento incompatível é devido à assincronia dos prónucleos macho e fêmea, na fase inicial da mitose, a prófase, que culmina em um atraso da formação do envelope nuclear masculino. Durante a anáfase, os cromossomos do sexo feminino maturam-se normalmente formando o pronúcleo feminino enquanto o pronúcleo masculino é arrastado para o pólo centrossoma. Em organismos diplóides o resultado desta fusão resulta em letalidade embrionária (WERREN et al., 2008).

Assim como a IC, a partenogênese é proveniente de modificações no ciclo celular durante o desenvolvimento embrionário, resultando em um núcleo diplóide (característico de fêmeas em algumas espécies). A indução à partenogênese é menos comum que a IC, sendo que ao invés da produção dos ovos masculinos, as fêmeas infectadas produzem apenas ovos femininos associado com o fato das fêmeas serem capazes de transmitir a bactéria a sua prole (WERREN et al., 2008).

Em várias espécies de isópodes e alguns insetos a *Wolbachia* prolifera-se dentro da glândula androgênica (produtora de hormônio masculino) levando sua hipertrofia e inibição da função. Como consequência o desenvolvimento genético dos machos se dá como nas fêmeas, produzindo a feminização dos machos. Outra estratégia de disseminação da *Wolbachia* é a morte dos machos, relatado em alguns artrópodes. A morte dos machos ocorre principalmente na embriogênese resultando em uma maior disponibilidade de alimento para o desenvolvimento das fêmeas (WERREN et al., 2008). Todas as alterações fenotípicas e manipulações reprodutivas ocasionadas em seus hospedeiros pela *Wolbachia,* associada com a alta eficiência na transmissão vertical dessa bactéria, são as razões de seu sucesso evolutivo (ZUG et al., 2012).

#### 1.8.1.2 Interferência à patógenos promovida pela *Wolbachia*

Inicialmente, o interesse de utilização da *Wolbachia* como controle de patógenos se baseava na redução da longevidade do inseto a fim de impedir que o EIP ocorresse e o patógeno fosse transmitido. Desta forma, a redução da longevidade poderia reduzir a transmissão do patógeno sem eliminar a população de mosquitos (BROWNSTEIN et al., 2003). A cepa *w*MelPop, originária de *D. melanogaster,* é conhecida por infectar o seu hospedeiro em alta densidade e reduzir drasticamente sua longevidade. A introdução desta cepa de *Wolbachia* em *A. aegypti* reduziu 50% a longevidade das fêmeas quando comparadas com mosquitos sem a bactéria (MCMENIMAN et al., 2009).

Porém, a estratégia do uso da *Wolbachia* como controle de arboviroses mudou de direção quando foi descoberto o seu efeito sobre os patógenos. Foi inicialmente demonstrado o efeito com as cepas *w*Mel e *w*MelPop, em *D. melanogaster*, contra alguns vírus de RNA específico da mosca (HEDGES et al., 2008; TEIXEIRA et al., 2008). Vários estudos têm mostrado que diversas cepas de *Wolbachia* são capazes de promover proteção ao seu hospedeiro contra variados patógenos, ocorrendo em indivíduos naturalmente infectados ou transfectados. Porém, dos principais vetores de arbovírus, apenas *A. albopictus (*que contém as cepas de *Wolbachia w*AlbA e *w*AlbB)*, A. bromeliae* e alguns membros do complexo de *C. pipiens (w*Pip) são naturalmente infectados com *Wolbachia*. Vetores importante como o *A. aegypti* e as espécies do gênero *Anopheles* nunca foram encontrados positivos para a bactéria.

Posteriormente, as cepas wMel e wMelPop, foram transfectadas, estavelmente em células germinativas de mosquitos *A. aegypti* (MCMENIMAN et al., 2009) e também protegeu o vetor contra os vírus da dengue e chikungunya e ao parasito *P. gallinaceum* (MOREIRA et al., 2009). O mesmo ocorreu em mosquitos *Anopheles gambiae* que foram transfectados em células somáticas com as cepas, *w*AlbB e *w*MelPop, que protegeram o vetor contra o parasito *Plasmodium falciparum* (HUGHES et al., 2011). Recentemente *Anopheles stephensi*, foi transfectado estavelmente, protegendo também contra o parasito *P. falciparum* (BIAN et al.,

2013). Em mosquitos *A. aegypti* transfectados com *w*AlbB, *w*Mel e *w*MelPop, também houve reduções significativas na replicação e disseminação de DENV com um bloqueio parcial ou completo da transmissão viral (BIAN et al., 2010; MOREIRA et al., 2009; WALKER et al., 2011).

Entretanto nem todas as cepas são capazes de proteger seus hospedeiros. Em *Drosophila simulans* naturalmente infectadas com um das cepas de *Wolbachia* de dois supergrupos, o A (*w*Au, *w*Ri e *w*Ha) e o B (*w*No) apenas as cepas *w*Au e *w*Ri protegem a mosca da infecção de vírus de RNA (WONG et al., 2011). O mesmo ocorre com *A. albopictus,* que possui infecção mista natural pelas cepas, *w*AlbA e *w*AlbB. Nenhuma das cepas inibem a replicação do vírus dengue no mosquito (BIAN et al., 2010). Hughes e colaboradores, em 2011, transfectaram a cepa *w*AlbB em células somáticas de *A. gambiae.* Em contraste com outros resultados da literatura, houve um aumento no número de oocistos encontrados no intestino médio do mosquito. Os genes relacionados ao sistema imune apresentaram uma supressão tanto na cultura de células quanto *in vivo* (HUGHES et al., 2011). Essa diversidade de efeitos demonstra que há uma grande complexidade na interação entre a bactéria, vetores e parasitos.

De modo geral, as cepas de *Wolbachia* que conferem resistência à patógenos possuem uma alta densidade e ampla disseminação em diversos tecidos do hospedeiro. Estudos em *A. albopictus* mostraram que, mosquitos infectados com a cepa *w*AlbB não apresentaram um bloqueio significativo ao vírus dengue. Entretanto, quando transfectou-se a mesma cepa em cultivo de células, cuja densidade de *Wolbachia* foi mais elevada quando comparada ao mosquito, os níveis de dengue diminuíram. Nesse mesmo trabalho, Lu e colaboradores, em 2012, também demonstraram que em mosquitos *A. aegypti* com a cepa *w*AlbB, houve uma correlação negativa entre a densidade de *Wolbachia* e o número de cópias virais, onde o tratamento com doses crescentes de antibiótico apresentaram níveis decrescentes de bloqueio com DENV-2. Assim, demonstrando que a resistência ao dengue é densidade-dependente (LU et al., 2012a).

#### 1.8.1.3 Mecanismos associados a interferência à patógenos

O mecanismo de interferência a patógenos ainda é desconhecido. A questão central é se a *Wolbachia* interfere diretamente na replicação viral ou se aumenta a resistência vetorial à infecção por outras vias. Ainda há especulações que ambas podem atuar no mesmo hospedeiro ou até mesmo, ser dependente da cepa em questão.

A densidade de *Wolbachia* e a sua distribuição em tecidos é diretamente correlacionada como o efeito antiviral (FRENTIU et al., 2010; LU et al., 2012b). A distribuição da *Wolbachia* nos tecidos também é uma característica determinante na interferência à patógenos em mosquitos, visto que, os tecidos de maior relevância de colonização pela bactéria são o intestino, as glândulas salivares e os túbulos de Malpighi (OSBORNE et al., 2012). Em hospedeiros transfectados a densidade de *Wolbachia* é geralmente maior quando comparada a hospedeiros nativos, o que pode explicar o fato das infecções naturais não possuírem ação antiviral (BATON et al., 2013) Além disso, densidades aumentadas da bactéria podem aumentar a chance da co-existência, dentro da célula, da *Wolbachia* com o vírus (RAINEY et al., 2014). Aparentemente, a capacidade da *Wolbachia* gerar interferência a patógenos é limitada a cepas da bactéria que apresentam alta densidade e possuem amplo tropismo no corpo do hospedeiro (HUGHES et al., 2011; MOREIRA et al., 2009).

Um possível fator que possa explicar a inibição de patógenos mediada pela *Wolbachia* é baseado na indução da imunidade basal do inseto pela bactéria. A imunidade dos insetos, por exemplo, consiste em um conjunto de mecanismos que atuam na primeira linha de defesa contra variados patógenos, como bactérias, vírus e parasitos. Desta forma, assume-se que a *Wolbachia* pode controlar infecções devido a pré-ativação do sistema imune. Três principais vias de sinalização regulam a expressão de genes da imunidade efetora, como os genes da via Toll, IMD e Jak-STAT sendo, Toll e IMD diferencialmente mais expressos em mosquitos *A. aegypti* transfectados com a cepa *w*MelPop (MOREIRA et al., 2009; ZHENG et al., 2011). Porém, análises em hospedeiros naturais de *Wolbachia*, como *D. melanogaster, D. simulans* e *A. albopictus* não apresentam essa alteração na imunidade, tornando a

análise complicada, pois ambos, *D. melanogaster* e *D. simulans* conferem a resistência mediada por *Wolbachia* (RAINEY et al., 2014). Um estudo mais recente demonstrou que *D. melanogaster,* deficiente em componentes das vias de IMD e Toll, não necessitam desta vias para conferir resistência à DENV (RANCÈS et al., 2013).

Alternativamente, outro mecanismo proposto que pode atuar em conjunto ou individualmente, é a competição metabólica por recursos entre a bactéria, o patógeno e as células do hospedeiro. O efeito de interferência relatado pode ser devido à competição por componentes celulares principais da célula hospedeira. Os insetos, por exemplo, necessitam obter o colesterol e outros lipídeos através da sua dieta. As bactérias, da mesma forma, não possuem a capacidade de sintetizá-lo, e dependem do inseto hospedeiro. Um estudo sugere que o metabolismo de colesterol é fortemente regulado para possibilitar a replicação viral e desenvolvimento da bactéria (CARAGATA et al., 2013). A homeostase do ferro no hospedeiro também parece ser regulada pela *Wolbachia*. As proteínas de ligação do ferro, transferrina e ferritina, são super expressas na presença das cepas *w*Mel e *w*MelPop (RANCÈS et al., 2012). Os patógenos, DENV e Chikungunya, exercem o efeito oposto no hospedeiro, sub expressando as quantidades dessas proteínas (TCHANKOUO-NGUETCHEU et al., 2010). Esta relação ainda não está bem estabelecida, mas nos insetos, estas proteínas estão relacionadas com a imunidade, sendo esta a principal hipótese investigada.

A via Toll é conhecida por ser induzida pela produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em *A. aegypti* transfectados com *w*AlbB, o que leva a produção de cecropina e defensina, dois peptídeos antimicrobianos (AMPs) envolvidos com a atividade antiviral (RAINEY et al., 2014). Avaliando todos os estudos conjuntamente, pode-se concluir que a ação antiviral ocasionada pela *Wolbachia* não é necessariamente ou apenas promovida pela indução da imunidade. Acredita-se que vários mecanismos atuem de forma conjunta para a promoção da atividade antiviral.

### 1.8.2 *Wolbachia* como estratégia de controle da dengue

A partir do programa “Eliminar a Dengue” uma série de projetos de pesquisa estão sendo desenvolvidos em vários países, com o intuito de utilizar a bactéria *Wolbachia* transfectada em *A. aegypti,* como ferramenta adicional ao controle da transmissão da dengue. O programa, iniciado na Austrália, atualmente tem parcerias com várias instituições em todo o mundo. Isto permite a disponibilização desta abordagem para controlar a dengue, em âmbito global. Em cada localidade é realizada uma análise crítica, levando-se em conta os aspectos geográficos, econômicos e culturais de cada região, para que ocorra a adequação da melhor estratégia de liberação dos mosquitos.

Atualmente estão em curso projetos na Austrália, Brasil, Colômbia, Indonésia, e Vietnã. Nesses países, com exceção da Colômbia, já ocorreram as solturas dos mosquitos com *Wolbachia* em campo (www.eliminatedengue.org). A utilização da *Wolbachia* como estratégia da redução da transmissão da dengue têm se mostrado eficiente, onde mosquitos liberados em Cairns em 2011, na Austrália, demonstram invasão e estabilidade da cepa wMel nas populações de campo (HOFFMANN et al., 2014), e o bloqueio viral persiste após o estabelecimento da população no campo (FRENTIU et al., 2014).

## 2 JUSTIFICATIVA

Estima-se que em todo o mundo existam cerca de 2,5 bilhões de pessoas, metade da população mundial, vivendo em áreas de risco de transmissão epidêmica da dengue, principalmente em regiões tropicais e subtropicais. A incidência da dengue vem aumentando, onde estima-se ocorrer cerca de 100 milhões de novos casos a cada ano, sendo atualmente considerada como a mais importante enfermidade viral transmitida por mosquitos (GUBLER, 2011; WHO, 2014). Os países da América se destacam no cenário mundial, contribuindo com 2,35 milhões de casos reportados em 2013 (WHO, 2014). No Brasil a doença constitui-se um sério problema de saúde pública, onde as condições ambientais favorecem o desenvolvimento e a disseminação do vetor (Ministério da saúde, 2014).

A distribuição da dengue é potencializada pelas características do mosquito *A. aegypti,* vetor primário da doença, que possui uma grande competência vetorial ao vírus dengue e é altamente sinantrópico, agravando ainda mais o estabelecimento da doença (QUINTERO et al., 2014). Atualmente, a prevenção e controle da dengue dependem exclusivamente de medidas de combate ao vetor, uma vez que não há tratamento específico para nenhuma manifestação da doença (WHITEHORN et al., 2014) e não há uma vacina eficaz e segura para imunizar contra todos os sorotipos virais (THISYAKORN; THISYAKORN, 2014). Todos estes aspectos, tornam as medidas tradicionais de controle da doença ineficientes e descentralizados. Nesse contexto, há a necessidade da busca de novas estratégias mais eficazes e que possam ser utilizadas, concomitantemente, com as formas de controle já existentes.

Uma nova abordagem de controle biológico tem como objetivo interferir na interação patógeno-hospedeiro através da introdução de cepas da bactéria *Wolbachia pipientis* (BROWNSTEIN et al., 2003; RASGON et al., 2003; SINKINS, 2000; COOK et al., 2008). A *Wolbachia* é uma bactéria intracelular, transmitida verticalmente e encontrada em diversos invertebrados. Estima-se que 40% das espécies de insetos do mundo estejam infectados pela bactéria (ZUG et al., 2012). A *Wolbachia* é capaz de se disseminar na população de sua espécie hospedeira através da indução de modificações reprodutivas (HOFFMANN; TURELLI, 1988).

Estudos com *Drosophila melanogaster* mostraram que infecções com *Wolbachia* podem proteger a mosca contra infecções com vírus de RNA. As cepas, *w*Mel e *w*MelPop, reduziram a mortalidade das moscas quando infectadas com o vírus C de *Drosophila*, *Flock House* e da paralisia de gafanhotos (*Cricket paralysis virus*) (HEDGES et al., 2008; TEIXEIRA et al., 2008). A partir desses estudos, surgiu a abordagem de transfectar vetores de doenças, que não se encontram naturalmente infectados pela *Wolbachia* na natureza, como o *A. aegypti* e mosquitos do gênero *Anopheles.* Assim, em mosquitos *A. aegypti* transfectados com *Wolbachia,* observou-se o bloqueio da infecção pelo vírus da dengue e da Chikungunya e o protozoário *Plasmodium gallinaceum* (MOREIRA et al., 2009). Estes resultados abriram um novo campo de possibilidades de controle destas doenças sendo, a interferência à patógenos a estratégia mais explorada pela utilização da *Wolbachia.*

Apesar de vários estudos demonstrarem a interferência da *Wolbachia* na transmissão horizontal do vírus dengue, ainda não existe conhecimento se a *Wolbachia* é capaz de interferir na infecção da progênie de mosquitos infectados, conhecida como transmissão vertical. A transmissão vertical é considerada um importante aspecto da doença, onde estima-se que ela esteja associada na manutenção da dengue em períodos inter-epidêmicos, onde a transmissão mosquito-homem é considerada baixa (JOSHI et al., 2002). Além disso, estudos nesta área são importantes para entender como o vírus persiste em ambientes sem hospedeiros vertebrados ou em condições desfavoráveis para o mosquito (MARTINS et al., 2012). A transmissão vertical do vírus dengue já foi demonstrada laboratorialmente (JOSHI et al., 2002) e no campo (ARUNACHALAM et al., 2008) inclusive com o vetor secundário da doença *Aedes albopictus* (LEE; ROHANI, 2005).

A promissora utilização da *Wolbachia* como estratégia de controle de doenças transmitidas por vetores associa-se à necessidade de novas alternativas de combate à dengue. A partir disso, esse trabalho visa a ampliação do entendimento da utilização da *Wolbachia,* não só na transmissão horizontal da doença, como também na transmissão vertical do vírus dengue. Assim, se a transmissão vertical estiver associada com a manutenção do vírus no período inter-epidêmico e a *Wolbachia*

também influenciar negativamente nessa transmissão, haveria um grande impacto na redução do número de casos da doença. Diante disso, os resultados obtidos neste trabalho visam gerar informações a respeito da interação da *Wolbachia* com a transmissão vertical do vírus dengue em mosquitos brasileiros, contribuindo como uma possível ferramenta para o combate da dengue no Brasil.

# 3 OBJETIVO

## 3.1 Objetivo geral

Avaliar se a bactéria *Wolbachia* introduzida na linhagem brasileira de mosquitos *A. aegypti* influencia a transmissão vertical do vírus dengue.

## 3.2 Objetivos específicos

- Obter uma geração de mosquitos livre de *Wolbachia* a partir da colônia de mosquitos *A. aegypti* brasileiros *w*MelBr.
- Padronizar metodologias para o estudo da transmissão vertical do vírus dengue em *A. aegypti;*
- Realizar infecções com o vírus dengue nos mosquitos através de repasto sanguíneo infectante (natural) e por nanoinjeções torácicas (artificial);
- Avaliar se a co-infecção *Wolbachia* e vírus dengue afeta a fertilidade e fecundidade dos mosquitos;
- Verificar se a *Wolbachia* influencia na transmissão vertical do vírus, através de infecções via, repasto sanguíneo infectante e nanoinjeções torácicas;
- Analisar se a *Wolbachia* influencia na proporção de ovários que se tornam infectados por ambas as metodologias, artificial e natural.

# 4 MÉTODOS

## 4.1 Mosquitos

### 4.1.1 Manutenção das colônias

Todos os mosquitos utilizados nesse trabalho foram mantidos em condições ambientais controladas, sob temperatura média de 27ºC (± 1ºC), umidade relativa do ar média de 70% (±10%) e fotoperíodo de 12 horas. Os adultos foram mantidos em gaiolas BugDorm-1 30x30x30 cm (DP1000B-P), com 3 laterais em tela de nylon e uma abertura de 16 centímetros de diâmetro coberta com malha de nylon. A solução de sacarose a 10% foi oferecida *ad libitum* e trocada uma vez por semana.

A fim de se obter ovos, o repasto sanguíneo foi realizado semanalmente, após um jejum de aproximadamente 24 horas para estimular o repasto, utilizando-se o sistema Hemotek (Discovery Workshops, Accrington, Lancaster). Este sistema eletrônico é constituído de alimentadores conectados a uma fonte elétrica, permitindo a regulação da temperatura para 37ºC. A base dos alimentadores foi fechada com uma membrana intestinal suína, lavada e cortada, presa com elástico próprio, sendo mantida esticada e firme. Dentro de cada alimentador, foi colocado um volume total de 3,0mL de sangue. Foi utilizado sangue humano total coletado em EDTA, estocado na geladeira por aproximadamente uma semana, proveniente da doação de uma clínica hematológica. Antes da realização de todos os repastos, o sangue foi previamente testado quanto a presença do vírus dengue, pelo kit Dengue NS1 Ag Strip® (BioRad Laboratories, California, EUA, Cat. No. 70700).

Dois dias após o repasto sanguíneo, foi colocado no interior da gaiola um recipiente de 6 cm de diâmetro contendo água filtrada e uma tira de papel de filtro para a postura dos ovos pelas fêmeas. Após 48 horas, este recipiente foi retirado e o papel de filtro contendo os ovos, foi colocado para secagem e embrionamento dos ovos, nas mesmas condições ambientais acima descritas.

Após 48 horas, quando os ovos foram completamente secos, as tiras de papel foram colocadas em envelopes e armazenadas em recipientes de plástico ou se necessário, imediatamente colocadas para eclosão. A eclosão ocorreu em bandejas de plástico com tampa (30cm x 20cm), identificadas, contendo água desclorada e filtrada em filtros de celulose e foi adicionado um tablete triturado de ração para peixe (TetraMin tropical tablets, Tetra, Blacksburg, Alemanha). Após 48 horas da eclosão dos ovos, as larvas são redistribuídas em outras bandejas para o controle da densidade (média de 1000 larvas por bandeja). Quando necessário, as larvas foram alimentadas com uma pastilha da ração TetraMin e a água da bandeja foi trocada, utilizando uma peneira de malha fina para transferir as larvas para outro recipiente. Cerca de uma semana após a eclosão dos ovos as larvas começaram empupar e estas foram coletadas manualmente, utilizando-se uma pipeta de *Pasteur,* e colocadas em copos descartáveis com água limpa, sendo então transferidos para gaiolas, para a emergência dos adultos. Cada gaiola conteve aproximadamente 1000 adultos.

### 4.1.2 Retrocruzamentos para inserção de *Wolbachia* em *A. aegypti* brasileiros

A linhagem de mosquitos *w*Mel usada nesse estudo derivou-se de mosquitos *A. aegypti* com background genético australiano, cedido pelo Prof. Scott O'Neill da Monash University, Austrália. Para esses experimentos, era desejável que os mosquitos tivessem um background genético similar aos mosquitos brasileiros. Então, para tal, as colônias de mosquitos *A. aegypti* foram retrocruzadas entre linhagens de mosquitos australianos transfectados com a cepa *w*Mel de *Wolbachia* (MCMENIMAN et al., 2009) e linhagens F1 de mosquitos brasileiros selvagens que constituíram um pool de 4 localidades do Rio de Janeiro, sendo estas: Tubiacanga, Paquetá, Vila Valqueire e Jurujuba. O retrocruzamento foi realizado em 2012, onde, a colônia *w*MelBr, resultado do retrocruzamento, mantêm-se estável até os dias atuais. O processo de retrocruzamento é descrito brevemente a seguir.

Os ovos de mosquitos australianos wMel e os mosquitos de campo F1 (uma linhagem de campo foi coletada e denominada F0, realizou-se o repasto e a

progênie advinda destes mosquitos foi denominada F1) foram colocados no mesmo dia para a eclosão e criados sincronicamente até a fase de pupa. As pupas foram sexadas e separadas em 250 pupas fêmeas da colônia australiana com *Wolbachia* e 200 pupas machos da colônia brasileira. As pupas foram colocadas separadamente, em gaiolas, e após a emergência o sexo foi verificado nas respectivas gaiolas. Os adultos então foram soltos em uma única gaiola onde ocorreu o retrocruzamento entre as colônias. Os mosquitos foram criados (conforme descrito acima) até a coleta de ovos provenientes desse cruzamento. O processo foi repetido, nas mesmas condições, sendo que alguns cruzamento foram fechados, ou seja, ocorreu apenas entre a colônia que estava sendo retrocruzada, não tendo a adição de mosquitos machos de campo. Após cinco gerações de retrocruzamentos os procedimentos foram finalizados, e mais duas gerações foram mantidas fechadas para a total fixação da *Wolbachia* na colônia. Assim, a colônia foi denominada *w*MelBr porém, por razões didáticas, daqui em diante denominou-se MEL. Desta forma, a *Wolbachia* foi inserida nos mosquitos brasileiros mantendo-se o background genético desta população. A cada cinco gerações é feita a introdução de machos de campo na colônia para melhorar o fitness e manter-se as características genéticas de campo na colônia.

## 4.2 Confirmação da presença de *Wolbachia* nos mosquitos da colônia

Em todos os retrocruzamentos, amostras de mosquitos foram coletadas para a triagem de *Wolbachia* via qPCR. O *screening* da colônia foi realizado a cada geração para acompanhar a densidade de *Wolbachia.* Para tal realizou-se a extração de DNA total de uma amostra de 12 mosquitos machos e 24 fêmeas e, em seguida fez-se a reação em cadeia da polimerase em tempo real, qPCR, para o gene *wsp* (*Wolbachia surface protein)* de *Wolbachia* (conforme detalhado a seguir).

### 4.2.1 Extrações de DNA

As extrações de DNA genômico foram realizadas de acordo com o Protocolo de Extração Rápida (FU et al., 2010), conforme a seguir. Mosquitos fêmeas: em um micro tubo de 1,5mL com tampa de rosca, adicionou-se um mosquito, uma esfera de

vidro de 2mm (Sigma) e 80µL da solução *Squash Buffer* autoclavada (4mM EDTA, 20mM Trisbase, 0,4 mM NaCl). As amostras foram homogeneizadas por 1,5 minutos no equipamento Mini Bead-Beater (BioSpec 1001), 2100 oscilações/minuto, e em seguida, centrifugados à 13.200 RPM por 30 segundos à 4ºC. Transferiu-se os tubos diretamente para o banho seco à 97ºC por 10 minutos e posteriormente estes foram mantidos no gelo por aproximadamente 15 minutos. Centrifugou-se por 10 minutos a 13.200 RPM à 4ºC e cuidadosamente sem desprender o pellet formado, transferiu-se 10µL do sobrenadante para um novo tubo contendo 90µL de água Milli-Q autoclavada, gerando assim uma diluição de 10 vezes.

Para os mosquitos machos: seguiu-se o mesmo protocolo utilizado para a extração de fêmeas excluindo-se as etapas do banho de gelo por 15 minutos e a diluição de DNA final de 10 vezes, utilizando-se assim os 10µLprovenientes do sobrenadante.

### 4.2.2 Detecção de *Wolbachia* via PCR em tempo real

Após a extração do DNA genômico do mosquito, foi realizada uma qPCR para detectar a presença da *Wolbachia* mediante a amplificação do gene *Wolbachia surface protein* (*wsp*) de *Wolbachia.* Foi amplificado utilizando-se os iniciadores *wsp* F (5'- ATC TTT TAT AGC TGG TGG TGG T -3') e *wsp* R (5'- GGA GTG ATA GGC ATA TCT TCA AT -3') (MOREIRA et al., 2009). Estes iniciadores, amplificam uma variedade de cepas de *Wolbachia* do supergrupo A e B*,* gerando fragmentos para *w*Mel, de 206 pares de bases. Em cada reação adicionou-se 0,5µL de cada iniciador, *forward* e *reverse* (10µM); 5,0µL Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), e 1µL de DNA com cerca de 30ng/uL, adicionando-se água MilliQ para um volume final de 10µL. Todas as amostras foram realizadas em duplicata. As reações foram realizadas no termociclador de PCR em Tempo Real ViiA™7 – Applied Biosystems®, nas seguintes condições: uma etapa inicial de desnaturação à 95ºC por 10 minutos, seguido de 35 ciclos contendo: desnaturação 95ºC por 15 segundos e anelamento à 60ºC por 30 segundos. Após os ciclos obteve-se a curva de dissociação entre 60-95ºC.

Foram utilizados, os seguintes controles: como controles negativos mosquitos *A. aegypti* sem *Wolbachia* e poços sem a adição de amostra (apenas mix). Como controles positivos da reação, utilizou-se o DNA de mosquitos da linhagem australiana de *A. aegypti w*Mel (WALKER et al., 2011) extraídos de duas formas: através do Qiagem "QIAamp DNA Mini kit" e através do protocolo rápido de extração de DNA, extraído concomitantemente com as amostras.

A análise das amostras foi feita pelo método de presença ou ausência, onde utilizou-se a curva de dissociação, observando-se a dissociação em pico único e específico entre 75 e 76ºC, e os valores de $C_T$ (*Cycle Threshold*), sendo estes analisados conforme os seguintes critérios: $C_T$s acima de 30 as amostras foram consideradas negativas enquanto $C_T$s iguais ou menores que 30 as amostras são potencialmente positivas. Para análise do $C_T$ foi utilizado com parâmetro os $C_T$s encontrados nos controles negativos e positivos da mesma reação. Posteriormente a quantidade de *Wolbachia* foi calculada, estimando o número de cópias de *Wolbahcia,* em Unidades Arbitrárias, através da fórmula 2^-($C_T$ – 35), onde 35 é o número de ciclos da reação.

### 4.3 Obtenção de linhagem livre de *Wolbachia*

Após os retrocruzamentos, um grupo de *A. aegypti w*MelBr foi tratado com antibiótico tetraciclina (Sigma, St Louis, MO; Cat. No. T3383) para a remoção da *Wolbachia* e obtenção de uma linhagem com o mesmo background genético da colônia, porém, sem a presença da *Wolbachia* (DOBSON; RATTANADECHAKUL, 2001). A tetraciclina foi administrada juntamente com a solução de sacarose à 10% em uma concentração final de 1mg/mL. Para evitar a degradação do antibiótico e contaminação por fungos, as soluções foram preparadas diariamente. A solução de sacarose com tetraciclina foi homogeneizada e colocada em um pequeno frasco de vidro com um algodão cilíndrico em contato com a solução e voltado para fora, disponibilizada dentro da gaiola. A solução foi trocada uma vez ao dia. Nenhuma outra fonte de alimentação (sacarose ou água) foi fornecida aos mosquitos durante o tratamento. Os adultos foram tratados por três gerações consecutivas, onde, em cada geração o tratamento ocorreu durante 10 a 14 dias. Em cada geração, o repasto sanguíneo foi realizado por alimentadores artificiais contendo sangue

humano (conforme descrito no item 1.1) para a produção de ovos. Acompanhou-se a cada geração de tratamento a densidade de *Wolbachia* através de qPCR (conforme descrito no item 1.3.2).

Após o tratamento foi realizada a re-colonização da microbiota dos mosquitos. Para tal, 100mL de água de bandejas de criação de larvas de mosquitos de campo, foram misturadas nas bandejas de larvas da linhagem tratada com antibiótico. Este procedimento foi realizado durante duas gerações consecutivas para a recuperação dos mosquitos e a restituição da sua microbiota. Assim, criou-se a colônia *w*MelBrTET, denominada TET, para a utilização como controle nos experimentos descritos a seguir.

### 4.4 Vírus dengue

Os vírus utilizados nesse trabalho foram fornecidos pelo laboratório de RNA de Interferência, departamento de Imunologia e Bioquímica do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) situado na Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Os vírus dengue utilizados neste trabalho foram conforme a seguir:

**Tabela 1:** Relação de sorotipos utilizados informando a origem do vírus, a cepa, o título em PFU/mL, a dose injetada em 69nl e a concentração final do vírus no sangue.

| Vírus | Origem | Cepa | Título (PFU/mL) | Dose injetada (69nl) | Concentração final (sangue) PFU/mL |
|---|---|---|---|---|---|
| **DENV-1** | Rio de Janeiro (RJ) | BR-90 | $6x10^5$ | 41,4 PFU | - |
| **DENV-3** | Contagem (MG) | MG20 | $1,9x10^6$ | 131,1 PFU | $9,5x10^5$ |
| **DENV-4** | Boa Vista (RR) | Boa Vista 1981 | $6x10^6$ | 414 PFU | $3x10^6$ |

Os vírus foram multiplicados em células C6/36 de *Aedes albopictus* (ATCC© - CRL1660TM) mantidas em meio L-15 Leibovitz Medium (Gibco®) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino, SFB, (Cultilab), Penicilina-Streptomicina (25mg/mL) e Anfotericina B (25ng/mL), em estufa a 28˚C.

Para a multiplicação do DENV foi retirado o meio de cultura de garrafas de 75 $cm^2$ com uma confluência de 60-80% de células C6/36 de *A. albopictus*, e estas foram infectadas com 4mL de meio L-15 suplementado com 10% de SFB contendo vírus suficiente para uma MOI (multiplicidade de infecção) de 0,1. Após 1 hora de adsorção, este meio foi descartado, e foi adicionado 14mL de meio L-15 suplementado com 5% de SFB, e a garrafa foi mantida por 8 dias em estufa a 28˚C. Após este período de incubação, o meio foi coletado, as células foram lisadas por congelamento à -80˚C por 10 minutos e descongelada a 37˚C. O meio de cultura previamente coletado foi misturado às células lisadas, sendo em seguida centrifugado a 1800g por 10 minutos à 4˚C, e o sobrenadante congelado a -80˚C até o momento do uso. Os vírus foram titulados em células BHK-21 (ATCC© - CCL10TM) pela metodologia de formação de placas (DULBECCO; VOGT, 1954).

## 4.5 Ensaios de transmissão vertical

Com o intuito de avaliar se a *Wolbachia* influencia na transmissão vertical do vírus dengue os experimentos foram realizados no infectório do insetário (conforme descrito). Para tal, duas formas de infecção foram utilizadas: infecção natural, através de repastos sanguíneos infectantes, e a infecção artificial, através de nanoinjeções intratorácicas. A infecção natural simulou a infecção que ocorre em campo, onde, o vírus foi adquirido através do repasto em sangue infectado e a dinâmica da infecção não foi alterada. Por outro lado, a infecção artificial foi realizada com o intuito de promover uma infecção em um nível mais elevado, de forma a induzir que a transmissão vertical ocorra, já que as injeções ocorreram diretamente na hemolinfa dos mosquitos.

### 4.5.1 Ensaios de infecção oral

Para os ensaios de infecção natural cerca de 100 fêmeas com 4-7 dias de idade, foram separadas em gaiolas médias de fibra de papelão (Barripel), para os seguintes grupos: Mel, Tet, Mock Mel e Mock Tet. Para estes, realizou-se um jejum de sacarose de 24 horas e, posteriormente, proveu-se o repasto sanguíneo

infectante. Os repastos foram feitos em um sistema de banho-maria. Nesse sistema a água à 37°C, circulou em mangueiras conectadas a alimentadores de vidro, sendo o bombeamento feito através de uma bomba de aquário. Os alimentadores de vidro ficaram suspensos por suportes de laboratório e as mangueiras foram conectadas a estes, onde, cada alimentador continha uma câmara interna, para o armazenamento do sangue, e outra câmara externa para a circulação da água e aquecimento do sangue. A base do alimentador foi fechada com uma membrana intestinal suína, que foi lavada e cortada, presa com elástico sendo mantida esticada e firme. A membrana foi totalmente seca, constituindo assim a área de penetração das probócides dos mosquitos para o repasto. A solução infectante foi constituída de sangue humano total (coletado no mesmo dia em tubos contendo EDTA) e sobrenadante de cultivo celular contendo o vírus dengue (DENV-4) na proporção 1:1. Para os mosquitos dos grupos Mock foram feitas misturas não infectantee, na mesma proporção 1:1, com sangue humano total e meio de cultivo Lebowitz 15 proveniente do cultivo de células C6/36 de *A. albopictus.* Dentro de cada alimentador, foi colocado um volume total de 1,5mL de solução infectante ou solução não infectante, dependendo do grupo. Os repastos sanguíneos tiveram uma duração de aproximadamente uma hora em ambiente escuro.

Posteriormente, as fêmeas foram anestesiadas em $CO_2$ e mantidas em placa de Petri resfriada com gelo onde realizou-se a separação das fêmeas completamente ingurgitadas de sangue e descartou-se as não alimentadas. As fêmeas retornaram para as gaiolas Barripel, com solução de sacarose, onde adicionou-se cerca de 20 machos, de cada grupo, para a realização da cópula. Adicionou-se, 72 horas após os repastos, uma placa de Petri pequena com papel de filtro molhado no fundo, em cada gaiola, para a coleta da primeira postura de ovos. A placa foi mantida por dois dias e posteriormente os ovos foram descartados.

Dezesseis dias após os repastos as fêmeas de todos os grupos foram submetidas a um segundo repasto sanguíneo, não infectante, sob um jejum de 24 horas. O segundo repasto, objetivou iniciar o segundo ciclo gonotrófico, onde estima-se ser mais provável os ovos se tornarem infectados pelo vírus dengue, devido ao período de incubação extrínseca do vírus. Procedeu-se, então, exatamente como descrito

anteriormente no primeiro repasto substituindo as misturas, infectantes e não infectantes, por sangue humano total coletado no mesmo dia em tubos contendo EDTA, e proveniente do mesmo doador do primeiro repasto. As fêmeas foram separadas como descrito acima.

Para a oviposição individual das fêmeas, após 48 horas do repasto, estas foram anestesiadas em $CO_2$ e mantidas em placa de Petri resfriada com gelo onde colocou-se, individualmente, cada fêmea em placas de Petri de plástico (90x15mm) com papel de filtro cortado circularmente colocado sob a base. Quando as fêmeas tornaram-se ativas, adicionou-se 1mL de água desclorada em cada placa para a oviposição. As fêmeas foram mantidas nas placas por 24-72 horas, em bandejas de plástico tampadas, para manter a umidade e acompanhou-se diariamente para avaliação da oviposição. As fêmeas que ovipuseram nas primeiras horas e permaneceram vivas foram mantidas nas placas até 72 horas, para garantir a completa oviposição; as fêmeas que oviporam e morreram foram coletadas com 24 ou 48h; e as fêmeas que permaneceram vivas mas sem ovipor foram mantidas por mais 2 dias e então descartadas. Posteriormente, as fêmeas que oviporam foram coletadas e identificadas.

Para a secagem dos ovos, os papéis com as posturas foram removidos, retirou-se o excesso de água por absorção em papel toalha e iniciou-se o processo de secagem para o embrionamento dos ovos. Para isso, os papeis foram colocados de volta nas respectivas bases das placas, sem as tampas, e expostos ao ambiente por aproximadamente 15 minutos. Posteriormente colocou-se as placas em bandejas de plástico com tampas, para secagem lenta afim de evitar a desidratação brusca dos ovos. Os ovos foram contados, com o auxílio de um contador de células e um microscópio estereoscópico, para avaliação da fecundidade (representada pelo número de ovos). Após 48 horas, quando os papéis estavam secos, estes foram colocados para eclodir em placas de Petri com água desclorada e ração Tetramin macerada, como fonte de nutrientes e estímulo da eclosão.

Após a eclosão, as larvas desenvolveram até atingirem o terceiro ínstar (L3), e foram aspiradas, separadamente por postura, com uma pipeta de Pasteur para um

recipiente com água estéril, realizando a primeira lavagem. Então foram transferidas para um outro recipiente de água estéril, para a segunda lavagem. Posteriormente estas foram aspiradas da água e colocadas em papéis de filtro estéreis para a remoção do excesso de água. Com o auxílio de uma pinça higienizada as larvas foram coletadas em pools, de até 10 indivíduos. Quando o número de larvas apresentou-se menor do que 10 indivíduos ou o número de larvas total não foi divisível por 10, um pool com menor quantidade de larvas foi coletado e identificado. Através do número de larvas coletado, foi avaliado o parâmetro de fertilidade (representado por número de larvas), de cada grupo.

### 4.5.2 Ensaios de infecção artificial

Mosquitos Mel e Tet foram criados conforme descrito acima. Estes experimentos também foram conduzidos com mosquitos *A. albopictus,* como parâmetro de comparação da transmissão vertical, uma vez que estes mosquitos já foram descritos na literatura como um vetor que apresenta taxas de transmissão vertical mais elevadas. Fêmeas com 4-7 dias de idade foram removidas das gaiolas das colônias e transferidas para pequenos copos de plástico (500mL) com tampas, em grupos de 20 fêmeas.

As fêmeas foram anestesiadas com $CO_2$ e mantidas em placas de Petri resfriadas com gelo. Para as nanoinjeções utilizou-se o Nanoject II™ Auto-Nanoliter Injector, sob um microscópio estereoscópico. Primeiramente os mosquitos foram individualmente injetados com 69 nanolitros de meio de cultivo Lebowitz 15 proveniente do cultivo de células C6/36 *A. albopictus*, constituindo o grupo Mock (controle) nesse experimento para obtenção de controles negativos de DENV para as subsequentes reações de RT-qPCR. Posteriormente, 69 nanolitros do vírus dengue (DENV-1, -3 e -4), foram nanoinjetados individualmente nos dois grupos de mosquitos: Mel e Tet. As fêmeas, de ambos os grupos, foram mantidas nas gaiolas Barripel e adicionou-se cerca de 5 machos em cada gaiola para a realização da cópula.

Os mosquitos foram mantidos com solução de sacarose a 10% provida através de um algodão no topo da gaiola, trocado diariamente e removido 24 horas antes do repasto sanguíneo. Sete dias após as nanoinjeções foi oferecido um repasto sanguíneo não infectante com sangue humano total (como descrito em item 4.5.1), para a postura dos ovos. As fêmeas foram anestesiadas em $CO_2$ e mantidas em placa de Petri resfriada com gelo onde realizou-se a separação das fêmeas completamente ingurgitadas de sangue e descartou-se as não alimentadas. Estas foram mantidas novamente em solução de sacarose a 10%, nas respectivas gaiolas.

A oviposição e secagem dos ovos foram conduzidas conforme previamente descrito, com uma única exceção para os mosquitos *A. albopictus,* onde os papéis utilizados para a oviposição foram papel tipo Craft (composto com fibras de celulose, mais grosso, textura um pouco rugosa e absorve menos a água). Neste experimento as larvas foram coletadas em pools de 5 indivíduos. Quando o número de larvas apresentou-se menor do que 5 indivíduos ou o número de larvas não foi divisível por 5 um pool com menor quantidade de larvas foi coletado e identificado. Todas as fêmeas e larvas foram coletados em tubos com rosca, estéreis, contendo 1 esfera de vidro 2mm e estocadas a -80ºC para a extração do RNA e confirmação da infecção do vírus da dengue através de RT-qPCR.

### 4.6 Detecções do vírus dengue nos ovários

Para determinar se a *Wolbachia* afeta a taxa com que os ovários se tornam infectados com DENV, e então, podendo influenciar na transmissão vertical, os ovários foram dissecados de mosquitos, Mel e Tet. Os mosquitos foram infectados por nanoinjeções (DENV-1 e-4) e repasto sanguíneo infectante (DENV-3 e -4).

As infecções foram realizadas conforme descrito nos experimentos de transmissão vertical, para ambas as formas de infecção, oral e nanoinjeção. Para os experimentos de infecção oral, foi realizado um segundo repasto sanguíneo, sem vírus, 16 dias após a infecção; e para os experimentos de nanoinjeções, o repasto sanguíneo foi realizado 7 dias após a infecção. As fêmeas completamente engurgitadas foram separadas e 72 horas após os repastos, os ovários foram

dissecados em PBS 1X estéril, com o auxílio de pinças e um microscópio estereoscópico. Os ovários foram fotografados e coletados, individualmente, em tubos com rosca estéreis contendo 1 esfera de vidro de 2mm e estocadas a -80ºC para a extração do RNA e confirmação da infecção do vírus da dengue e *Wolbachia* através de RT-qPCR.

## 4.7 Detecção do vírus dengue através de RT-qPCR

A partir das amostras coletadas, as fêmeas e os pools de larvas, estocados em freezer -80ºC foram processados para a extração do RNA, RT-qPCR one step e síntese de cDNA.

### 4.7.1 Extração de RNA

Em todas as amostras o RNA foi extraído pelo método químico utilizando o TRIzol® (Invitrogen), de acordo com o seguinte protocolo. Com as amostras mantidas no gelo adicionou-se 200µL de TRIzol e macerou-se no Bead Beater por 1 min e 30 segundos. Posteriormente, adicionou-se 40µL de clorofórmio e os tubos foram homogeneizados em vortex por 30 segundos e centrifugados a 13.200 RPM por 15 minutos à 4˚C. Transferiu-se 90µL da fase aquosa (superior) para um novo tubo e adicionou-se 4µL de glicogênio a 5mg/mL (Invitrogen) sendo os tubos vortexados por 10 segundos a 1500 RPM. Adicionou-se 100µL de isopropanol gelado homogeneizando-se os tubos suavemente por inversão e incubando-se *overnight* (12-16 horas) a -20ºC para precipitação do RNA. Após a precipitação os tubos foram centrifugados a 13.200 RPM por 10 minutos à 4˚C e então foi removido delicadamente o sobrenadante (tomando cuidado para não descartar o pellet) e adicionado 200µL de etanol 75%. Os tubos foram homogeneizados com o dedo até soltar o pellet e centrifugados a 7.600 RPM por 5 minutos à 4˚C. Removeu-se novamente o sobrenadante (mantendo-se o pellet) sendo os tubos colocados abertos para secagem do pellet (aproximadamente por 10 minutos). O RNA foi ressuspendido em 20µL de água MilliQ e os tubos foram colocados em banho seco à 55ºC por 10 minutos. Os tubos foram homogeneizados e colocados imediatamente

em banho de gelo, quantificando-se o RNA no mesmo dia pelo NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). Armazenou-se o RNA em freezer -80ºC.

### 4.7.2 Síntese de cDNA para utilização na RT-qPCR como controle positivo de amostra

Para obtenção de um controle positivo para ser usado em todas as reações de RT-qPCR, foi realizado a síntese do cDNA, a partir do RNA extraído e dosado, individualmente, de 5 fêmeas infectadas por nanoinjeção. Após a síntese, formou-se um pool com os 5 cDNAs, e este foi aliquotado e utilizado em todas as placas. Para a síntese do cDNA procedeu-se da seguinte forma: em um microtubo de 0,5mL adicionou-se 1µL de Random Primers, 250ng/µL (Promega), 1µg de RNA e o volume final foi completado com água MilliQ q.s.p 7,0µL. Os tubos foram aquecidos à 70ºC por 5 minutos e resfriados, imediatamente, no gelo por 2 minutos. Posteriormente centrifugou-se em máxima velocidade para coletar todo o conteúdo do tubo e adicionou-se 2,5µL de tampão M-MLV RT 5X Buffer (Promega); 2,5µL de dNTPs mix a 10mM (Invitrogen) e 0,5µL da enzima Transcriptase Reversa M-MLV (Promega) totalizando-se um volume final de 12,5µL. Os tubos foram homogeneizados gentilmente e incubados a 37ºC por 60 minutos. Posteriormente os tubos foram incubados à 70ºC por 10 minutos. Foi realizada uma diluição final de 10 vezes e o produto formado foi estocado a -20ºC para reações de qPCR.

### 4.7.3 Plasmídeos DENV

O plasmídeo utilizado neste estudo foi cedido pela Universidade Monash, Austrália. O inserto contendo 107 pb da região UTR do vírus, generalista para todos os sorotipos (1 a 4), foi clonado no vetor pGEM®-T (Promega), com 3000 pares de bases. O plasmídeo foi clonado em *Escherichia coli.* O estoque do plasmídeo foi recebido já clonado nas bactérias *E. coli*, em glicerol 65%. Ressuspendeu-se 100µL da cultura em 3mL de meio líquido Luria-Bertani (LB) com ampicilina à concentração final de 0,1mg/mL, e incubou-se sob agitação à 37ºC, *overnight*. Posteriormente, plaqueou-se em meio ágar LB com ampicilina (0,1mg/mL) 100µL da cultura com as bactérias crescidas através de estriamento com alça de platina, e então incubou-se

em estufa à 37ºC *overnight*. Posteriormente foi selecionada uma colônia isolada, onde fez-se a PCR de colônia verificando-se a presença do inserto, nas seguintes condições: a região UTR foi amplificada utilizando-se os seguintes iniciadores, DENV-G-F: (5' -AAG GAC TAG AGG TTA GAG GAG ACC C -3') e DENV-G-R: (5' -CGT TCT GTG CCT GGA ATG ATG -3'). As reações foram realizadas no termociclador automático Veriti® 96-well Thermal Cycler (Applied Biosystems) nas seguintes condições: desnaturação de 95ºC por 10 minutos seguidos de 40 ciclos de desnaturação 95ºC por 15 segundos, anelamento à 60ºC por 1 minuto e extensão à 72ºC por 30 segundos, seguidos de uma extensão final de 72ºC por 5 minutos. Em cada reação adicionou-se 1,5µL de cada primer*, forward* e *reverse* (2µM); 1,5µL de dNTPs (2mM); 1,5µL de Tampão 10x (Invitrogen); 0,45µL $MgCl_2$ (Invitrogen); 0,2µL da enzima Taq DNA Polimerase (1U) (Invitrogen) e como amostra adicionou-se uma parte diretamente da colônia, completando-se com água livre de nucleases (QIAGEN) para um volume final de 15µL. Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose (110V) à 1% contendo 2µL de brometo de etídeo 10µg/mL, utilizando o tampão Tris acetato-EDTA (TAE) 1x. O padrão de peso molecular usado foi o 1kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). A amplificação foi visualizada em transiluminador ultra violeta. Após a confirmação da presença do inserto UTR na colônia, a mesma foi repicada em 3mL de meio líquido LB com ampicilina (Gibco) a 0,1mg/mL, por 37ºC, *overnight*. Posteriormente, procedeu-se a extração do plasmídeo das células através do QIAprep Spin Miniprep Kit – Qiagen, sendo o DNA plasmidial eluído em 30µL de tampão EB. O DNA foi quantificado pelo NanoDrop 2000 (Thermo Scientific).

Após a obtenção do plasmídeo, o mesmo foi cortado com enzimas de restrição: a *Eco* RI (Promega) para a liberação do inserto e confirmação da presença deste e *Pst* I (Ludwing Biotec) para a linearização do plasmídeo e utilização desse como curva padrão. Os protocolos utilizados para as enzimas foram: Enzima *Pst* I, 10µL do DNA do plasmídeo, 2µL do Buffer O, 2µL da enzima, 2µL de BSA e 4,0µL de água; Enzima *Eco* RI, 4µL do DNA do plasmídeo, 1,5µL do Buffer H, 1,0µL da enzima, 1,5µL de BSA acetilado e 7,0µL de água. As reações ocorreram em banho seco à 37ºC por uma hora. Aplicou-se 2µL dos produtos da reação para separação por eletroforese em gel de agarose (110v) à 2% contendo 2µL de brometo de etídeo

10µg/mL, utilizando o tampão Tris acetato-EDTA (TAE) 1x. O padrão de peso molecular usado foi 1kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). A reação foi visualizada em transiluminador ultra violeta. Após a confirmação da linearização do plasmídeo pela enzima PstI, o restante do produto (18µL) foi purificado pelo QIAquick PCR Purification (Qiagen) e eluído em 50µL de tampão EB. O produto foi quantificado em NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) e foram feitos os cálculos para a quantidade do número de moléculas presentes por microlitro. O plasmídeo estoque foi aliquotado, para a realização das curvas de diluição a cada placa, e estocado à -30ºC.

### 4.7.4 RT-qPCR *One step*

A partir da extração de RNA os ensaios Taqman *one step* RT-qPCR foram realizados, para a detecção do vírus dengue. O RNA extraído em todas as amostras, foi diluído na concentração de 1µg, no momento em que foram feitas as reações para evitar a degradação do RNA. As reações foram baseadas na região UTR conservada para todos os sorotipos (generalista). Os primers utilizados para a detecção dos vírus foram: DENV-G-F: (5'-AAG GAC TAG AGG TTA GAG GAG ACC C -3'), DENV-G-R: (5'-CGT TCT GTG CCT GGA ATG ATG -3'), DENV-G-Probe: (5'-HEX- AAC AGC ATA TTG ACG CTG GGA GAG ACC AGA- BHQ1-3'). As reações foram realizadas conforme a seguir: 2,5µL de 4x Taqman® Fast Virus 1-Step Master Mix (Life Technologies); 0,5µL de cada primer, *forward* e *reverse,* a 10µM; 0,25µL de sonda a 10µM; 2,5µL de RNA a 1µg, adicionando-se água para biologia molecular (Sigma) um volume final de 10µL. As reações foram realizadas no termociclador de PCR em tempo real ViiA™ 7 (Applied Biosystems®), nas seguintes condições: primeiro passo foi a transcrição reversa do RNA à 50ºC por 6 minutos, seguida da inativação da enzima e desnaturação inicial à 95ºC por 20 minutos e 45 ciclos de amplificação, sendo 95ºC por 03 segundos, 60ºC por 30 segundos e 72ºC por 1 segundo, sendo nesse último passo que os dados foram adquiridos.

Foram utilizados como controles negativos o RNA de mosquito ou pool de larvas não infectados pelo vírus dengue, além do mix contendo apenas os reagentes da reação. Como controle positivo da reação utilizou-se o pool de cDNA (conforme descrito acima). A cada placa foi realizada uma nova curva padrão utilizando-se os

plasmídeos linearizados com a região UTR, em triplicata, nas seguintes diluições: $10^8$, $10^7$, $10^6$,$10^5$, $10^4$ e $10^3$ para a quantificação absoluta do vírus nas amostras. As amostras foram analisadas no ViiA™ 7 *Software,* provido pelo próprio equipamento. Os valores finais são expressos em números de cópias virais contidas em 1µg de RNA total.

### 4.8 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas em dois programas diferentes: SPSS *Statistics* e *GraphPad* Prism®. As análises de fecundidade, fertilidade e suscetibilidade ao vírus dengue foram analisadas no SPSS, utilizando-se como teste o modelo linear generalizado. Na suscetibilidade o teste utilizado foi o Regressão logística binária. Já as análises de carga viral, foram analisadas no *GraphPad* Prism®, sendo o Mann-Whitney U, o teste utilizado.

# 5 RESULTADOS

## 5.1 Obtenção de linhagem livre de *Wolbachia*

Para a obtenção de um grupo controle com o mesmo background genético da linhagem com *Wolbachia* foi necessária a remoção da bactéria. O tratamento com antibiótico tetraciclina em mosquitos da colônia, *w*MelBr, foi utilizado para gerar uma nova linhagem de laboratório sem *Wolbachia,* denominada TET. A cada geração de tratamento foi realizado o monitoramento da densidade de *Wolbachia* através de qPCR, onde pôde-se observar a diminuição do número de cópias de *Wolbachia* a cada geração (**Figura 2**). Após três gerações consecutivas de tratamento com tetraciclina, foi possível observar a completa eliminação da *Wolbachia* na colônia. Desde então é realizado, a cada geração, o monitoramento por qPCR, para verificar se a *Wolbachia* permanece ausente.

A recolonização da microbiota foi realizada na colônia Tet, durante duas gerações consecutivas, como parte fundamental para os experimentos de competência vetorial. Todos os experimentos realizados neste trabalho foram conduzidos após esse processo.

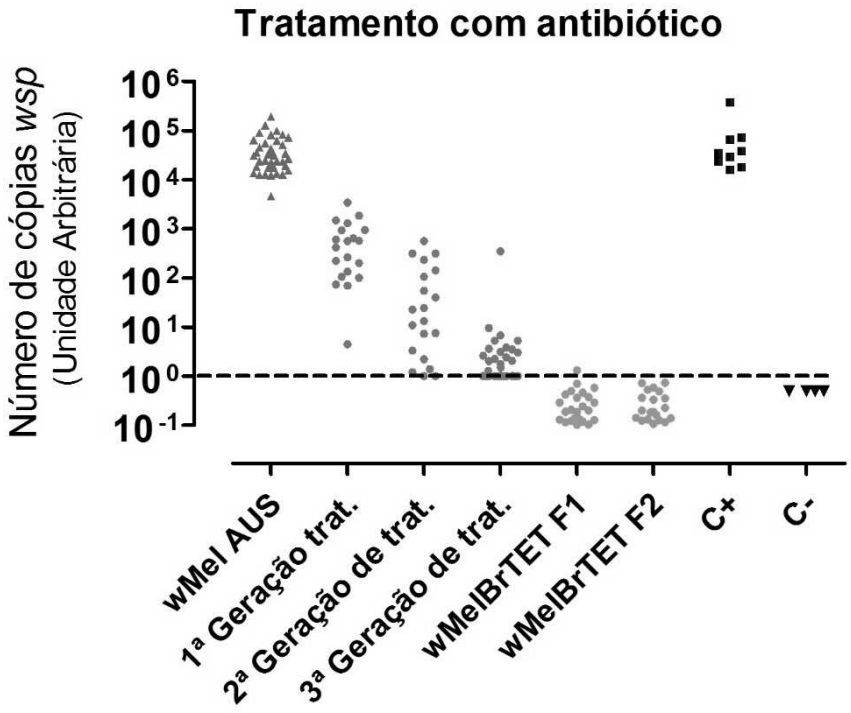


**Figura 2:** Tratamentos com tetraciclina na colônia *w*MelBr, de *A. aegypti*, para a eliminação de *Wolbachia*. O gráfico expressa os três tratamentos realizados, consecutivamente, nas gerações da colônia wMelBr, para a obtenção de um grupo controle com o mesmo background genético que a colônia com *Wolbachia.* Cada figura geométrica representa uma única fêmea adulta de *A. aegypti*. ***w*Mel AUS:** linhagem de mosquitos australianos com *Wolbachia*; **C+**: Controle positivo; **C-**: Controle negativo. A linha tracejada demonstra o limite entre amostras positivas e negativas.

## 5.2 Transmissão vertical

### 5.2.1 Infecção oral

Os experimentos de infecção oral foram realizados com o objetivo de avaliar se a transmissão vertical do vírus dengue ocorre, como em um sistema natural, simulando as condições de campo. Assim, vírus dengue proveniente de cultivo de células foi misturado a sangue humano total e os mosquitos foram alimentados através de alimentadores artificiais. Para esses experimentos foram realizadas as análises de fecundidade, fertilidade, suscetibilidade e carga viral do vírus, para a geração parental e a análise da progênie dos parentais infectados. Foram realizadas duas réplicas biológicas, com DENV-4, Experimentos 1 e 2.

Em relação à fecundidade pode-se observar que comparando-se Tet e Mel infectados com o vírus, os mosquitos Tet apresentaram maior produção de ovos

(Modelo linear generalizado; *W* = 51,518; *df* = 2; *P* < 0,0001), demonstrando que a co-infecção *Wolbachia* e o vírus pode estar causando um custo biológico aos mosquitos (**Figura 3**). Quando compara-se mosquitos do grupo controle Mock com os respectivos grupos infectados, Mel e Tet, têm-se que ambos os controles apresentam maior fecundidade em Tet infectado comparado com Tet Mock (Modelo linear generalizado; *W* = 14,887; *d.f.* = 1; *P* < 0,0001), e em Mel infectado comparado com Mel Mock (Modelo linear generalizado; *W* = 57,059; *d.f.* = 1; *P* < 0,0001). Esses resultados reafirmam a possibilidade da infecção pelo vírus dengue causar um custo aos aspectos biológicos do mosquito, independente da infecção pela *Wolbachia.*

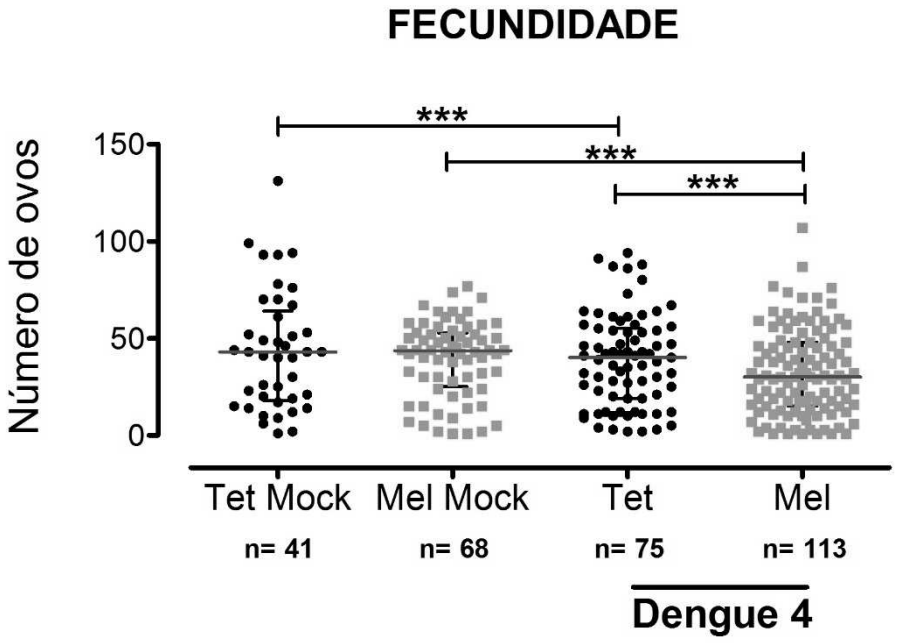


**Figura 3:** Fecundidade dos mosquitos *A. aegypti* infectados oralmente com o DENV-4, 20 dias após a infecção (Experimento 1). Cada ponto representa o número de ovos proveniente de uma única fêmea. Os asteriscos mostram a significância entre os grupos (*P* < 0,0001, modelo linear generalizado). A linha vermelha horizontal representa a mediana e as linhas pretas na vertical representam o intervalo interquartil.

Na fertilidade, medida pelo número de larvas eclodidas, pode-se observar que, comparando-se mosquitos Tet e Mel infectados, a fertilidade também é maior em mosquitos Tet (Modelo linear generalizado; *W* = 292,826; *d.f.* = 1; *P* < 0,0001), sugerindo que a co-infecção com *Wolbachia* e o vírus dengue também pode diminuir o número de larvas (**Figura 4**). Quando se compara o controle Mel Mock com o

grupo infectado Mel, a fertilidade permanece maior no grupo controle (Modelo linear generalizado; $W$ = 14,976, $d.f.$ = 1; $P$ < 0,0001). Porém, quando se compara o controle Tet Mock com os mosquitos do grupo Tet infectado a fertilidade é maior nos mosquitos do grupo infectado (Modelo linear generalizado; $W$ = 27,44, $d.f.$ = 1; $P$ < 0,0001). Portanto, em nossas condições, a infecção pelo vírus dengue não afeta a fertilidade na ausência da *Wolbachia*, estando a infecção favorecendo o número de larvas viáveis.

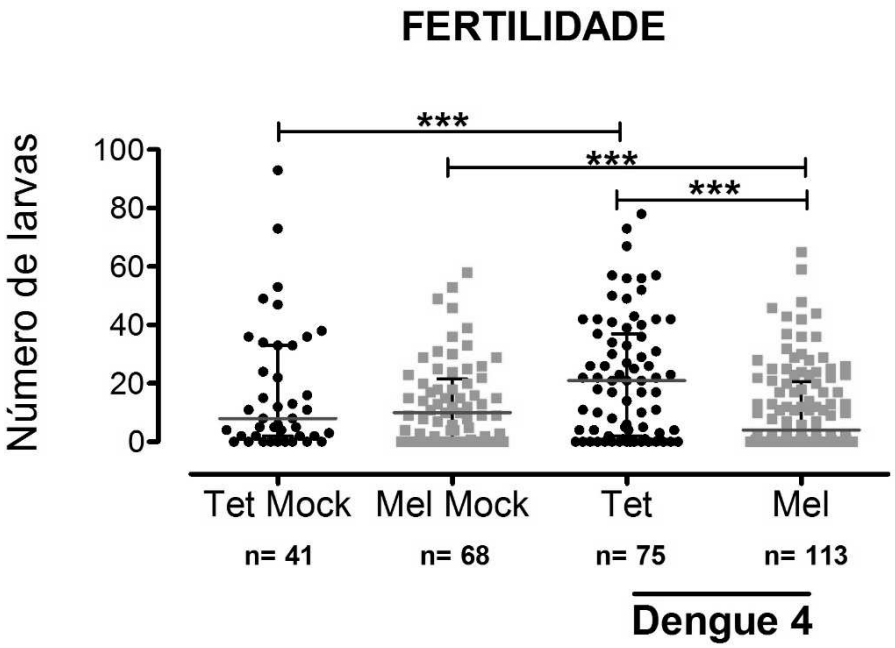


**Figura 4:** Fertilidade dos mosquitos *A. aegypti* infectados oralmente com o DENV-4, 20 dias após a infecção (Experimento 1). Cada ponto representa o número de larvas proveniente de uma única fêmea. Os asteriscos mostram a significância entre os grupos ($P$ < 0,0001, modelo linear generalizado). A linha vermelha horizontal representa a mediana e as linhas pretas na vertical representam o intervalo interquartil.

Após as análises de fecundidade e fertilidade, os mosquitos com 20 dias após o repasto infectante foram analisados quanto à suscetibilidade ao vírus dengue, com o intuito de verificar se a presença da *Wolbachia* interfere nessa infecção. As taxas de infecção dos mosquitos foram 40,00% (24 em um total de 60) e 45,68% (37 em um total de 81), em Tet e Mel, respectivamente (**Figura 5**). As análises foram feitas pelo teste de Regressão logística binária e mostraram não haver diferença na suscetibilidade dos mosquitos ao vírus dengue ($W$ = 2,702; $d.f.$ = 1; $P$ = 0,100), ou

seja, não há diferença na porcentagem de mosquitos Tet e Mel infectados, demonstrando que a *Wolbachia* não afetou a taxa de infecção.

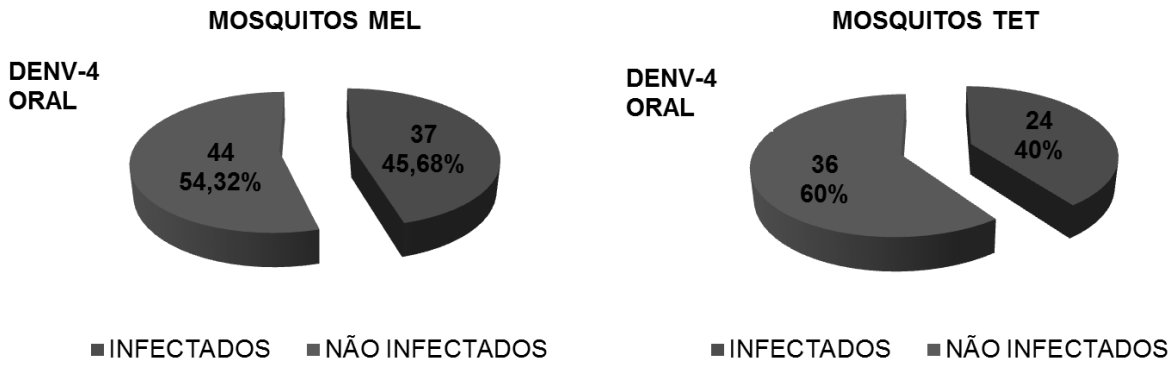


**Figura 5:** Suscetibilidade ao vírus dengue entre os mosquitos *A. aegypti* Tet e Mel, 20 dias após a infecção oral. O gráfico representa a porcentagem de mosquitos que tornaram-se infectados, onde, Tet n = 60 (24 infectados) e Mel n = 81 indivíduos (37 infectados). Análises estatísticas não apontam diferenças entre os grupos (*P* = 0,100; regressão logística binária).

Visto que a suscetibilidade dos mosquitos Tet e Mel não foi alterada pela presença da *Wolbachia*, a carga viral dos mosquitos foi analisada, representada pelo número de cópias virais em cada amostra. Os mosquitos Tet apresentaram uma carga viral maior quando comparados aos mosquitos Mel (*U* = 271,0; *P* = 0,0089; Mann-Whitney U) (**Figura 6**). Esse resultado demonstra que, apesar da porcentagem de mosquitos que se tornam infectados ser igual, a carga viral é maior nos mosquitos que não possuem a *Wolbachia,* revelando a interferência ao vírus dengue conferida pela bactéria.

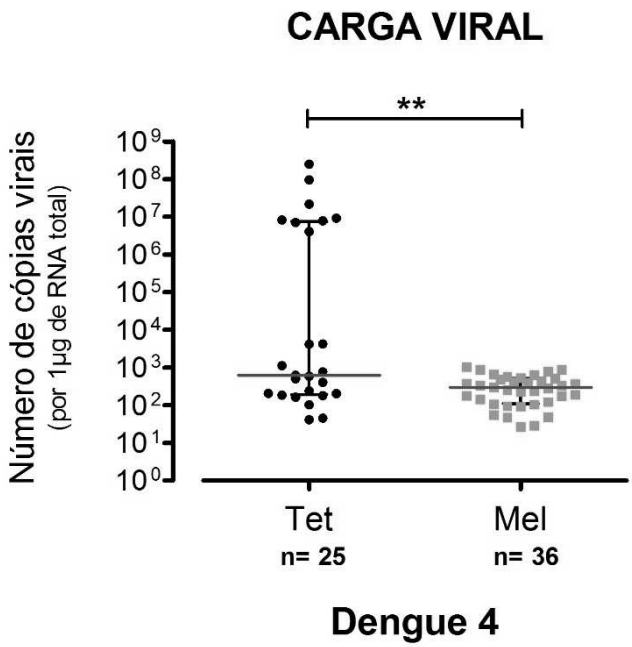


**Figura 6:** Carga viral do vírus dengue nos dois grupos de mosquitos *A. aegypti,* Tet e Mel, da geração parental, 20 dias após a infecção oral. (Experimento 1). A carga viral foi determinada por quantificação absoluta, com a utilização de plasmídeos contendo um fragmento do vírus dengue. Cada ponto representa um único indivíduo. Os asteriscos mostram a significância entre os grupos (U = 271,0 e *P* = 0,0089). A linha vermelha horizontal representa a mediana e as linhas pretas na vertical representam o interquartil. Teste estatístico utilizado, Mann-Whitney U.

Nestes experimentos apesar de um longo período após a infecção (20 dias), e considerando a idade dos mosquitos, estes apresentaram-se saudáveis e consequentemente tiveram uma boa fecundidade. Portanto, as larvas foram coletadas em pool de 10 indivíduos. Após todas as análises com a geração parental, os pools de larvas provenientes dos mosquitos positivos para dengue, foram analisados. Um total de 108 pools, com 773 larvas (379 Tet e 394 Mel), foram testados quanto à presença do vírus dengue (**Figura 7**). Neste experimento foram detectados 4 pools positivos (1 Tet e 3 Mel), onde a carga viral deste pode ser observada (**Figura 8**).

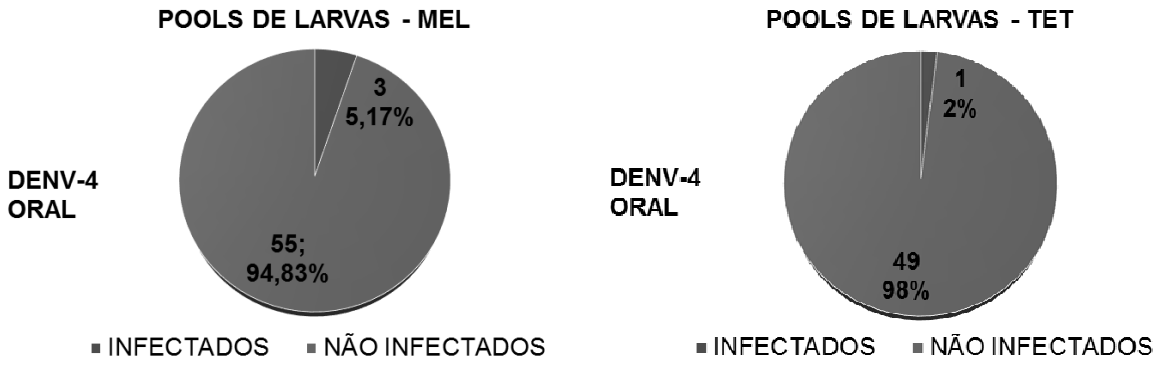


**Figura 7:** Pools de larvas provenientes de fêmeas *A. aegypti*, Tet e Mel, infectadas oralmente com DENV-4, 20 dias após a infecção oral. Cada pool contém até 10 larvas. Foi analisando um total de 773 larvas (379 Tet e 394 Mel).

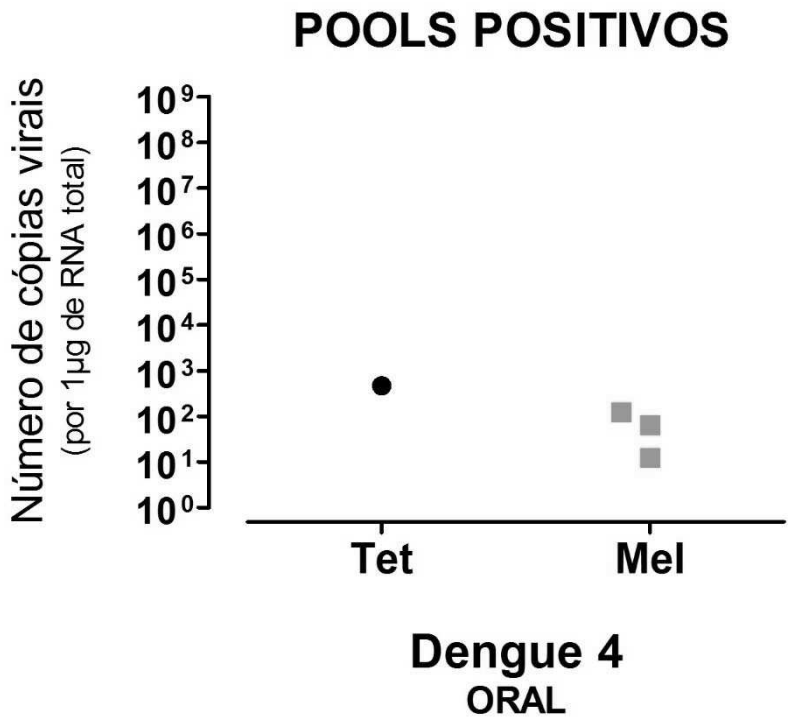


**Figura 8:** Carga viral de pools de larvas de *A. aegypti* positivos para dengue, infectados oralmente com DENV-4, 20 dias após a infecção oral dos parentais. Cada forma geométrica representa um pool de larvas. Cada pool contém até 10 larvas.

O Experimento 2 foi uma réplica com menor número de mosquitos (Tet n = 11 e Mel n = 17) e não foi detectado nenhum mosquito positivo para o vírus dengue (taxa de infecção de 0% em Mel e Tet). Nenhuma análise foi realizada com esse

experimento, porém os resultados encontrados confirmam os do Experimento 1, que mostrou uma baixa taxa de infecção nos mosquitos, sendo necessário um grande número de amostras para se obter uma quantidade representativa de mosquitos positivos.

### 5.2.2 Infecções artificiais

Uma vez que as infecções orais não demonstraram um alto índice de transmissão vertical do vírus dengue, foram realizadas as infecções artificiais (nanoinjeções intratorácicas) com o intuito de aumentar a carga viral das infecções nos mosquitos de forma a favorecer a ocorrência da transmissão vertical. Uma vez que o vírus não necessita passar pela barreira do intestino, sendo injetado diretamente na hemolinfa, estima-se que seja mais fácil os ovários se tornarem infectados.

As nanoinjeções normalmente causam danos aos mosquitos por ser um método invasivo de infecção, e desta forma repercute na sobrevivência dos mosquitos ao longo do experimento. Fatores como, a experiência do profissional nas aplicações, o preparo adequado das agulhas e o manuseio cauteloso, porém rápido, dos mosquitos, representaram um grande obstáculo no sucesso das infecções e sobrevivência dos mosquitos. Apesar de nestes experimentos a sobrevivência necessária dos mosquitos para as coletas dos ovos ser menor (11 dias após a infecção), em relação aos experimentos de infecção oral (20 dias após a infecção), a taxa de mortalidade foi maior comparado aos mosquitos infectados oralmente.

Para esses experimentos foram avaliados a fecundidade, fertilidade e a carga viral entre os mosquitos parentais, e a porcentagem de pools infectados no pool de larvas. A suscetibilidade ao vírus dengue não foi avaliada nesses experimentos, pois a taxa de infecção variou em torno de 99% em todos os experimentos. Foram realizadas nanoinjeções com os vírus DENV-1, -3 e -4, onde realizou-se, uma réplica biológica com o DENV-1, uma réplica biológica com o DENV-3 e três réplicas biológicas com o DENV-4 (Experimento 1-3).

#### 5.2.2.1 Nanoinjeções com o vírus dengue 1

Nas infecções com DENV-1 ao comparar a fecundidade entre os dois grupos infectados, observou-se um maior número de ovos nos mosquitos com *Wolbachia* (Modelo linear generalizado, $W$ = 33,386; *d.f.* = 1; $P$ < 0,0001) onde, nesse experimento, a co-infecção da *Wolbachia* com o vírus favoreceu a produção de ovos (**Figura 9**). O mesmo ocorreu em relação à fertilidade (**Figura 10**), onde os mosquitos com *Wolbachia* apresentaram um maior número de larvas comparado com o grupo Tet (Modelo linear generalizado, $W$ = 22,629; *d.f.* = 1; $P$ < 0,0001).

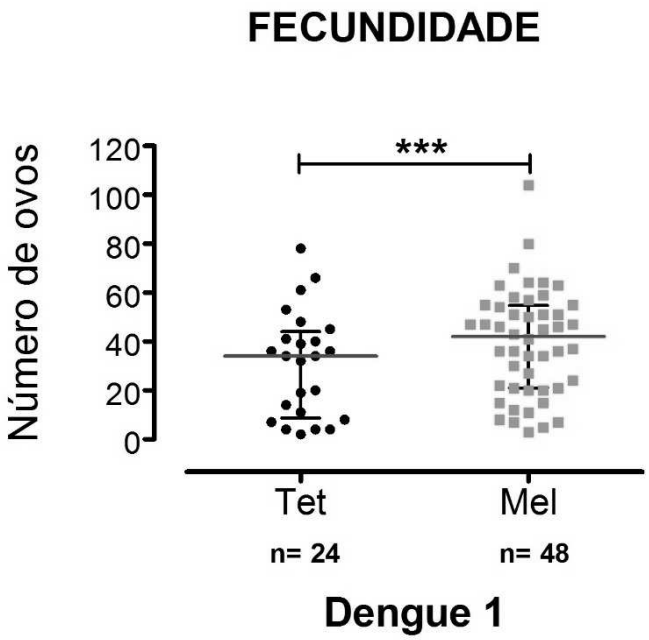


**Figura 9:** Fecundidade dos mosquitos *A. aegypti* infectados por nanoinjeções com DENV-1, 11 dias após a infecção. Cada ponto representa o total de ovos provenientes de uma única fêmea. Os asteriscos mostram a significância entre os grupos (Modelo linear generalizado; $W$ = 33,386; *d.f* = 1; $P$ < 0,0001). A linha vermelha horizontal representa a mediana e as linhas pretas na vertical representam o intervalo interquartil.

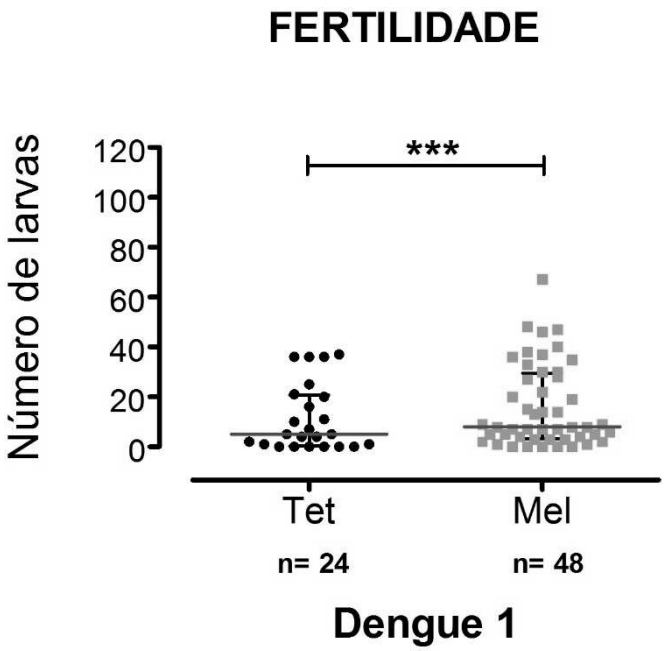


**Figura 10:** Fertilidade dos mosquitos *A. aegypti* infectados por nanoinjeções com o DENV-1, 11 dias após a infecção. Cada ponto representa o número de larvas provenientes de uma única fêmea. Os asteriscos mostram a significância entre os grupos (Modelo linear generalizado; $W$ = 22,629; $d.f.$ = 1; $P$ < 0,001). A linha vermelha horizontal representa a mediana e as linhas pretas na vertical representam o intervalo interquartil.

Em um período de 11 a 13 dias após a infecção, as taxas de infecções dos mosquitos foram de Tet = 100% e Mel = 95,65% (1 mosquito não infectado em um total de 23 indivíduos), onde, entre os mosquitos infectados não apresentou diferença significativa entre os grupos (Mann-Whitney U; $U$ = 215,0; $P$ = 0,2862), sendo assim, nesse experimento a *Wolbachia* não interferiu na infecção ao DENV-1 (**Figura 11**).

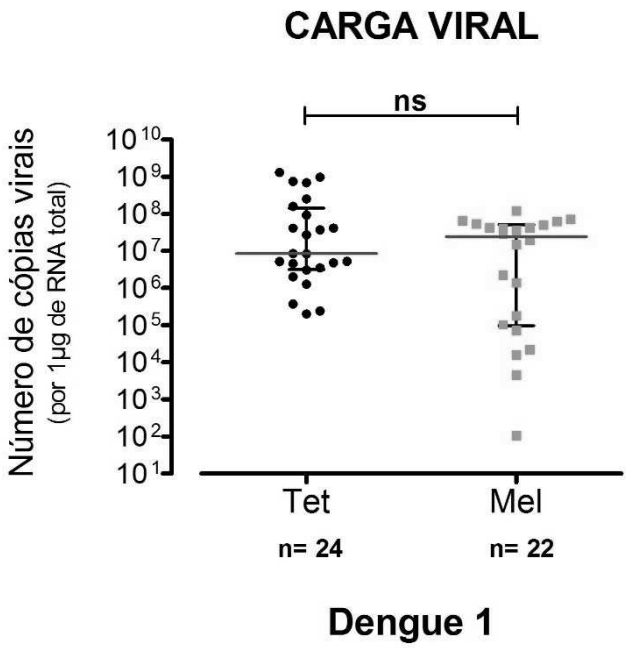


**Figura 11:** Carga viral do vírus dengue nos grupos de mosquitos *A. aegypti,* Tet e Mel, da geração parental, 11 dias após as nanoinjeções. A carga viral foi determinada por quantificação absoluta, com a utilização de plasmídeos contendo um fragmento do vírus dengue. Cada ponto representa um único indivíduo. "ns" representa não significativo (Mann-Whitney U, *U* = 215; *P* = 0,2862). A linha vermelha horizontal representa a mediana e as linhas pretas na vertical representam o interquartil.

Os pools de larvas provenientes de mosquitos infectados com DENV-1, foram processados e analisados quanto à infecção pelo vírus dengue. Foram analisados um total de 265 pools, totalizando 1.050 larvas (277 Tet e 773 Mel). Foram encontrados um total de 4 pools positivos (1 Tet e 3 Mel) no experimento (**Figura 12**).

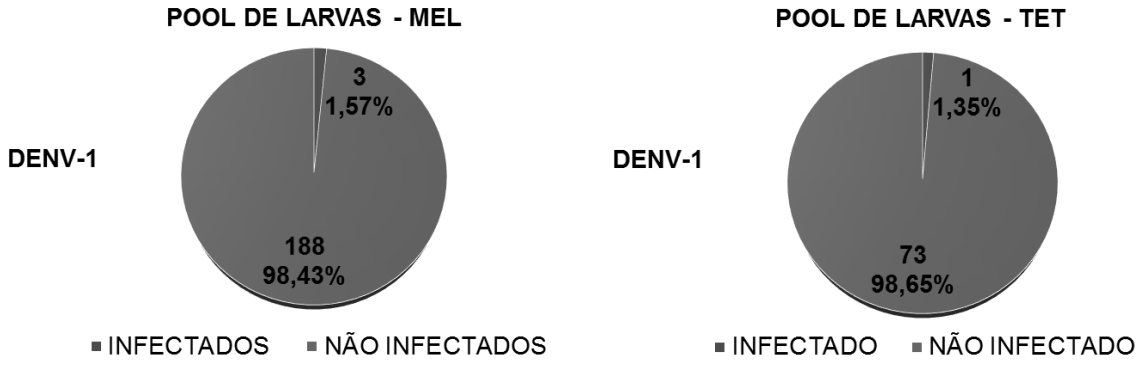


**Figura 12:** Pools de larvas provenientes de fêmeas *A. aegypti*, Tet e Mel, infectadas por nanoinjeções intratorácicas com DENV-1, de 11 a 13 dias após a infecção. Cada pool contém até 5 larvas. Foram analisados um total de 1050 larvas (277 Tet e 773 Mel).

### 5.2.2.2 Nanoinjeções com o vírus dengue 3

Nas infecções com DENV-3, ao comparar-se a fecundidade e fertilidade, as análises mostraram não haver significância em relação a estes aspectos (Modelo linear generalizado; $W$ = 0,768; $d.f.$ = 1; $P$ = 0,381) (**Figura 13**) e (Modelo linear generalizado; $W$ = 1,453; $d.f.$ = 1; $P$ = 0,228) (**Figura 14**), respectivamente. Ou seja, a *Wolbachia* não afetou esses parâmetros reprodutivos do hospedeiro na condição testada de infeção com DENV-3.

Em um período de 11 a 13 dias após a infecção, as taxas de infecções dos mosquitos foram de, Tet = 100% e Mel = 96,87% (1 mosquito não infectado/ em um total de 32 indivíduos). A análise da carga viral entre os grupos também não demonstrou diferença significativa (Mann-Whitney U; $U$ = 266,0; $P$ = 0,5757), mostrando que a *Wolbachia* não interfere na infecção ao DENV-3, nessas condições (**Figura 15**).

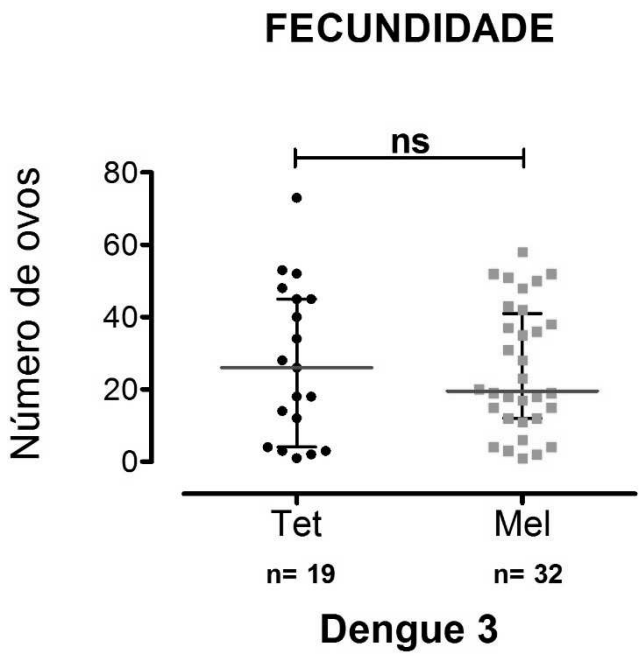


**Figura 13:** Fecundidade dos mosquitos *A. aegypti* infectados por nanoinjeções com DENV-3, 11 dias após a infecção. Cada ponto representa o total de ovos provenientes de uma única fêmea. "ns" representa não significativo (Modelo linear generalizado; $W$ = 0,768; $d.f.$ = 1; $P$ = 0,381). A linha vermelha horizontal representa a mediana e as linhas pretas na vertical representam o intervalo interquartil.

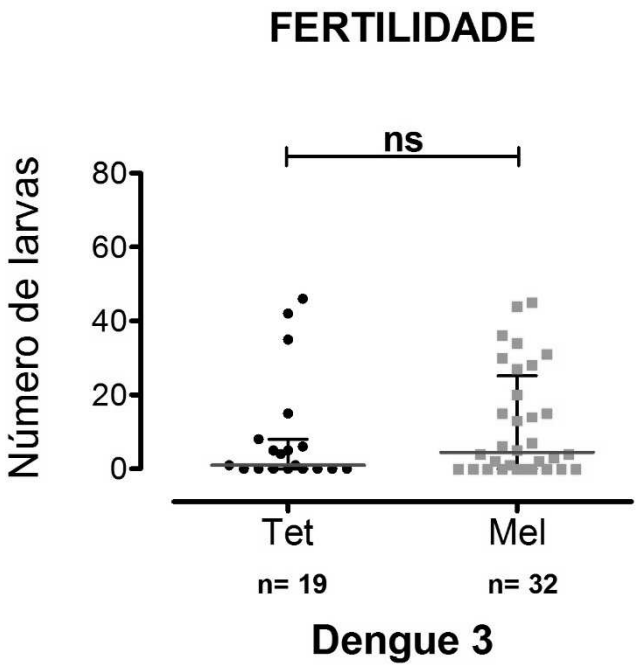


**Figura 14:** Fertilidade dos mosquitos *A. aegypti* infectados por nanoinjeções com o DENV-3, 11 dias após a infecção. Cada ponto representa um único indivíduo. "ns" representa não significativo (Modelo linear generalizado; $W = 1{,}453$; *d.f.* = 1; $P = 0,\ 228$). A linha vermelha horizontal representa a mediana e as linhas pretas na vertical representam o intervalo interquartil.

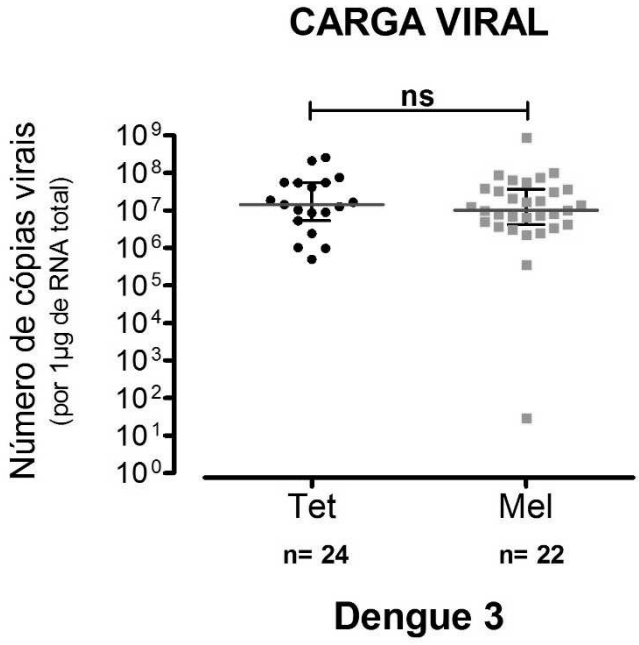


**Figura 15:** Carga viral do vírus dengue nos grupos de mosquitos *A. aegypti,* Tet e Mel, da geração parental, 11 dias após as nanoinjeções. A carga viral foi determinada por quantificação absoluta, com a utilização de plasmídeos contendo um fragmento do vírus dengue. Cada ponto representa um único indivíduo. "ns" representa não significativo (Mann-Whitney U; $U = 266{,}0$; $P = 0{,}5757$). A linha vermelha horizontal representa a mediana e as linhas pretas na vertical representam o interquartil.

Os pools de larvas provenientes dos mosquitos infectados com DENV-3, foram processados e analisados quanto à infecção pelo vírus dengue. Foram analisados um total de 141 pools, totalizando 597 larvas (211 Tet e 386 Mel). Foi encontrado somente 1 pool positivo (Mel) no experimento (**Figura 16**).

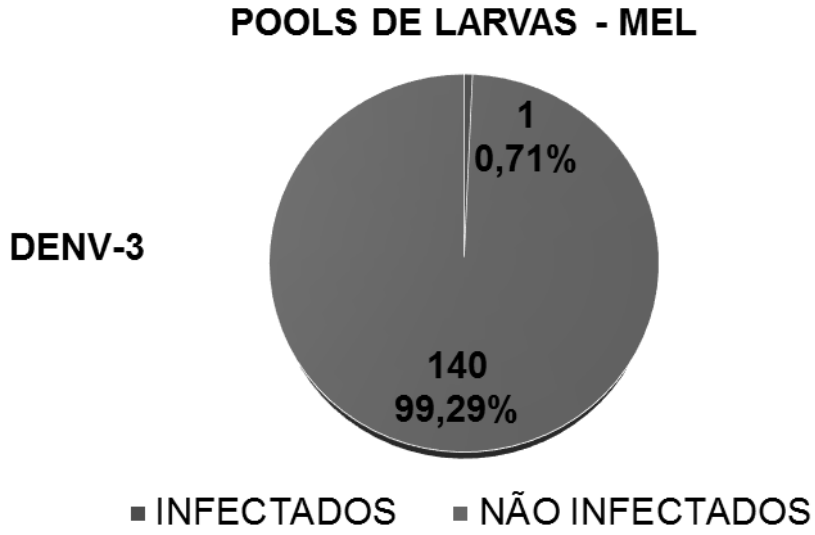


**Figura 16:** Pools de larvas provenientes de fêmeas *A. aegypti,* Tet e Mel, infectadas por nanoinjeções intratorácicas com DENV-3, de 11 a 13 dias após a infecção. Cada pool contém até 5 larvas. Foram analisados um total de 597 larvas (211 Tet e 386 Mel).

#### 5.2.2.3 Nanoinjeções com o vírus dengue 4

Para os experimentos com Dengue 4 foram realizadas 3 réplicas biológicas (Experimento 1-3). As análises estatísticas demonstraram que os experimentos não poderiam ser avaliados em conjunto, pois as réplicas apresentaram um fator significante entre si, demonstrando que a variação entre os experimentos foi alta e por isso não poderiam ser avaliadas em conjunto (Modelo linear generalizado; $W$ = 14,479; *d.f.* = 2; $P$ = 0,001). Em relação à fecundidade, todos os experimentos apresentaram-se significativos quanto ao aumento no número de ovos dos mosquitos Tet comparados com os mosquitos Mel, onde: Experimento 1 ($W$ = 32,053; *d.f.* = 1; $P$ < 0,0001); Experimento 2 ($W$ = 49,201; *d.f.* = 1; $P$ < 0,0001) e Experimento 3 ($W$ = 8,597; *d.f.* = 1; $P$ < 0,003) (**Figura 17**). As análises de fertilidade e fecundidade foram analisadas pelo teste de modelo linear generalizado.

Quanto à fertilidade, o Experimento 1 e 3 também apresentaram um maior número de larvas no grupo Tet em relação ao grupo Mel, Experimento 1 ($W$ = 32,85; $d.f.$ = 1; $P$ < 0,0001) e Experimento 3 ($W$ = 51,89; $d.f.$ = 1; $P$ < 0,0001). Já no Experimento 2, essa diferença não ocorreu ($W$ = 0,21; $d.f.$ = 1; $P$ = 0,647), não havendo diferenças entre os grupos, o que pode ser atribuído ao número reduzido de fêmeas no grupo Tet (**Figura 18**).

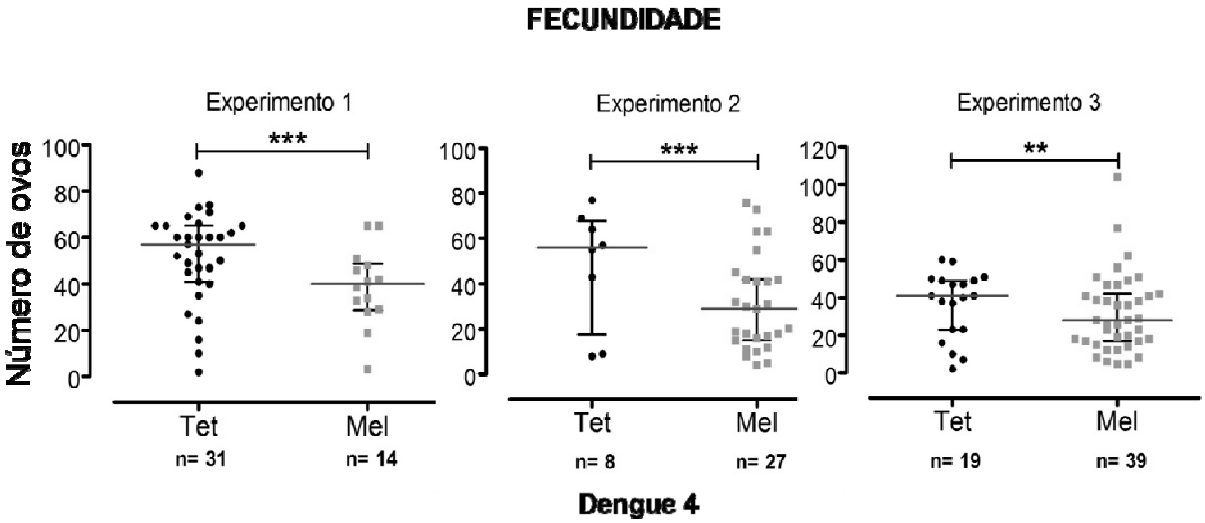


**Figura 17:** Fecundidade dos mosquitos *A. aegypti* infectados por nanoinjeções com DENV-4, 11 dias após a infecção, em 3 experimentos independentes. Cada ponto representa um único indivíduo. Os asteriscos mostram a significância entre os grupos, sendo Exp 1 (Modelo linear generalizado, $W$ = 32,053; $d.f.$ = 1; $P$ < 0,0001); Exp 2 (Modelo linear generalizado, $W$ = 49,201; $d.f.$ = 1; $P$ < 0,0001) e Exp 3 (Modelo linear generalizado; $W$ = 8,597; $d.f.$ = 1; $P$ = 0,003). A linha vermelha horizontal representa a mediana e as linhas pretas na vertical representam o intervalo interquartil.

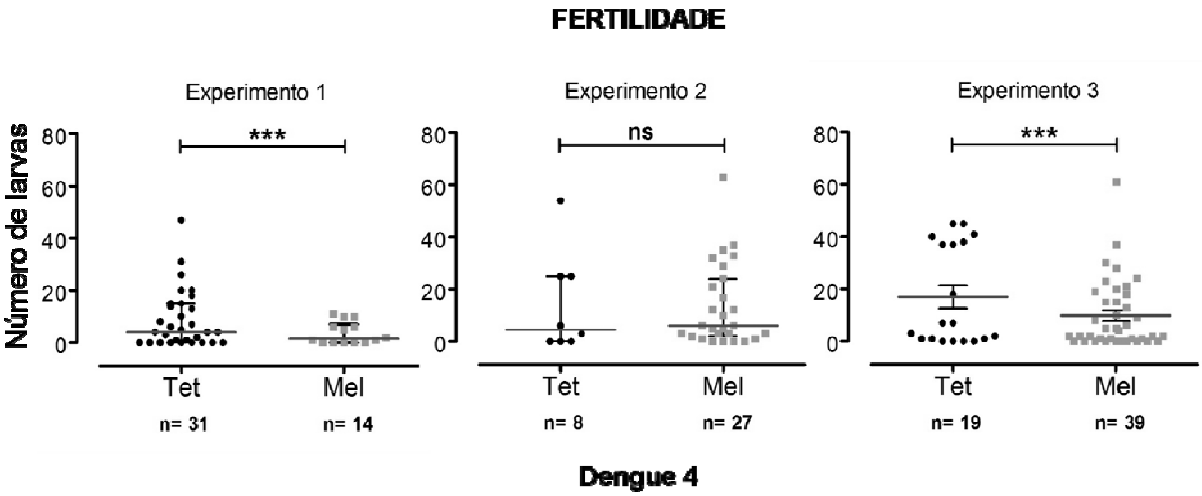


**Figura 18:** Fertilidade dos mosquitos *A. aegypti* infectados por nanoinjeções com DENV-4, 11 dias após a infecção, em 3 experimentos independentes. Cada ponto representa um único indivíduo. Os asteriscos mostram a significância entre os grupos e "ns" corresponde a não significativo, sendo: Exp 1 (Modelo linear generalizado; $W$ = 32,85; *d.f.* = 1; $P$ < 0,0001); Exp 2 (Modelo linear generalizado, $W$ = 0,21; *d.f.* = 1; $P$ = 0,647) e Exp 3 (Modelo linear generalizado, $W$ = 51,89; *d.f.* = 1; $P$ < 0,0001). A linha vermelha horizontal representa a mediana e as linhas pretas na vertical representam o intervalo interquartil.

Em um período de 11 a 13 dias após a infecção, as taxas de infecções dos mosquitos nos experimentos foram as seguintes: Experimento 1, Tet = 100% e Mel = 100%, Experimento 2, Tet = 100% e Mel = 96,3% (1 mosquito não infectado/em um total de 27 indivíduos) e Experimento 3, Tet = 100% e Mel = 100%. Quanto à carga viral, os experimentos foram diferentes entre si, sendo: o Experimento 1, não apresentou diferença nas quantidades de vírus entre os grupos Tet e Mel ($U$= 200,0; $P$ = 0,6858); no Experimento 2, o grupo Tet teve uma maior carga viral em relação ao grupo Mel ($U$ = 45,0; $P$ = 0,007) e no Experimento 3, o grupo Tet também apresentou uma maior carga viral em relação ao grupo Mel ($U$ = 208,0; $P$ = 0,0432), porém menos significativa que o Experimento 2 (**Figura 19**). Todos os experimentos foram avaliados pelo teste Mann-Whitney U.

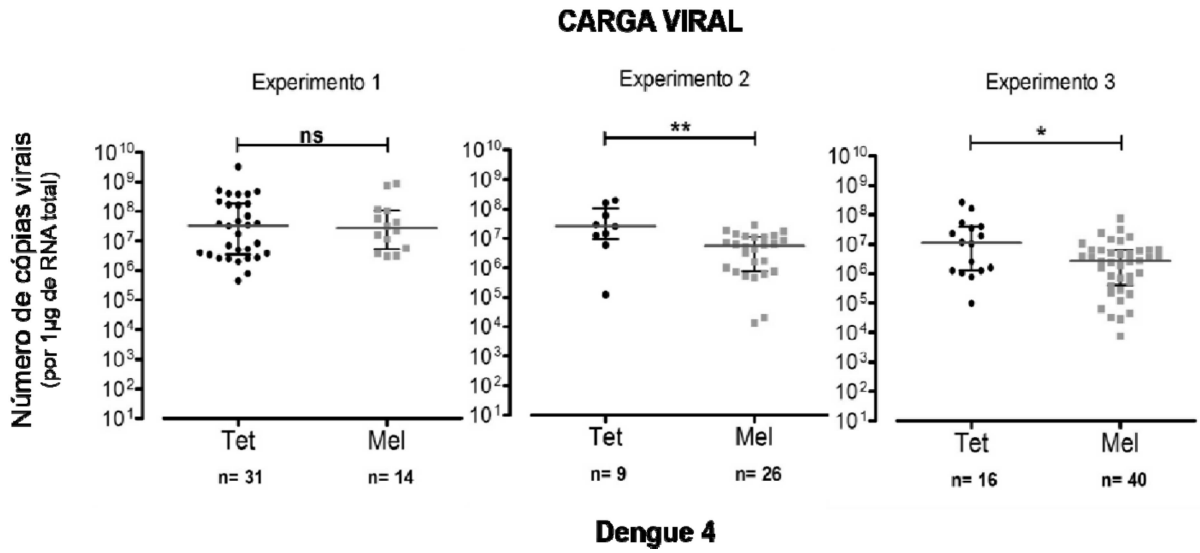


**Figura 19:** Carga viral do vírus dengue nos grupos parentais de mosquitos *A. aegypti,* Tet e Mel, 11 dias após as nanoinjeções, em 3 experimentos independentes. A carga viral foi determinada por quantificação absoluta, com a utilização de plasmídeos contendo um fragmento do vírus dengue. Cada ponto representa um único indivíduo. Os asteriscos mostram a significância entre os grupos, sendo: Exp 1 (Mann-Whitney U; $U$ = 200,0, $P$ = 0,6858); (Mann-Whitney U; $U$ = 45,0, $P$ = 0,007) e Exp 3 (Mann-Whitney U; $U$ = 208,0; $P$ = 0,0432). A linha vermelha horizontal representa a mediana e as linhas pretas na vertical representam o interquartil.

Os pools de larvas provenientes dos mosquitos infectados com DENV-4, foram processados e analisados quanto à infecção pelo vírus dengue. Foram analisados um total de 331 pools, totalizando 1.510 larvas (710 Tet e 800 Mel). Foram encontrados um total de 8 pools positivos nos experimentos, onde: no Experimento 1, detectou-se 4 pools positivos (3 Tet e 1 Mel) (**Figura *20***); no Experimento 2, detectou-se 2 pools positivos (2 Mel) (**Figura *21***) e no Experimento 3, detectou-se 2 pools positivos (1 Tet e 1 Mel) (**Figura 22**).

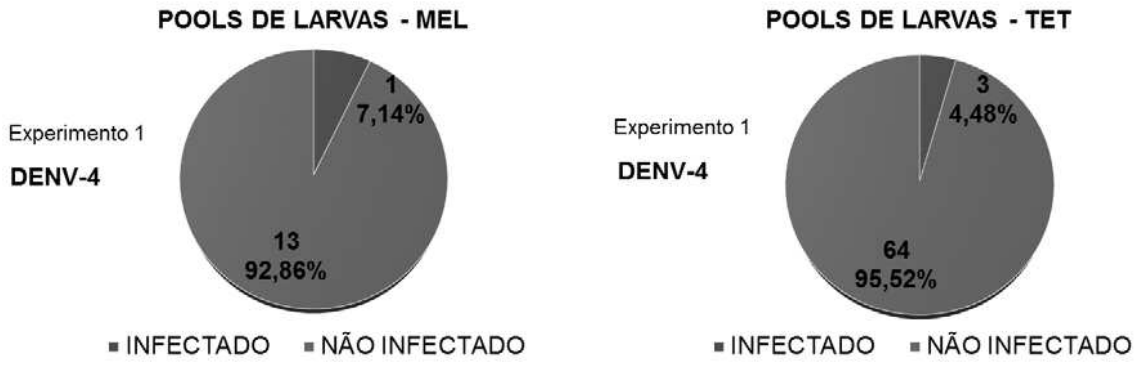


**Figura 20:** Pools de larvas provenientes de fêmeas *A. aegypti,* Tet e Mel, infectadas por nanoinjeções intratorácicas com DENV-4, de 11 a 13 dias após a infecção, experimento 1. Cada pool contém até 5 larvas.

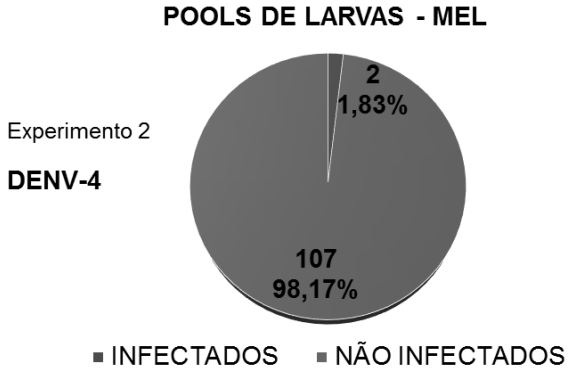


**Figura 21:** Pools de larvas provenientes de fêmeas *A. aegypti,* Mel, infectadas por nanoinjeções intratorácicas com DENV-4, de 11 a 13 dias após a infecção, experimento 2. Cada pool contém até 5 larvas. Não foi detectado pools positivos Tet neste experimento.

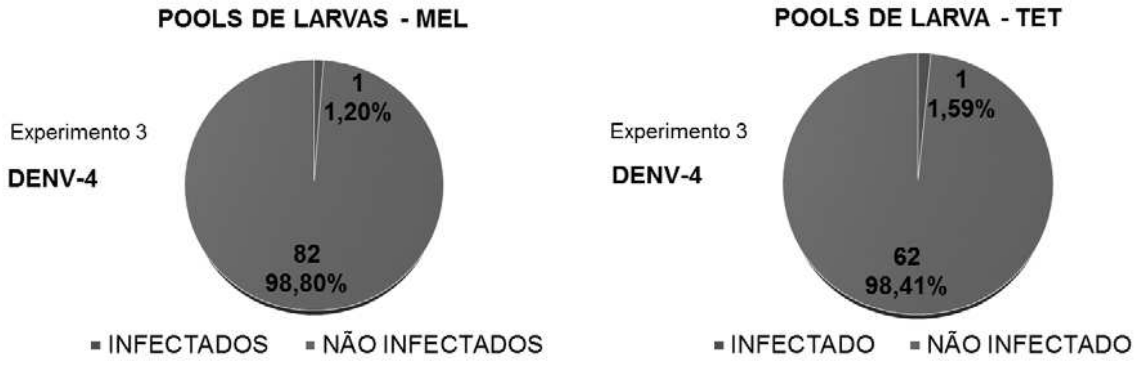


**Figura 22:** Pools de larvas provenientes de fêmeas *A. aegypti,* Tet e Mel, infectadas por nanoinjeções intratorácicas com DENV-4, de 11 a 13 dias após a infecção, experimento 3. Cada pool contém até 5 larvas.

### 5.2.2.4 Carga viral dos pools positivos por nanoinjeções

Ao agrupar todos os pools positivos, dos experimentos de nanoinjeções, para uma análise global do número de cópias virais, pode-se observar que os pools provenientes de fêmeas infectadas com DENV-4 apresentam maior carga viral em relação aos outros sorotipos (**Figura 23**).

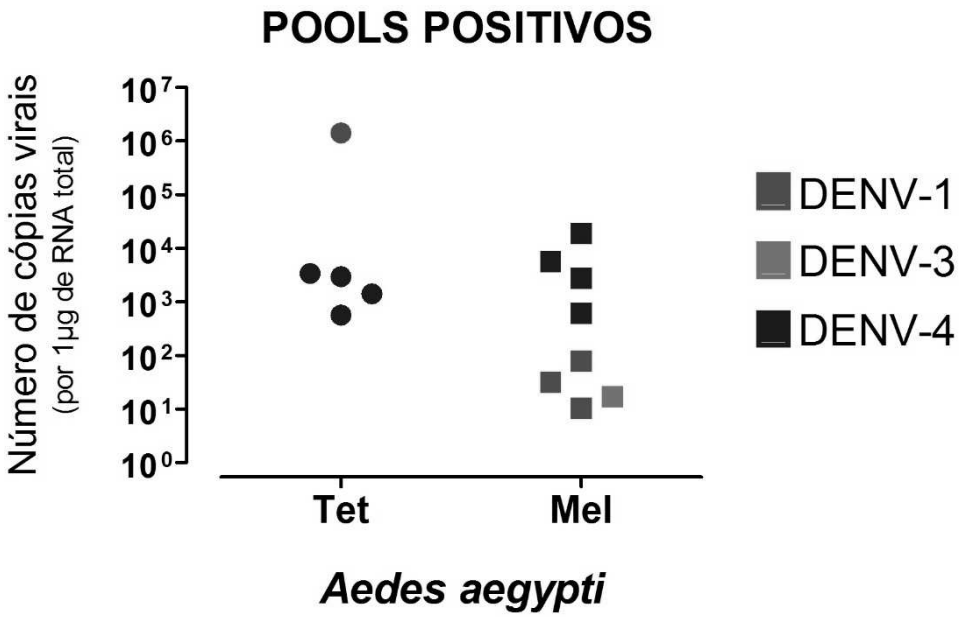


**Figura 23:** Carga viral de pools de larvas de *A. aegypti* positivos para dengue, infectados através de nanoinjeções com DENV-1, -3 e -4. Cada forma geométrica representa um pool de larvas, de experimentos diferentes, diferenciados pelas cores, onde: vermelho representa DENV-1; verde representa DENV-3 e azul representa DENV-4.

### 5.2.2.5 Nanoinjeções em *A. albopictus* com o vírus Dengue 3 e 4

Em paralelo às infecções nos mosquitos *A. aegypti* também realizou-se algumas infecções com os mosquitos *A. albopictus*, que apesar de não ser o foco desse trabalho, é tido na literatura como um vetor que apresenta taxas de transmissão vertical mais elevadas (BUCKNER et al., 2013; CASTRO et al., 2004; LEE; ROHANI, 2005). O mosquito *A. albopictus* é infectado naturalmente pela *Wolbachia* na natureza, porém neste experimento não realizou-se comparações com o controle sem a *Wolbachia,* uma vez que esse não era o foco do estudo.

A fecundidade e fertilidade dos mosquitos foi comparada entre infecções com dois sorotipos diferentes DENV-3 e DENV-4. Os mosquitos *A. albopictus* apresentaram

uma alta mortalidade após as nanoinjeções o que reduziu significativamente o número de indivíduos. Devido ao baixo número de amostras não foi possível aplicar nenhuma análise estatística (**Figura 24**). Entretanto, pode-se observar que os mosquitos infectados com o DENV-3, mesmo em pequeno número, apresentam uma mediana de número de ovos e larvas mais elevada, quando comparada as infecções com DENV-4, podendo demonstrar uma possível diferença nos parâmetros reprodutivos em relação ao sorotipo.

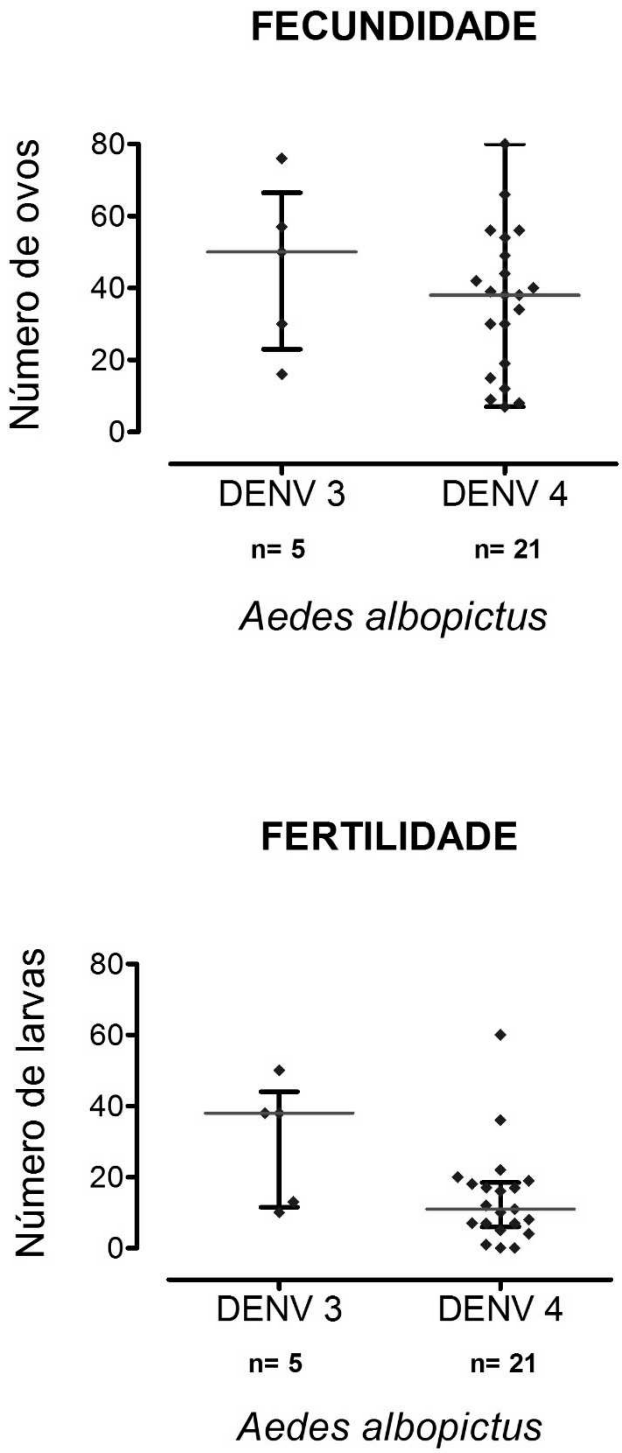


**Figura 24:** Fertilidade e fecundidade dos mosquitos *A. albopictus* infectados por nanoinjeções com o DENV-3 e -4. Cada ponto representa um único indivíduo. A linha vermelha horizontal representa a mediana e as linhas pretas na vertical representam o intervalo interquartil.

Em um período de 11 a 13 dias após a infecção os mosquitos *A. albopictus* apresentaram uma taxa de infecção de 100% nas infecções com DENV-3 e -4. Quanto a carga viral não houve diferenças entre os grupos (Mann-Whitney U; $U$ = 52,0; $P$ = 1,00), porém quando compara-se a carga viral destes com as infecções com *A. aegypti* pode-se observar que estas foram ligeiramente mais elevadas (**Figura 25**).

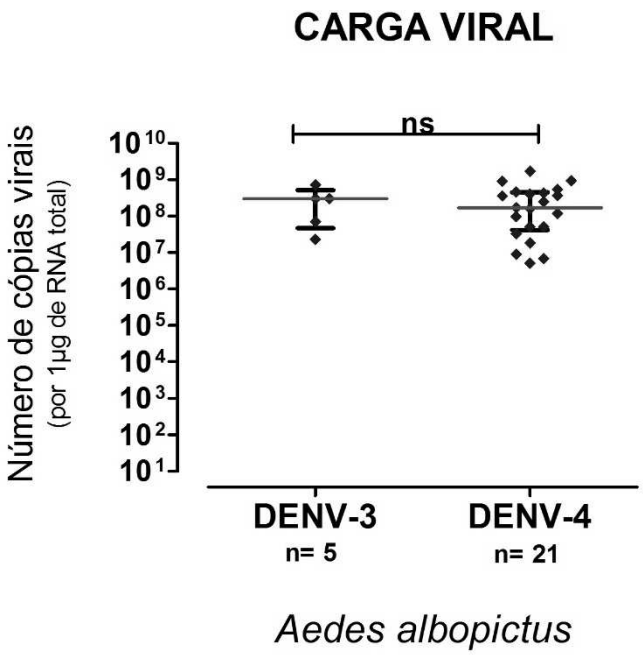


**Figura 25:** Carga viral do vírus dengue nos grupos parentais de mosquitos *A. albopictus*, em 2 experimentos independentes. A carga viral foi determinada por quantificação absoluta, com a utilização de plasmídeos contendo um fragmento do vírus dengue. Cada ponto representa um único indivíduo. "ns" representa não significativo (Mann-Whitney; $U$ = 52,0; $P$ = 1,00). A linha vermelha horizontal representa a mediana e as linhas pretas na vertical representam o interquartil.

Os pools de larvas provenientes dos mosquitos infectados com DENV-3 e -4, foram processados e analisados quanto à infecção pelo vírus dengue. Nas infecções com DENV-3, foram analisados um total de 27 pools, totalizando 149 larvas. Foram encontrados 2 pools positivos (7,41%). Nas infecções com DENV-4, foram analisados um total de 52 pools, totalizando 262 larvas (**Figura 26**). Foram encontrados 15 pools positivos no experimento (28,84%), demonstrando que a taxa de transmissão vertical do vírus dengue é bem mais elevada em *A. albopictus* comparado ao vetor *A. aegypti* (**Figura 27**).

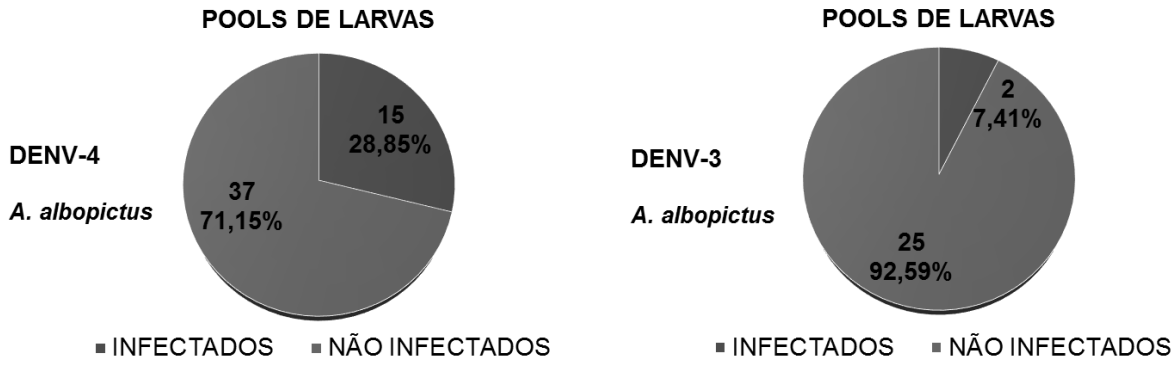


**Figura 26:** Pools de larvas provenientes de fêmeas *A. albopictus,* infectadas por nanoinjeções intratorácicas com DENV-3 e -4, de 11 a 13 dias após a infecção. Cada pool contém até 5 larvas. Foram analisados um total de 149 larvas, para DENV-3, e 262 larvas, para DENV-4.

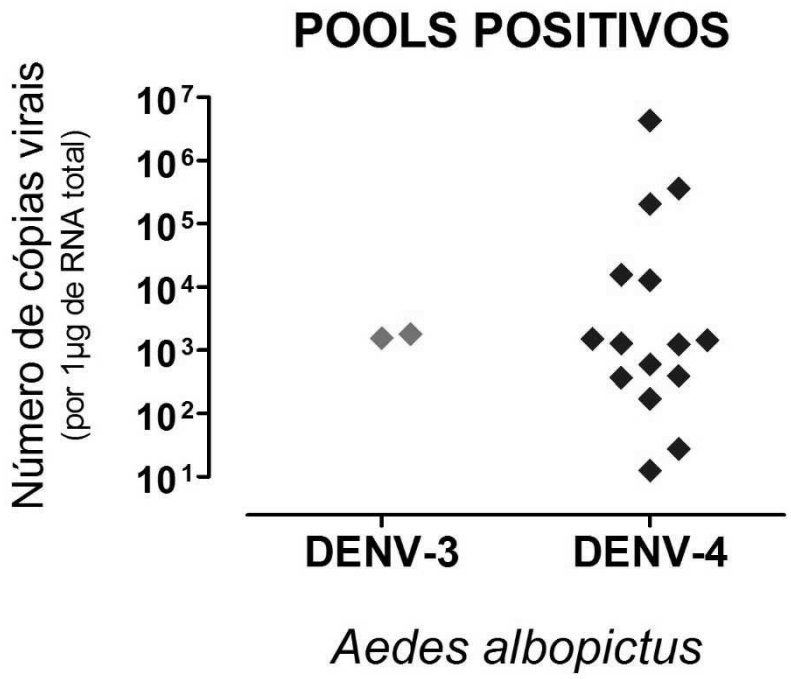


**Figura 27***:* Carga viral de pools de larvas de *A. albopictus* positivos para dengue, infectados através de nanoinjeções com DENV-3 e -4. Cada forma geométrica representa um pool de larvas, contendo até 5 larvas.

## 5.3 Detecção de vírus dengue nos ovários

Após a análise da infecção dos mosquitos parentais e dos pools de larvas provenientes destes, os ovários foram dissecados, para avaliar se a *Wolbachia* influencia na proporção destes que se tornam infectados. Os ovários são considerados o órgão chave da transmissão vertical, e portanto, se a *Wolbachia*

influenciar na infecção destes pelo vírus dengue, possivelmente terá alguma repercussão no que diz respeito a transmissão do vírus verticalmente.

### 5.3.1 Ovários na infecção oral

Ovários foram dissecados, 20 dias após o repasto infectante, para avaliação da infecção pelo vírus dengue. Foi realizada a infecção oral com os sorotipos DENV-3 e DENV-4. Na infecção com DENV-3, a taxa de infecção dos ovários foi de 91,30% e 53,57%, em Tet e Mel, respectivamente. Quanto à suscetibilidade dos ovários a infecção pelo vírus dengue, a infecção com *Wolbachia* reduz significativamente as chances da infecção do vírus dengue (Regressão logística binária, $W$ = 7,055; *d.f.* = 1; $P$ = 0,008) (**Figura 28***).* A carga viral foi analisada onde na infecção com DENV-3 não houve diferença entre os grupos (Mann-Whitney U; $U$ = 59,0; $P$ = 0,0545), porém a mediana do número de cópias virais apresentou-se maior no grupo Tet, 5.014, quando comparada ao grupo Mel, 1.851 (**Figura 29**).

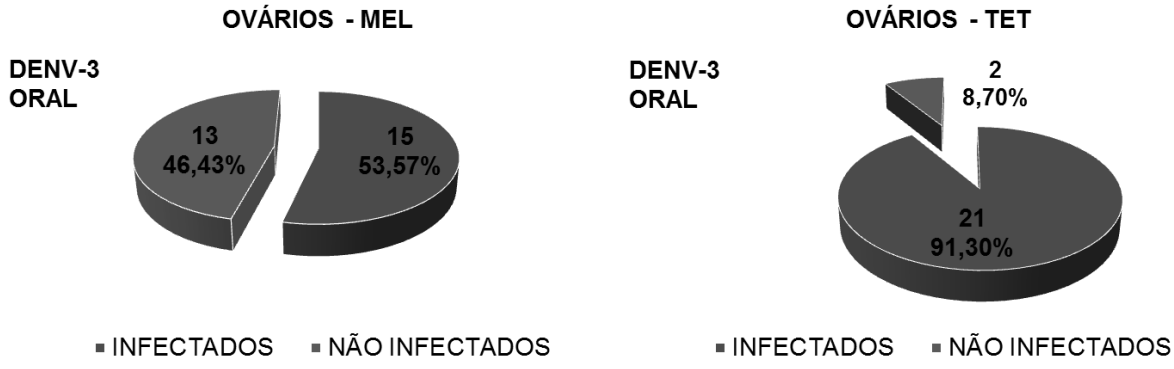


**Figura 28:** Suscetibilidade entre os ovários de mosquitos *A. aegypti*, Tet e Mel, ao DENV-3 infectado através de infecção oral. O gráfico representa a proporção de ovários que tornaram-se infectados, onde: Mel n =28 (15 infectados) e Tet n = 23 (2 infectados). A *Wolbachia* reduz significativamente as chances de infecção dos ovários pelo DENV-3 (Regressão logística binária, $W$ = 7,055; d.f. = 1; $P$ = 0,008)

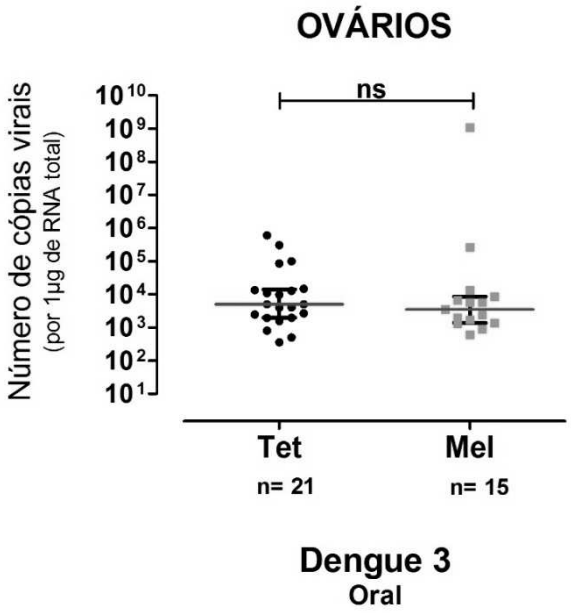


**Figura 29**: Carga viral do vírus dengue nos ovários de mosquitos *A. aegypti*, Tet e Mel, infectados oralmente com o vírus dengue 3. A carga viral foi determinada por quantificação absoluta, com a utilização de plasmídeos contendo um fragmento do vírus dengue. Cada ponto representa um único ovário. "ns" representa não significativo, (Mann-Whitney; *U* = 59,0; *P* = 0,0545). A linha vermelha horizontal representa a mediana e as linhas pretas na vertical representam o interquartil.

Na infecção com DENV-4, a taxa de infecção dos ovários foi de 76,19% e 25%, em Tet e Mel, respectivamente. Quanto a suscetibilidade dos ovários a infecção pelo vírus dengue, a *Wolbachia* também reduz significativamente as chances da infecção do vírus dengue (Regressão logística binária, *W* = 11,92; *d.f.* = 1; *P* = 0,001) (**Figura 30**). A carga viral foi maior no grupo Tet (Mann-Whitney; *U* = 4,0; *P* = 0,0003), demonstrando que a *Wolbachia* não só influencia na proporção de ovários infectados com também na quantidade de vírus presentes nestes (**Figura 31**).

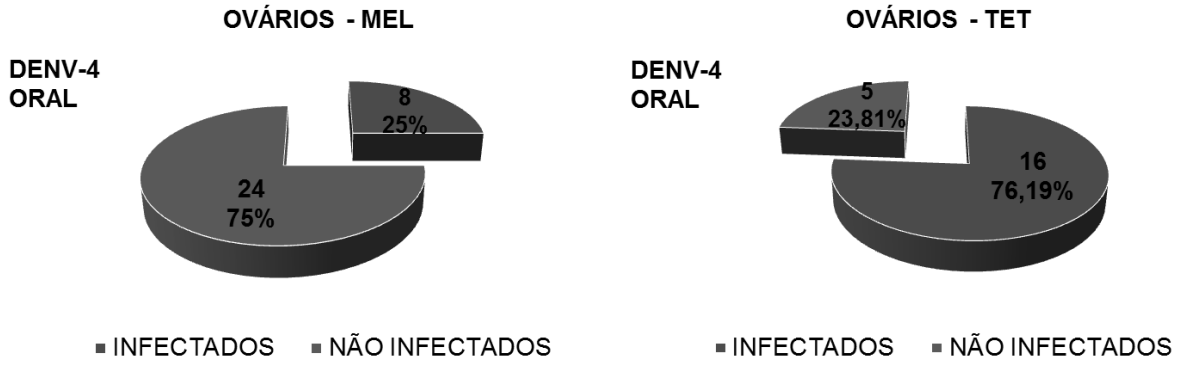


**Figura 30:** Suscetibilidade entre os ovários de mosquitos *A. aegypti*, Tet e Mel, ao DENV-4 infectado através de infecção oral. O gráfico representa a proporção de ovários que tornaram-se infectados, onde: Mel n =32 (8 infectados) e Tet n = 21 (16 infectados). A *Wolbachia* reduz significativamente as chances de infecção dos ovários pelo DENV-4 (Regressão logística binária, $W$ = 11,92; d.f. = 1; $P$ = 0,001).

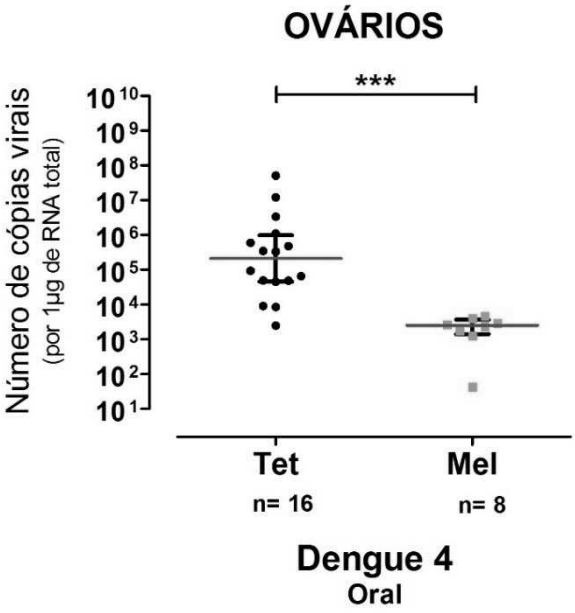


**Figura 31:** Carga viral do vírus dengue nos ovários de mosquitos *A. aegypti*, Tet e Mel, infectados oralmente com o vírus dengue 4. A carga viral foi determinada por quantificação absoluta, com a utilização de plasmídeos contendo um fragmento do vírus dengue. Cada ponto representa um único ovário. Os asteriscos representam a significância, (Mann-Whitney U; $U$ = 4,0; $P$ = 0,0003). A linha vermelha horizontal representa a mediana e as linhas pretas na vertical representam o interquartil.

Os mosquitos do grupo Mel co-infectados com a *Wolbachia* e o vírus, apresentaram alterações morfológicas nos ovários, em cerca de 20% dos mosquitos. No grupo Tet infectado, não foram observadas tão frequentemente estas alterações, sendo visualizado em apenas 1 mosquito destes experimentos. Dentre estas alterações, encontramos ovários com ovos arredondados e ligeiramente menores e alterações

nas formas dos ovários (um normal com ovos maduros e o outro de menor tamanho com ovos arredondados e não desenvolvidos). Também observamos ovos já melanizados com formato normal. Este novo fenótipo identificado principalmente na co-infecção entre a *Wolbachia* e o vírus dengue ainda não foi descrito e mais experimentos necessitam ser realizados para a sua melhor caracterização (**Figura 32**).

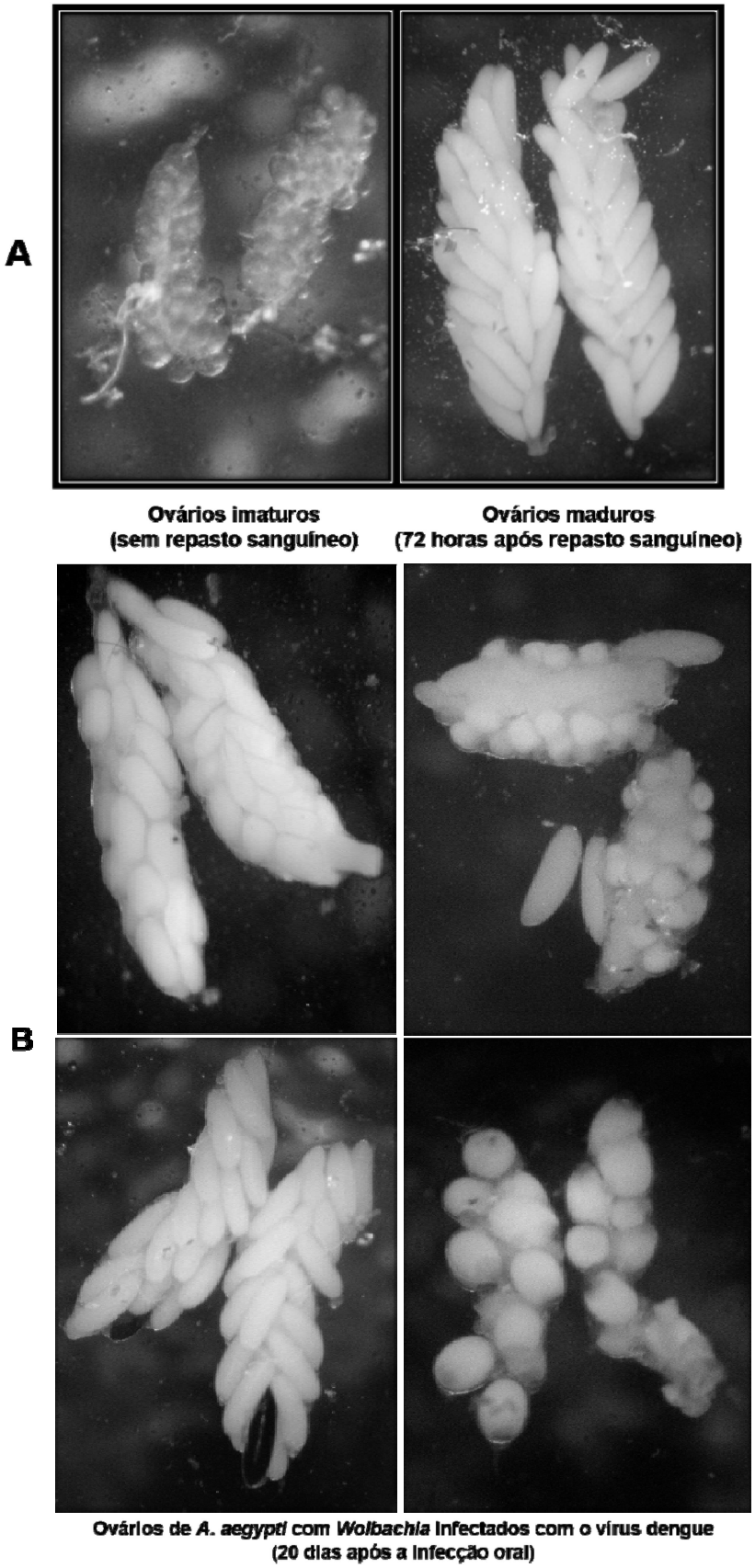


**Figura 32**: Ovários de mosquitos *A. aegypti* com *Wolbachia.* **A)** Ovários sem infecção com vírus dengue, imaturos (sem repasto sanguíneo) e maduros (72 horas após repasto sanguíneo) e **B)** Ovários com alterações morfológicas, visualizadas 20 dias após repasto infectante com DENV-4.

### 5.3.2 Ovários na infecção artificial

Ovários foram dissecados, 10 dias após as nanoinjeções, para avaliação da infecção pelo vírus dengue. As injeções foram realizadas com os sorotipos DENV-1 e DENV-4. Nas infecções com DENV-1 a taxa de infecção dos ovários foi de 100% e 95%, em Tet e Mel, respectivamente. A carga viral foi analisada entre os grupos Tet e Mel, onde na infecção com DENV-1 o grupo Tet infectado apresentou maior número de cópias virais (Mann-Whitney U; *U* = 116,0; *P* = 0,0389) (**Figura 33**). Na infecção com DENV-4, a taxa de infecção dos ovários foi de 90,47% e 100%, em Tet e Mel, respectivamente. A carga viral foi maior no grupo Tet (Mann-Whitney U; *U* = 97,0; *P* = 0,0057), demonstrando que a *Wolbachia* influencia na infecção dos ovários (**Figura 34**).

Nestes experimentos de nanoinjeções também foram possíveis observar as alterações morfológicas presentes nos ovários conforme as acimas citadas. Estando presente em 20% do grupo Mel infectado. Porém nesses experimentos não foi possível a visualização das alterações no grupo Tet infectado.

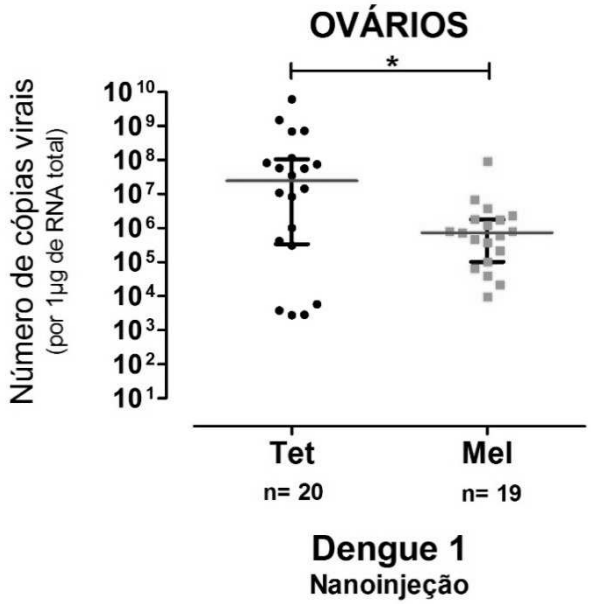


**Figura 33:** Carga viral do vírus dengue nos ovários de mosquitos *A. aegypti*, Tet e Mel, infectados por injeções com o vírus dengue 1. A carga viral foi determinada por quantificação absoluta, com a utilização de plasmídeos contendo um fragmento do vírus dengue. Cada ponto representa um único ovário. O asterisco representa a significância, (Mann-Whitney U; *U* = 116,0; *P* = 0,0389). A linha vermelha horizontal representa a mediana e as linhas pretas na vertical representam o interquartil.

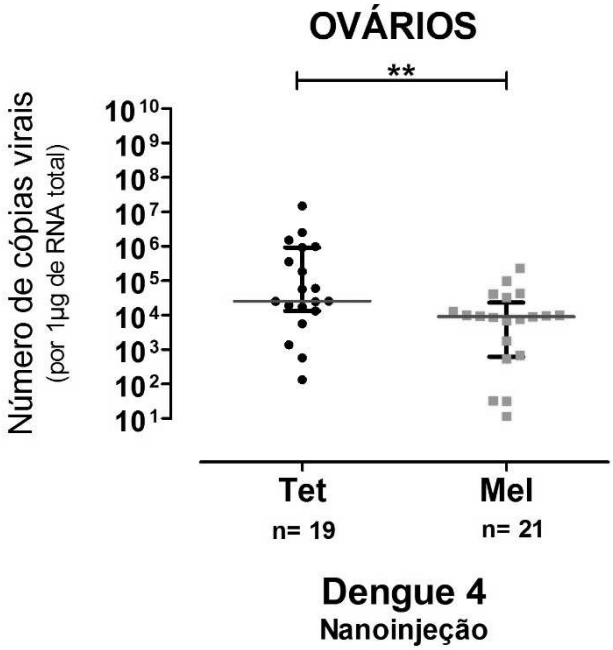


**Figura 34:** Carga viral do vírus dengue nos ovários de mosquitos *A. aegypti*, Tet e Mel, infectados por injeções com o vírus dengue 4. A carga viral foi determinada por quantificação absoluta, com a utilização de plasmídeos contendo um fragmento do vírus dengue. Cada ponto representa um único ovário. Os asteriscos representam a significância, (Mann-Whitney U; $U$ = 97,0; $P$ = 0,0057). A linha vermelha horizontal representa a mediana e as linhas pretas na vertical representam o interquartil.

# 6 DISCUSSÃO

## 6.1 Metodologias utilizadas

Para a padronização de uma metodologia adequada para avaliar a transmissão vertical através de infecção oral, alguns fatores foram limitantes. A primeira réplica biológica do experimento foi realizada com uma quantidade inicial de mosquitos bastante grande, correspondendo a centenas de mosquitos. Apesar de ser uma quantidade representativa de mosquitos, pudemos observar que, ao longo do experimento as quantidades decaíram exponencialmente em cada etapa da metodologia (primeiro e segundo repasto, e oviposição individual) e, além disso, na etapa de secagem dos ovos, onde alguns ovos não eclodiram. Ao fim do experimento restaram apenas 60 mosquitos Tet e 81 mosquitos Mel. Este fato, foi o maior obstáculo encontrado nos experimentos de infecção oral, com a dificuldade em se obter uma quantidade representativa final de mosquitos infectados. Confirmando essa dificuldade, o segundo experimento, de menor proporção, não apresentou mosquitos positivos para o vírus dengue, em nenhum dos grupos. Este fato realça a necessidade da utilização de uma grande quantidade de mosquitos inicial.

A estratégia de infecção para a metodologia de nanoinjeções intratorácicas foi utilizado, onde apesar do método de infecção ser artificial, não invalida o objetivo do estudo, que é de avaliar se a Wolbachia influenciaria na transmissão vertical do vírus dengue, assim como no bloqueio da infecção. As infecções artificiais foram realizadas com o intuito de garantir que a infecção ocorra, de forma a induzir a transmissão vertical. Essa indução se baseia no fato de que as injeções ocorreram diretamente na hemolinfa dos mosquitos, dificultando a ação de grande parte das defesas primárias do mosquito frente às infecções (barreiras biológicas e ativação do sistema imune). Vários trabalhos têm utilizado nanoinjeções intratorácica para infecções com o vírus dengue (FRANZ et al., 2006; JOSHI et al., 2002; MOREIRA et al., 2009; OSBORNE et al., 2012).

## 6.2 Fecundidade e fertilidade

A fecundidade e fertilidade nos mosquitos infectados com DENV-4, oralmente, apresentou-se mais elevada nos mosquitos não infectados com a *Wolbachia,* quando ambos estavam infectados com o vírus dengue (**Figuras 3** e **4**). A comparação dos controles Mock, também demonstrou que a infecção com o vírus dengue causa uma diminuição nos parâmetros reprodutivos (exceto na fertilidade em Mock Tet), não necessariamente correlacionado com a presença da *Wolbachia.* Em resumo, a fecundidade e fertilidade são alteradas nos mosquitos co-infectados com *Wolbachia* e o vírus dengue ou apenas infectados com o vírus.

Nos experimentos de infecção por nanoinjeções os resultados referentes à fecundidade e fertilidade foram diversos entre si (**Figuras 9, 10, 13, 14, 17** e **18**). Em outros trabalhos, infecções orais com DENV-1, demonstraram não haver um custo associado à infecção, em mosquitos *A. aegypti* (BUCKNER et al., 2013) e infecções intratorácicas com DENV-3 em fêmeas de mosquitos *A. aegypti* demonstrou que a fecundidade e fertilidade das fêmeas infectadas foram diminuídas (JOSHI et al., 2002). Uma análise global entre os experimentos de genótipos diferentes, podemos observar a existência de padrões de resposta as infecções diferentes entre si, demonstrando ser específica de cada isolado, já que não pode-se estabelecer uma correlação com a dose de PFU injetados e o efeito ocasionado.

Os resultados de associação positiva da fecundidade e fertilidade, com a ausência da *Wolbachia* e/ou do vírus dengue, estão em acordo com outros estudos, que demonstram haver um custo no fitness do hospedeiro quando este apresenta-se infectado com cepas específicas de *Wolbachia* ou com o vírus dengue. Por exemplo, a cepa *w*MelPop é considerada uma cepa virulenta ao mosquito interferindo drasticamente no fitness e na sobrevivência deste (MCMENIMAN et al., 2009), e a cepa *w*Mel apesar de ser considerada benigna, também causa um custo na fecundidade (TURLEY et al., 2013). Já foi descrito que a *Wolbachia* é capaz de influenciar também a fertilidade e fecundidade em *D. simulans* naturalmente infectadas, em fêmeas (SNOOK et al., 2000) e em machos, reduzindo a habilidade competitiva dos espermatozoides, o que influencia diretamente na fertilidade (CHAMPION DE CRESPIGNY; WEDELL, 2006). Mosquitos *A. albopictus* transfectados com a cepa *w*Pip (CALVITTI et al., 2010) e mosquitos *C. pipiens*, com

alta densidade de *Wolbachia* (DURON et al., 2006), também tiveram a fecundidade reduzida.

Os efeitos da infecção ao vírus dengue são incoerentes na literatura. Em concordância com os nossos resultados Maciel-de-freitas e colaboradores demonstraram que fêmeas de *A. aegypti* desafiadas com DENV-2 apresentaram uma diminuição na taxa de longevidade e fecundidade (MACIEL-DE-FREITAS et al., 2011). Por outro lado, um recente estudo realizado com mosquitos *A. aegypti* infectados naturalmente por repastos sanguíneos em pacientes positivos para dengue, no Vietnam, demonstrou que a infecção pelo vírus da dengue causa um efeito mínimo na sobrevivência dos mosquitos e portanto provavelmente não afetando os outros aspectos biológicos (CARRINGTON et al., 2015). Em resumo, os estudos acerca da interação patógenos/hospedeiro apresentam resultados variáveis no que diz respeito aos aspectos reprodutivos e devem ser avaliados de acordo com o contexto do estudo.

Efeitos no fitness do hospedeiro são importantes principalmente no contexto da utilização da *Wolbachia* como estratégia de controle da dengue, e particularmente neste caso, na transmissão vertical do vírus dengue. Efeitos podem influenciar tanto no contexto da *Wolbachia* quanto no contexto de transmissão do vírus. As alterações nos parâmetros reprodutivos do mosquito podem afetar a distribuição da *Wolbachia* na população, uma vez que a *Wolbachia* é transmitida maternalmente e/ou a capacidade do hospedeiro em transmitir o vírus, portanto, influenciado diretamente na probabilidade do vírus ser transmitido verticalmente. Assim nos nossos experimentos, a co-infecção da *Wolbachia* e do vírus reduzir a quantidade de ovos e larvas produzidos, trazem um benefício para a menor ocorrência da transmissão vertical.

### 6.3 Infecção dos mosquitos e carga viral

Esperávamos que os mosquitos que tivessem uma menor carga viral tivessem uma menor chance de causar a transmissão vertical. Após cerca de 20 dias do repasto sanguíneo infectante, a *Wolbachia* não alterou a suscetibilidade dos mosquitos ao

vírus dengue (**Figura 5**). Por outro lado, ao avaliarmos a carga viral dos mosquitos, pudemos observar que houve uma diferença significativa quanto ao número de cópias virais presentes nos grupos, ocorrendo a interferência à patógenos promovida pela *Wolbachia* (**Figura 6**). Em relação as nanoinjeções, a suscetibilidade foi alta (acima de 90% em todos os experimentos) representando que o efeito da *Wolbachia* em bloquear a infecção foi sobrecarregado. Observamos a interferência à patógenos promovida pela *Wolbachia* apenas nas infecções com DENV-4 (**Figuras 11, 15** e **19**).

O fenótipo de interferência à patógenos já é conhecido e caracterizado com o vírus dengue e a *Wolbachia* (BIAN et al., 2010; MOREIRA et al., 2009; WALKER et al., 2011). É importante mencionar, que a cepa *w*Mel não promove o bloqueio total ao vírus, e sim o bloqueio parcial (MOREIRA et al., 2009). Um aspecto importante nessa análise é a carga viral, contida nas glândulas salivares, necessária para infectar um indivíduo. O fato do mosquito estar infectado não necessariamente ocasiona na transmissão do vírus durante um repasto, podendo assim, a *Wolbachia* influenciar na redução da infecção pela diminuição da carga viral. Assim foi demostrado por Mousson e colaboradores, onde a *Wolbachia* em mosquitos *A. albopictus* não afeta a replicação do vírus mas reduz a infecção viral nas glândulas salivares limitando a transmissão (MOUSSON et al., 2012). Além disso, nas glândulas salivares há uma alta densidade de *Wolbachia,* constituindo um forte sítio de interação entre *Wolbachia* e o vírus (FRENTIU et al., 2014; WALKER et al., 2011). Por isso, destacamos a necessidade de um estudo mais ampliado, em que a saliva dos mosquitos, de ambos os tratamentos, seja analisada quanto a presença do vírus dengue (HADDAD et al., 2012).

A interferência à patógenos promovida pela *Wolbachia,* está associada com a interação entre a bactéria e o vírus, sendo o intestino, um sítio de ampla interação. A densidade da bactéria quando transfectada artificialmente em *A. aegypti*, em cepas específicas, se encontra maior no intestino, ovários e glândulas salivares, sendo estas as interações mais importantes no bloqueio à patógenos (MOREIRA et al., 2009; WALKER et al., 2011). Porém, outros tecidos que a *Wolbachia* também está presente, como, corpo gorduroso, túbulos de Malpighi e tecidos nervosos, também

ocorrem interações e impacta no bloqueio do vírus. Desta forma, essa interação pode ser bastante diminuída quando a forma de infecção é através das nanoinjeções, por serem aplicadas diretamente na hemolinfa do mosquito. Por isso a análise do mosquito inteiro, pode não demonstrar à interferência a patógenos conferida pela *Wolbachia,* podendo ocorrer, por exemplo, a inibição da presença do vírus nas glândulas salivares. A dinâmica de infecção dos diferentes isolados, também é um aspecto importante a ser considerado nas infecções (SALAZAR et al., 2007). Ainda existe pouca informação sobre a dinâmica e tropismo dos diferentes genótipos no corpo do mosquito, tão pouco, através de infecções por nanoinjeções. O tropismo do vírus possui uma importante correlação com a distribuição da *Wolbachia* nos diferentes tecidos do mosquito já que esta interação está diretamente relacionando com o bloqueio da infecção.

Por outro lado, nos sorotipos DENV-1 e -3, não foi possível observar diferenças na carga viral entre os grupos. Especificamente, o DENV-3, pode ter tido uma boa interação com as células do hospedeiro, onde a *Wolbachia* não conseguiu conferir resistência ao vírus. Resultados anteriores de infecção em nosso laboratório (dados não publicados) apontam o DENV-3 como o sorotipo mais infeccioso (entre os sorotipos utilizados neste trabalho e em adicional o sorotipo 2), tanto por infecções orais quanto nanoinjeções. Essas observações também demonstram que a *Wolbachia* é capaz de conferir o fenótipo de interferência à patógenos frente a ambos métodos de infecção. Porém, os mosquitos foram testados com um menor período após infecção (7 e 14 dias após a infecção para infecções orais e 5 dias após a infecção para nanoinjeções), em relação ao período de infecção testadas neste estudo (cerca de 11 dias após a infecção). Este vírus, dentro dos sorotipos testados, é o que foi isolado mais recentemente (em 2012), onde sabe-se que, longos períodos de manutenção do vírus em cultivos de células tornam a cepa menos infectiva (ALVAREZ et al., 2001; AÑEZ et al., 2009). O fato de não haver diferença entre os grupos, pode se dar pela alta infectividade do sorotipo ou por mosquitos mais velhos infectados com a *Wolbachia* serem menos efetivos para o bloqueio do vírus, já que a densidade de *Wolbachia* pode variar ao longo da vida do mosquito (TORTOSA et al., 2010).

## 6.4 Detecção do vírus dengue nos pools de larvas

Já dentro do contexto da transmissão vertical, foi possível detectar pools de larvas positivos em ambos os métodos de infecção. Nas infecções orais, foram detectados 4 pools de larvas positivos (1 Tet e 3 Mel) (**Figura 7**), e nas infecções artificiais foram detectados: 4 pools positivos em DENV-1 (1 Tet e 3 Mel), 1 pool positivo em DENV-3 (1 Mel) e 8 pools positivos em DENV-4 (4 Tet e 4 Mel) (**Figuras 12, 16, 20, 21** e **22**). Não foi possível observar a influência direta da *Wolbachia* na transmissão vertical do vírus dengue, uma vez que, em ambos os grupos, a proporção de pools infectados foi aproximadamente a mesma. Porém as cargas virais dos pools apresentam-se ligeiramente diminuídas nos pools provenientes de indivíduos com a *Wolbachia,* e apesar de mais experimentos serem requeridos para essa análise, isto pode indicar que a carga viral nos pools é influenciada pela presença da bactéria. Ainda assim, a baixa carga viral nos pools Mel detectados pode não ser suficientemente infectante para a transmissão do vírus através dos mosquitos. Por exemplo, em um estudo que utilizou-se mosquitos alimentados com altos títulos virais ($10^9$) estes apresentaram um número reduzido de partículas virais na saliva, 21 dias após a infecção. Esse valor pode ser ainda mais diminuído nas larvas que adquirem o vírus por transmissão vertical (HADDAD et al., 2012). Outra hipótese é a da existência de uma imunidade coletiva adquirida, em comunidades endêmicas que estão frequentemente em contato com o vírus, necessitando assim, de títulos virais mais altos para que a infecção ocorra (LEQUIME; LAMBRECHTS, 2014).

É importante mencionar que, a taxa de transmissão materna da *Wolbachia* não ocorre em 100% dos mosquitos. Sendo em mosquitos australianos, *w*MelPop e wMel, em torno de 99% (MCMENIMAN et al., 2009; WALKER et al., 2011). Dados ainda não publicados, desenvolvidos em nosso laboratório, estima que a taxa de transmissão materna da cepa *w*MelBr seja de 96-100% de transmissão. Assim, destacamos a possibilidade de alguma larva dentro de um dos pools positivos Mel, não estar infectada ou possuir uma densidade mais baixa de *Wolbachia*, gerando uma superestimativa nos resultados. De acordo com a metodologia empregada, não é possível realização o *screening* da *Wolbachia* nos pools positivos, pois o RNA total do pool é extraído, impossibilitando as larvas de serem individualizadas. Porém não

consideramos a taxa de transmissão materna seja completamente responsável por todos os pools positivos.

Avaliando os possíveis aspectos que contribuíram para baixa ocorrência da transmissão vertical da dengue, nas infecções orais, caracterizamos a concentração final do título viral no sangue, utilizado nas infecções, como baixa, e portanto, pode ter sido insuficiente para ultrapassar as barreiras de infecção do intestino e infectar apropriadamente os ovários. Um estudos apontou que a dose infectiva necessária para infectar 50% dos mosquitos ($MID_{50}$) para os sorotipos DENV-1 a -4, varia entre 6,29 a 7,52 log10 copias de RNA/mL de plasma, sendo esta superior a dose usada neste trabalho (NGUYEN et al., 2013). O título viral é um aspecto muito importante não só na infecção dos mosquitos, como também na disseminação e transmissão do vírus no mosquito. Um estudo com *A. albopictus* demonstrou que mosquitos oralmente infectados com DENV-2 tiveram suas cabeças e glândulas salivares dissecadas, e apresentaram taxas de infecção em torno de 35% e 12%, respectivamente. Porém, quando avaliada a taxa de infecção na saliva, nenhuma foi encontrada positiva. Após o aumento do título viral utilizado nas infecções, houve um aumento da taxa de infecção das salivas para 38% (HADDAD et al., 2012).

Além do título viral, a interação genótipo-genótipo, do vírus e do hospedeiro, pode ser incompatível quando avalia-se a transmissão do vírus, e não apenas a infecção dos mosquitos. Visto que, o genótipo de DENV-4 utilizado, foi isolado em Boa Vista/RO, provavelmente não circulou na mesma população de mosquitos *A. aegypti* provenientes do Rio de Janeiro, então não se sabe sobre a compatibilidade desta inteiração. Essa relação genótipo-genótipo é muito importante no sucesso da infecção e provavelmente repercutindo também na transmissão vertical do vírus (HANLEY et al., 2008). Possivelmente a utilização de outro genótipo, ou até mesmo, outro sorotipo, repercutisse em resultados diferentes, quanto à transmissão vertical.

Além dos aspectos biológicos que podem ter influenciado na transmissão vertical do vírus dengue, devemos levar em consideração que, nestes experimentos, as barreiras biológicas dos mosquitos atuam diretamente no controle da infecção. A barreira de infecção (MIB) e a barreira de escape (EB), ambas no intestino, são

fatores limitantes na disseminação do vírus do intestino para a hemolinfa (BENNETT et al., 2002). No entanto, mesmo quando essas barreiras foram ultrapassadas, nos experimentos de nanoinjeção, a prevalência geral da transmissão vertical foi muito baixa. Estes resultados indicam que mecanismos ainda desconhecidos atuam sobre a transmissão vertical. O tropismo do vírus pelos órgãos do hospedeiro ainda é pouco conhecido, mas estima-se que também esteja relacionado com a interação genótipo-genótipo (SALAZAR et al., 2007).

Apesar da transmissão vertical já ter sido relatada em mosquitos, outro aspecto importante a se considerar é o estágio de vida do mosquito em que está sendo avaliada a presença do vírus. Alguns trabalhos mais antigos demonstram a dificuldade em se obter pools positivos de larvas. Em alguns casos, não foi possível a detecção de nenhum pool positivo onde retrataram ser a avaliação da transmissão vertical facilitada quando utiliza-se pools de adultos (CHOW et al., 1998; GÜNTHER et al., 2007). Porém, nestes trabalhos, técnicas de biologia molecular menos sensíveis foram utilizadas para a detecção do vírus, com a RT-PCR, o que pode ter ocasionado na dificuldade em se detectar pools de larvas positivos. Destacamos que a eficiência de detecção nas nossas reações são muito sensíveis, detectado até 1 cópia do vírus. A suscetibilidade das larvas à infecção do vírus dengue, foi demonstrada de forma interessante, onde os pesquisadores expuseram o habitat de criação das larvas (água) a duas formas: expondo as larvas a sobrenadante viral e cultura de tecidos infectados. Interessantemente, as larvas se infectaram através das duas formas avaliadas e assim como os adultos emergidos (BARA et al., 2013). Esses resultados, afirmam que, em ambiente natural, as larvas são suscetíveis à infecção pelo vírus dengue e isso pode contribuir com a persistência da dengue na população.

Em geral, os resultados aqui encontrados, afirmam que a transmissão vertical do vírus dengue é um evento raro. Comparando-se as duas formas de infecção, podemos observar que mecanismos mais complexos estão associados com a infecção do vírus nos ovos, visto que, mesmo manipulando a infecção para promover a transmissão vertical, as taxas ainda persistem baixas. Isto pode sugerir que, mesmo em infecções com títulos mais elevados a *Wolbachia* pode manter a

transmissão vertical em índices mais baixos. Por outro lado, um estudo em que se infectou fêmeas de *A. aegypti* através de nanoinjeções intratorácicas, com DENV-3, foi demonstrado que a transmissão vertical pode ocorrer em sucessivas gerações, sendo detectada até a sétima geração após a infecção, se a pressão seletiva de transmissão vertical for mantida entre as gerações (JOSHI et al., 2002).

### 6.5 A transmissão vertical em mosquitos *A. albopictus*

Para comparar as taxas de transmissão vertical dos mosquitos *A.* aegypti, fizemos em paralelo, algumas nanoinjeções nos mosquitos *A. albopictus,* que apesar dessa comparação não ser o foco deste trabalho, este vetor é descrito na literatura por apresentar taxas de transmissão vertical mais elevadas. Foram realizadas nanoinjeções com os sorotipos DENV-3 e -4, onde os mosquitos infectados com DENV-3 apresentaram uma alta mortalidade, possivelmente associada a algum trauma pelas nanoinjeções.

Em contraste com os experimentos com *A. aegypti*, a carga viral dos parentais apresentou-se mais elevada do que todos os sorotipos testados (**Figura 25**). As porcentagens de pools infectados foram de 7,41% e 28,85%, para DENV-3 e-4, respectivamente (**Figura 26**). Enquanto é difícil de associar os dados da infecção com DENV-3, devido ao baixo número de indivíduos, nas infecções com DENV-4 podemos observar claramente que a taxa de transmissão vertical é mais alta, comparada à de mosquitos *A. aegypti* infectados com o mesmo sorotipo. Estes dados estão em acordo com diversos trabalhos que apontam a transmissão vertical mais elevada em mosquitos *A. albopictus* (ANGEL; JOSHI, 2008a; CASTRO et al., 2004; MARTINS et al., 2012). Além disso, ao compararmos a carga viral dos pools positivos entre os experimentos, podemos observar que, nos pools provenientes de *A. albopictus* esta se encontra mais elevada (variando de $10^1$ a $10^7$) do que em *A. aegypti* ($10^3$ e $10^4$) (**Figura 27**).

A maioria dos trabalhos tem como foco a transmissão vertical em mosquitos *A. aegypti*, por ser o vetor primário da dengue na maior parte dos países. Porém os dados obtidos neste trabalho com infecções artificiais em laboratório, corroboram com resultados de campo de estudos anteriores que indicam ser o mosquito *A.*

*albopictus* o principal responsável pela transmissão vertical do vírus dengue. Contudo, destacamos a necessidade da realização de experimentos através de infecções orais, para uma melhor correlação destes dados com os aspectos naturais.

### 6.6 Detecção de vírus dengue nos ovários

No contexto da transmissão vertical, os ovários são os órgãos chave para a transmissão do vírus. As análises das infecções dos ovários correlacionam dados importantes com todos os outros parâmetros avaliados e os dois métodos utilizados para as infecções trazem uma melhor compreensão acerca da dinâmica de infecção dos vírus na transmissão vertical. A suscetibilidade dos ovários nas infecções é drasticamente reduzida nos ovários infectados oralmente (**Figuras 28** e **30**), comparado com os resultados de todo o corpo dos parentais. Como esperado, nas nanoinjeções, ambos os grupos se infectaram. Porém em todos os ovários analisados a *Wolbachia* diminui a carga viral (exceto em DENV-3, que nenhum efeito foi observado) (**Figuras 29, 31, 33** e **34**). Estes resultados constituem um excelente benefício na utilização da *Wolbachia* como bloqueio da transmissão vertical.

O DENV-3 ter sido o único vírus a não interferir na carga viral dos ovários, reforça a ideia deste sorotipo realmente ser mais infectivo ao mosquito, como observado em todos os outros aspectos avaliados neste trabalho, não haver diferenças entre os grupos. Isto explica o fato dos ovários terem tido uma maior suscetibilidade de infecção ao vírus quando comparado com o DENV-4. Acreditamos que a inexistência de diferença entre os grupos se dá pelo fato do sorotipo ter sido o último a ser isolado (em 2012), e portanto, ter menor efeito na perda da infectividade, ocasionada pela manutenção do vírus em cultivo celular (ALVAREZ et al., 2001; AÑEZ et al., 2009). Nas infecções com DENV-4 encontramos exatamente o efeito oposto, onde, em todos os aspectos analisados, a *Wolbachia* favoreceu positivamente o hospedeiro, frente as infecções. Estes resultados analisados em conjunto, são satisfatórios do ponto de vista da utilização da *Wolbachia* como estratégia de controle da dengue, pois podemos observar que, além da redução da transmissão horizontal já caracterizada (BIAN et al., 2010; MOREIRA et al., 2009;

WALKER et al., 2011), a *Wolbachia* influencia, de forma indireta na transmissão vertical.

O período de 20 dias após as infecções orais, foi necessário para o vírus ultrapassar as barreiras do intestino e se disseminarem pelo corpo do mosquito. Apesar de não termos testado a presença do vírus nas glândulas salivares, o período de incubação extrínseco do vírus, provavelmente foi alcançado uma vez que foi suficiente para infectar os ovários. Nas nanoinjeções o período de incubação extrínseco do vírus deveria ser mais curto, devido as injeções ocorrerem diretamente no tórax, como esperado (TJADEN et al., 2013). Considerando que há variação no período de acordo com o sorotipo e hospedeiro, períodos mais longos podem aumentar a proporção de ovários infectados (SALAZAR et al., 2007), e de acordo com a sobrevida do mosquito em campo, aumentar a transmissão vertical do vírus dengue. Em campo estima-se que a longevidade média de mosquitos seja de aproximadamente 30 dias (BRADY et al., 2013), assim, correlacionando com os dados obtidos no nosso trabalho, a partir do primeiro dia que o mosquito adquirisse o vírus (considerando a idade de 5 dias de vida) o mosquito teria que realizar o segundo repasto sanguíneo em um período de no mínimo 16 dias após a infecção, onde a data de oviposição do segundo ciclo gonotrófico já seria no limite de sua longevidade. Ou seja, a proporção de mosquitos estimada em sobreviver ao longo do tempo de infecção realizando dois ciclos gonotróficos, provavelmente é pequena, ainda assim, a fecundidade e fertilidade provavelmente estaria reduzida, quando comparado com mosquitos mais novos. Sendo assim, a *Wolbachia* poderia ter grande influência na transmissão vertical diante desta proporção.

As alterações morfológicas observadas nos ovários co-infectados com *Wolbachia* e o vírus dengue, apesar de não estar claro, justificam a diminuição dos aspectos reprodutivos nestes experimentos. Destacamos a necessidade da realização de mais experimentos para a caracterização deste novo fenótipo encontrado nos ovários. Porém, se avaliarmos que encontramos diminuições na fecundidade e fertilidade nos mosquitos co-infectados com a *Wolbachia* e o vírus, podemos inferir que estas alterações morfológicas estejam associadas com essa diminuição. Assim, a redução da fecundidade e fertilidade teria um impacto na redução da população de

mosquitos e na transmissão vertical, onde a *Wolbachia* estaria influenciando indiretamente na quantidade de ovos e larvas produzidas, podendo reduzir, a probabilidade da ocorrência da transmissão vertical. A infecção por *Wolbachia* em mosquitos tem sido reportada causar várias alterações na morfologia e durabilidade dos ovos. Estas alterações provavelmente são devido a altas taxas de densidade bacteriana nos ovários (MCMENIMAN et al., 2011; MCMENIMAN; O'NEILL, 2010).

Em relação aos ovários extraídos nas infecções por nanoinjeções a suscetibilidade dos ovários foi acima de 90%, assim como nas infecções com a geração parental. Isso evidencia a utilização da metodologia de infecção artificial para promover um maior número de mosquitos infectados. Comparando-se o sorotipo 4, que foi utilizado nas duas formas de infecção, podemos observar que interessantemente, a capacidade de bloqueio da *Wolbachia* foi maior na infecção oral, apesar do bloqueio na geração parental ter sido parecido entre as formas de infecção. Esse resultado evidência que a interação da *Wolbachia*, em outros tecidos além do intestino, também possui efeito na infecção da dengue, similar ao observado em *D. simulans* e o vírus C de *Drosophila* (OSBORNE et al., 2012). A importância dos ovários no fenótipo de bloqueio é, em circunstâncias gerais, pouco conhecida. Porém, isto pode explicar, porque nos mosquitos *w*MelPop injetados com o vírus dengue existe um bom bloqueio a infecção (MOREIRA et al., 2009). Nas infecções com DENV-1, encontramos uma relação diversa dos padrões de resposta: a *Wolbachia* que favoreceu os aspectos reprodutivos e não apresentou diferença na carga viral dos parentais entre os grupos, reduziu a carga viral dos ovários. Destacamos a importância de se analisar o papel de outros tecidos no bloqueio da dengue para correlacionar se outros efeitos são similares aos observados no bloqueio avaliando o corpo inteiro.

Podemos constatar que as nossas metodologias para análise de transmissão vertical, tanto através de infecções orais quando por nanoinjeções, mostrou-se eficiente, uma vez que, em ambos os métodos de infecções pudemos obter ovários infectados no grupo sem a *Wolbachia*. A partir das análises dos ovários infectados oralmente, podemos concluir que, a baixa taxa de transmissão vertical não se dá pelo fato dos ovários não se infectarem, mas sim por outros motivos associados, que

ainda não estão bem entendidos. Em outro contexto, a *Wolbachia* encontra-se em alta densidade dentro dos ovários, para garantir sua propagação, uma vez que a bactéria é transmitida maternalmente. Enquanto a densidade está altamente associada com o bloqueio da *Wolbachia* ao vírus dengue (LU et al., 2012; MOUSSON et al., 2012), quando esta possui uma alta densidade nos ovários, ela também pode prejudicar os aspectos reprodutivos, dependendo da cepa em questão, como no caso da *w*MelPop (MCGRAW et al., 2002).

## 6.7 Visão geral da *Wolbachia* na transmissão vertical

A utilização da bactéria *Wolbachia* já vem sendo empregada em campo como estratégia de redução da transmissão da dengue. Desde 2011, os mosquitos já foram liberados, na Austrália, onde demonstrou a invasão e estabilidade da cepa wMel nas populações de campo (HOFFMANN et al., 2014) persistindo o bloqueio viral após três anos de associação com as populações de campo, similar aos resultados demostrados com as colônias de laboratório (FRENTIU et al., 2014). Muitos aspectos relacionados à interação patógeno-hospedeiro, ainda necessitam serem elucidados, como por exemplo, o mecanismo específico utilizado pela bactéria no bloqueio as infecções virais. Apesar de várias pesquisas ao redor do mundo, direcionarem sua atenção aos diversos efeitos que a *Wolbachia* causa em seu hospedeiro, nunca foi caracterizado se a *Wolbachia* possui alguma influência sobre a transmissão vertical do vírus dengue. Apesar de muito antiga a hipótese de que a transmissão vertical do vírus dengue, pode estar relacionada com a manutenção do vírus nos períodos inter-epidêmicos, ainda não criou-se um consenso em relação a isto. Assim, neste trabalho objetivou-se fazer uma caracterização primária desta influencia utilizando análises relacionadas a fecundidade, fertilidade, carga viral dos parentais, detecção do vírus dengue nos pools e ovários.

A utilização de vários sorotipos foi realizada, sabendo-se que, o perfil de resposta frente à infecção da dengue, pode variar muito de acordo com o sorotipo testado. E dois métodos de infecção foram selecionados para ampliar as chances de ocorrência da transmissão vertical, já que esta é caracterizada com um evento raro e

variável, podendo não ocorrer em algumas regiões. Os resultados encontrados neste trabalho, em linhas gerais, demonstram que: 1) Os aspectos reprodutivos (fecundidade e fertilidade) são alterados na co-infecção da *Wolbachia* com o vírus dengue; 2) Após longos períodos de infecção (10 dias na infecção artificial e 20 dias na infecção oral) o fenótipo de bloqueio à patógenos é observado; 3) A suscetibilidade dos mosquitos infectados oralmente, não foi alterada pela *Wolbachia*; 4) Foram encontrados pools positivos (Mel e Tet) em ambos os métodos de infecção, porém a carga viral dos pools provenientes de fêmeas com *Wolbachia*, geralmente, é mais baixa; 5) Foi possível a obtenção de ovários infectados com o vírus dengue, onde a *Wolbachia* reduz fortemente a proporção de ovários que tornaram-se infectados. Englobando todos os resultados, pode-se concluir que a *Wolbachia* influencia, de forma indireta, a transmissão vertical do vírus dengue, causando o efeito de interferência à patógenos desde os mosquitos parentais as larvas infectadas. Ao final do estudo, a questão central passa a ser: se a *Wolbachia* bloqueia a dengue no mosquito e nos ovários, porque a proporção de pools Mel e Tet se infectam na mesma proporção? Assim, mas experimentos necessitam realizados para a caracterização mais ampla da influência da *Wolbachia* na transmissão vertical da dengue.

# 7 CONCLUSÕES

Poucos trabalhos focam no estudo da transmissão vertical do vírus dengue e portanto, muitos aspectos ainda não são entendidos. Contudo, a maioria dos estudos apontam a transmissão vertical como um evento raro, dependente de fatores como o sorotipo e genótipo do vírus e os aspectos biológicos dos hospedeiros vertebrados e o mosquito vetor. Este trabalho constituiu a primeira avaliação da influência da *Wolbachia* na transmissão vertical do vírus dengue.

A partir deste estudo, avaliou-se que a presença da bactéria *Wolbachia* introduzida em uma linhagem de mosquitos brasileiros, influenciou na transmissão vertical do vírus dengue. Esta influência não se deu de forma direta, impedindo os pools de tornem-se infectados, mas sim, indiretamente, reduzindo a carga viral nos pools positivos e alterando a proporção de ovários que se tornaram infectados. A utilização de duas formas diferentes de infecção, oral e artificial, promoveu o entendimento mais aprofundado do comportamento do vírus frente à longos períodos de infecção. E a comparação entre estas, demostrou que, independente da forma de infecção, a transmissão vertical ocorreu, apresentando taxas diferentes entre elas.

Os dados obtidos nestes experimentos apontam que a transmissão vertical do vírus dengue ocorre, em pequenas taxas, de acordo com outros trabalhos. Além disso, pudemos constatar que, as metodologias utilizadas para a análise da transmissão vertical, mostraram-se eficientes, uma vez que, 76-90% e 90-100% dos ovários do grupo sem a *Wolbachia*, se infectaram com o vírus, através das infecções orais e artificiais, respectivamente.

Além do bloqueio à transmissão horizontal do vírus, a *Wolbachia* pode potencialmente ser responsável pela redução da transmissão vertical em campo. Isto é considerado um grande avanço no controle da dengue, se for comprovada que a transmissão vertical é a responsável pela manutenção do vírus da dengue, em períodos inter-epidêmicos. Portanto pode-se reforçar que a estratégia de utilização da *Wolbachia*, como forma de controle da transmissão da doença, se mostra cada vez mais evidente.

## 8 REFERÊNCIAS


ALM, E. et al. Universal Single-Probe RT-PCR Assay for Diagnosis of Dengue Virus Infections. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 12, p. e3416, 2014.

ALVAREZ, M. et al. Study of biologic attributes of Cuban dengue 2 virus after serial passage in primary dog kidney cells. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 5, p. 35–39, 2001.

ANDERSON, J. R.; RICO-HESSE, R. the Infecting Genotype of Dengue Virus. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 75, n. 5, p. 886–892, 2006.

AÑEZ, G. et al. Passage of dengue virus type 4 vaccine candidates in fetal rhesus lung cells selects heparin-sensitive variants that result in loss of infectivity and immunogenicity in rhesus macaques. **Journal of virology**, v. 83, n. 20, p. 10384–10394, 2009.

ANGEL, B.; JOSHI, V. Distribution and seasonality of vertically transmitted dengue viruses in Aedes mosquitoes in arid and semi-arid areas of Rajasthan, India. **Journal of vector borne diseases**, v. 45, p. 56-59, mar. 2008.

ARMSTRONG, P. M.; RICO-HESSE, R. Differential susceptibility of Aedes aegypti to infection by the American and Southeast Asian genotypes of dengue type 2 virus. **Vector borne and zoonotic diseases**, v. 1, n. 2, p. 159–168, 2001.

ARMSTRONG, P. M.; RICO-HESSE, R. Efficiency of dengue serotype 2 virus strains to infect and disseminate in *Aedes aegypti*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 29, n. 5, p. 997–1003, 2003.

ARUNACHALAM, N. et al. Natural vertical transmission of dengue viruses by Aedes aegypti in Chennai, Tamil Nadu, India. **The Indian journal of medical research**, v. 127, n. 4, p. 395–7, abr. 2008.

BAHIA, A. C. et al. The JAK-STAT pathway controls Plasmodium vivax load in early stages of Anopheles aquasalis infection. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 5, n. 11, p. e1317, nov. 2011.

BARA, A. J. J. et al. Susceptibility of Larval Aedes aegypti and Aedes albopictus ( Diptera : Culicidae ) to Dengue Virus Susceptibility of Larval Aedes aegypti and Aedes albopictus ( Diptera : Culicidae ) to Dengue Virus. **Entomological Society of America**, v. 50, p. 179–184, 2013.

BARRERA, R. et al. Vertebrate Hosts of Aedes aegypti and Aedes mediovittatus ( Diptera : Culicidae ) in Rural Puerto Rico. **Journal of Medical Entomology**, v. 49, n. 4, p. 917–921, 2012.

BARRETO, M. L.; TEIXEIRA, M. G. Dengue no Brasil : situação epidemiológica e contribuições para uma agenda de pesquisa. **Estudos avançados**, v. 22, n. 64, p. 53–72, 2008.

BATON, L. A. et al. wFlu: Characterization and Evaluation of a Native Wolbachia from the Mosquito Aedes fluviatilis as a Potential Vector Control Agent. **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, 2013.

BEHURA, S. K. et al. Global cross-talk of genes of the mosquito Aedes aegypti in response to dengue virus infection. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 11, 2011.

BENNETT, K. E. et al. Variation in vector competence for dengue 2 virus among 24 collections of Aedes aegypti from Mexico and the United States. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** v. 67, n. 1, p. 85–92, 2002.

BIAN, G. et al. The endosymbiotic bacterium Wolbachia induces resistance to dengue virus in Aedes aegypti. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 4, p. e1000833, 2010.

BIAN, G. et al. Wolbachia Invades Anopheles stephensi. **Science**, v. 340, n. May, p. 748–751, 2013.

BOSIO, C. F. et al. Quantitative genetics of vector competence for dengue-2 virus in Aedes aegypti. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 59, n. 6, p. 965–970, 1998.

BRADY, O. J. et al. Modelling adult Aedes aegypti and Aedes albopictus survival at different temperatures in laboratory and field settings. **Parasites & vectors**, v. 6, p. 351, 2013.

BRADY, O. J. et al. Global temperature constraints on Aedes aegypti and Ae. albopictus persistence and competence for dengue virus transmission. **Parasites & vectors**, v. 7, n. 1, p. 338, jan. 2014.

BROWNSTEIN, J. et al. The potential of virulent Wolbachia to modulate disease transmission by insects. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 84, n. 1, p. 24–29, set. 2003.

BUCKNER, E. A. et al. Vertical Transmission of Key West Dengue-1 Virus by Aedes aegypti and Aedes albopictus ( Diptera : Culicidae ) Mosquitoes from Florida. **Journal of Medical Entomology**, v. 50, n. 6, p. 1291–1297, 2013.

CALVITTI, M. et al. Characterization of a New Aedes albopictus (Diptera: Culicidae)–Wolbachia pipientis (Rickettsiales: Rickettsiaceae) Symbiotic Association Generated by Artificial Transfer of the wPip Strain From Culex pipiens (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 47, p. 179–187, 2010.

CARAGATA, E. P. et al. Dietary Cholesterol Modulates Pathogen Blocking by Wolbachia. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 6, 2013.

CARRINGTON, L. B. et al. Naturally-Acquired Dengue Virus Infections Do Not Reduce Short-Term Survival of. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 5, 2015.

CARRINGTON, L. B.; SIMMONS, C. P. Human to mosquito transmission of dengue viruses. **Frontiers in immunology**, v. 5, n. June, p. 290, jan. 2014.

CASTRO, M. G. DE et al. Dengue virus detection by using reverse transcription-polymerase chain reaction in saliva and progeny of experimentally infected Aedes albopictus from Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 8, p. 809–14, dez. 2004.

CECÍLIO, A. B. et al. Natural vertical transmission by Stegomyia albopicta as dengue vector in Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 69, p. 123–127, 2009.

CHAMPION DE CRESPIGNY, F. E.; WEDELL, N. Wolbachia infection reduces sperm competitive ability in an insect. **Proceedings. Biological sciences / The Royal Society**, v. 273, n. March, p. 1455–1458, 2006.

CHAN, M.; JOHANSSON, M. A. The incubation periods of Dengue viruses. **PloS one**, v. 7, n. 11, p. e50972, jan. 2012.

CHARAN, S. S. et al. Comparative analysis of midgut bacterial communities of Aedes aegypti mosquito strains varying in vector competence to dengue virus. **Parasitology Research**, v. 112, p. 2627–2637, 2013.

CHOW, V. T. K. et al. Monitoring of dengue viruses in field-caught Aedes aegypti and Aedes albopictus mosquitoes by a type-specific polymerase chain reaction and cycle sequencing. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 58, n. 5, p. 578–586, 1998.

CIRIMOTICH, C. M. et al. Natural Microbe-Mediated Refractoriness to Plasmodium Infection in Anopheles gambiae. **Science**, v. 332, n. May, 2011.

CLEMENTS, A. N. **The Biology of Mosquitoes.** Volume 3, Trasmission of viruses and interactions with bacteria**.** British Library, London, UK. p. 571, 2012.

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

COOK, P. E. et al. To Control Vector-Borne Disease. **Transgenesis and the Management of Vector-Borne Disease**, p. 126–140, 2008.

DISEASES, M. et al. Sterile-Insect Methods for Control. **Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, N.Y.)**, v. 10, n. 3, 2010.

DOBSON, S. L.; RATTANADECHAKUL, W. A novel technique for removing Wolbachia infections from Aedes albopictus (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 38, n. 6, p. 844–9, nov. 2001.

DULBECCO, R.; VOGT, M. Plaque formation and isolation of pure lines with Poliomyelitis viruses. **The Journal of experimental medicine**, v. 99, p. 167–182, 1954.

DURON, O. et al. High Wolbachia density correlates with cost of infection for insecticide resistant Culex pipiens mosquitoes. **Evolution; international journal of organic evolution**, v. 60, n. 2, p. 303–314, 2006.

ESTEVA, L.; VARGAS, C. Influence of vertical and mechanical transmission on the dynamics of dengue disease. **Mathematical Bioscience**, v. 167, p. 51–64, 2000.

FRANZ, A. W. E. et al. Engineering RNA interference-based resistance to dengue virus type 2 in genetically modified Aedes aegypti. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, p. 4198–4203, 2006.

FRENTIU, F. D. et al. Wolbachia-Mediated resistance to dengue virus infection and death at the cellular level. **PLoS ONE**, v. 5, n. 10, p. 1–8, 2010.

FRENTIU, F. D. et al. Limited Dengue Virus Replication in Field-Collected Aedes aegypti Mosquitoes Infected with Wolbachia. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 2, p. 1–10, 2014.

FU, Y. et al. Artificial triple Wolbachia infection in Aedes albopictus yields a new pattern of unidirectional cytoplasmic incompatibility. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 17, p. 5887–5891, 2010.

GUBLER, D. J. et al. **Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever,** 2nd Edition. Hardcover, 624 p. CABI, oct, 2014.

GUBLER, D. J. Dengue, Urbanization and Globalization: The Unholy Trinity of the 21st Century. **Tropical Medicine and Health**, v. 39, n. 4, p. S3–S11, 2011.

GÜNTHER, J. et al. Evidence of vertical transmission of dengue virus in two endemic localities in the state of Oaxaca, Mexico. **Intervirology**, v. 50, n. 5, p. 347–52, jan. 2007.

HADDAD, N. et al. Aedes albopictus in Lebanon, a potential risk of arboviruses outbreak. **BMC infectious diseases**, v. 12, n. 1, p. 300, 2012.

HANLEY, K. A et al. Superior infectivity for mosquito vectors contributes to competitive displacement among strains of dengue virus. **BMC ecology**, v. 8, p. 1, 2008.

HEDGES, L. M. et al. Wolbachia and virus protection in insects. **Science (New York, N.Y.)**, v. 322, n. 5902, p. 702, 31 out. 2008.

HERTIG, M.; WOLBACH, S. B. Studies on Rickettsia-Like Micro-Organisms in Insects. **The Journal of medical research**, v. 44, n. 3, p. 329–374.7, mar. 1924.

HOFFMANN, A A; TURELLI, M. Unidirectional incompatibility in Drosophila simulans: inheritance, geographic variation and fitness effects. **Genetics**, v. 119, p. 435–444, 1988.

HOFFMANN, A. A. et al. Stability of the wMel Wolbachia Infection following Invasion into Aedes aegypti Populations. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 9, p. e3115, 2014.

HUANG, Y.-J. S. et al. Flavivirus-Mosquito Interactions. **Viruses**, v. 6, n. 11, p. 4703–4730, jan. 2014.

HUGHES, G. L. et al. Wolbachia infections are virulent and inhibit the human malaria parasite Plasmodium falciparum in Anopheles gambiae. **PLoS pathogens**, v. 7, n. 5, p. e1002043, maio 2011.

JOSHI, V. et al. Persistence of dengue-3 virus through transovarial transmission passage in successive generations of Aedes aegypti mosquitoes. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 67, n. 2, p. 158–61, ago. 2002.

KONDO, N. et al. Genome fragment of Wolbachia endosymbiont. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America,** v. 99, n. 22, p. 14280-14285, oct. 2002.

LAMBRECHTS, L. et al. Impact of daily temperature fluctuations on dengue virus transmission by Aedes aegypti. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 18, p. 7460-7465, may. 2011.

LARA-RAMÍREZ, E. E. et al. Large-Scale Genomic Analysis of Codon Usage in Dengue Virus and Evaluation of Its Phylogenetic Dependence. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 9, 2014.

LE GOFF, G. et al. Natural vertical transmission of dengue viruses by Aedes aegypti in Bolivia**.Parasite**, v. 18, n. 3, p. 277-280, ago. 2011.

LEE, H. L.; ROHANI, A. Transovarial Transmission of Dengue Virus in Aedes aegypti and Aedes albopictus in Relation to Dengue Outbreak in an Urban Area in Malaysia. **Dengue Bulletin**,v. 29, p. 106–111, ago, 2005.

LEITMEYER, K. C. et al. Dengue Virus Structural Differences That Correlate with Pathogenesis. **Journal of Virology**, v. 73, n. 6, p. 4738–4747, 1999.

LEQUIME, S.; LAMBRECHTS, L. Vertical transmission of arboviruses in mosquitoes: A historical perspective. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 28, p. 681–690, 2014.

LU, P. et al. Wolbachia induces density-dependent inhibition to dengue virus in mosquito cells. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 7, p. 1–8, 2012a.

LU, P. et al. Wolbachia induces density-dependent inhibition to dengue virus in mosquito cells. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 6, n. 7, p. e1754, jan. 2012b.

MACIEL-DE-FREITAS, R. et al. Daily survival rates and dispersal of Aedes aegypti females in Rio de Janeiro, Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 76, n. 4, p. 659–665, 2007.

MACIEL-DE-FREITAS, R. et al. Lower survival rate, longevity and fecundity of Aedes aegypti (Diptera: Culicidae) females orally challenged with dengue virus serotype 2. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 105, n. 8, p. 452–8, ago. 2011.

MARQUARDT, W. C. et al. **Biology of Disease Vectors.** Second edition. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 785 pages, 2004.

MARTINS, V. E. P. et al. Occurrence of natural vertical transmission of dengue-2 and dengue-3 viruses in Aedes aegypti and Aedes albopictus in Fortaleza, Ceará, Brazil. **PloS one**, v. 7, n. 7, p. e41386, jan. 2012.

MCGRAW, E. A et al. Wolbachia density and virulence attenuation after transfer into a novel host. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 5, p. 2918–23, 5 mar. 2002.

MCMENIMAN, C. J. et al. Stable Introduction of a Life-Shortening Wolbachia Infection into the Mosquito Aedes aegypti. **Science**, v. 295, n. January, p. 485–488, 2009.

MCMENIMAN, C. J. et al. A Wolbachia symbiont in Aedes aegypti disrupts mosquito egg development to a greater extent when mosquitoes feed on nonhuman versus human blood. **Journal of medical entomology**, v. 48, n. 1, p. 76–84, 2011.

MCMENIMAN, C. J.; O'NEILL, S. L. A Virulent wolbachia infection decreases the viability of the dengue vector aedes aegypti during periods of embryonic quiescence. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 7, 2010.

MCNULTY, S. N. et al. Comparing the mitochondrial genomes of Wolbachia - dependent and independent filarial nematode species. **BMC genomics**, v. 13, p. 145-155, 2012.

MOREIRA, L. A et al. A Wolbachia symbiont in Aedes aegypti limits infection with dengue, Chikungunya, and Plasmodium. **Cell**, v. 139, n. 7, p. 1268–78, 24 dez. 2009.

MORRISON, A. C. et al. Defining challenges and proposing solutions for control of the virus vector Aedes aegypti. **PLoS medicine**, v. 5, n. 3, p. e68, 18 mar. 2008.

MOUSSON, L. et al. The Native Wolbachia Symbionts Limit Transmission of Dengue Virus in Aedes albopictus. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 12, 2012.

MURRAY, N. E. A. et al. Epidemiology of dengue : past , present and future prospects. **Clinical Epidemiology**, v. 5, p. 299–309, 2013.

NGUYET, M. N. et al. Host and viral features of human dengue cases shape the population of infected and infectious Aedes aegypti mosquitoes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, p. 9072–7, 2013.

NORMILE, D. Surprising New Dengue Virus Throws A Spanner in Disease Control Efforts. **Science**, v. 342, n. October, p. 2013, 2013.

OSBORNE, S. E. et al. Antiviral protection and the importance of Wolbachia density and: Tissue tropism in Drosophila simulans. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 19, p. 6922–6929, 2012.

RAINEY, S. M. et al. Understanding the wolbachia-mediated inhibition of arboviruses in mosquitoes: Progress and challenges. **Journal of General Virology**, v. 95, p. 517–530, 2014.

RAMIREZ, J. L. et al. Reciprocal tripartite interactions between the Aedes aegypti midgut microbiota, innate immune system and dengue virus influences vector competence. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 6, n. 3, p. e1561, jan. 2012.

RANCÈS, E. et al. The relative importance of innate immune priming in Wolbachia-mediated dengue interference. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 2, 2012.

RANCÈS, E. et al. The toll and Imd pathways are not required for wolbachia-mediated dengue virus interference. **Journal of virology**, v. 87, n. 21, p. 11945–9, 2013.

RIEHLE, M. A.; JACOBS-LORENA, M. Using bacteria to express and display anti-parasite molecules in mosquitoes: Current and future strategies. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 35, p. 699–707, 2005.

SALAZAR, M. I. et al. Dengue virus type 2: replication and tropisms in orally infected Aedes aegypti mosquitoes. **BMC microbiology**, v. 7, p. 9, jan. 2007.

SCHATZMAYR, H. G. Dengue Situation in Brazil by Year 2000. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, p. 179–181, 2000.

SNOOK, R. R. et al. Offsetting effects of Wolbachia infection and heat shock on sperm production in Drosophila simulans: Analyses of fecundity, fertility and accessory gland proteins. **Genetics**, v. 155, p. 167–178, 2000.

TCHANKOUO-NGUETCHEU, S. et al. Differential protein modulation in midguts of Aedes aegypti infected with chikungunya and dengue 2 viruses. **PLoS ONE**, v. 5, n. 10, 2010.

TEIXEIRA, L. et al. The bacterial symbiont Wolbachia induces resistance to RNA viral infections in Drosophila melanogaster. **PLoS biology**, v. 6, n. 12, p. e2, 23 dez. 2008.

THISYAKORN, U.; THISYAKORN, C. Latest developments and future directions in dengue vaccines. **Therapeutic advances in vaccines**, v. 2, p. 3–9, 2014.

TJADEN, N. B. et al. Extrinsic Incubation Period of Dengue: Knowledge, Backlog, and Applications of Temperature Dependence. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 7, n. 6, p. e2207, jun. 2013.

TORTOSA, P. et al. Wolbachia age-sex-specific density in Aedes albopictus: A host evolutionary response to Cytoplasmic Incompatibility? **PLoS ONE**, v. 5, n. 3, p. 4–9, 2010.

TURLEY, A. P. et al. Transinfected Wolbachia have minimal effects on male reproductive success in Aedes aegypti. **Parasites & vectors**, v. 6, n. 1, p. 36, 2013.

VALLE, D.; BRAGA, I. A. Aedes aegypti : histórico do controle no Brasil *. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 16, n. 2, p. 113–118, 2007.

VASILAKIS N. et al. Fever from the forest: prospects for the continued emergence of sylvatic dengue virus and its impact on public health. **Nat Rev Microbiolology**, v. 9, n. 7, p. 532–541, 2012.

VASILAKIS, N. The third international conference on dengue and dengue haemorrhagic fever. Bangkok - Tailândia, oct. 2013.

VAUGHN, D. W. et al. Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. **The Journal of infectious diseases**, v. 181, n. 1, p. 2–9, 2000.

WALKER, T. et al. The wMel Wolbachia strain blocks dengue and invades caged Aedes aegypti populations. **Nature**, v. 476, n. 7361, p. 450–453, 2011.

WERREN, J. H. et al. Wolbachia: master manipulators of invertebrate biology. **Nature reviews. Microbiology**, v. 6, n. 10, p. 741–51, out. 2008.

WHITEHORN, J. et al. Dengue human infection models supporting drug development. **Journal of Infectious Diseases**, v. 209, n. Suppl 2, 2014.

WHO. Treatment, prevention and control global strategy for dengue prevention and control 2. **WHO Library Cataloguing-in-Publication Data**, 2012.

WISE DE VALDEZ, M. R. et al. Genetic elimination of dengue vector mosquitoes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 12, p. 4772–4775, 2011.

WONG, Z. S. et al. Wolbachia-mediated antibacterial protection and immune gene regulation in Drosophila. **PloS one**, v. 6, n. 9, p. e25430, jan. 2011.

XIAO, F.-Z. et al. The effect of temperature on the extrinsic incubation period and infection rate of dengue virus serotype 2 infection in Aedes albopictus. **Archives of virology**, p. 3053–3057, 2014.

ZHENG, Y. et al. Differentially expressed profiles in the larval testes of Wolbachia infected and uninfected Drosophila. **BMC genomics**, v. 12, n. 1, p. 595, jan. 2011.

ZUG, R. et al. Epidemiology in evolutionary time: The case of Wolbachia horizontal transmission between arthropod host species. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 25, p. 2149–2160, 2012.