

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

**CAPACIDADE DE BLOQUEIO A PATÓGENOS DE CEPAS DE *Wolbachia*
EM *Aedes* sp.**

por

JÉSSICA BARRETO LOPES SILVA

Belo Horizonte

2016

DISSERTAÇÃO MCS-CPqRR

J.B.L SILVA

2016

JÉSSICA BARRETO LOPES SILVA

**CAPACIDADE DE BLOQUEIO A PATÓGENOS DE CEPAS DE *Wolbachia*
EM *Aedes* sp.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência da saúde do Centro de Pesquisas René Rachou, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências - área de concentração de Biologia Celular e Molecular.

Orientação: Dr. Luciano Andrade Moreira

Co- orientação: Dr. Eric Pearce Caragata

Belo Horizonte

2016

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

S586c Silva, Jéssica Barreto Lopes.
2016

Capacidade de bloqueio a patógenos de cepas de *Wolbachia* em *Aedes* sp. / Jéssica Barreto Lopes Silva. – Belo Horizonte, 2016.

XVI, 98 f.: il.: 210 x 297 mm.

Bibliografia: 102 - 112

Dissertação (mestrado) – Dissertação 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/genética 2. *Aedes*/patogenicidade 3. *Wolbachia*/patogenicidade. Título. II. Moreira, Luciano Andrade (Orientação). III. Caragata, Eric Pearce (Co-orientação).

CDD – 22. ed. – 616.918 52

JÉSSICA BARRETO LOPES SILVA

**CAPACIDADE DE BLOQUEIO A PATÓGENOS DE CEPAS DE *Wolbachia*
EM *Aedes* sp.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência da saúde do Centro de Pesquisas René Rachou, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências - área de concentração de Biologia Celular e Molecular.

Dissertação avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Luciano Andrade Moreira (CpqRR/ FIOCRUZ) Presidente

Prof. Dr. Marcelo Gustavo Lorenzo (CpqRR/FIOCRUZ) Titular

Prof. Dr. Maurício Roberto Vianna Sant'Anna (UFMG) Titular

Suplente: Dr. Luiz Eduardo Martinez Villegas (CpqRR/ FIOCRUZ) Suplente

Dissertação defendida e aprovada em 26/02/2016

Turn your magic on
everything you want is a dream away
and we are legends, every day
that's what she told me

Under this pressure, under this weight
We are diamonds taking shape

(Adventure of a lifetime – Chris Martin)

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Dr. Luciano Moreira, pela orientação e pelos conselhos valiosos, por me aceitar como aluna e permitir que eu fizesse parte desse grupo de pesquisa que tanto gosto. Obrigada acima de tudo por garantir que absolutamente nada faltasse para a realização do meu projeto.

Ao meu co-orientador Dr. Eric Caragata, por sua dedicação, por acompanhar todo o processo de realização do trabalho com sua imensa paciência e estando sempre preocupado com meu aprendizado. Obrigada por ter deixado essa caminhada mais leve com sua amizade, suas piadas únicas e com sua atenção a todos os detalhes.

A Fernanda Resende por toda ajuda com os experimentos, por me ensinar tantas coisas e pela sua extrema boa vontade em colaborar mesmo nos procedimentos mais chatos. Obrigada pela sua sinceridade e torcida, você é uma das pessoas mais autênticas que já conheci.

A todo o pessoal do insetário, pelo constante aprendizado, pela convivência maravilhosa, e pelo encorajamento. Deixo aqui um agradecimento carinhoso à Sofia uma das amigas mais sinceras neste período, e a Bianca e a Anna Paula com quem tantas coisas dividi. Obrigada também a Carol e ao Fabiano pelo incentivo e ao Heverton, por sempre me dar boas sugestões e me socorrer de diversas maneiras ao longo da realização deste trabalho. Certamente tudo foi mais fácil em grande parte devido a vocês!

A Marcele pelo suporte com o cultivo do vírus e a Simone pelo auxílio com os protocolos de extração. Obrigada meninas pelas longas conversas, e por me explicarem algumas coisas repetidas vezes sempre com muita serenidade.

Aos colegas do insetário que agora estão seguindo novos rumos, todos os momentos que compartilhamos foram importantes para o meu crescimento pessoal.

Aos colegas do Laboratório de Malária por termos dividido os espaços por tanto tempo e de forma tão amistosa, inclusive a salinha dos estudantes que por

muitas vezes foi um espaço de conversas enriquecedoras. Um agradecimento especial a Ana Luiza pelo carinho e aconchego durante esse tempo.

Ao Dr. João Marques do Laboratório de Vírus e RNA de interferência da Universidade Federal de Minas Gerais, pela doação do vírus utilizado neste trabalho.

Aos técnicos do Biotério por todo auxílio e pelo cuidado necessário com os animais de experimentação.

A todos os professores do Programa de pós graduação em Ciências da saúde, por transmitirem seus conhecimentos aos alunos com maestria. E aos colegas de classe pela camaradagem e solidariedade durante as aulas, trabalhos e momentos de dificuldade, obrigada por deixarem esses momentos mais calmos tenha sido com uma conversa ou um sorriso de bom dia.

A banca examinadora, por aceitar o convite e pelas contribuições.

A minha querida família, minha mãe Berenice e meu pai Rogério pelo amor incondicional e por serem as pessoas que mais acreditam em mim. Obrigada por terem sido pessoas tão trabalhadoras e amáveis fazendo sempre o melhor possível para minha criação e sendo exemplos de honestidade, dignidade e dedicação. Vocês são essenciais!

Ao meu noivo Victor pelo amor e companheirismo, por me ouvir falar milhões de vezes sobre qualquer assunto relacionado ao mestrado, obrigada pela compreensão nos momentos de ausência e por continuar ao meu lado me apoiando independente de qualquer coisa.

A todos os meus amigos pela força emocional, carinho e incentivo. Em especial a Samantha Hausmann por ser a melhor amiga possível, sempre tendo as palavras certas nas horas de necessidade. Ao Filipe Fidelis pela amizade de longa data e por nunca permitir que eu desistisse dos meus ideais.

Enfim, gostaria de agradecer a todos que contribuíram de alguma forma com a realização deste trabalho. Muito obrigada por tudo!

AGRADECIMENTOS ÀS INSTITUIÇÕES FINANCIADORAS

A Fundação Oswaldo Cruz, ao Centro de Pesquisas René Rachou pela excelente infraestrutura no que diz respeito a reagentes e equipamentos necessários para realização do trabalho.

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.

RESUMO

A bactéria *Wolbachia pipientis* tem sido investigada como nova estratégia de controle biológico que pode ser usada simultaneamente com as medidas de controle de vetores já existentes. O potencial desse endossimbionte para o controle de doenças transmitidas por vetores está na sua capacidade de induzir diversos efeitos no hospedeiro, dentre eles a capacidade de bloquear patógenos. Nos dias de hoje existem técnicas de transinfecção que permitem criar associações entre *Wolbachia* e hospedeiros que não abrigam a bactéria naturalmente. Estudos anteriores têm demonstrado que nesses casos o fenótipo de bloqueio é mais intenso em comparação àquele observado em mosquitos com infecção natural. As infecções nativas podem se atenuar depois de um processo de coevolução entre o hospedeiro e o endossimbionte, entretanto, sob condições específicas, possivelmente seja observada uma capacidade residual de interferência a patógenos. Uma dessas circunstâncias pode ser a carga parasitária adquirida pelo vetor em uma alimentação sanguínea. Diante do exposto, realizamos uma análise comparativa entre a capacidade de bloqueio em duas espécies de *Aedes* infectados com *Wolbachia*, o mosquito *Aedes fluviatilis* com a cepa natural wFlu, e o *Aedes aegypti* transinfectado com a cepa wMel. Mosquitos tratados com tetraciclina foram usadas como controle para cada espécie. Investigamos a capacidade de bloqueio para o Dengue vírus e para o modelo de malária aviária *Plasmodium gallinaceum*. Os mosquitos foram infectados diretamente em aves com curvas ascendentes de parasitemias ou via alimentação sanguínea artificial e os intestinos foram dissecados 7 dias após infecção para contagem de oocistos. Em outra série de experimentos vírus dengue sorotipo 3 foi adicionado a sangue humano para obter titulações que variaram de 10^6 a 10^3 PFU/mL as cargas virais foram quantificadas aos 7 e 14 dias pós infecção sanguínea por RT-qPCR. Em contraste ao que foi observado para o *P. gallinaceum*, observamos diferentes respostas ao vírus nas duas espécies de *Aedes*, a cepa wMel induziu forte interferência a este patógeno enquanto que wFlu levou ao aumento da susceptibilidade no *Ae. fluviatilis* aos 7 dias pós infecção. Diante desses resultados investigamos a presença do vírus na saliva de *Ae. fluviatilis*. Mais uma vez foi observado aumento da susceptibilidade dos mosquitos da linhagem wFlu e detectamos a presença do vírus em parte das salivas coletadas. Nossos dados sugerem que a cepa wMel não é eficiente no bloqueio do *P. gallinaceum*, o que indica que a capacidade de interferência não é uma característica universal para os diferentes patógenos. Constatamos que a carga parasitária não é um fator que induz a capacidade de bloqueio em *Ae. fluviatilis*, já que esse feito não foi observado em nenhuma das parasitemias testadas. Criticamente, demonstramos o potencial aumento da susceptibilidade de *Ae. fluviatilis* ao vírus dengue em uma infecção nativa de *Wolbachia*. Nossos resultados destacaram que a análise da capacidade de bloqueio a patógenos em mosquitos transinfectados com *Wolbachia* é complexa e que o estudo de espécies correlatas naturalmente infectadas por este endossimbionte podem ajudar a esclarecer questões relacionadas com o fenótipo de bloqueio de infecção a patógenos.

ABSTRACT

Wolbachia pipientis has been investigated as a new biological control strategy that can be used simultaneously with current vector control methods. The potential of this endosymbiont for disease control is its ability to induce various effects on the host, including pathogen blocking. Nowadays there are transinfections techniques that allow to create associations in hosts that not harbor the bacteria naturally. Previous studies have shown that pathogen blocking is stronger in those cases compared to what observed in mosquitoes with a native infection. Natural infections may have attenuated following a long period of co-evolution between host and symbiont. However there may be a residual capacity for blocking in natural strains that could manifest under certain conditions, as according pathogen load acquired by the mosquito during a blood feeding. In this study we conducted a comparative analysis of the effect of pathogen load on the pathogen blocking in two different *Wolbachia*-infected mosquitoes; the wFlu strain in its natural host, *Aedes fluviatilis*, and the wMel strain transinfected in *Aedes aegypti*. Tetracycline treated, *Wolbachia*-uninfected mosquitoes served as a control line for each species. We looked at pathogen blocking against dengue virus and the model avian malaria parasite *Plasmodium gallinaceum*. Malaria infections were conducted either by feeding directly on an infected chicken, over several day throughout the course of *P. gallinaceum* infection, or by artificial feeding. *Plasmodium* oocyst numbers were counted at 7dpi. Neither mosquito species displayed consistent pathogen blocking, nor was there a change in the effect of either *Wolbachia* strain at lower pathogen loads. Dengue virus in cell culture was mixed with human blood to produce different final concentrations that ranged from 10^6 to 10^3 PFU/mL, virus levels were quantified at 7 and 14 days pos blood infection by RT-qPCR. In contrast to *P. gallinaceum*, we observed a differential response to DENV for the two species, with wMel producing a strong blocking effect when viral loads were sufficient for mosquitoes to become infected. On the other hand, wFlu appeared to increase susceptibility to DENV, as infection rates were higher than in *Wolbachia*-uninfected *Ae. fluviatilis* at 7dpi. Because of these results we investigated the vector competence of *Ae. fluviatilis*. We were able to detect the presence of the virus in a small portion of *Ae. fluviatilis* saliva. We again observed that wFlu enhanced susceptibility rates at the whole body level, however *Wolbachia* appeared to decrease the prevalence of virus in the saliva. Our data suggest firstly that wMel is effective at blocking *P. gallinaceum*, which indicates that pathogen blocking is not ubiquitous for all pathogens even among transinfections. Lower pathogen loads did not induce pathogen blocking in infected *Ae. fluviatilis*, which suggests that induction of the phenotype, is not dependent on the amount of pathogen ingested by the mosquito. Critically, we firstly demonstrated a potential pathogen enhancement effect for a native *Wolbachia* infection and dengue virus. However, the fact that wFlu appears to reduce DENV levels in saliva, may indeed be evidence that a latent pathogen blocking persists in this association. Overall, our results provide further evidence of the complexity of the pathogen blocking response, and highlight the insight that can be gained by studying the phenotype in native strain.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Áreas de transmissão da malária no mundo e risco de transmissão da malária no Brasil.....	21
Figura 2: Esquema simplificado do ciclo de vida do Plasmodium no hospedeiro invertebrado	23
Figura 3: Mapa de risco para Dengue no mundo	27
Figura 4: Distribuição geográfica do Aedes aegypti e do Aedes albopictus	29
Figura 5: Diferentes cepas de <i>Wolbachia</i> em <i>Drosophila</i> e seus respectivos níveis de proteção ao Drosophila C- vírus e ao Flock House Vírus de acordo com a densidade no hospedeiro	43
Figura 6: Metodologia do experimento de infecção em condições semi-naturais	54
Figura 7: Metodologia do experimento de infecção artificial	55
Figura 8: Variação da parasitemia ao longo do experimento de infecção natural do Ae. fluviatilis com P. gallinaceum	60
Figura 9: Susceptibilidade de infecção do Ae. fluviatilis ao P. gallinaceum.....	63
Figura 10: Carga de oocistos de P. gallinaceum nos intestinos de Ae. fluviatilis	64
Figura 11: Variação da parasitemia ao longo do experimento de infecção natural do Ae. aegypti com P. gallinaceum	65
Figura 12: Susceptibilidade de infecção do Ae. aegypti ao P. gallinaceum.....	68
Figura 13: Carga de oocistos de P. gallinaceum no intestino de Ae. aegypti.....	69
Figura 14: Correlação entre parasitemia e gametocitemia no curso de infecção	70
Figura 15: Susceptibilidade do Ae. fluviatilis ao P.gallinaceum na infecção artificial	71
Figura 16: Carga de oocistos de P.gallinaceum no intestino de Ae. fluviatilis na infecção artificial	72
Figura 17: Susceptibilidade do Ae. aegypti ao P.gallinaceum na infecção artificial	74
Figura 18: Carga de oocistos de P.gallinaceum no intestino de Ae. aegypti na infecção artificial.....	75
Figura 19: Relação entre susceptibilidade e carga viral do Ae. fluviatilis diante da infecção com Dengue vírus.....	76

Figura 20: Relação entre susceptibilidade e carga viral do <i>Ae. aegypti</i> diante da infecção com Dengue vírus.	77
Figura 21: Porcentagem de infecção nos mosquitos <i>Ae. fluviatilis</i> utilizados para coleta da saliva no experimento de competência vetorial.	79
Figura 22: Presença do vírus Dengue na saliva de mosquitos <i>Ae. fluviatilis</i>	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 01: Sequencia de primers para monitoramento da infecção por <i>Wolbachia</i> e por vírus Dengue em mosquitos <i>Ae. aegypti</i>	51
Tabela 02: Relação entre parasitemia e gametocitemia nos experimentos com <i>Ae. fluviatilis</i>	61
Tabela 03: Relação entre parasitemia e gametocitemia nos experimentos com <i>Ae. aegypti</i>	66

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

µg – Micrograma

mg- Miligrama

µL – Microlitro

mL – Mililitro

mM – Milimolar

°C – Graus Celsius

CEUA – Comitê de ética no uso de animais

DENV – Dengue virus

DNA – Desoxiribonucleic Acid (Ácido Desoxirribonucleico)

DNTPs – Desoxirribonucleotídeos Trifosfatados

EIP– Período de incubação extrínseco

IFCS - Inactivated Fetal Calf Serum

PBS - Phosphate Buffered Saline (Tampão fosfato-salino)

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

(p/v) – Peso por volume

qPCR – PCR em tempo real

RNA - Ribonucleic Acid (ácido ribonucleico)

Rps - Proteína ribossomal de mosquitos S17

RPM – Rotações Por Minuto

SPG (Sucrose/ Phosphate / Glutamate)

Wsp – Proteína de superfície de *Wolbachia*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Doenças transmitidas por vetores	17
1.1.1 Situação geral da malária humana.	18
1.1.2 Ciclo do <i>Plasmodium</i> no hospedeiro invetebado	21
1.1.3 Malária aviária	23
1.1.4 Situação geral da dengue.....	25
1.1.5 Os Vetores da dengue.....	27
1.2 Controle de doenças causadas por mosquitos vetores	29
1.3 Técnicas emergentes de controle vetorial	33
1.4 Controle de mosquitos vetores baseado no uso de <i>Wolbachia pipientis</i>	35
1.5 <i>Wolbachia</i> e seus efeitos nos hospedeiros	37
1.6 A interferência a patógenos nas infecções artificiais.....	39
1.7 Fatores determinantes na interferência contra patógenos.....	42
1.8 As relações naturais <i>Wolbachia</i> - hospedeiro em mosquitos e a interferência a patógenos.....	45
2 JUSTIFICATIVA.....	47
3 OBJETIVOS.....	49
3.1 Objetivo geral	49
3.1 Objetivos específicos.....	49
4 METODOLOGIA	50
4.1 Linhagens de mosquitos utilizadas.....	50
4.2 Manutenção das colônias de <i>Aedes aegypti</i> e <i>Aedes fluviatilis</i>	51
4.3 Manutenção de <i>Plasmodium gallinaceum</i>	52
4.4 Infecção dos mosquitos sob condições semi-naturais	53
4.5 Infecção com <i>P. gallinaceum</i> via alimentação artificial.....	54
4.6 Efeitos das mudanças na concentração de DENV	56

4.7 Investigação da capacidade vetorial do <i>Ae. fluviatilis</i>	57
4.8 Análise dos dados	58
5 RESULTADOS.....	60
5.1 Efeito da cepa wFlu na interferência ao <i>P. gallinaceum</i> em <i>Ae. fluviatilis</i> (infecção semi-natural).....	60
5.2 Efeito da cepa wMe na interferência ao <i>P. gallinaceum</i> em <i>Ae. aegypti</i> (infecção semi-natural).....	65
5.3 Efeito da cepa wFlu na interferência ao <i>P. gallinaceum</i> em <i>Ae. fluviatilis</i> (Infecção via alimentação artificial)	70
5.4 Efeito da cepa wMel na interferência ao <i>P. gallinaceum</i> em <i>Ae. aegypti</i> (Infecção via alimentação artificial)	73
5.5 Efeito da titulação de DENV na infecção do <i>Ae. fluviatilis</i>	75
5.6 Efeitos da titulação de DENV na infecção do <i>Ae. aegypti</i>	77
5.7 Análise da competência vetorial do <i>Ae. fluviatilis</i>	78
6 DISCUSSÃO	80
6.1 Efeito da carga parasitária na capacidade de interferência de <i>Wolbachia</i> ao <i>P. gallinaceum</i>	80
6.2 Efeito da titulação viral na capacidade de interferência de <i>Wolbachia</i> ao Dengue Vírus	85
6.3 Interferência a patógenos das cepas wFlu e wMel e suas implicações para o uso no controle de doenças transmitidas por vetores	90
6.4 Competência vetorial do <i>Ae. fluviatilis</i>	94
6.5 Direções futuras	97
7 CONCLUSÃO	101
REFERÊNCIAS.....	102
ANEXOS	113
Anexo 1: Esfregaço de células sanguíneas de aves infectadas com <i>P.</i> <i>gallinaceum</i>	113
Anexo 2: Protocolo de cultivo de Dengue vírus	114

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doenças transmitidas por vetores

Vetores são organismos, tipicamente artrópodes, capazes de transmitirem diversos agentes infecciosos, tais como vírus, protozoários, bactérias e helmintos (GUBLER, 1998; NEVES, 2005). Muitas doenças são transmitidas por insetos vetores; mosquitos por exemplo, podem transmitir parasitos do gênero *Plasmodium*, causadores da malária, como também arboviroses como dengue ou febre amarela, e filariose, enquanto que flebotomíneos transmitem os parasitos da leishmaniose, e outros artrópodes como carrapatos, piolhos, pulgas transmitem diversas outras doenças. A participação desses animais na propagação de determinado patógeno acontece porque eles apresentam em geral hábitos hematófagos, o que leva a propagação das doenças entre hospedeiros vertebrados susceptíveis (BROGDON; MCALLISTER, 1998; WHO 2014). Podem existir vetores biológicos e vetores mecânicos na transmissão de doenças, o primeiro é aquele onde o patógeno se reproduz e desenvolve dentro do hospedeiro ao passo que o segundo trabalhará como um carreador do agente transmissor da doença.

A importância dos vetores na transmissão de doenças vem sendo estudada desde o século XIX e, naquela época essas enfermidades já representavam um obstáculo para o desenvolvimento de grandes áreas dos trópicos, e ainda hoje constituem uma importante causa de morbidade no Brasil e em todo mundo (GLUBLER, 1998; WHO, 2014). Cerca de 100 países são afetados pelas doenças transmitidas por vetores, cuja distribuição é determinada por um complexo dinâmico de fatores ambientais, sociais e econômicos. Os principais territórios afetados são aqueles em desenvolvimento nos quais essas doenças representam 17% de todas as doenças infecciosas e causam 1 milhão de mortes por ano (MCGRAW; O'NEILL, 2013; WHO, 2014). As mudanças climáticas, a globalização e a urbanização não planejada são elementos que têm contribuído consideravelmente para expansão da

distribuição dos vetores e consequente aumento da transmissão dessas doenças (WHO, 2014; WHO, 2013).

Embora certo progresso já tenha sido alcançado no combate de algumas dessas doenças como a malária, a doença de Chagas e a filariose, em outros casos o problema tem piorado globalmente, de forma que doenças como a dengue, febre chikungunya e a Zika tem se tornado endêmicas em países onde previamente haviam baixos níveis de transmissão (MUSSO et al., 2014; ZOFOU et al., 2014). As doenças reemergentes aparecem como resultado de diversos fatores que vão desde a resistência dos vetores aos inseticidas até questões políticas que têm ênfase na resposta de emergência no lugar da prevenção (GUBLER, 1998; MCGRAW; O'NEILL, 2013). Para combater essa ameaça crescente torna-se cada vez mais evidente a necessidade de novas estratégias, tais como vacinas, inseticidas ambientalmente seguros, programas de formação para profissionais de saúde e abordagens alternativas para o controle de vetores e as doenças que eles transmitem (BROGDON; MCCALISTER, 1998; GUBLER, 1998).

1.1.1 Situação geral da Malária humana

A Malária é o exemplo mais importante dentre as doenças transmitidas por culicídeos devido ao elevado número de casos que ocorrem anualmente como também a elevada mortalidade; ela é causada por parasitos unicelulares do gênero *Plasmodium* pertencentes ao filo Apicomplexa, família Plasmodiidae (NEVES, 2005). Atualmente são conhecidas cerca de 150 espécies causadoras de malária em diferentes hospedeiros vertebrados; porém somente cinco espécies de parasitos conhecidas podem causar a doença no homem, são elas: *Plasmodium ovale*, *P. malariae*, *P. vivax*, *P. falciparum*, sendo que as duas últimas são responsáveis pela maioria dos casos humanos (NEVES, 2005; VLACHOU et al., 2006). O *P. falciparum* é apontado como o responsável pelos quadros mais agudos e fatais, enquanto que o *P. vivax* é a espécie de maior distribuição podendo ser capaz de permanecer no hospedeiro vertebrado em formas dormentes, chamadas hipnozoítos, o que permite a permanência do parasito na possível ausência de vetores (GREENWOOD et al., 2008; WHO, 2013). Além das espécies anteriormente citadas, estudos recentes apontam

que o *P. knowlesi*, um parasito zoonótico, também apresenta capacidade de infectar humanos (GREENWOOD et al., 2008; SABATINI et al., 2010; WHO, 2015).

As diferentes espécies de *Plasmodium* são transmitidas por mosquitos do gênero *Anopheles*. No Brasil *Anopheles darlingi* é incriminado como principal transmissor de malária, mas outras espécies como *An. albitarsis* s.l., *An. aquasalis*, e *An. cruzii* (CONSOLI E OLIVEIRA, 1998). Na África, o mosquito *An. gambiae* e *An. arabiensis* são os principais vetores da malária humana, na Ásia e no oriente médio, o mosquito *An. stephensi* é considerado uma das espécies mais importantes (LABORATRI, 1976; CAMARGO, 2003; MAYAGAYA et al., 2015).

A malária é uma doença cuja manifestação é caracterizada por episódios de febre alta acompanhada de mal-estar, náuseas, cefaléias e dores articulares; esses eventos retornam em períodos de uma dois dias podendo se repetir por semanas até que o paciente receba tratamento adequado ou se cure espontaneamente. O intervalo entre os episódios, a gravidade da doença e seu grau de mortalidade, dependem, dentre outros aspectos, da espécie de parasita; podendo existir formas clínicas com diferentes níveis de gravidade e até mesmo casos assintomáticos (CAMARGO, 2003). Em 2012 ocorreram 207 milhões de casos de malária, e essa doença era endêmica em 104 países principalmente nas regiões da África e sudeste da Ásia (**Figura 1**), sendo que em 97 desses territórios havia elevada transmissão e o restante estava em fase de prevenção à reintrodução dos parasitos (WHO, 2013). Nesse ano a doença foi responsável por uma mortalidade estimada em 627 mil casos, principalmente em crianças menores de 5 anos de idade (WHO, 2013; SINHA et al., 2014).

Atualmente o Brasil é o país com maior registro de malária nas Américas, a magnitude da doença em nosso território está relacionada com a sua alta incidência na região da Amazônia legal, onde ocorreram 178.613 casos no ano de 2013, representando uma queda de 26% em relação ao que foi registrado no ano anterior (SVS, 2015), entretanto esses dados são variáveis a cada ano e a doença ainda representa considerável problema de

saúde pública no país. Diversos fatores são relevantes para a caracterização do quadro da malária no Brasil como, por exemplo, a ocupação desordenada do espaço periurbano e outras atividades socioeconômicas que têm colocado o homem em maior contato com os vetores (SVS,2015). Entre os anos de 2001 e 2013 esforços na intervenção da doença contribuíram para o declínio de 47% das taxas de mortalidade relacionadas a doença mas, apesar desse progresso, a doença ainda tem difícil controle, pois está associada a países pobres onde existe distribuição desigual dos recursos e também a ocorrência de vetores resistentes a inseticidas (WHO, 2014).

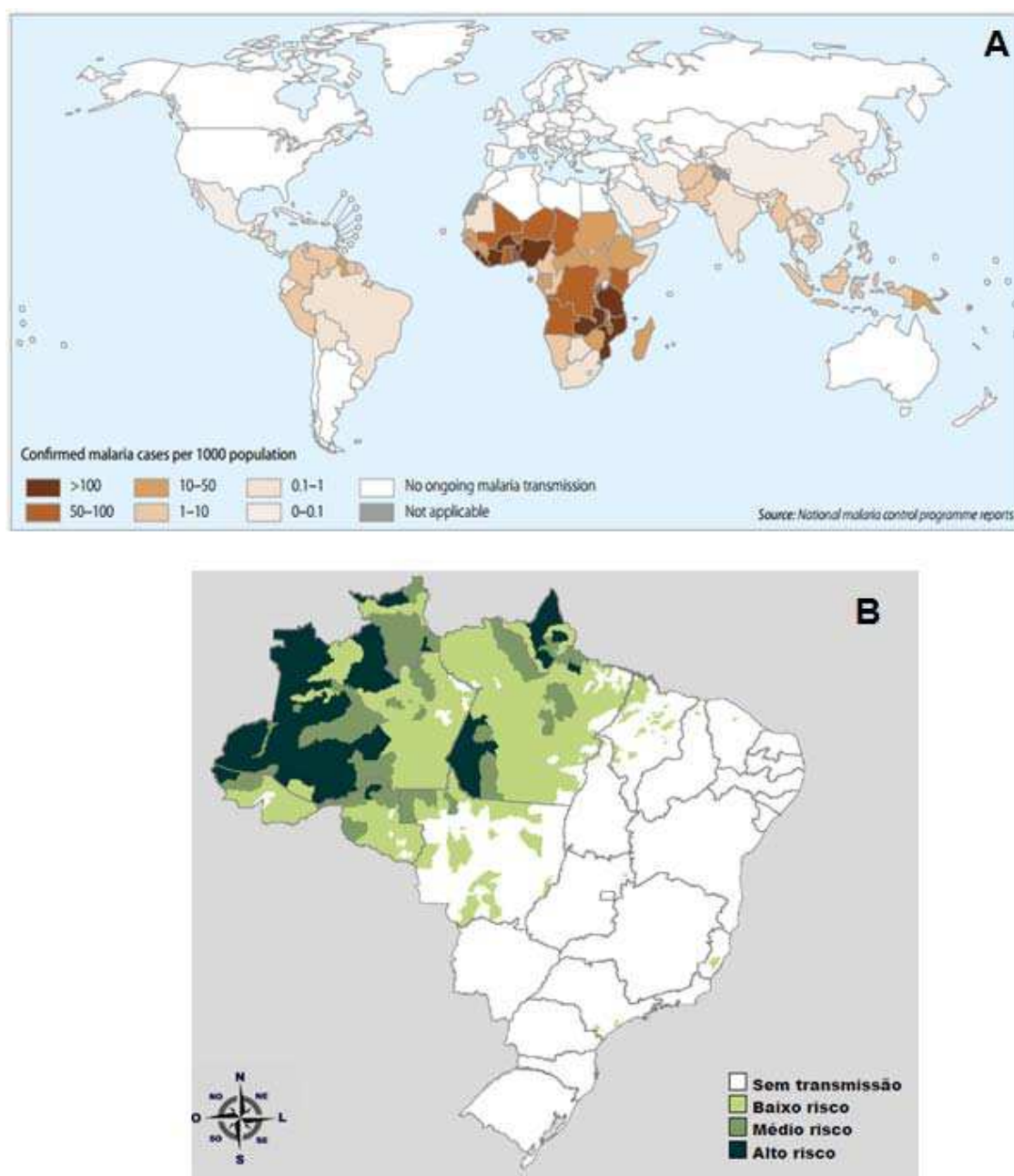


Figura 1: Áreas de transmissão da malária no mundo e risco de transmissão da malária no Brasil: Dados da Organização Mundial de Saúde; a escala de cores representa o número de casos registrado a cada 1000 habitantes **(A)** (World Malaria report; WHO, 2014). Área de transmissão no Brasil em 2014 segundo a secretaria de vigilância em saúde, representando o risco de transmissão da malária na Amazônia Legal **(B)** (SVS, 2015).

1.1.2 O ciclo de vida do *Plasmodium* no hospedeiro invertebrado

Os parasitos do gênero *Plasmodium* apresentam um ciclo heteroxênico com formas morfolologicamente distintas e, nas etapas de desenvolvimento dentro dos vetores, os parasitos encontram um ambiente hostil capaz de estabelecer forte pressão seletiva (ABRAHAM; JACOBS-LORENA, 2004; VLACHOU et al., 2006). O ciclo do *Plasmodium* se inicia com a ingestão das

formas sexuadas denominadas gametócitos durante o repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado infectado (**Figura 2**). Cada mosquito pode ingerir até 10^3 gametócitos e uma vez ingeridas, essas formas irão se desenvolver em gametas no lúmen do intestino onde ocorrerá a formação zigotos diplóides. O zigoto formado irá se desenvolver em uma forma móvel conhecida como oocineto, que migra para a matriz peritrófica e em seguida para o epitélio do intestino onde se transformará em oocisto. No epitélio intestinal os oocistos se transformam em esporozoítos, atingem a hemolinfa e migram até invadirem as glândulas salivares. Os esporozoítos presentes na saliva serão transmitidos na próxima alimentação sanguínea infectando novos hospedeiros vertebrados (VLACHOU et al., 2006; PIMENTA et al., 2015).

A participação de formas móveis como os oocinetos e esporozoítos é fundamental para o sucesso da infecção do *Plasmodium* no vetor. Contudo esses estágios também devem ser capazes de atravessar barreiras físicas e químicas no corpo do inseto como por exemplo a matriz peritrófica e as enzimas digestivas do intestino (ABRAHAM; JACOBS-LORENA, 2004; SMITH et al., 2014; PIMENTA et al., 2015). Esses empecilhos no corpo do mosquito fazem com que aconteça uma redução do número de parasitos em cada etapa de seu desenvolvimento (um processo denominado “malária bottleneck”); diversos eventos contribuem para essa redução; até mesmo a transição do parasita de um meio intracelular para o meio extracelular é capaz de levar a uma queda do número de parasitos (SMITH et al., 2014).

De todos os gametócitos ingeridos pelo mosquito apenas 50-100 restarão para o processo da fecundação e formação de zigotos, e uma quantidade ainda menor será capaz de atingir a fase de oocisto. Contudo, uma vez formados, os oocistos são capazes de levar a formação de milhares de esporozoítos restabelecendo uma maior quantidade de parasitos e permitindo a eficácia de seu ciclo de transmissão. Esse fato mostra que o entendimento das formas pelas quais os mosquitos limitam o desenvolvimento dos parasitos é um campo de pesquisa a ser explorado principalmente no que diz respeito aos seus mecanismos moleculares, e devido a perda dos parasitos ao longo do ciclo no vetor os estágios de desenvolvimento intestinais são alvos em

potencial para estratégias de bloqueio da transmissão da malária (ABRAHAM; JACOBS-LORENA, 2004; SMITH et al., 2014)

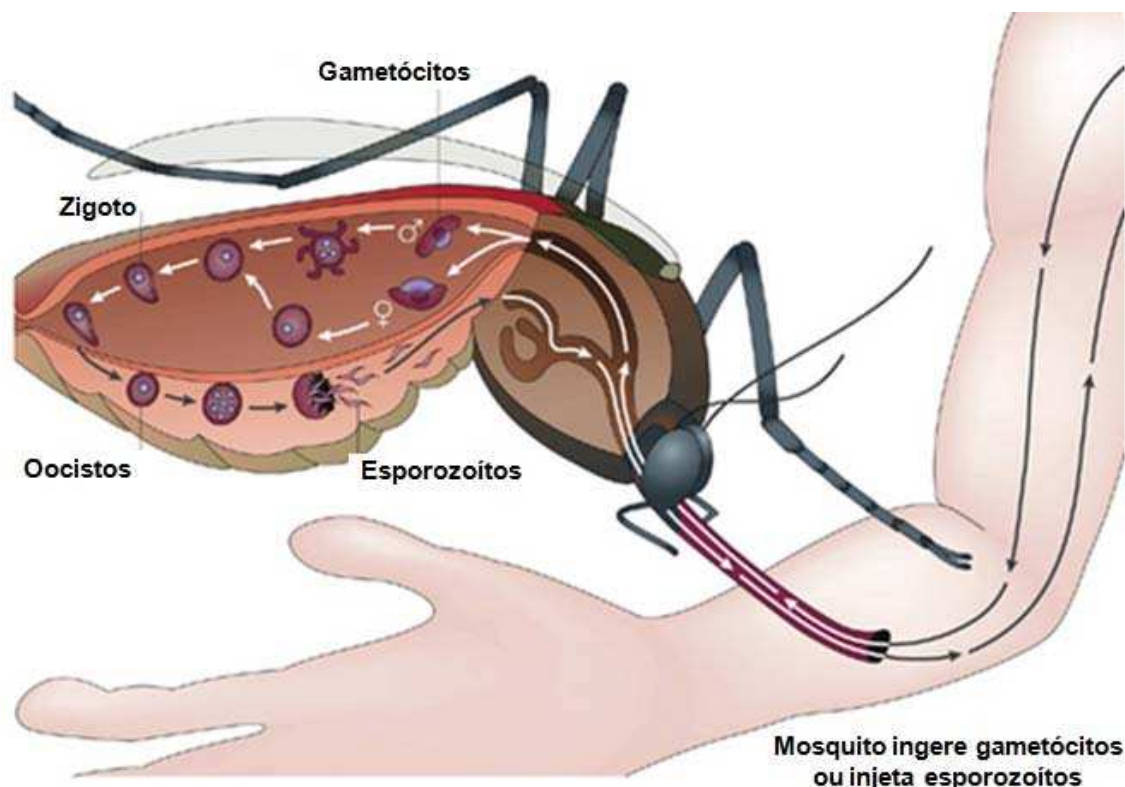


Figura 2: Esquema simplificado do ciclo de vida do *Plasmodium* sp. em seu hospedeiro invertebrado (adaptado de SU et al., 2007).

1.1.3 Malária aviária

Determinadas espécies de *Plasmodium* possuem a capacidade de infectar diferentes hospedeiros vertebrados, dentre eles diversas espécies de aves. Em contraste com a malária humana, os parasitos da malária aviária possuem uma ampla distribuição geográfica e constituem um grupo com cerca de 50 espécies (NJABO et al., 2009; NJABO et al., 2012). Por sua diversidade, o estudo da malária aviária é um modelo apropriado para a compreensão da dinâmica entre vetor, parasita e hospedeiro (NJABO et al., 2009). Além disso, existe um especial interesse no estudo desses parasitos devido a sua relação filogenética próxima com os parasitos da malária humana. Por causa dessa característica eles constituem em um bom modelo laboratorial (RICKFLES, 2002). Não se pode descartar a importância desses parasitos no contexto veterinário, uma vez que a doença pode acometer um número considerável de

hospedeiros vertebrados sendo letal em aves que não forem adaptadas e podendo até mesmo levar a extinção de espécies (NJABO et al., 2009).

As primeiras evidências de vetores da malária aviária surgiram em 1965, quando Niles e colaboradores encontraram mosquitos da espécie *Mansonia crassipes* naturalmente infectados com *Plasmodium gallinaceum* (NILES, 1965). Desde então está relatado que uma variedade de espécies pode atuar como vetores de malária aviária como por exemplo, mosquitos dos gêneros *Culex*, *Aedes*, *Culiseta*, *Anopheles*, *Mansonia*, *Aedeomya*, *Coquillettidia* (CAMARGO, 1977; NJABO et al., 2009; NJABO et al., 2011). Aproximadamente 26 espécies de mosquitos podem ser usadas experimentalmente como modelo da malária aviária. Durante muito tempo o *Ae. aegypti* foi adotado como a espécie de primeira escolha e posteriormente foi proposta a utilização de um novo modelo que fosse também de fácil manutenção, e que fosse altamente susceptível ao *P. gallinaceum*: o mosquito *Ae. fluviatilis* (CAMARGO, 1977).

O *Ae. fluviatilis* apresenta vasta distribuição neotropical, estendendo-se nas Américas Central e do Sul, desde o sul do México até ao norte da Argentina, e na região meridional do Brasil (FORATINNI, 2002). Em condições naturais esses mosquitos podem ser encontrados em diferentes paisagens com características silvestres ou urbanas. As fêmeas se alimentam de sangue humano, ou de outros animais, e utilizam como criadouros preferencialmente escavações de rochas ou ocos de árvores, mas também utilizar recipientes artificiais (FORATINNI, 2002). Esta espécie foi considerada tão susceptível quanto o *Ae. aegypti* à infecção pelo *P. gallinaceum*. Em ambas foi observada grande variação nas taxas de infecção com o parasita, diferenças que foram atribuídas a fatores genéticos e também à idade dos mosquitos (CAMARGO, 1977).

Com o advento de técnicas que permitem o cultivo *in vitro* de espécies de *Plasmodium* que causam a malária humana, o estudo da malária aviária não tem recebido tanto atenção, fazendo com que exista uma grande lacuna no entendimento do seu ciclo de transmissão completo. Apesar de o ciclo de vida de todos os parasitos da malária aviária ainda não estar completamente

descrito, este modelo ainda pode ser considerado vantajoso em relação aos modelos convencionais uma vez que apresenta baixo custo, reprodutibilidade, e não oferece riscos à saúde humana (COLLINS et al., 1986). É importante salientarmos que até hoje no Brasil não conseguimos fechar o ciclo da malária humana em vetores brasileiros, em laboratório. Adicionalmente existem limitações para o cultivo de determinadas espécies de *Plasmodium*, o que torna ainda mais relevante o estudo de outros modelos de interação parasito e hospedeiro.

1.1.4 Situação geral da dengue

A dengue é considerada a arbovirose mais importante do mundo e é causada por um dos quatro sorotipos do vírus, pertencente a família *Flaviviridae* (DENV-1; DENV-2; DENV-3; DENV-4), que estão intimamente relacionados mas são antigenicamente distintos. Apesar de em muitos casos a doença apresentar um caráter assintomático, em outras situações há casos febris clássicos ou mais severos, que podem inclusive levar à morte. Atualmente a dengue está presente em países de quase todos os continentes, em particular naqueles de regiões tropicais e subtropicais onde há condições favoráveis à propagação dos vetores (BÄCK; LUNDKVIST, 2013; BHATT et al., 2013). Além do clima favorável, a transmissão da dengue tem crescido predominantemente em áreas urbanas e semi-urbanas devido a grande disponibilidade de criadouros artificiais do vetor e a intensa aglomeração de pessoas que leva a ocorrência de surtos (TEIXEIRA, 2015). Estimativas mostram que cerca de 2,5 bilhões de pessoas vivem atualmente em áreas de risco, e que ocorrem de 50 a 100 milhões de infecções por ano no mundo todo, fazendo com que esta enfermidade considerada uma das maiores preocupações em saúde pública (WHO, 2014). Dentre as diversas localidades nas quais a dengue está presente, a maior parte dos casos acontece no sudeste asiático (**Figura 3**) onde é considerada hiperendêmica e constitui uma das maiores causas de morbidade da região (TEIXEIRA, 2015). Nas Américas a circulação do vírus acontece desde 1960 quando os primeiros sorotipos foram identificados. Desde então diversas epidemias importantes têm sido

descritas, sendo que a maior destas ocorreu em 2013 tendo sido registrados 2,35 milhões de casos (TEIXEIRA, 2015; WHO, 2014).

O cenário da dengue no Brasil é considerado bastante heterogêneo entre as diferentes regiões e cidades devido a fatores como a dimensão territorial, elevado número de centros urbanos e a diversidade climática (TEIXEIRA, 2015). A primeira grande epidemia de dengue no Brasil foi registrada em 1981, na região norte, mas somente a partir de 1986 com a primeira epidemia do Rio de Janeiro é que a doença passou a ser considerada um problema expressivo. Desde então, a transmissão da doença aconteceu de maneira continuada. A partir de 1995 todas as regiões brasileiras passaram a notificar casos da enfermidade (TEIXEIRA, 2015). Em 2015 foram registrados 1.587.080 casos prováveis de dengue no país, com maior ocorrência na região sudeste (997.268 casos; 62,8%). Esses índices foram maiores do que os reportados até dezembro do ano anterior (569.610 casos) demonstrando que a doença é um problema contínuo (SVS, 2015).

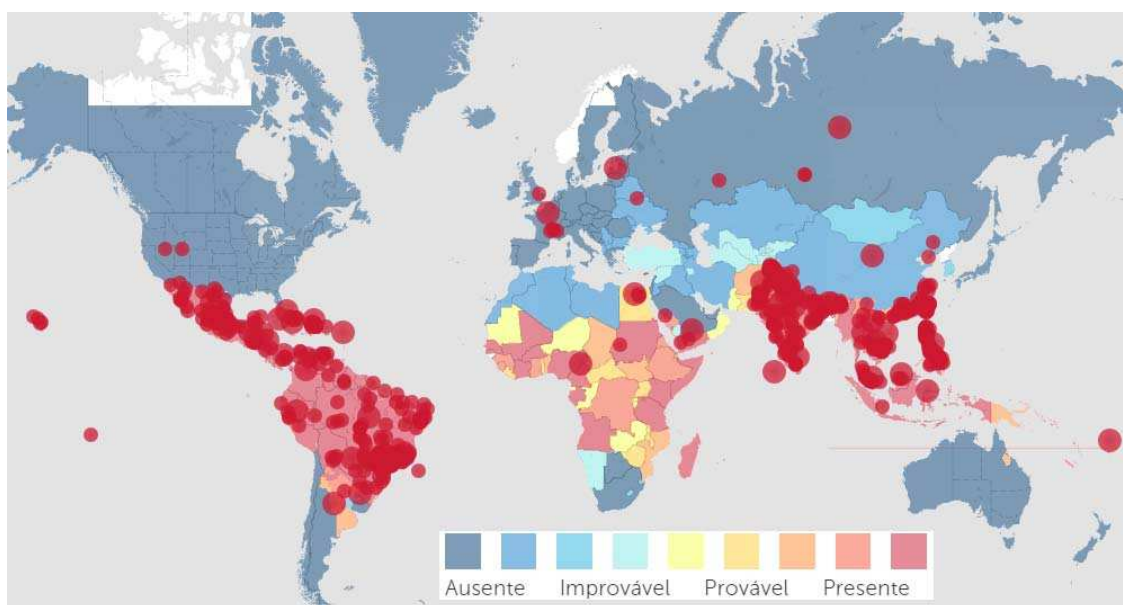


Figura 3: Mapa de risco para Dengue no mundo. Área de transmissão da dengue em 2015, segundo o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC). Os círculos maiores em vermelho mostram as transmissões locais da doença e os círculos menores os casos importados. A escala de cores representa as localidades onde há risco da doença. Dados coletados no período de agosto de 2015 a outubro de 2015. Disponível em: <http://www.healthmap.org/dengue/pt/>. □

1.1.5 Os vetores da Dengue

A transmissão do vírus Dengue é dependente de mosquitos do gênero *Aedes*, sendo que *Aedes aegypti* é considerado o vetor primário da doença, com competência vetorial comprovada para os quatro sorotipos do dengue vírus (FORATINI, 2002). Este mosquito é extremamente bem adaptado ao ambiente urbano, apresentando como preferência alimentar o sangue humano, o que facilita a transmissão do vírus aos hospedeiros humano, e diferente da grande maioria dos mosquitos, as fêmeas de *Ae. aegypti* se alimentam no período diurno. Uma vez presente no organismo do mosquito o vírus dengue passa por um período de incubação de cerca de 10 a 14 dias - o período de incubação extrínseco (do inglês EIP) - e após esse tempo o inseto se torna transmissor durante toda vida (WHO, 2014). O EIP é dependente de fatores genéticos do vírus e do hospedeiro, além de fatores ambientais (TJADEN et al., 2013; CARRINGTON; SIMMONS, 2014).

O grande nível de adaptação do mosquito ao vírus e ao ambiente habitado pelo homem faz com que o *Ae. aegypti* seja um excelente vetor em várias partes do globo, principalmente nos trópicos e subtrópicos (**Figura 4**). O mosquito está concentrado no sudeste da Ásia, América do Norte e Brasil, esta vasta distribuição do mosquito é outra razão para que ele seja considerado um vetor primário (KRAEMER et al., 2015). No Brasil o quadro epidemiológico atual da dengue é marcado pela ampla distribuição do *Ae. aegypti* em todas as regiões, com uma complexa dinâmica de dispersão do vírus e com a circulação simultânea dos quatro sorotipos virais (PIMENTA et al., 2015).

Existe também a participação do *Aedes albopictus* no ciclo epidemiológico da dengue. Essa espécie ocorre principalmente em áreas silvestres e rurais; e é apontado como transmissor secundário da doença, entretanto esse cenário tem mudado em decorrência da constante modificação dos ambientes, de forma que este mosquito tem sido cada vez mais encontrado em áreas urbanas e responsabilizado por vários surtos de dengue na China (WU, 2011). A distribuição do *Ae. albopictus* se estende ao Japão, sul da Europa, norte da China, sul do Brasil e norte dos Estados Unidos. Nestas regiões a espécie tem se expandido rapidamente o que reflete a sua capacidade de tolerar temperaturas mais baixas (KRAEMER et al., 2015).

Populações brasileiras de *Ae. albopictus* são capazes de adquirir infecção e transmitir o vírus dengue sob condições de laboratório, porém essa espécie ainda não foi incriminada como vetor em potencial no país, ou em demais países fora do continente asiático onde o vetor está associado a casos esporádicos da doença (PANCETTI et al., 2015; DEGALLIER et al., 2003). É de extrema relevância o fato de que além do vírus dengue, o *Ae. albopictus* e o *Ae. aegypti* também mostram elevada competência vetorial para outros arbovírus tais como Chikungunya e mais recentemente ao Zika Vírus (WONG et al., 2013). Tal realidade deixa clara a importância da contínua vigilância entomológica e epidemiológica de ambas as espécies no Brasil e no mundo e reforça a necessidade de implementação de medidas de controle de vetores adequadas (PANCETTI et al., 2015).

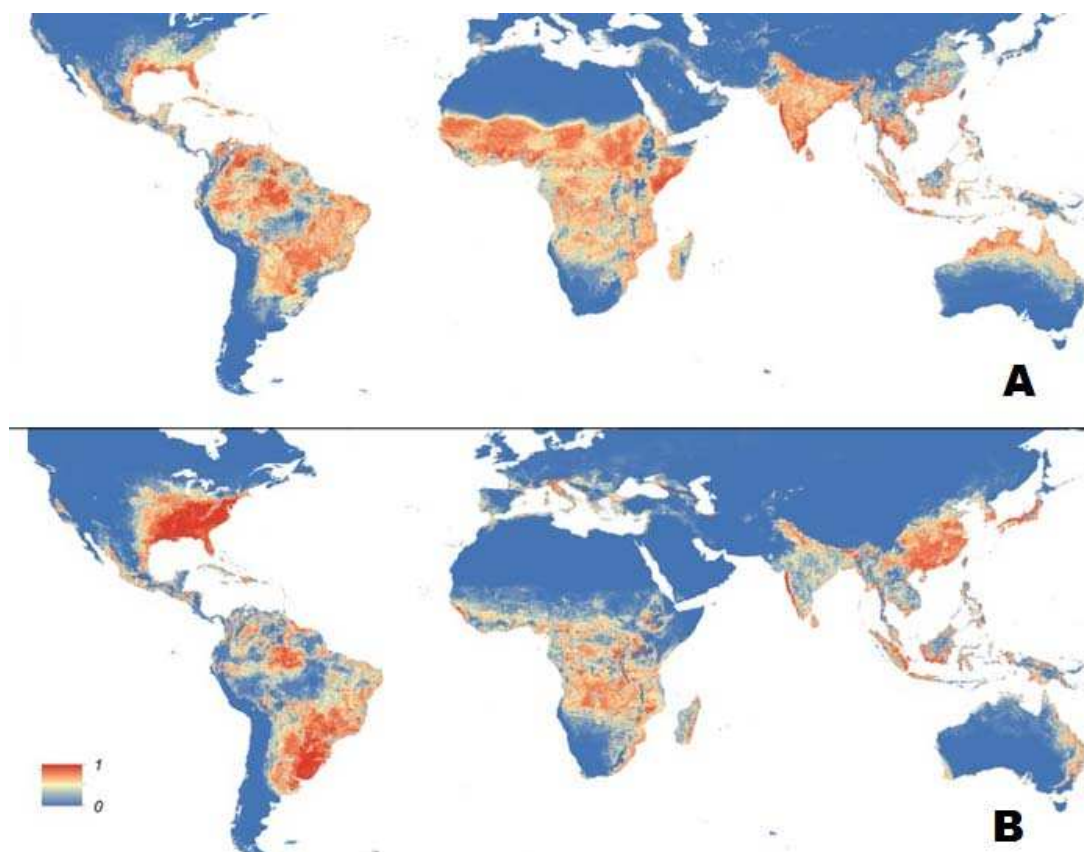


Figura 4: Distribuição geográfica do *Aedes aegypti* (A) e do *Aedes albopictus* (B); as regiões em vermelho indicam locais de ocorrência e em branco está indicado o local com potencial presença desses vetores (adaptado de KRAEMER et al., 2015). □

1.2 Controle de doenças causadas por mosquitos vetores

Durante muitos anos as comunidades médica e científica têm direcionado seus esforços para o desenvolvimento de vacinas e medicamentos visando o controle de doenças transmitidas por mosquitos (MCGRAW; O'NEILL, 2013). Entretanto os desafios para o desenvolvimento dessas alternativas fazem com que os vetores ainda sejam o alvo mais importante na cadeia de transmissão. Atualmente, existem diversas estratégias de controle para reduzir ou prevenir a transmissão das doenças pelos mosquitos vetores. Estes envolvem desde o combate ativo via eliminação de criadouros, à utilização de produtos químicos e até medidas mais recentes relacionadas ao controle biológico e à manipulação genética (ARAÚJO et al., 2015).

No âmbito das pesquisas em busca do desenvolvimento da vacina contra a malária, o questionamento fundamental é a escolha da espécie de

parasito e o estágio de vida mais adequado a ser utilizado como alvo (MCGRAW; O'NEILL, 2013). Durante os últimos anos foi obtido significativo progresso na busca de uma vacina contra malária, sendo uma candidata de primeira geração, a RTS, S/AS01, baseada na proteína circunsporozoita, cujo alvo é a prevenção da infecção dos hepatócitos pelos esporozoítos. Resultados de estudos de fase 3 com essa vacina mostraram níveis aceitáveis de proteção em combinação com outras medidas de intervenção (TAKASHIMA et al., 2016; HOFFMANN, 2015). Apesar das adversidades para a elaboração de vacinas, a existência de drogas antimaláricas é um ponto crucial no controle dessa doença, mas, mesmo assim é cada vez mais frequente a ocorrência de resistência do *Plasmodium* a diversas drogas (SINHA et al., 2014).

No caso da dengue, o desenvolvimento de uma vacina foi definido como uma prioridade pela Organização Mundial da Saúde desde 1990 (GALLER, 2015) e apesar de várias candidatas, após 25 anos nenhuma vacina foi comprovadamente eficaz a ponto de ser comercializada. A explicação para esse cenário está no fato de a produção de uma vacina contra dengue ser dificultada pela existência de quatro sorotipos de reação cruzada, além da ausência de modelos animais experimentais que apresentem patologia semelhante à doença humana (WAN et al., 2013; GUY et al., 2015; GALLER, 2015). Atualmente existem diversas candidatas em desenvolvimento, sejam vacinas baseadas no DNA recombinante, no vírus atenuado ou vacinas de subunidades. Apesar de mostrarem avanços nos ensaios clínicos, essas vacinas apresentam problemas com a interferência viral entre os quatro sorotipos em formulações tetravalentes (WAN et al., 2013). Atualmente a candidata em estágio mais avançado é a da Sanofi Pasteur, a CYD-TDV, tendo sido recentemente aprovada para comercialização pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Esta é uma vacina tetravalente e recombinante, criada a partir de formas vivas atenuadas, que tem como base uma linhagem vacinal contra febre amarela (GUY et al., 2015). O Instituto Butantan também tem desenvolvido uma vacina tetravalente com o vírus vivo atenuado, que adquiriu aprovação para testes de fase 3 em 2015 (ROBERTO et al., 2015).

Enquanto vacinas permanecem indisponíveis ao público em geral o controle vetorial é ainda a opção mais válida para restringir a propagação dessas doenças, sendo o controle mecânico uma das alternativas mais eficientes dentre os métodos clássicos de controle de mosquitos. Baseado no manejo ambiental, o objetivo primário dessa alternativa é eliminar os habitats de reprodução dos mosquitos e consequentemente sua densidade populacional. Contudo, limitações econômicas, dificuldades no gerenciamento, e a necessidade de uma forte e contínua participação social fazem com que essas medidas sejam limitadas, tornando cada vez mais necessária sua complementação com diversas outras práticas de controle (MCGRAW; O'NEILL, 2013)

A utilização de inseticidas de origem orgânica ou inorgânica é outra forma de controle de mosquitos vetores e constitui uma das intervenções mais utilizadas até os dias atuais. O primeiro inseticida a ser utilizado foi o dicloro-difenil-triclor-etano (DDT) mas, nos dias de hoje este produto não é mais usado em muitas partes do mundo devido seu acúmulo no ambiente, transmissão através da cadeia alimentar e a formação de resíduos tóxicos e também o desenvolvimento de resistência nos mosquitos (D'AMATO et al., 2002). Outros componentes químicos mais aplicados pertencem à classe dos piretróides, organofosforados e carbamatos; moléculas que interagem com o sistema nervoso dos insetos levando a sua morte (BRAGA; VALLE, 2007; ARAÚJO et al., 2015). No Brasil a aplicação desses produtos tem sido realizada desde a reintrodução do mosquito *Ae. aegypti*, sendo preconizado o uso das diferentes classes para o controle de larvas e adultos na tentativa de preservar as opções disponíveis para uso em saúde pública (VALLE et al., 2015). No contexto da malária, as intervenções mais aplicáveis são o uso redes pulverizadas com inseticidas de longa duração e a pulverização desses produtos com efeitos residuais no intra e peridomicílio. Tais práticas são consideradas altamente eficazes em termos de custos e demonstram um bom retorno sobre o investimento em saúde pública (WHO, 2015).

O rápido efeito dos inseticidas sobre as populações de mosquitos faz com que eles sejam amplamente utilizados, porém, os efeitos nocivos, a

acumulação no ambiente, e a eliminação de predadores naturais com conseqüente dependência no uso desses produtos, alertam para a necessidade de cautela quando o controle vetorial for realizado dessa maneira (MARCONDES, 2011). Somado a esses aspectos, existe também a seleção de populações de mosquitos resistentes que tem aumentado o custo de programas públicos de controle de vetores baseados na estratégia química (BELINATO et al., 2012; CHANG et al., 2014; VALLE et al., 2015). A resistência a inseticidas tem sido detectada para todas as classes de produtos disponíveis. Os mecanismos envolvidos nesse processo são, por exemplo, a diminuição da taxa de penetração dos produtos pela cutícula, ou a diminuição da sensibilidade dos sítios alvo, vias estas que são inespecíficas e conferem resistência cruzada a outros inseticidas estruturalmente parecidos, aumentando a dimensão do problema e contribuindo para a reemergência das doenças transmitidas por vetores (BRAGA; VALLE, 2007)

Outra técnica que visa a supressão das populações de mosquitos é o controle biológico, método que pode ser baseado na utilização de outros organismos vivos, seus produtos, ou ainda no manejo de habitats para intensificar o efeito de agentes que ocorram naturalmente em uma dada área (MARCONDES, 2011). O uso de copépodos, pequenos crustáceos que podem ser predadores de larvas de mosquitos, em locais de armazenamento de água é um bom exemplo de aplicação do controle biológico. A técnica foi usada em pequenas comunidades do Vietnã levando à eliminação local de mosquitos adultos e a redução da incidência de dengue (LAZARO et al., 2015). Existe também a utilização da bactéria *Bacillus thuringiensis*, que quando ingerida pelas larvas de mosquitos libera toxinas letais no intestino das mesmas (BOYCE et al., 2013). Essas estratégias tem se mostrado efetivas no controle de mosquitos, mas dependendo da espécie envolvida, podem haver dificuldades para sua implantação dado a grande quantidade de locais que servem como criadouros (BOYCE et al., 2013).

É importante ressaltar que o controle efetivo dos vetores deve associar várias estratégias adequadas à realidade local, que permitam sua execução de forma integrada e seletiva (BRAGA; VALLE, 2007). Ademais, apesar da

eficácia dos métodos citados anteriormente a morbidade e mortalidade destas doenças ainda são elevadas em muitas partes do mundo. Esse fato mostra que as medidas convencionais não tem sido suficientes para o controle dessas enfermidades, e torna necessárias o desenvolvimento de técnicas alternativas, que em combinação com as medidas clássicas pode levar a melhores resultados.

1.3 Técnicas emergentes de controle vetorial

Alternativas clássicas de controle de doenças transmitidas por vetores também são tipicamente focadas na redução populacional ou ainda na prevenção da transmissão do patógeno pelos mosquitos e reposição de uma população natural por uma população de mosquitos refratários às doenças por eles transmitidas. Dentre essas alternativas podemos citar a técnica do inseto estéril (SIT), a manipulação genética e a paratransgênese (MCGRAW; O'NEILL, 2013; ARAÚJO et al., 2015). Essas medidas têm se tornado de extrema relevância já que existem falhas nas técnicas clássicas de controle, inexistência das vacinas e limitações nos tratamentos específicos.

A esterilização de insetos (SIT) é uma técnica de controle biológico que consiste na liberação mosquitos esterilizados quimicamente ou pela utilização de radiação, principalmente machos que não produzem descendentes férteis ao acasalarem com as fêmeas de campo (FRANZ E ROBINSON, 2011). A produção dos insetos estéreis deve ser feita em larga escala e os machos devem ser igualmente competentes em relação aos machos selvagens. Uma vantagem da SIT é sua alta especificidade além da alternativa de interrupção dos programas de controle caso se julgue necessário (MARCONDES, 2011). Nos dias de hoje a SIT tem sido baseada no uso da tecnologia transgênica como, por exemplo, na inserção de genes letais dominantes, também chamada de RIDL (do inglês “release of insects carrying a dominant lethal”). Um grande enfoque tem sido dado à aplicação da RIDL em *Ae. aegypti*; e, baseado nesta técnica, uma linhagem deste mosquito chamada OX513A foi criada com o intuito de gerar insetos com alta letalidade principalmente na fase de pupa

(BURT, 2014). Esta linhagem apresentou bons resultados em laboratório e posteriormente foi testada nas Ilhas Caiman mostrando eficiência em causar a supressão da população de mosquitos locais. Em algumas regiões do Brasil cerca de 11 milhões de machos transgênicos foram soltos no período de fevereiro de 2011 a fevereiro de 2012 levando a redução das populações de mosquitos de campo (CARVALHO et al., 2014).

Outra abordagem tem como base a inserção de genes que influenciam na musculatura de pupas fêmeas. Como resultado, as filhas dos machos transgênicos liberados não conseguem voar, o que impede que encontrem machos ou hospedeiros humanos (FU et al., 2010). Baseada na engenharia genética outra possível alternativa é o RNA de interferência (RNAi), aplicada com o intuito de reconhecer e degradar o RNA viral invasor, como forma de ampliar as defesas naturais do vetor. Com esta técnica foi realizada a produção de mosquitos que expressam cópias inversas do RNA genômico do vírus Dengue que são capazes de ativar a resposta via RNAi, protegendo assim o vetor da colonização viral (FRANZ et al., 2006).

Outra estratégia conhecida como paratransgênese também tem sido desenvolvida e consiste na manipulação de microorganismos da flora intestinal dos insetos para que estes produzam moléculas anti-patogênicas (ARAÚJO et al., 2015). Existem diversos requisitos para que essa abordagem obtenha êxito: primeiramente o simbiote escolhido deve apresentar grande prevalência na população e devem ser facilmente cultivados sendo capazes de manter suas funções como simbiote natural. Finalmente, os produtos de transgenes devem interagir com o patógeno alvo, e este endossimbiote deve ser eficientemente transmitido entre as populações naturais de vetores para as próximas gerações (HURWITZ et al., 2011).

As bactérias escolhidas para a paratransgênese em geral são capazes de colonizar uma variedade de espécies de mosquitos. A bactéria *Asaia*, por exemplo, apresenta associação estável com mosquitos dos gêneros *Aedes*, *Culex* e *Anopheles*; podendo ser utilizada para o controle de diferentes doenças (WILKE; MARRELLI, 2015). A paratransgênese é considerada uma abordagem mais flexível porque a produção de bactérias recombinantes é um

processo mais simples do que criação de mosquitos transgênicos. Além disso o endossimbionte utilizado pode ser substituído em caso de não se obter os resultados desejados (WILKE; MARRELLI, 2015). Apesar de ser uma alternativa promissora uma questão pendente é a introdução eficiente das bactérias modificadas em populações de mosquitos selvagens e conseguir limitar a infecção somente para as espécies alvo (WANG; JACOBS-LORENA, 2013).

1.4 Controle de doenças transmitidas por vetores baseado no uso de *Wolbachia pipientis*

Uma metodologia de controle biológico vem sendo largamente estudada, baseando-se no uso da bactéria *Wolbachia pipientis*, devido a sua capacidade de interferir no processo de infecção por diversos patógenos. *Wolbachia* é uma bactéria intracelular, gram-negativa, pertencente à ordem *Rickettsiales*, descrita pela primeira vez em 1924 por Hertig e Wolbach nos tecidos reprodutivos de mosquitos *Culex pipiens*. A distribuição dessa bactéria é bastante ampla de forma que ela está naturalmente presente em cerca de 40% dos artrópodes de diversas famílias, além de ser encontrada em vermes nematóides causadores de filariose, fazendo com que seja um dos endossimbiontes mais comuns do planeta (WERREN et al., 2008; ZUG; HAMMERSTEIN, 2012).

Em termos gerais *Wolbachia* apresenta uma relação endossimbionte obrigatória com seus hospedeiros; sendo primariamente transmitida de forma vertical da fêmea para a prole. Este processo é essencial para que a bactéria permaneça nas populações de hospedeiros e permite que ela seja usada de maneira auto-sustentável como alternativa de controle de doenças transmitidas por vetores. Estudos recentes têm sugerido haver também a forma de transmissão horizontal entre diferentes espécies. Os mecanismos pelos quais essa propagação ocorre não estão completamente elucidados; porém já foi descrita a transmissão horizontal de *Wolbachia* em relações entre vespas parasitoides, e outras relações entre artrópodes infectados e seus predadores (HUIGENS et al., 2004; CLEC'H, LE et al., 2013; AHMED et al., 2015). Esses

dados permitem compreender como a *Wolbachia* é tão extensamente distribuída em hospedeiros filogeneticamente diferentes.

As questões envolvendo a classificação taxonômica de *Wolbachia* são amplamente debatidas. Por um lado algumas vertentes defendem que todas as bactérias deveriam ser consideradas uma única espécie denominada *Wolbachia pipientis*. Por outro lado há a convicção de que outras nomenclaturas deveriam ser aplicadas. Um novo estudo baseado em análises filogenômicas verificou que alguns dos supergrupos de *Wolbachia* mostram heterogeneidade interna suficiente para serem considerados como conjuntos de mais de uma espécie (RAMÍREZ-PUEBLA et al., 2015). Mas, pela inexistência de uma definição, as bactérias ainda são consideradas uma espécie única e convencionalmente apontada por cepas divididas em supergrupos. No momento estão descritos 14 supergrupos (nomeados de A-O), contudo tal categorização pode se alterar com a descoberta de novas cepas (GLOWSKA et al., 2015). A classificação em um dos supergrupos é determinada com base no DNA ribossomal 16S bem como por estudos das sequências dos genes *ftsZ* e *wsp* (BALDO; WERREN, 2007; GLOWSKA, 2015). Os supergrupos A e B são os mais comuns e abrangem cepas identificadas predominantemente em insetos e isópodes terrestres, enquanto que os supergrupos C e D são mais comumente encontrados em vermes nematóides, e os supergrupos G e H são representados por cepas de hospedeiros aracnídeos (WERREN et al., 2008).

A diversidade de *Wolbachia* ocorre de tal forma que é possível encontrar em um mesmo hospedeiro infecção múltipla com supergrupos distintos, como acontece no caso do vetor *Ae. albopictus* que apresenta infecção dupla com as cepas *wAlbA* e *wAlbB*. Também não é incomum que populações de uma mesma espécie de hospedeiro sejam encontradas com infecções por diferentes cepas quando são geograficamente distintas (MOUSSON et al., 2012). Além da sua abundância e distribuição, a *Wolbachia* tem sido de cada vez mais estudada devido a sua capacidade de causar diversos efeitos nos artrópodes que podem ser desde efeitos prejudiciais considerados formas de parasitismo reprodutivo, a influências benéficas sobre a sobrevivência e influência na infecção por patógenos (WERREN et al., 2008), que serão discutidos a seguir.

1.5 *Wolbachia* e seus efeitos nos hospedeiros

Uma característica da *Wolbachia* é sua capacidade de manipular processos celulares e induzir diferentes efeitos que são considerados formas de parasitismo reprodutivo em seus hospedeiros. Estes fenótipos incluem a partenogênese, a indução da feminização ou morte dos machos e a incompatibilidade citoplasmática (WERREN et al., 2008; SARIDAKI; BOURTZIS, 2010). A partenogênese, por exemplo, é um efeito no qual ovos não fertilizados resultam em uma progênie composta apenas de fêmeas, em alguns casos tem sido descrito que a indução desse fenótipo tem levado a fixação resultando em espécies partenogenéticas (WERREN et al., 2008; SARIDAKI; BOURTZIS, 2010). A razão adaptativa por trás desses efeitos está no fato de que a transmissão vertical de *Wolbachia* ocorre exclusivamente através das linhagens germinativas femininas, assim todas essas manipulações serão benéficas para a bactéria direta ou indiretamente, pois aumentarão a proporção de fêmeas infectadas e ajudarão a sua dispersão nas populações de hospedeiros (ZUG; HAMMERSTEIN, 2015).

Dentre todas as alterações reprodutivas conferidas por *Wolbachia*, a incompatibilidade citoplasmática (IC) é sem dúvida a mais frequente. Consiste em um efeito de letalidade dos embriões formados pelo cruzamento entre machos infectados e fêmeas não infectadas, enquanto que fêmeas infectadas podem acasalar com machos que abrigam ou não a bactéria sem que haja nenhum resultado deletério na prole (WERREN et al., 2008; LEPAGE; BORDENSTEIN, 2013; ZUG; HAMMERSTEIN, 2015). A IC acontece porque o esperma de machos se torna incompatível com os ovos de fêmeas que carregam a bactéria, em decorrência de alterações na progressão da mitose que levam à eliminação dos cromossomos paternos e formação de um embrião haplóide (WERREN et al., 2008; SARIDAKI; BOURTZIS, 2010; LEPAGE; BORDENSTEIN, 2013). Os defeitos do processo mitótico são resgatados na fertilização de uma fêmea infectada com a mesma cepa; entretanto esse resgate não acontece caso o cruzamento seja feito entre hospedeiros que carregam cepas diferentes (LEPAGE; BORDENSTEIN, 2013). A incompatibilidade citoplasmática é particularmente alta em espécies de

mosquitos e é tipicamente associada a taxas de 90 a 100% na falha da eclosão dos ovos (MOUSSON et al., 2010).

Em certas situações a *Wolbachia* também pode levar a efeitos negativos nos hospedeiros não relacionados à manipulação reprodutiva; por exemplo, a presença da bactéria em alguns hospedeiros é capaz de levar a redução do tempo de vida. Como foi descrito na relação entre *Drosophila melanogaster* e a cepa variante de laboratório denominada wMelPop, cepa considerada altamente virulenta e capaz de infectar a maioria dos tecidos deste hospedeiro (MIN; BENZER, 1997). Da mesma forma algumas infecções induzem efeitos desfavoráveis em outros aspectos do fitness dos hospedeiros. Em algumas espécies de mosquitos, tais como em *Culex quinquefasciatus*, a infecção por *Wolbachia* leva à redução das taxas de fecundidade e fertilidade (ALMEIDA et al., 2011). Existem ainda casos nos quais a bactéria é capaz de reduzir a competitividade de machos para o acasalamento (JOSHI et al., 2014).

Por outro lado, em determinados casos a *Wolbachia* pode conferir efeitos benéficos ao fitness dos hospedeiros caracterizando um tipo de relação mutualística. Em *Ae. albopictus* e em determinadas espécies de *Culex* a presença da bactéria induz, na verdade, um aumento do tempo de vida (BIAN et al., 2010; ALMEIDA et al., 2011). Em teoria, a indução de efeitos positivos facilitaria a invasão da bactéria nas populações de hospedeiros auxiliando a sua persistência, ainda que ela seja capaz de levar simultaneamente a alguma das formas de parasitismo reprodutivo. Nesse sentido os exemplos citados anteriormente mostram que uma distinção clara entre parasitismo e mutualismo nas relações *Wolbachia* hospedeiro nem sempre é possível (ZUG; HAMMERSTEIN, 2015).

Nos dias de hoje existem métodos de transinfecção que permitem explorar a biologia de *Wolbachia* e suas diferentes formas de interação com o hospedeiro (HUGHES; RASGON, 2014); tais técnicas baseiam-se na realização de microinjeções em embriões após um período de adaptação da bactéria em linhagens de células (MCMENIMAN et al., 2009; HUGHES; RASGON, 2014). A transinfecção representa uma importante ferramenta para o controle das doenças transmitidas por vetores, uma vez que permite que

associações com espécies de importância médica sejam examinadas na busca de fenótipos desejáveis. Um dos exemplos mais importantes nesse contexto inclui a criação de linhagens de mosquitos *Ae. aegypti* abrigando diferentes cepas de *Wolbachia* (MCMENIMAN et al., 2009, WALKER et al., 2011).

A introdução da cepa wMelPop leva a diversos efeitos no *Ae. aegypti*, assim como no modelo de *Drosophila*, sendo observada a redução do tempo de vida dos mosquitos e modificações em seu comportamento alimentar de acordo com a idade (MCMENIMAN et al., 2009; TURLEY et al., 2009). Estudos posteriores mostraram também que essa cepa leva ao aumento da atividade diurna e das taxas metabólicas nos mosquitos infectados (EVANS et al., 2009). Outra transinfecção do *Ae. aegypti*, com a cepa wMel também tem sido amplamente estudada pois, além de se distribuir amplamente no corpo do inseto é menos virulenta, não levando a grandes alterações fisiológicas. Foi detectado pouco efeito sob traços importantes no fitness como fecundidade e fertilidade, diferente do que foi comprovado para a cepa wMelPop, e a wMel não levou a diminuição considerável no tempo de vida (MCMENIMAN et al., 2009; WALKER et al., 2011). Os fenótipos induzidos pelas diferentes cepas no mesmo hospedeiro comprovam que os efeitos mediados por *Wolbachia* são específicos em cada associação estudada.

1.6 A interferência a patógenos em infecções artificiais

A capacidade de interferência a patógenos é mais um efeito benéfico conferido por *Wolbachia* em seus hospedeiros, e pode ser definido como a capacidade de restringir a infecção por determinado patógeno, sem levar em consideração as alterações que tal fenótipo pode causar ao fitness (ZUG; HAMMERSTEIN, 2015). Este efeito foi inicialmente observado em moscas da fruta *D. melanogaster*, nas quais a bactéria foi capaz de reduzir a carga viral e a mortalidade induzida pelo Drosophila C vírus. Foi demonstrado posteriormente que devido à presença de *Wolbachia* essas moscas apresentavam resistência a diversos outros vírus de RNA (HEDGES et al., 2008; TEIXEIRA et al., 2008; OSBORNE et al., 2009).

As descobertas baseadas em modelos de *Drosophila* e o fato deste endossimbionte infectar naturalmente várias espécies artrópodes despertaram interesse na possibilidade da capacidade de interferência se estender a insetos vetores de doenças humanas. Curiosamente, *Wolbachia* não é comumente encontrada em espécies de grande importância médica como a maioria dos mosquitos do gênero *Anopheles spp* ou no mosquito *Ae. aegypti*; esse último representa um dos mais importantes exemplos onde a transinfecção com *Wolbachia* é capaz de induzir forte interferência a patógenos. Linhagens de *Ae. aegypti* infectadas com a cepa virulenta, wMelPop, se mostraram altamente refratárias a infecção por vírus dengue; vírus Chikungunya e o *P. gallinaceum* (MCMENIMAN et al., 2009; MOREIRA et al., 2009). Outros trabalhos mostraram que a cepa wMelPop é capaz de levar a interferência ao vírus da febre amarela, e ao vírus do Oeste do Nilo em *Ae. aegypti*. Essa bactéria também pode ser usada no controle de doenças causadas por vermes nematóides, já tendo sido relatado seu efeito na interferência contra a infecção de mosquitos com microfilárias da espécie *Brugia pahangi* (KAMBRIS et al., 2009)

O *Ae. aegypti* abrigando a cepa wMel também mostrou intensa resistência ao vírus dengue. Os resultados revelaram que somente 12,5% dos mosquitos infectados com *Wolbachia* apresentaram disseminação do vírus no corpo e, ainda assim essas taxas de infecção foram cerca de três vezes mais baixas em comparação à linhagem não transinfectada (WALKER et al., 2011). Infecções estáveis de mosquitos *Aedes* com outras cepas de *Wolbachia* também tem sido estudadas. A estirpe wAlbB foi capaz de se fixar em populações de *Ae. aegypti* em laboratório, levando também a interferência ao vírus dengue (BIAN et al., 2010). A substituição das cepas wAlb nativas de *Ae. albopictus* pela cepa wMel também é capaz de levar a redução parcial da infecção viral por dengue nas glândulas salivares e limitar sua transmissão (MOUSSON et al., 2012).

Após essas descobertas, um programa baseado na soltura de mosquitos *Ae. aegypti* infectados com *Wolbachia* já vem sendo desenvolvido: o *Eliminate Dengue Program* (www.eliminatedengue.org). Esta iniciativa vem sendo aplicada em diversos países como a Austrália, Indonésia, Vietnã,

Colômbia e Brasil. Foi iniciado com a soltura de uma linhagem de mosquitos infectados com a cepa wMel, na região de Cairns na Austrália, onde a *Wolbachia* invadiu com sucesso as populações locais de *Ae. aegypti*, chegando à fixação em poucos meses (HOFFMANN et al., 2011). Dados posteriores comprovaram que a capacidade das populações em bloquear o vírus dengue persiste após o processo de soltura, mostrando que o controle baseado no uso *Wolbachia* tem grande potencial para reduzir a transmissão da dengue (FRENTIU et al., 2014). Por outro lado, a abordagem baseada na liberação de mosquitos *Ae. aegypti* transinfectados com a cepa wMelPop não se mostrou bem sucedida. Após a finalização do período de solturas no norte da Austrália e na região central do Vietnã foi observada considerável diminuição da frequência de *Wolbachia* nos locais de estudo, sendo esta rapidamente perdida. Este resultado está diretamente relacionado aos efeitos negativos que a wMelPop induz no fitness dos mosquitos, limitando a utilização desta cepa de *Wolbachia*, ainda que ocorra forte propriedade de interferência ao vírus dengue (NGUYEN et al., 2015).

A introdução artificial também foi estabelecida em mosquitos do gênero *Anopheles*, contudo essas infecções são em sua grande maioria transientes, isto é, não serão transmitidas pela fêmea para a geração seguinte devido a limitações da bactéria para invadir as células germinativas do hospedeiro (KAMBRIS et al., 2010 ; HUGHES et al., 2011). Em *An. stephensi*, principal transmissor da malária na Índia, a transinfecção com a cepa wAlbB foi capaz de levar a resistência ao *P. falciparum* e induzir altos níveis de incompatibilidade citoplasmática (BIAN et al., 2013), mostrando que pode ser uma boa candidata para o controle da malária no futuro. A interferência contra a patógenos também foi comprovada em fêmeas de *An. gambiae* com uma infecção transiente com a cepa wMelPop, quando os insetos foram capazes de reduzir de 75 a 84% os níveis de infecção por *P. berghei* sem causar alterações na sua longevidade (JIN et al., 2009; KAMBRIS et al., 2010). Este fato sugere que *Wolbachia* tem grande potencial para o controle da malária em múltiplos anofelinos uma vez que as transinfecções sejam desenvolvidas. Recentemente Baldini e colaboradores (2014) relataram a primeira identificação de uma infecção natural por *Wolbachia* em populações de *An.*

gambiae na África. O seqüenciamento do genoma das amostras sugeriu que a bactéria pertence a uma cepa geneticamente distinta denominada *wAnga*. A evidência de infecção por *Wolbachia* em populações naturais de anofelinos promove novas perspectivas sobre o uso da bactéria para limitar a transmissão da malária (BALDINI et al., 2014).

1.7 Fatores determinantes na interferência contra patógenos

Os mecanismos moleculares por trás da capacidade antipatogênica de *Wolbachia* ainda não estão completamente esclarecidos, entretanto existem hipóteses que apontam alguns dos fatores que podem levar a esse efeito. Um dos aspectos de maior relevância na interferência a patógenos é a densidade de *Wolbachia*; diversos trabalhos tem verificado que a intensidade deste fenótipo acontece de forma proporcional à abundância da bactéria presente nos hospedeiros (OSBORNE et al., 2009; MARTINEZ et al., 2014; MICIELI; GLASER, 2014). Em *Drosophila simulans*, infectada com múltiplas cepas de *Wolbachia*, foi comprovado que apenas as cepas presentes em densidades elevadas, foram capazes de conferir bloqueio ao *Drosophila C-vírus* (OSBORNE et al., 2009, 2012). Tal hipótese foi igualmente testada em células de *Ae. aegypti*, onde foi visto considerável inibição do vírus dengue somente em linhagens que apresentavam altas densidades de *Wolbachia* (FRENTIU et al., 2010). Em recente estudo Martinez e colaboradores (2014) demonstraram como variações na capacidade de interferência a patógenos podem ser explicadas por diferenças na densidade de *Wolbachia*. O estudo desenvolvido com 19 cepas comprovou existir grande variedade na densidade relativa, de forma que a estirpe com maior densidade (*wMelCS*) possuía 114 vezes mais *Wolbachia* do que a cepa com menor densidade. Mais uma vez foi constatado que moscas do gênero *Drosophila* com maiores densidades da bactéria apresentavam redução da infecção pelos vírus DCV e Flock house vírus (**Figura 5**) (MARTINEZ et al, 2014).

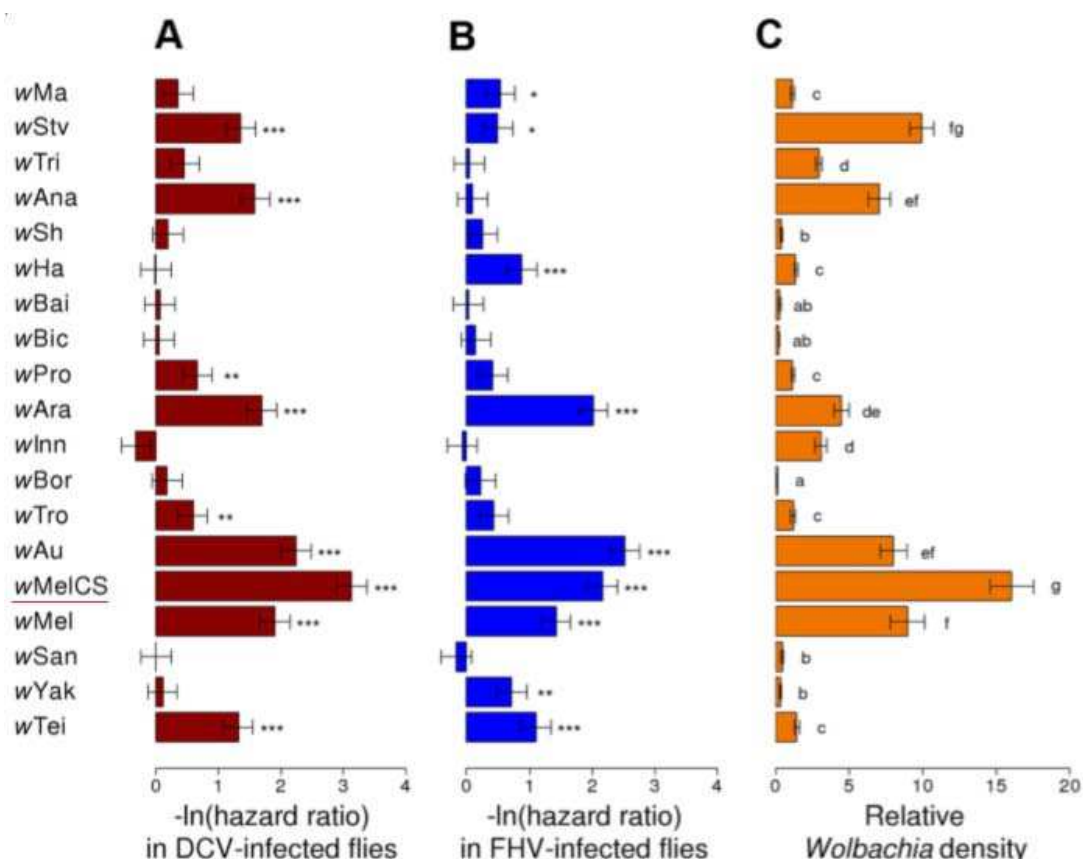


Figura 5: Diferentes cepas de *Wolbachia* em *Drosophila* e seus respectivos níveis de proteção ao DCV vírus (A) e ao FHV vírus (B) de acordo com a densidade no hospedeiro (C). Os níveis de proteção são dados com base na sobrevivência das moscas após a infecção pelos vírus, os dados são expressos em log natural negativo da taxa de risco (hazard ratio, a razão entre a probabilidade de morte de uma mosca infectada com *Wolbachia* pela probabilidade da morte de uma mosca não infectada) (Adaptado de MARTINEZ, et al., 2014).

Em comparação com as transinfecções, as infecções nativas apresentam menor densidade e distribuição mais restrita nos tecidos do hospedeiro. Moreira e colaboradores (2009) exemplificaram esse fato ao demonstrarem que a cepa *wFlu* nativa e *Ae. fluviatilis* estava presente somente nos ovários, túbulos de Malpighi e cabeça do mosquito, enquanto que na infecção artificial por *wMelPop* em *Ae. aegypti* a bactéria é encontrada em quase todos os tecidos e com densidade cerca de 20 vezes maior (MOREIRA et al., 2009). As diferenças na densidade de *Wolbachia*, entretanto, não são restritas ao fato da associação ser artificial ou natural, podendo ser observadas também em um mesmo hospedeiro. Alguns trabalhos mostraram que a carga de *Wolbachia* em *Cx. pipiens* pode variar até 100 vezes entre indivíduos e também entre populações, fator este importante que pode levar a diferenças na

interferência contra patógenos e na competência vetorial (GLASER; MEOLA, 2010).

Alguns autores indicam ainda que pode haver uma competição entre *Wolbachia* e os patógenos por recursos intracelulares. A competição por colesterol, por exemplo, é uma parte importante do mecanismo de interferência, pois foi constatado que a criação de moscas *D. melanogaster* com dietas enriquecidas com colesterol leva à queda da capacidade de interferência ao *Drosophila C* vírus (CARAGATA et al., 2013). Existem estudos que mostram que a bactéria é capaz de induzir uma ativação da resposta imunológica nos hospedeiros tornando-os menos susceptíveis a determinados patógenos (KAMBRIS et al., 2009; MOREIRA et al., 2009; BIAN et al., 2010). Nesse sentido foi comprovado que *Wolbachia* é capaz de induzir a um stress oxidativo, levando um aumento de espécies reativas de oxigênio que por sua vez ativam a via Toll, via de sinalização essencial para a expressão de antioxidantes e de peptídeos antimicrobianos (PAN et al., 2012). Também existe a participação de *Wolbachia* na ativação de outras vias como IMD e JAK-STAT e na ativação do RNA de interferência (MOREIRA et al., 2009; PAN et al., 2012; RANCÈS et al., 2012).

A maioria dos casos onde é observada a ativação do sistema imune envolve hospedeiros que apresentam relação mais recente com a bactéria, enquanto que tal processo não costuma ocorrer em relações naturais. Rancès e colaboradores (2012), por exemplo, analisaram a capacidade de bloqueio ao vírus dengue na associação nativa entre *wMelPop* e *D. melanogaster* e constataram que o bloqueio não estava relacionado à super expressão de genes de imunidade (RANCÈS et al., 2012, 2013). Por esse ângulo, existe uma suposição de que após o processo de invasão e adaptação na população de hospedeiros, a ativação da resposta imune e demais efeitos conferidos pela transinfecção podem se atenuar ao longo do tempo restando somente o parasitismo reprodutivo para manter *Wolbachia* na população (ZUG; HAMMERSTEIN, 2015). A transinfecção é apontada como a principal causa da forte indução da resposta imune, sendo assim o efeito anti-patogênico também poderia ser temporário tornando-se semelhante as infecções nativas ao longo da coevolução *Wolbachia* e hospedeiro (ZUG; HAMMERSTEIN, 2015).

1.8 As relações naturais *Wolbachia* - hospedeiro em mosquitos e a interferência a patógenos

Os fatores apontados como responsáveis pela interferência a patógenos, tais como a elevada densidade e a ativação da resposta imune, em geral não estão presentes nas relações nativas. Em hospedeiros naturalmente infectados o processo de interferência a patógenos é bastante variável. Em grande número de casos a *Wolbachia* não leva a interferência, mas também é possível encontrar associações onde será percebida capacidade de bloqueio ou até mesmo o aumento da infecção (LU et al., 2012; ZUG; HAMMERSTEIN, 2015).

A combinação entre *Cx. pipiens* e *Wolbachia* é um bom exemplo de associação com longa história evolutiva onde é possível observar interferência a patógenos. Este mosquito é um vetor natural do vírus do Oeste do Nilo (WNV) e também apresenta uma infecção natural com a cepa wPip que é capaz de torná-lo resistente à infecção pelo *P. relictum*, um parasita da malária aviária (ZÉLÉ et al., 2012). A interferência a patógenos também foi descrita para *Cx. quinquefasciatus*, outro vetor natural do (WNV), no qual a ausência da bactéria leva um aumento de 2 a 3 vezes nas taxas de disseminação do vírus (GLASER; MEOLA, 2010). Resultados similares foram observados em populações específicas com maiores densidades de *Wolbachia* que se mostraram ainda mais refratárias a esse vírus (MICIELI; GLASER, 2014). Dados como este são relevantes, pois tratam de relações naturais parasito-vetor e demonstram a capacidade de cepas nativas de *Wolbachia* em inibir a infecção de mosquitos reduzindo assim a sua capacidade vetorial (ZÉLÉ et al., 2012; MICIELI; GLASER, 2014).

Existem situações onde efeitos diferentes podem ser presenciados diante de uma mesma associação entre *Wolbachia* e hospedeiro; Baton e colaboradores (2013), por exemplo, observaram que em alguns casos *Wolbachia* não interfere na infecção por *P. gallinaceum* no mosquito *Ae. fluviatilis*, enquanto que em algumas situações foi constatado um aumento da carga de oocistos do parasito (BATON et al., 2013). Efeitos variáveis também já foram observados em *Ae. albopictus* infectado com duas cepas de *Wolbachia*, em geral a infecção não afeta a replicação do vírus Chikungunya

(CHIKV). Entretanto existem casos onde foi relatado que a bactéria induziu o aumento da replicação do CHIKV de 10^5 para 10^8 cópias virais (MOUSSON et al., 2010). O aumento da infecção nessa associação natural coincidiu com um período onde foi detectada queda na densidade de *Wolbachia* (MOUSSON et al., 2010).

Apesar de acontecer em um nível bem menor em relação às cepas transinfectadas, também pode existir bloqueio ao vírus dengue na relação *Ae. albopictus* e *Wolbachia*. Em uma linhagem de mosquitos originados da ilha La Reunion, França, local altamente endêmico para CHIKV, foi demonstrado que *Wolbachia* foi capaz de limitar a disseminação do vírus dengue e impedir sua chegada às glândulas salivares, sugerindo que a bactéria torna o *Ae. albopictus* um vetor menos eficaz para dengue naquela região (MOUSSON et al., 2012). Em contrapartida, em outros estudos com a mesma espécie foi detectada 100% de infecção por CHIKV nas cabeças dos mosquitos, taxa similar aos mosquitos que foram tratados para remoção da bactéria, mostrando que a mesma também pode levar a um efeito de interferência nulo (BIAN et al., 2010). Os exemplos descritos anteriormente mostram que os fenótipos de interferência são dependentes das populações de mosquitos envolvidas como também da infectividade e genótipos dos patógenos utilizadas (BIAN et al., 2010; MOUSSON et al., 2010, 2012).

A relação entre a densidade e capacidade de interferência indicaria, em teoria, que em infecções nativas esse fenótipo dificilmente poderia ocorrer diante de altas cargas patogênicas. Se houver possibilidade de o fenótipo de interferência ser perdido gradualmente, ou parcialmente, pode existir uma capacidade latente de bloqueio que se manifeste sob certas condições, como por exemplo, diante da infecção com baixas cargas patogênicas. Sendo assim é importante estudar as diferentes associações entre a bactéria e os hospedeiros para compreender a variabilidade inerente da capacidade de bloqueio a patógenos, e para compreender o grau de semelhança desse fenótipo entre associações nativas e não nativas, fornecendo informações para futuros programas de controle de vetores envolvendo *Wolbachia*.

2 JUSTIFICATIVA

A dengue e a malária são exemplos de doenças transmitidas por vetores que apresentam grande importância para a saúde global, sendo uma problemática que associa o elevado número de casos com a inexistência de vacinas (. As medidas atuais de controle tem se mostrado insuficientes para limitar a transmissão, levando a necessidade da criação de novas estratégias. Uma nova abordagem para controle dessas doenças é a utilização da bactéria *Wolbachia*, que já está sendo aplicada em situações de campo com foco principal na sua capacidade de induzir ao fenótipo de bloqueio a patógenos (FRENTIU et al., 2014; HOFFMANN et al., 2014).

Com o advento de técnicas de transinfecção têm sido possível criar associações em hospedeiros que não apresentam infecção natural com *Wolbachia*, principalmente em espécies importantes na transmissão de doenças (HUGHES; RASGON et al., 2014). Entretanto existem grandes diferenças entre as transinfecções e as relações nativas que são determinantes para o tipo de resposta observado após a infecção com determinado patógeno. Em geral, esse fenótipo tem sido apontado principalmente em relações não nativas de *Wolbachia* devido a alta densidade da bactéria em virtude do processo de transinfecção (ZUG; HAMMERSTEIN, 2015). Por outro lado é mais comum que em relações nativas *Wolbachia* induza pouco ou nenhum efeito de interferência (MOREIRA et al., 2009; BATON et al., 2013; DODSON et al., 2014).

Apesar de levarem a efeitos de interferência a patógenos menos consistentes, o estudo das associações nativas de *Wolbachia* não deve ser desprezado, pois estas associações apresentam uma longa história evolutiva, e dizem muito a respeito dos fenótipos que podem ser observados em hospedeiros transinfectados em longo prazo (ZUG; HAMMERSTEIN, 2015; ZELÉ et al., 2014). Nessas relações pode haver uma diminuição na densidade de *Wolbachia* em consequência da sua co- evolução com o hospedeiro, é possível que seja observado também uma atenuação na capacidade de interferência, uma vez que a densidade da bactéria influencia fortemente esse fenótipo (ZUG; HAMMERSTEIN, 2015; HOFFMANN; PERRAN, 2015).

Entretanto não existe nenhuma evidência de que esta evolução poderia ocorrer rapidamente, o que torna relevante investigar demais fatores relacionados a capacidade de bloqueio a patógenos para melhor caracterizar esse fenótipo e compreender suas possíveis mudanças em situações naturais.

Pouco se sabe atualmente sobre como a capacidade de interferência pode mudar de acordo com a carga patogênica adquirida pelo vetor e se diferentes espécies de patógenos podem ser afetados por *Wolbachia* da mesma maneira. Sendo assim é importante compreender como esses aspectos influenciam a capacidade de interferência a patógenos com o intuito de melhor caracterizar esse fenótipo, dado sua relevância para o uso da *Wolbachia* como medida de controle de doenças. E devido ao fato de as transinfecções poderem evoluir de forma a serem parecidas com as infecções nativas, é necessário identificar semelhanças e diferenças nos padrões de resposta dessas diferentes associações, para gerar informações úteis que podem ser usadas no monitoramento de mosquitos transinfectados liberados em campo.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Comparar a capacidade de bloqueio de *Wolbachia* a infecção pelo *P. gallinaceum* e ao Dengue vírus na relação nativa entre a cepa wFlu e o mosquito *Ae. fluviatilis* e também na transfecção entre a cepa wMel e o *Ae. aegypti*.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar se a infecção natural com a cepa wFlu pode levar a algum fenótipo de interferência diante de baixas cargas parasitárias.
- Analisar se o aumento da susceptibilidade do inseto vetor a determinado patógeno está relacionado ao aumento da carga parasitária.
- Determinar se a capacidade de bloqueio pode mudar frente à infecção por diferentes patógenos nas espécies *Ae. fluviatilis* e *Ae. aegypti*.
- Determinar se o *Ae. fluviatilis* pode adquirir infecção com Dengue, e se a cepa nativa wFlu leva a alguma capacidade de bloqueio a esse vírus.
- Levantar informações sobre os efeitos biológicos das infecções nativas por *Wolbachia* em mosquitos.

4 METODOLOGIA

4.1 Linhagens de mosquitos utilizadas

Os mosquitos *Aedes fluviatilis*, naturalmente infectados com a cepa wFlu de *Wolbachia*, foram provenientes de populações de campo e vem sendo mantidos no insetário por quase 40 anos, sendo as colônias originais primeiramente estudadas por Cônsoli (1976). A linhagem de mosquitos *Aedes aegypti* utilizada, foi gerada através do cruzamento entre mosquitos brasileiros de campo e mosquitos australianos infectados artificialmente via microinjeção de embriões com a cepa wMel (WALKER et al., 2011; DUTRA et al., 2015). Os grupos controle consistiram em linhagens de mosquitos infectados com a cepa wFlu ou wMel brasileira que passaram por um tratamento com o antibiótico tetraciclina para remoção de *Wolbachia* conforme proposto por Dobson e colaboradores (2001). Para isso foi oferecido para os mosquitos das duas linhagens uma solução de sacarose a 10% contendo 0,1 mg/mL de hidrocloreto tetraciclina (Sigma) durante três gerações consecutivas; após esse período as linhagens passaram por um processo de recolonização de sua microbiota natural antes de serem utilizadas nos experimentos, esse processo se deu com a utilização da água das bandejas usadas para a criação de outras linhagens, assumindo que parte da microbiota natural desses insetos é adquirida por meio da ingestão (DUTRA et al., 2015; BATON et al., 2013).

A presença e ausência de *Wolbachia* nestas linhagens foi monitorada através de PCR em tempo real a cada geração para as linhagens wFlu e wMel, e a cada três gerações para linhagens tratadas. Nas reações de PCR para monitoramento das linhagens de *Aedes fluviatilis* foram utilizados primers do gene de superfície de *Wolbachia* (wsp) que já foram descritos por sua capacidade em amplificar uma variedade de cepas de *Wolbachia* de diferentes supergrupos (MOREIRA et al., 2009). As colônias de *Ae. aegypti* por sua vez foram monitoradas via sistema Taqman[®] com os seguintes primers e sondas:

Tabela 1: Sequência dos primers para monitoramento da infecção por *Wolbachia* e por vírus Dengue em mosquitos *Aedes aegypti*

Iniciador	Sequência
RpS17 F:	5'-TCCGTGGTATCTCCATCAAGC-3'
RpS17 R:	5'- ACTTCCGGCACGTAAGTTGTC-3'
RpS17 Probe:	5'-FAM-CAGGAGGAGGAACGTGAGCGCAG- QSY-3'
TM513 F:	5' - CAAATTGCTCTTGTCCTGTGG -3'
TM513 R:	5' - GGGTGTTAAGCAGAGTTACGG -3'
TM513 Probe	5'Cy5-TGAAATGGAAAAATTGGCGAGGTGTAGG-BHQ3 -3'
wsp F	5'- ATC TTT TAT AGC TGG TGG TGG T -3'
wsp R	5'- GGA GTG ATA GGC ATA TCT TCA AT -3'
3'DENV F:	5'-AAGGACTAGAGGTTAGAGGAGACCC-3
3'DENV R:	5'-CGTTCTGTGCCTGGAATGATG-3'
3'DENV Probe:	5'- ABY/HEX- AACAGCATATTGACGCTGGGAGAGACCAGA- QSY -3'

Fonte: FRENTIU et al.,2014. DUTRA et al.,2015.

4.2 Manutenção das colônias de *Aedes aegypti* e *Aedes fluviatilis*

As espécies de mosquitos utilizadas neste trabalho foram criadas em condições de insetário a uma temperatura média de 27°C $\pm$ 1°C, umidade relativa do ar média de 80% $\pm$ 10% e fotoperíodo de 12 horas. As larvas eram mantidas em bandejas de 40x29x18 cm com aproximadamente 3 litros de água desclorada a uma densidade média de 200 larvas por bandeja. As larvas de *Ae. aegypti* eram alimentadas com ração de peixe (Tetramin tablets) (meio *pellet* por bandeja) sempre que necessário, enquanto que as larvas de *Ae. fluviatilis* receberam em média 15 *pellets* de ração de peixe Goldfish Colour por dia. As pupas foram coletadas diariamente e colocadas em copos plásticos descartáveis dentro de gaiolas. Os mosquitos ao emergirem recebiam solução de sacarose a 10% (p/v) que era trocada duas vezes por semana.

As fêmeas de *Ae. aegypti* de colônia são alimentadas em sangue humano semanalmente em condições artificiais com a utilização de alimentadores de vidro e membrana de intestino suíno na base. O sangue oferecido às fêmeas é proveniente de banco de sangue, sendo previamente testado para a presença do vírus dengue com a utilização do kit Dengue NS1 Ag Strip® (BioRad). Três dias após a alimentação sanguínea um recipiente plástico contendo água e papel filtro é colocado na gaiola para a realização da postura dos ovos. As fêmeas de *Ae. fluviatilis*, por sua vez, são alimentadas em sangue de camundongo (CEUA-LW49/10), previamente anestesiados por via intraperitoneal com Thiopentax (Tiopental sódico); sendo a postura coletada após três dias, em copos plásticos sem a utilização de papel filtro. Após 48 horas os ovos de ambas as espécies são retirados das gaiolas; sendo os ovos de *Ae. fluviatilis* transferidos diretamente para bandejas plásticas com água, enquanto que os ovos de *Ae. aegypti* passam por um processo de secagem por cerca de 48 horas antes de serem colocados para eclosão.

4.3 Manutenção da cepa de *Plasmodium gallinaceum*

Aves *Gallus gallus* de uma a duas semanas de idade foram infectadas através do inóculo intramuscular de 200 µl de sangue de outra ave previamente infectada com *Plasmodium gallinaceum* (cepa 8A, isolado de Brumpt, 1937), sendo a parasitemia acompanhada por esfregaços sanguíneos corados com Giemsa (**Anexo 01**). A parasitemia corresponde a taxa de hemácias infectadas no esfregaço sanguíneo a cada 1000 hemácias contadas, já a gametocitemia é a porcentagem de gametócitos encontrada entre as formas infectantes.

Foram utilizadas aves com parasitemia de até 20% e gametocitemia ascendente para realização das passagens, sendo realizadas desta maneira por no máximo 5 vezes consecutivas, quando então o ciclo sexual era completado através da alimentação sanguínea dos mosquitos nas aves infectadas. Após 15 dias do repasto infectante, tempo necessário para se encontrar esporozoítos nas glândulas salivares, foi realizado um novo repasto em aves sadias para restabelecimento do ciclo, procedimento importante para garantir que a infectividade da cepa não fosse perdida ao longo dos

experimentos. A utilização das aves nesses experimentos teve a aprovação do comitê de ética no uso de animais (CEUA LW-38/12).

4.4 Infecção dos mosquitos com *P. gallinaceum* sob condições semi-naturais

Os mosquitos de ambas as espécies criados conforme descrito no item 4.1, foram separados em gaiolas de papelão (quatro gaiolas para mosquitos infectados com *Wolbachia* – wFlu e wMel, e quatro para mosquitos infectados com *Wolbachia*, linhagens wFlu wMel tratadas com tetraciclina) e privados da solução de sacarose por 24 horas. As aves utilizadas neste experimento foram infectadas conforme descrito anteriormente e a partir de então a parasitemia foi acompanhada diariamente. As aves foram então imobilizadas e colocadas na parte superior das gaiolas de papelão para que os mosquitos realizassem o repasto infectante. Cada par de gaiolas, uma contendo mosquitos com *Wolbachia* (linhagens wFlu ou wMel) e a outra contendo mosquitos sem *Wolbachia* (respectivas linhagens Tet), foi alimentada em um dia diferente e as alimentações foram realizadas durante quatro dias consecutivos o que representou a análise de quatro faixas de parasitemia.

Após a alimentação sanguínea, a solução de sacarose era colocada novamente nas gaiolas e os mosquitos que não realizaram o repasto foram descartados. Passados sete dias as fêmeas foram retiradas das gaiolas, anestesiadas com CO₂ e mantidas em gelo, seus intestinos foram dissecados em PBS 1X e corados com Mercúrio Cromo (2%) para contagem dos oocistos sob microscópio ótico em aumento de 100X. Foram realizados três experimentos independentes para cada par de linhagens wFlu/ Tet e wMel/ Tet, isto é, em cada experimento foram utilizadas aves e mosquitos diferentes, não consistindo em réplicas biológicas (**Figura 06**)

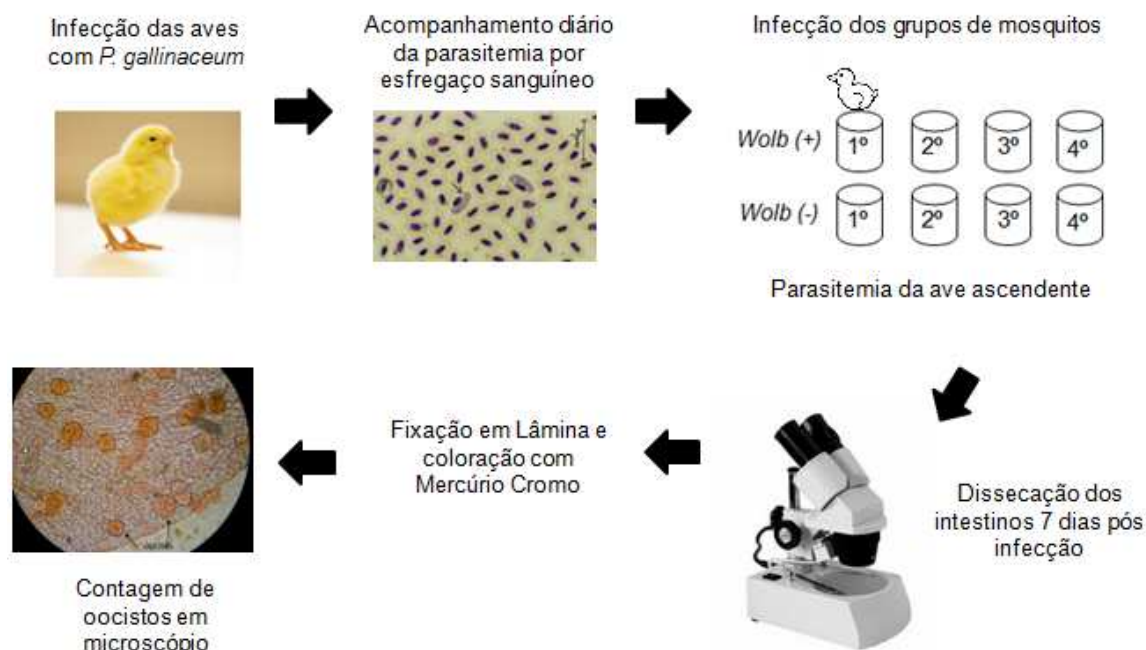


Figura 6: Metodologia do experimento de infecção em condições semi-naturais. O mesmo procedimento foi aplicado para as linhagens wMel e wFlu

4.5 Infecção com *P. gallinaceum* via alimentação artificial (experimento de diluição)

Com o intuito de reduzir a variação das parasitemias avaliadas, realizamos experimentos de infecção dos mosquitos em condições exclusivamente artificiais baseadas na diluição do sangue de uma única ave infectada. Para isso aves de cerca de 10 dias foram infectadas com inóculo controlado de 1×10^6 parasitos, via intramuscular, e a parasitemia acompanhada diariamente. Quando uma das aves atingiu uma parasitemia de aproximadamente 25% o sangue foi coletado (cerca de 6mL via punção cardíaca) em seringas previamente preparadas com Heparina. Cerca do dobro deste volume de sangue também foi coletado de uma ave sem infecção por *P. gallinaceum* e usado para se obter as diluições estudadas. Em capela de fluxo laminar o sangue coletado foi transferido para tubos falcon de 15 ml que foram submetidos a uma dupla centrifugação a 1500rpm, 37°C, 10 minutos para lavagem das hemácias. As hemácias foram então ressuspensas no volume de 1:1 com meio RPMI para cultura de oocinetos suplementado com 40% de

soro de ave inativado a 56°C por 30 minutos para inativação do sistema de complemento. Com base no volume de hemácias obtido após a centrifugação e ressuspensão, foi realizada uma diluição seriada de forma que a próxima diluição recebeu 50% do volume de sangue infectado da concentração anterior e 50% de volume de sangue da ave não infectada. Os procedimentos foram realizados cuidadosamente e em curto espaço de tempo para minimizar a perda de parasitos.

A parasitemia inicial das aves infectadas se manteve em aproximadamente 25%. Com a realização das diluições obtivemos o sangue com parasitemias nas faixas de 12,5%, 6,75%, 3,5% e 1,5% que foram oferecidos aos mosquitos através de sistema de alimentação artificial com a utilização de alimentadores de vidro e membrana de intestino suíno na base. Após a alimentação sanguínea, procedemos da mesma maneira como descrito para os experimentos em condições seminaturais, e assim como nos experimentos em condições seminaturais, os experimentos de diluição foram realizados de maneira independente, onde o sangue infectado foi coletado de diferentes aves nos três experimentos realizados (**Figura 7**).

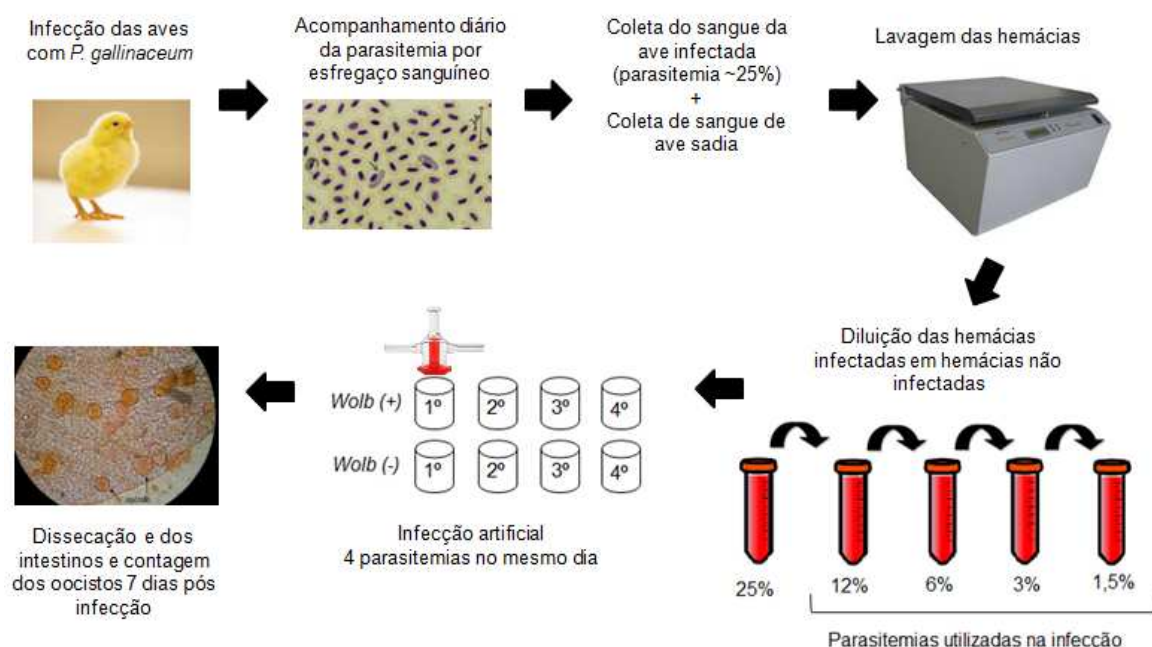


Figura 7: Metodologia do experimento de infecção artificial. O mesmo procedimento foi aplicado para as linhagens wMel e wFlu.

4.6 Efeitos das mudanças na concentração de DENV

Dengue vírus, sorotipo 3, foi obtido através de protocolo de cultivo em células C6/36 (**Anexo 2**) (Amostra 375 MG20, isolada de plasma humano em 06/2012, cedido pelo laboratório de RNA de Interferência, departamento de Imunologia e Bioquímica do Instituto de Ciências Biológicas) foi utilizado para a infecção artificial de mosquitos wMel, wFlu e as respectivas linhagens tratadas com tetraciclina. Foram utilizadas as mesmas alíquotas de vírus que permaneceram armazenadas a -80°C até o momento da alimentação sanguínea. As alíquotas foram tituladas por ensaio de formação de placas e TCDI - 50, de acordo com protocolos anteriormente descritos (MOREIRA et al., 2009). O vírus foi diluído em meio L15 Leibovitz Medium (Gibco®) suplementado com 10% de soro fetal bovino, para se obter a faixa de títulos virais que foram testados. Partindo-se da concentração de 10^6 PFU/mL, obtivemos as concentrações de 10^5 , 10^4 , e 10^3 PFU/mL. O vírus foi misturado em sangue humano, coletado de um voluntário por um profissional treinado, no dia da realização do experimento, e adicionado em sistema de alimentação artificial por membrana aquecido a 37°C . Cerca de 24 horas após a infecção, os mosquitos que não realizaram o repasto infectante foram descartados.

Os mosquitos foram então coletados 7 e 14 dias após a infecção e a extração de RNA foi feita através do método químico de Trizol (Invitrogen). Brevemente, 200 μl desse reagente foi adicionado a um tubo contendo os mosquitos e esferas de vidro de 3 mm, esse material foi então homogeneizado em *beadbeater* (Biospec) e depois adicionado 40 μl de clorofórmio. As amostras foram centrifugadas a 12.000g por 15 minutos a 4°C , o sobrenadante foi cuidadosamente transferido para tubos estéreis e resfriado *overnight* a -20°C com 100 μl de álcool isopropílico. Posteriormente o RNA foi precipitado através de uma centrifugação a 12.000g por 10 minutos a 4°C , o sobrenadante foi descartado e adicionado 200 μl de etanol 75%, seguido de outra centrifugação 7.500g por 5min a 4°C . Finalmente o sobrenadante foi descartado e o precipitado submetido a processo de secagem em temperatura ambiente e depois ressuspensionado em 20 μl de água ultra pura. Logo após a

extração foi feita a dosagem do RNA aplicando-se 2 µl de cada amostra em um leitor NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific).

Para a síntese do DNA utilizamos o kit Promega, sendo utilizado 2 µg de RNA, 2 µl de random primers (C118A) e o volume completado para 14 µl com água livre de DNase/RNase, incubando-se a mistura a 70°C por 5 min. Após este tempo foi adicionado a cada amostra 5 µl de tampão M-MLV, 5 µl de dNTPs (10 mM) e 1 µl de enzima transcriptase reversa M-MLV 200U/ µl. Em seguida as amostras foram incubadas a 37°C por 60 minutos e depois a 70°C por 10 minutos. As cópias virais nos mosquitos infectados com DENV3 foram estimadas a partir de qRT-PCR usando sondas específicas, em comparação com os iniciadores para os genes do RNA ribossomal do mosquito, RPS17 conforme descrito na tabela 1.

4.7 Investigação da capacidade vetorial do *Ae. fluviatilis*

A linhagem wFlu de *Ae. fluviatilis* foi infectada através de alimentação artificial com dengue vírus, sorotipo 3, na titulação de 10⁶ PFU/mL, como descrito no item 4.5. Procedemos com a triagem dos mosquitos não alimentados após 24 horas; e após 14 dias realizamos o processo de coleta da saliva dos insetos antes da coleta das carcaças para proceder com a extração do RNA. Para realizar a coleta da saliva primeiramente removemos a solução de açúcar das gaiolas por um período de cerca de 12 horas, visando aumentar o processo de salivação; em seguida os mosquitos foram anestesiados utilizando CO₂ e deixados em placa de vidro disposta em gelo. Após esse processo, as asas e pernas dos mosquitos foram removidas para evitar a fuga, e a probóscide foi inserida em ponteira plástica de 10 µl com filtro contendo 5 µl de meio IFCS. A solução IFCS foi preparada nos dias da coleta, e consiste de uma solução de açúcar 30% (p/v) suplementada com soro fetal bovino inativado em igual volume. A probóscide dos mosquitos foi mantida nas ponteiras por cerca de 30 minutos e, em seguida a solução presente na ponteira foi transferida para tubos de microcentrífuga de 1,5ml e mantidos a -80°C. Em alguns casos era observada a ingurgitação do abdome dos mosquitos antes de 30 minutos, sendo necessária a coleta da saliva

antecipadamente. A coleta das salivas foi armazenada e analisada individualmente.

Antes de dar continuidade ao procedimento realizamos a extração de RNA e o qRT-PCR dos mosquitos coletados, como método de triagem das salivas estocadas. As amostras de saliva de mosquitos comprovadamente infectados foram utilizadas para realizar microinjeções intratorácicas em mosquitos sadios da linhagem wFlu e, em seguida, mantivemos esses mosquitos em solução de açúcar por cerca de sete dias. Os mosquitos foram coletados inteiros, sendo realizada a extração de RNA pelo método químico de Trizol e estas amostras foram testadas para a presença de infecção pelo dengue vírus. O desenvolvimento de infecção nos mosquitos inoculados com a mistura meio/saliva é uma evidência de que os mosquitos inicialmente utilizados estavam aptos a transmitir o vírus.

Além da inoculação em mosquitos, foi testada também a possibilidade de detecção do dengue vírus diretamente da saliva coletada. Para isso parte das amostras foi selecionada e procedemos com a extração através da utilização do kit High Pure Viral Nucleic Acid (Roche), o protocolo de extração foi seguido conforme as instruções do fabricante reduzindo os volumes dos reagentes para a metade devido ao pequeno volume das amostras. Em termos gerais foram realizados os seguintes passos: adicionamos as amostras de saliva a 100 µl de tampão de ligação suplementado com 25 µl de proteinase K, sendo as amostras incubadas por 10 minutos a 72°C. Essa mistura foi então transferida para uma coluna de separação fixada em um tubo coletor e centrifugadas a 8,000 g por um minuto, em seguida foi adicionado 250 µl de tampão de inibição. As amostras foram submetidas a 3 centrifugações sucessivas de um minuto cada, seguido do descarte do sobrenadante e utilização de novos tubos coletores, finalmente os tubos foram centrifugados a 13.000g por 10 segundos e adicionamos 25 µl do tampão de eluição.

O RNA extraído pelo método químico de Trizol ou pela utilização do Kit foi dosado em nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific), e diretamente aplicado em placas 96 poços para realização de reação qRT-PCR pelo One Step Kit. A

corrida das amostras foi feita em termociclador Light Cycler (Roche), utilizando-se de sonda HEX e os mesmos primers conforme descrito no item 4.1.

4.8 Análise dos dados

O efeito de bloqueio ao *P. gallinaceum* mediado por *Wolbachia* foi avaliado com base na susceptibilidade de infecção, isto é, na porcentagem de mosquitos que se tornam infectados pelo parasito conforme a presença da bactéria e conforme a parasitemia analisada; levando em consideração também a carga de oocistos observada após a dissecação dos intestinos. As análises estatísticas foram feitas utilizando o software SPSS V 17.0 (IBM), usando um modelo linear generalizando (GLM) com distribuição binomial e regressão de Poisson respectivamente.

Utilizamos também o software GraphPad Prism[®] versão 5.0.1, para comparações entre os pares de linhagens infectados ou não por *Wolbachia* a cada parasitemia testada. A avaliação da susceptibilidade foi realizada com base na utilização do Teste de Fisher; enquanto que a abundância de oocistos, e os títulos virais de DENV3 em mosquitos infectados foi realizada com o teste de Mann Whitney.

5 RESULTADOS

5.1 Efeito da cepa wFlu na interferência ao *P. gallinaceum* em *Ae. fluviatilis* (Infecção semi-natural)

Foram realizados três experimentos utilizando as linhagens wFlu e Tet de *Ae. fluviatilis*, sendo os insetos separados em quatro diferentes grupos que receberam sangue diretamente de uma ave infectada por *P. gallinaceum*. As aves utilizadas foram acompanhadas diariamente e apresentavam parasitemia e gametocitemia ascendentes (**Figura 8; Tabela 2**), parâmetros fortemente associados ao longo dos experimentos ($R^2 = 0,898$) (**Figura 14**). Para compreender o efeito da cepa wFlu e das mudanças na carga do patógeno na interferência de infecção no hospedeiro, utilizamos como parâmetros a carga de oocistos e a análise da susceptibilidade, que representa a porcentagem de mosquitos que adquiriram infecção. Tendo em mente que a densidade de *Wolbachia* em hospedeiros naturalmente infectados tende a ser menor e a proporção direta entre a densidade da bactéria e sua capacidade de interferência, nossa hipótese inicial era de que somente os mosquitos wFlu que recebessem baixa carga parasitária apresentassem resistência ao parasito.



Figura 8: Variação da parasitemia na infecção seminatural do *Ae. fluviatilis* com *P. gallinaceum*. Uma única ave foi utilizada no curso do 1º e 2º experimentos. No 3º foram usadas aves diferentes. NA (não se aplica)

Tabela 2: Relação entre parasitemia e gametocitemia nos experimentos com *Ae. fluviatilis*

Dia do experimento		Parasitemia da ave (%)	Gametocitemia da ave (%)
1º Experimento	1º Dia	0,2	< 0,1
	2º Dia	2,7	N.A
	3ª Dia	35,4	17,75
2º Experimento	1º Dia	1,3	<0,1
	2º Dia	2,8	0,9
	3ª Dia	5,3	2,7
	4ª Dia	22,5	6,4
3º Experimento	1º Dia	subpatente	subpatente
	2º Dia	0,7	0,2
	3ª Dia	1,1	0,7
	4ª Dia	5,6	3,0

Fonte: Dados da pesquisa

Os resultados de infecção com *P. gallinaceum* foram bastante variáveis, ainda assim, é possível identificar padrões que demonstram que o aumento da carga de patógeno, a presença de *Wolbachia*, ou a interação entre esses dois fatores não são capazes de levar a mudanças na susceptibilidade do mosquito a este patógeno (GLM; $P > 0,05$). Ao analisarmos os dados entre os pares de linhagens, vimos que em dois dos três experimentos (Experimentos 1 e 2) também não foi detectada diferença significativa na susceptibilidade entre mosquitos wFlu e Tet em nenhuma das parasitemias avaliadas (Fisher's exact test; $P > 0,05$) (**Figura 9**). Somente no experimento três, foi observada susceptibilidade reduzida para a linhagem Tet, na maior parasitemia utilizada (Fisher's exact test; $P = 0,458$).

Apesar de não levar a alterações na susceptibilidade, foi observado que os aumentos na parasitemia que ocorreram com a progressão da infecção nas aves levam ao aumento da carga de oocistos nos mosquitos infectados, fato observado nas linhagens wFlu e Tet em todos os experimentos realizados (Exp. 1 - GLM; $df = 2$, $W = 95,20$, $P < 0,001$), (Exp. 2 - GLM; $df = 3$, $W = 129,795$, $P < 0,001$), (Exp. 3 - GLM; $df = 3$, $W = 1617,85$, $P < 0,001$). O efeito de interferência de *Wolbachia* na carga de oocistos não foi observado nos experimentos 1 e 2, porém no experimento 3 verificamos efeito da infecção por *Wolbachia* (GLM; $df = 3$, $W = 16,566$, $P < 0,001$) e da interação entre este fator e a parasitemia (GLM, $df = 3$, $W = 47,722$, $P < 0,001$) (**Figura 10**). Ao compararmos os efeitos entre os pares de linhagens vimos que somente na segunda parasitemia utilizada no terceiro experimento (0,7%), foi possível detectar número reduzido de oocistos na linhagem wFlu (Mann Whitney U test; $U = 170,5$, $P < 0,001$).

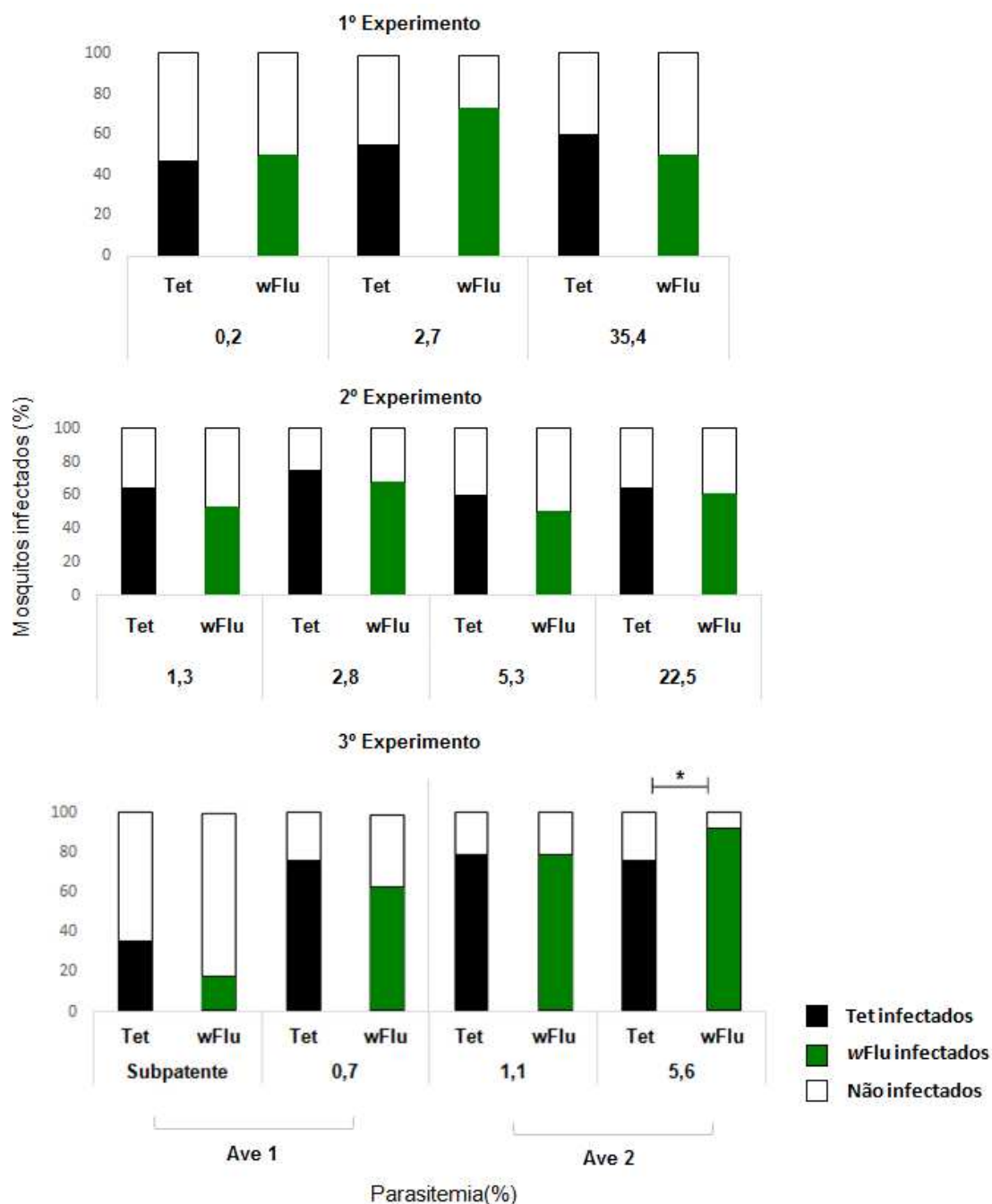


Figura 9: Susceptibilidade de infecção do *Ae. fluviatilis* ao *P. gallinaceum*. Dados representam os resultados dos três experimentos independentes. No experimento 3 foi observado efeito da maior parasitemia (Fisher's exact test; $P = 0,458$) no aumento da suscetibilidade da linhagem wFlu. Estão representados os dois tempos do experimento onde foram usadas diferentes aves. As barras pretas representam a porcentagem de mosquitos infectados, enquanto que as barras brancas representam a porcentagem de mosquitos não infectados. As parasitemias utilizadas nos experimentos são demonstradas em ordem crescente (valores abaixo de cada par de linhagens wFlu e Tet). * = $P < 0,05$. □

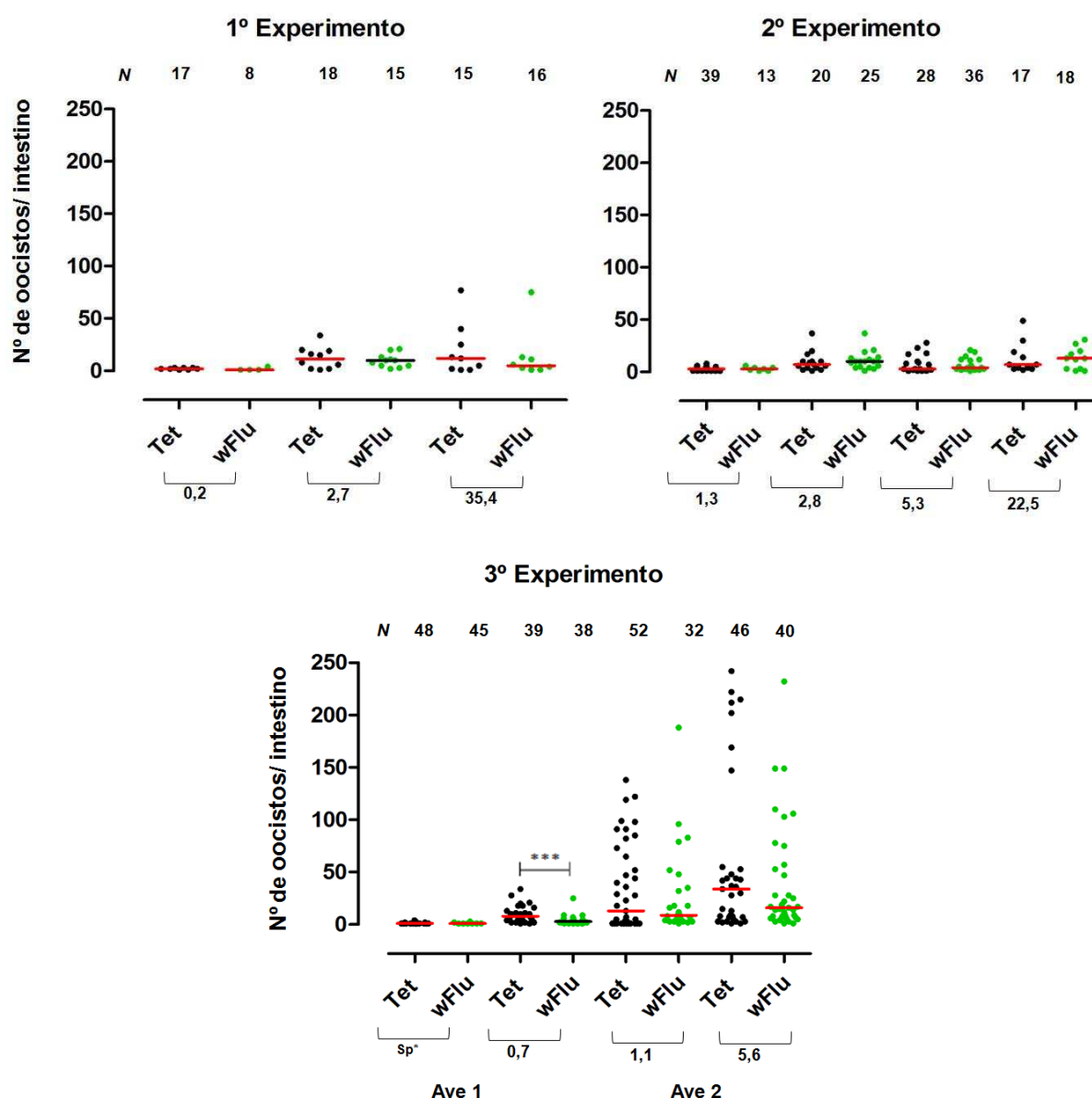


Figura 10: Carga de oocistos de *P. gallinaceum* nos intestinos de *Ae. fluviatilis*. Dados representam os resultados dos três experimentos independentes. Em geral o status de infecção por *Wolbachia* não leva a mudanças na carga de oocistos. No experimento 3 *Wolbachia* foi capaz de levar à redução de oocistos em uma das faixas de parasitemia (0,7% segundo dia de infecção - Fisher's exact test; $P < 0,001$). Os círculos pretos representam a carga de oocistos em mosquitos sem *Wolbachia*, os círculos verdes representam a carga patogênica na linhagem wFlu e as barras vermelhas representam a mediana do número de oocistos. As parasitemias utilizadas são demonstradas em ordem crescente (mesmos valores para susceptibilidade), (Sp* parasitemia subpatente). *** = $P < 0,001$.

5.2 Efeito da cepa wMel na interferência ao *P. gallinaceum* em *Ae. aegypti* (Infecção semi-natural)

A linhagem de mosquitos *Ae. aegypti* utilizados em nossos experimentos abriga a cepa wMel, que foi infectada artificialmente, apresentando então densidade bacteriana é consideravelmente maior se comparada com a cepa natural no *Ae. fluviatilis*. Diante desse fato, nossa hipótese inicial era de que essa cepa fosse capaz de reduzir a suscetibilidade do hospedeiro ao *P. gallinaceum*, inclusive quando este fosse infectado com sangue contendo altas parasitemias. Procedemos da mesma maneira conforme descrito no experimento anterior; realizando 3 experimentos independentes, nos quais comparamos a infecção entre as linhagens wMel e Tet que realizaram o repasto sanguíneo com faixas variáveis de parasitemias (**Figura 11**). Assim como no experimento com o mosquito *Ae. fluviatilis*, a análise do esfregaço sanguíneo das aves mostrou que o aumento da gametocitemia foi proporcional ao aumento da parasitemia (**Tabela 3**).

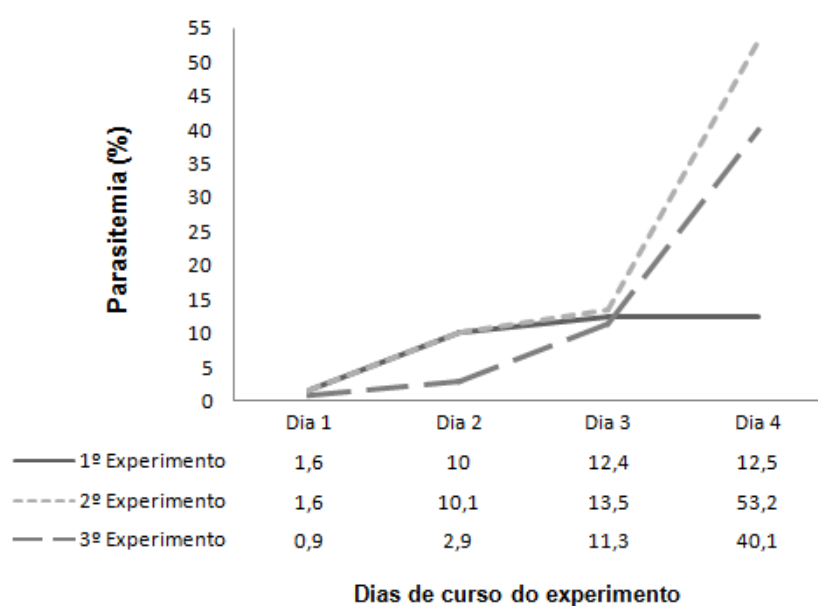


Figura 11: Variação da parasitemia ao longo do experimento de infecção natural do *Ae. aegypti* com *P. gallinaceum*. Foram registradas as parasitemias de uma única ave ao longo do 2º e 3º experimento. No 1º experimento uma ave foi usada nos dois primeiros dias, e a outra ave nos dois últimos dias.

Tabela 03: Relação entre parasitemia e gametocitemia nos experimentos com *Ae. aegypti*

Dia do experimento		Parasitemia da ave (%)	Gametocitemia da ave (%)
1º Experimento	1º Dia	2,6	0,7
	2º Dia	10,0	2,9
	3ª Dia	12,4	7,25
	4º Dia	12,5	4,2
2º Experimento	1º Dia	1,6	0,3
	2º Dia	10,1	1,9
	3ª Dia	13,5	8,4
	4ª Dia	53,2	21,0
3º Experimento	1º Dia	0,9	0,4
	2º Dia	2,9	0,7
	3ª Dia	11,3	4,5
	4ª Dia	40,1	11,1

Fonte: Dados da pesquisa

Foi possível observar variações ainda maiores no conjunto de resultados da infecção do *Ae. aegypti* pelo *P. gallinaceum*; mas em termos gerais constatamos que o status de infecção por *Wolbachia*, a parasitemia ou a interação entre esses fatores também não foram capazes de levar a mudanças significativas na suscetibilidade de infecção nessa associação (GLM; $P > 0,05$). Ao considerarmos o efeito de cada parasitemia entre os pares de linhagens podemos ver que no experimento 1 houve redução da susceptibilidade na linhagem infectada por *Wolbachia* em uma parasitemia intermediária (10,02% -

Fisher's exact test; $P < 0,001$), e nas duas parasitemias subseqüentes que representaram faixas bastante similares (12,4% - Fisher's exact test; $P = 0,0491$) (12,5% - Fisher's exact test; $P = 0,0025$). Nos experimentos 2 e 3 não houve efeito significativo da parasitemia no número de mosquitos que adquiriram infecção (Fisher's exact test; $P > 0,05$) (**Figura 12**).

Variações foram observadas ao analisarmos a carga de oocistos adquirida pelos mosquitos *Ae. aegypti*. A análise global dos dados permite constatar que o efeito da parasitemia (GLM, $df = 1$, $W = 664,435$, $P < 0,001$), do status de infecção por *Wolbachia* (GLM, $df = 1$, $W = 36,464$, $P < 0,01$), e da interação entre esses dois fatores influenciam nos resultados obtidos (GLM, $df = 3$, $W = 114,628$, $P < 0,001$). No experimento 1 a bactéria foi capaz de levar à redução da infecção em mosquitos submetidos a carga parasitária intermediária (10,02%) (Mann Whitney U test; $U = 36,50$; $P < 0,001$), já nas maiores parasitemias (12,5%) foi possível observar um ligeiro aumento na carga de oocistos nos mosquitos wMel (Mann Whitney U test; $U = 569,5$; $P = 0,0483$). No segundo experimento esse efeito não foi observado, de forma que não houve efeito significativo de *Wolbachia* na carga de oocistos em nenhuma das parasitemias avaliadas (Mann Whitney U test; $P > 0,05$). No experimento 3, uma diferença estatística foi observada somente na segunda faixa de parasitemia; onde a bactéria levou a uma redução do número de oocistos em comparação aos grupos Tet (Mann Whitney U test; $U = 166,5$; $P = 0,0201$) (**Figura 13**).

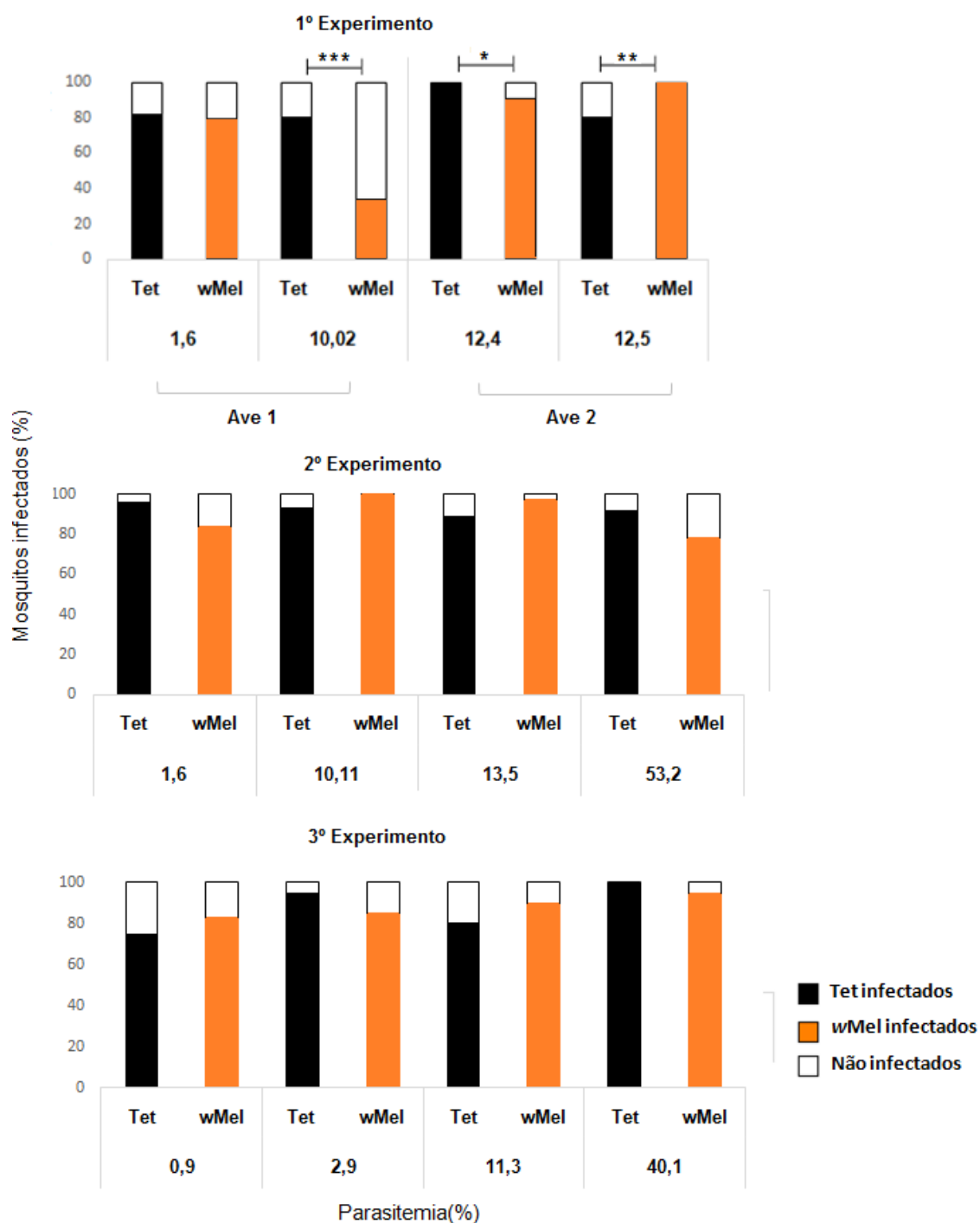


Figura 12: Susceptibilidade de infecção do *Ae. aegypti* ao *P. gallinaceum* Dados representam o resultado de três experimentos independentes. Em geral não há efeito da parasitemia ou da infecção por *Wolbachia* na susceptibilidade. Esse resultado divergiu somente no experimento 1, onde foi observada diferença em três faixas de parasitemia. As barras pretas representam a porcentagem de mosquitos infectados, enquanto que as barras brancas representam os não infectados. As parasitemias utilizadas nos experimentos são mostradas em ordem crescente (valores abaixo de cada par de linhagens Tet e wMel) * = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$; *** = $P < 0,001$. □

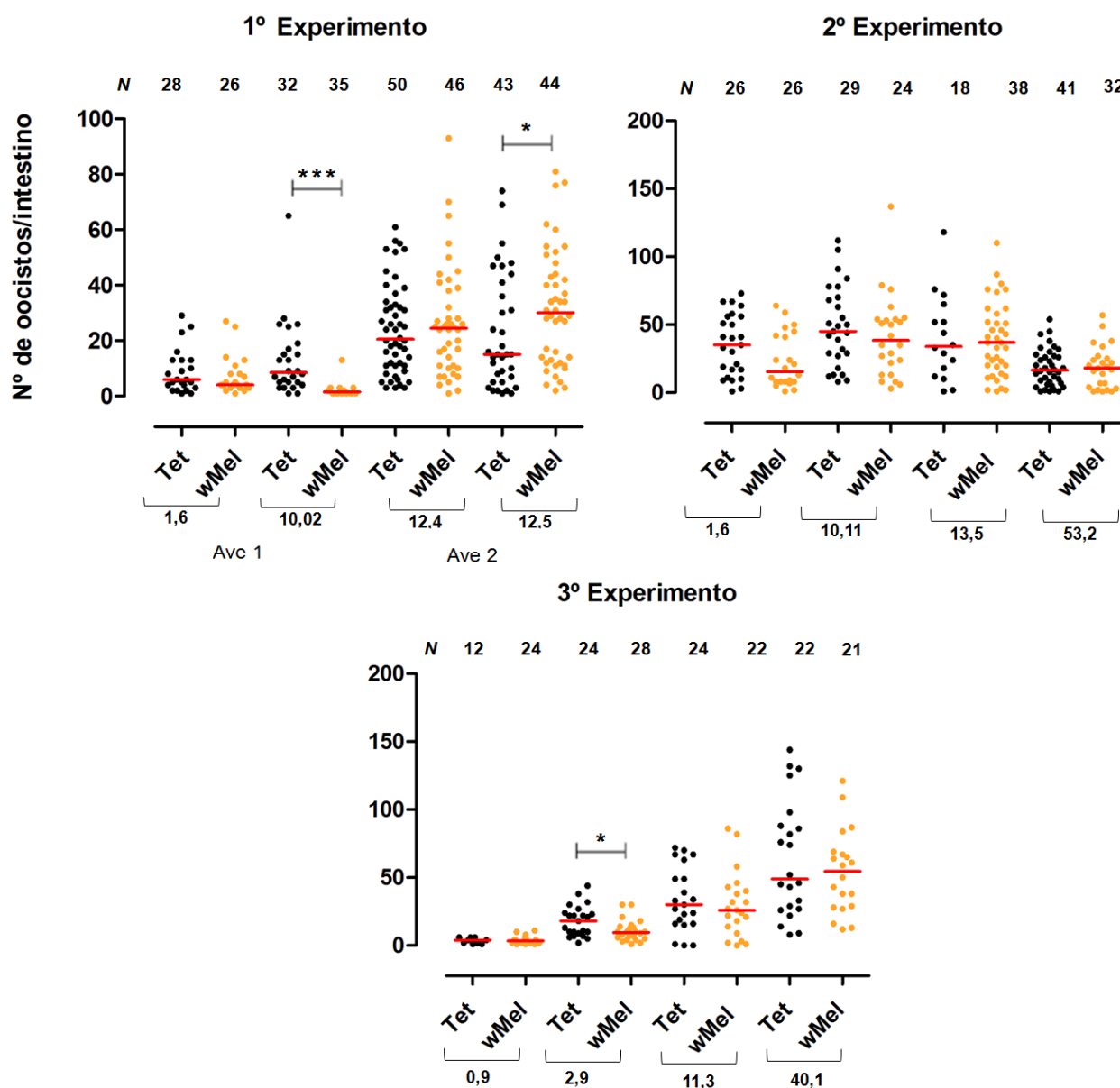


Figura 13: Carga de oocistos de *P. gallinaceum* nos intestinos de *Ae. aegypti*. Dados representam os resultados de três experimentos independentes. Em geral o status de infecção pela cepa wMel não levou a mudanças na carga de oocistos, entretanto houve algumas variações entre os experimentos. No primeiro experimento houve redução da infecção na parasitemia intermediária (10,02% - Mann Whitney U Test; $U = 36,50$, $P < 0,001$); e aumento da carga de oocistos na maior parasitemia (12,5% - Mann Whitney U Test; $U = 569,5$, $P = 0,0483$). No experimento 3 houve diferença estatística na segunda parasitemia (2,9% - Mann Whitney U Test; $U = 166,5$, $P = 0,0201$). Os círculos pretos representam a carga de oocistos em mosquitos sem *Wolbachia* e os círculos alaranjados a carga patogênica na linhagem wMel, as barras vermelhas representam a mediana de oocistos. As parasitemias utilizadas são mostradas em ordem crescente (mesmos valores para susceptibilidade). * = $P < 0,05$; *** = $P < 0,001$.

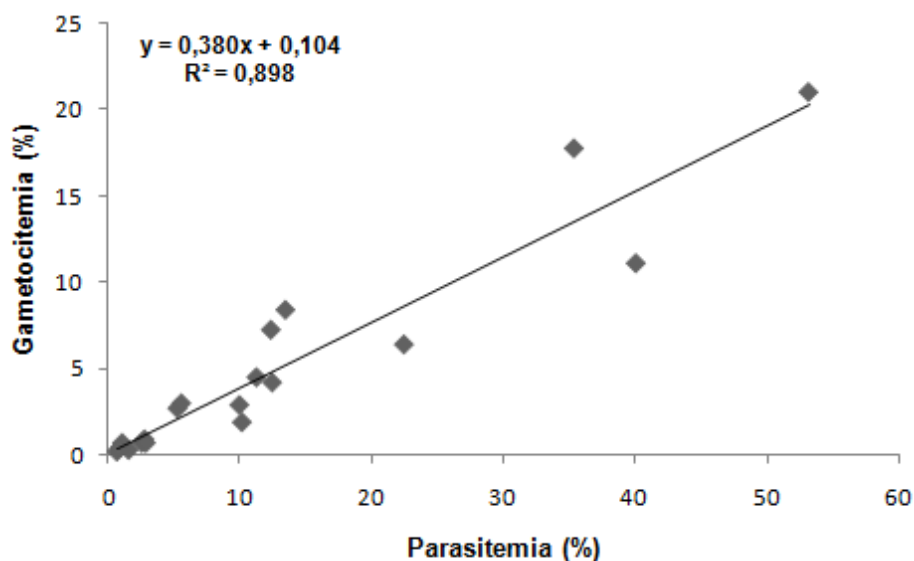


Figura 14: Correlação entre parasitemia e gametocitemia no curso de infecção das aves. Dados representam as parasitemias e gametocitemias de todas as aves utilizadas nos experimentos de infecção semi-natural com *Ae. aegypti* e com *Ae. fluviatilis*, existe forte correlação entre essas variáveis. □

5.3 Efeito da cepa wFlu na interferência ao *P. gallinaceum* em *Ae. fluviatilis* (Infecção via alimentação artificial)

Visando eliminar a variabilidade das parasitemias entre os experimentos, propusemos uma metodologia baseada na diluição do sangue de uma ave infectada com sangue de uma ave sadia. Foi realizada a coleta do sangue de uma ave infectada a partir do qual obtivemos 4 diluições (sangue infectado com quatro diferentes parasitemias, de aproximadamente 1,5% 3,12%; 6,25%; 12,5%) que foram utilizadas para o procedimento de infecção artificial. Assim como realizado nos experimentos em condições semi-naturais comparamos as taxas de infecção e a carga de oocistos nas linhagens wFlu e Tet. Os resultados desses experimentos estiveram de acordo com os dados observados nos experimentos anteriores. Não foi observada influência da infecção por *Wolbachia*, da parasitemia ou interação entre esses fatores na susceptibilidade do *Ae. fluviatilis* ao *P. gallinaceum* (GLM; $P > 0,05$) (**Figura 15**).

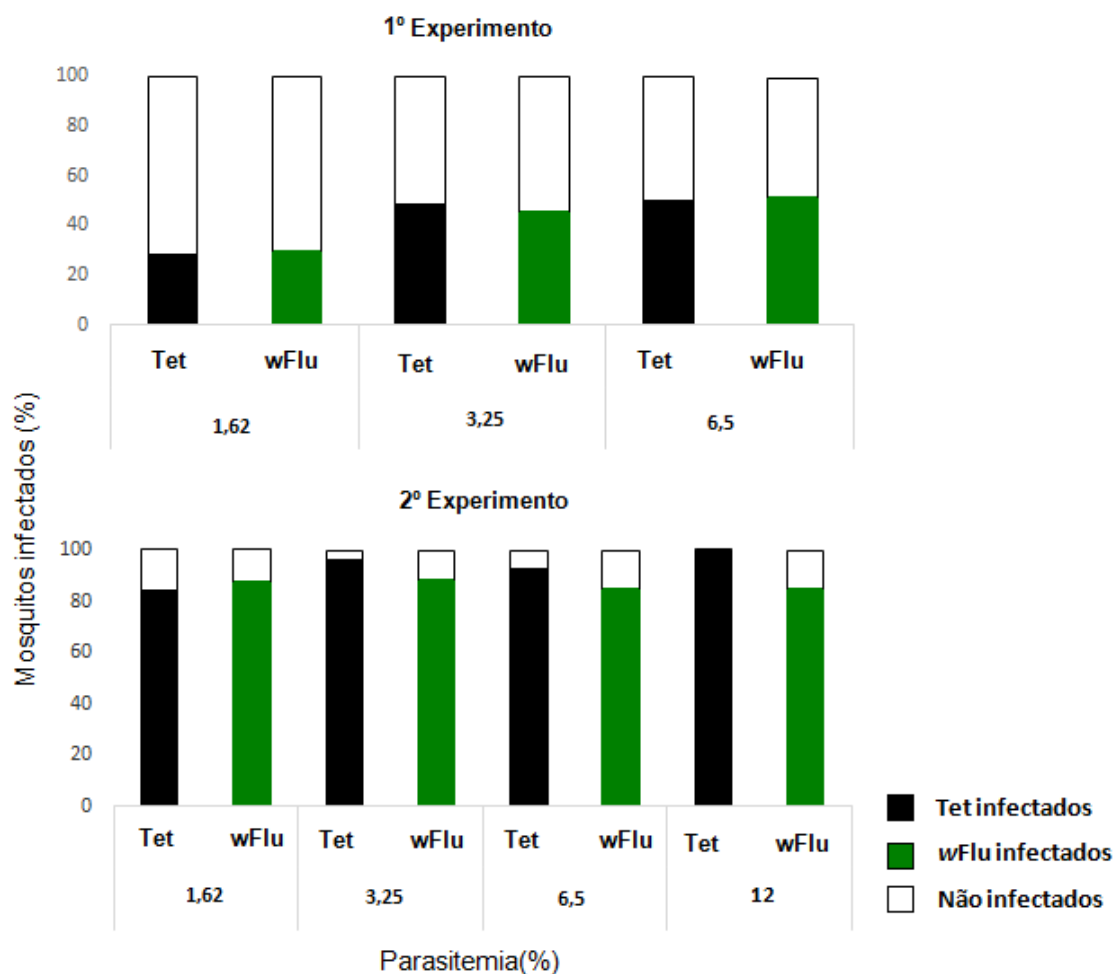


Figura 15: Suscetibilidade do *Ae. fluviatilis* ao *P. gallinaceum* na infecção artificial. Dados representam os resultados dos dois experimentos realizados, onde não foi observado efeito das parasitemias ou do status de infecção por *Wolbachia* na suscetibilidade (Fisher's exact test; $P > 0,05$). As barras pretas representam a porcentagem de mosquitos infectados, enquanto que as barras brancas representam os não infectados. As parasitemias utilizadas nos experimentos são mostradas em ordem crescente (valores abaixo de cada par de linhagens Tet e wFlu). Os mosquitos infectados com parasitemia de 12% foram perdidos ao longo do curso do experimento 1, foram realizados experimentos independentes. □

A parasitemia foi capaz de levar alterações na carga de oocistos nos experimentos de infecção artificial (Exp. 1 - GLM; $df = 2$, $W = 16,383$, $P = 0,017$) (Exp. 2 - GLM, $df = 1$, $W = 632,449$, $P < 0,001$), assim como a presença de *Wolbachia* (Exp. 1- GLM; $df = 2$, $W = 63,562$, $P < 0,001$) (Exp. 2 - GLM, $df = 3$, $W = 18,883$, $P < 0,001$). Ao analisar o efeito das parasitemias a cada par de linhagens verificamos que no experimento 1 nenhum efeito significativo foi obtido (Mann Whitney U test ; $P > 0,05$); enquanto que no experimento 2 o efeito da parasitemia sobre a carga de oocistos ocorreu somente na parasitemia mais alta (12%- Mann Whitney U test; $U = 77,50$; $P = 0,0176$) (**Figura 16**).

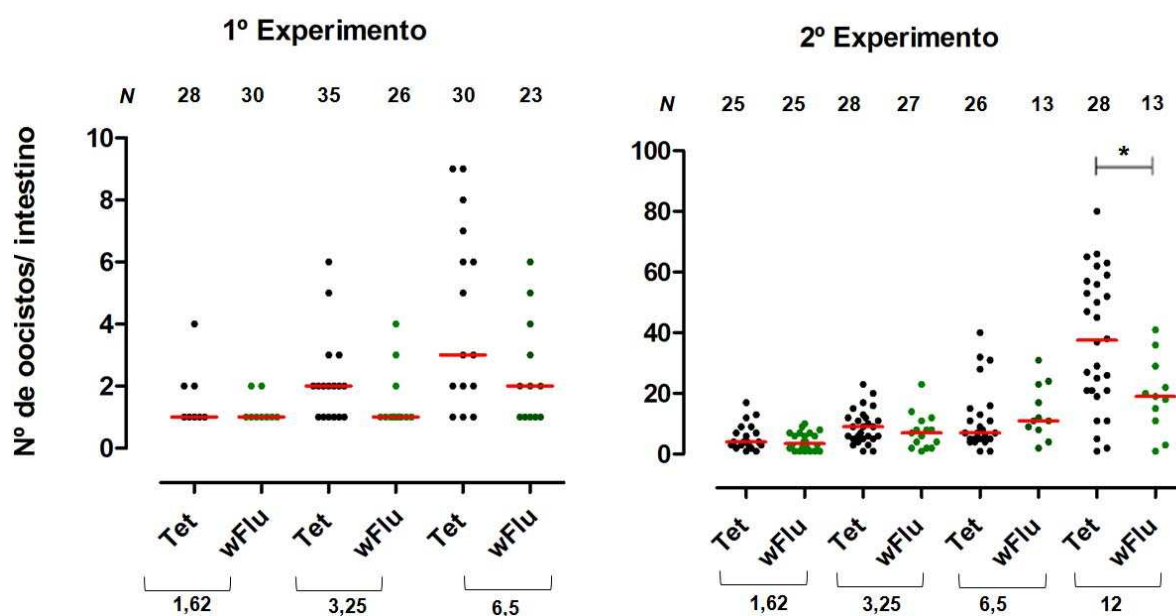


Figura 16: Carga de oocistos de *P.gallinaceum* nos intestinos de *Ae. fluviatilis* na infecção artificial. Dados representam os resultados dos dois experimentos realizados. No primeiro experimento não houve efeito significativo do status de infecção por *Wolbachia* na carga de oocistos (Mann Whitney U test; $P > 0,05$); enquanto que no segundo experimento houve redução da carga de oocistos na maior parasitemia utilizada para mosquitos wFlu (12% - Mann Whitney U test; $U = 77,50$, $P = 0,0176$). * = $P < 0,05$.

5.4 Efeito da cepa wMel na interferência ao *P. gallinaceum* em *Ae. aegypti* (Infecção via alimentação artificial)

Ao compararmos os resultados deste experimento em relação à primeira metodologia utilizada comprovamos que a parasitemia do hospedeiro vertebrado é um fator que afeta significativamente a susceptibilidade do mosquito *Ae. aegypti* (Exp. 1- GLM; $df = 3$, $W = 8,014$, $P = 0,046$) (Exp. 2 – GLM, $df = 3$, $W = 36,287$, $P < 0,001$). No primeiro experimento foi demonstrado ainda que as mudanças na parasitemia afetam a susceptibilidade dependendo do status de infecção por *Wolbachia* (GLM; $df = 3$, $W = 8,226$, $P = 0,042$), sendo observado que a cepa wMel foi capaz de levar a uma redução das taxas de infecção em mosquitos que receberam a menor parasitemia avaliada (1,5% - Fisher's exact test; $P = 0,0075$). Por outro lado, não foi observado efeito de interferência mediado por *Wolbachia* no experimento 2 em nenhuma das parasitemias avaliadas (Fisher's exact test; $P > 0,05$) (**Figura 17**).

Ao longo dos experimentos as alterações na parasitemia levaram a variações na carga de oocistos (Exp. 1 - GLM; $df = 3$, $W = 45,576$, $P < 0,001$), (Exp. 2 - GLM; $df = 3$, $W = 479,509$, $P < 0,001$) assim como a presença de *Wolbachia* (Exp. 1 - GLM; $df = 1$, $W = 5,821$, $P = 0,016$) (Exp. 2 - GLM, $df = 1$, $W = 39,162$, $P < 0,001$) e a relação entre esses dois elementos (Exp. 1 - GLM; $df = 3$, $W = 13,939$, $P < 0,01$) (Exp. 2 - GLM, $df = 3$, $W = 31,131$, $P < 0,001$). A análise de cada parasitemia individualmente não revelou efeito significativo para nenhuma das linhagens (Mann Whitney U test; $P > 0,05$) (**Figura 18**). Nossos resultados mostram também que a capacidade de resposta do *Ae. aegypti* ao *P. gallinaceum* difere de acordo com a metodologia de infecção utilizada uma vez que foi visto certo efeito de *Wolbachia* na susceptibilidade nesses experimento, mas não nos experimentos em condições naturais.

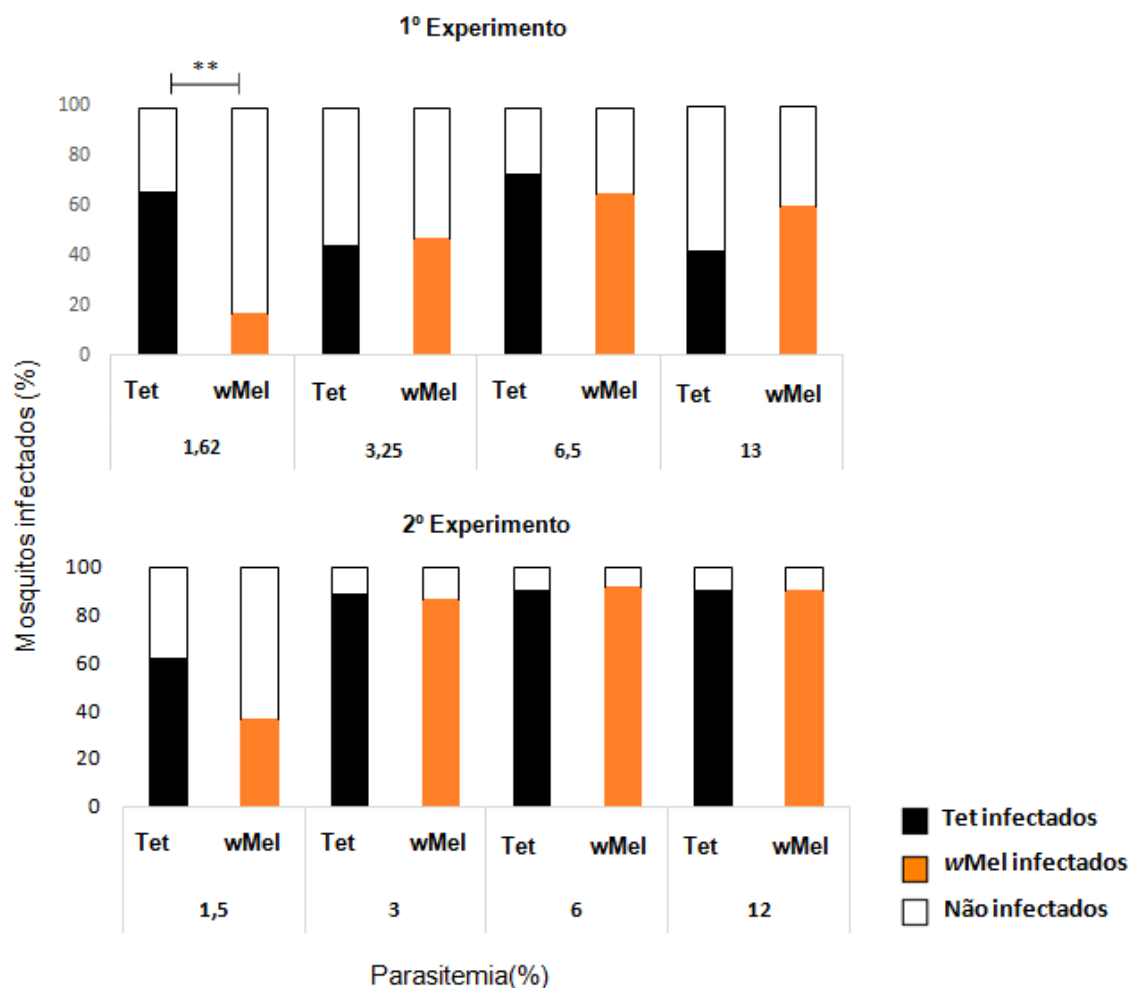


Figura 17: Susceptibilidade do *Ae. aegypti* ao *P. gallinaceum* na infecção artificial. Dados representam os resultados de dois experimentos independentes. No experimento 1 foi observado efeito de *Wolbachia* na susceptibilidade nos mosquitos infectados com a menor parasitemia (Fisher's exact Test; $P = 0,0075$). As parasitemias utilizadas nos experimentos são mostradas em ordem crescente (valores abaixo de cada par de linhagens wMel e TET); ** = $P < 0,01$.

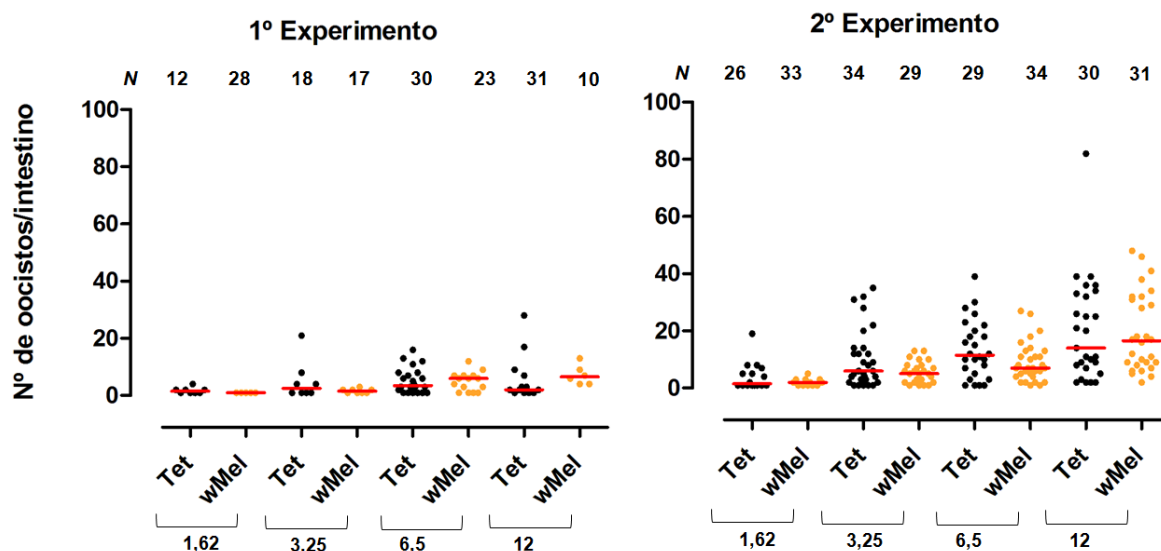


Figura 18: Carga de oocistos de *P.gallinaceum* nos intestinos de *Ae. aegypti* na infecção artificial. Dados representam os resultados dos dois experimentos independentes. Não houve diferença significativa na carga de oocistos entre as linhagens wMel e Tet em nenhuma das parasitemias testadas nos dois experimentos. As barras vermelhas representam a mediana do número de oocistos.

5.5 Efeitos da titulação de DENV na infecção do *Ae. fluviatilis*

Além da combinação *Wolbachia* - hospedeiro, o patógeno envolvido também é um fator determinante para a capacidade de interferência. Por isso, propusemos analisar qual o efeito da bactéria na infecção do *Ae. fluviatilis* com o vírus Dengue. Partindo da titulação inicial de 10^6 PFU/mL, obtivemos as titulações 10^5 , 10^4 , 10^3 PFU/mL, que foram homogeneizadas em sangue humano e oferecidas aos mosquitos wFlu e Tet, via sistema de alimentação artificial por membrana. Foram consideradas positivas as amostras com valores superiores a um limite de detecção de 10^3 cópias virais, pois foi demonstrado através da utilização de curva padrão que não é possível obter amplificação abaixo desta concentração nas condições de reação aplicadas.

A análise dos dados permitiu determinar que uma grande quantidade de mosquitos *Ae. fluviatilis* pode adquirir infecção pelo vírus Dengue. A elevada susceptibilidade dessa espécie foi encontrada nos grupos que receberam titulações virais mais altas nos dois tempos avaliados, predominantemente na linhagem wFlu aos 7 dias após infecção (10^6 PFU/mL - Mann Whitney test; $P = 0,0496$) (10^5 PFU/mL - Mann Whitney test; $P = 0,0250$). Entretanto, tal cenário não foi observado 14 dias após a infecção onde o número de mosquitos positivos nas titulações mais altas foi semelhante nas linhagens wFlu e Tet (Mann Whitney Test; $P > 0,05$) (**Figura 19**). Não foram encontradas amostras positivas nas duas menores diluições, independentemente do tempo de coleta e do status de infecção por *Wolbachia*. A susceptibilidade destes mosquitos tende a ser maior a medida que se aumentou a titulação viral e a carga viral nas amostras positivas também foi bastante variável aos 7 e 14 dias.

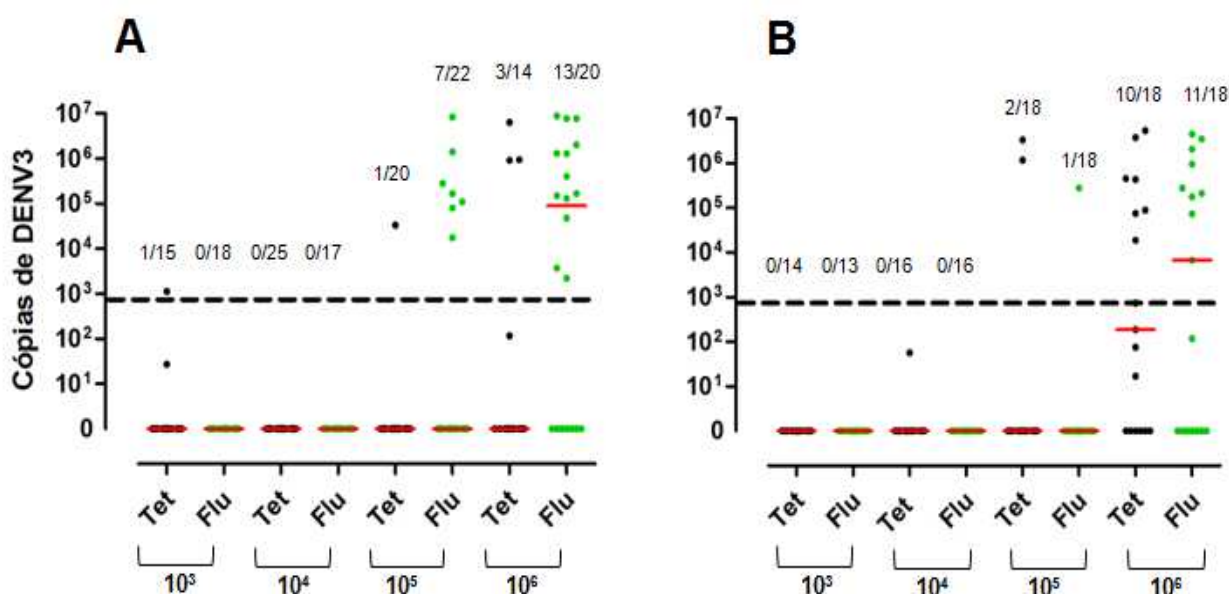


Figura 19: Relação entre susceptibilidade e carga viral do *Ae. fluviatilis* diante da infecção com Dengue vírus. As titulações virais utilizadas no experimento estão representadas em ordem crescente (10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6). Cada círculo representa uma fêmea; os círculos verdes representam a linhagem wFlu enquanto os círculos pretos representam a linhagem Tet. A linha tracejada indica o limite de detecção e os números acima de cada grupo de pontos representam a razão de mosquitos infectados/ mosquitos analisados. A carga viral foi quantificada em $1\mu\text{g}$ de RNA total; os resultados do experimento são mostrados aos 7 (A) e 14 dias (B) pós infecção. As barras vermelhas representam a mediana do número de cópias virais.

5.6 Efeitos da titulação de DENV na infecção do *Ae. aegypti*

Os resultados mostraram que mesmo diante da maior carga patogênica houve completa capacidade de bloqueio da cepa wMel ao vírus, nos diferentes tempos avaliados; enquanto que altas taxas de infecção foram encontradas somente nos mosquitos sem a bactéria (**Figura 20**). Grande número de amostras positivas na linhagem sem *Wolbachia* somente foram detectadas no grupo que recebeu a maior titulação viral do experimento (Mann Whitney U Test; $P < 0,0001$). Na segunda diluição, por sua vez, um número muito baixo de mosquitos se tornou positivo e as cargas patogênicas seguintes não foram suficientemente altas para levar a infecção em nenhuma das amostras coletadas. Esses dados demonstram que a susceptibilidade do *Ae. aegypti* ao DENV é dependente da carga viral, e evidenciam ainda que é necessária uma titulação viral ainda mais alta para levar alguma mudança no fenótipo de interferência mediado pela cepa wMel.

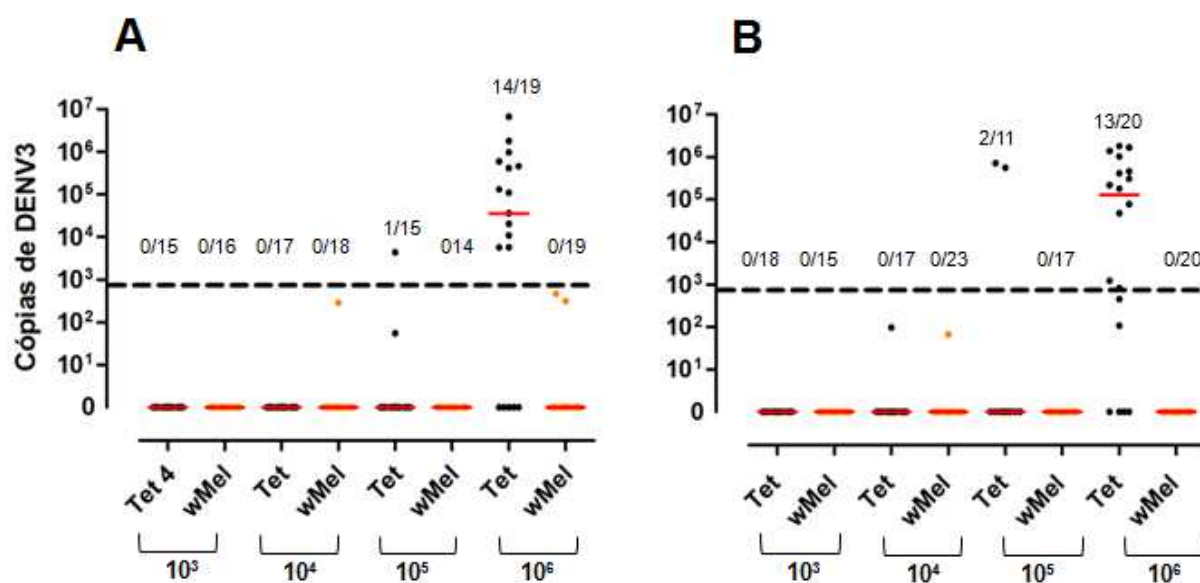


Figura 20: Relação entre susceptibilidade e carga viral do *Ae. aegypti* diante da infecção com Dengue vírus. Foi demonstrado consistente capacidade de bloqueio da cepa wMel aos 7 (A) e 14 (B) dias pós infecção, e a redução das titulações virais levou a considerável diminuição do número de mosquitos infectados. Os círculos alaranjados representam a linhagem wMel e os círculos pretos representam a linhagem Tet. A linha tracejada indica o limite de detecção e os números acima de cada grupo de pontos representam a razão de mosquitos infectados/ mosquitos testados. A carga viral foi quantificada em 1µg de RNA total. As barras vermelhas representam a mediana de cópias virais.

5.7 Análise da competência vetorial do *Ae. fluviatilis*

Diante da alta susceptibilidade do mosquito *Ae. fluviatilis* ao vírus Dengue, levantamos a possibilidade desta espécie possuir competência vetorial. Para responder essa pergunta foi realizada outra infecção com novos mosquitos das linhagens wFlu e Tet foi realizada utilizando somente a maior titulação do experimento anterior (10^6 PFU/mL). Após a infecção sanguínea procedemos com a coleta da saliva dos mosquitos, e somente a saliva dos mosquitos comprovadamente positivos foi utilizada para realização de injeções intratorácicas em novos mosquitos da linhagem wFlu, ou extração de RNA viral diretamente da amostra de saliva.

A porcentagem de infecção dos mosquitos que realizaram o repasto sanguíneo foi maior na linhagem wFlu em comparação com a linhagem Tet (**Figura 21**), corroborando os dados do primeiro experimento de infecção que mostrou maior susceptibilidade desta linhagem ao Dengue vírus aos 7 dias pós infecção (**Figura 19**), apesar destes valores não terem sido estatisticamente diferentes (Fisher's exact test; $P > 0,05$). Pouco se sabe sobre a interação patógeno/vetor nessa associação e, por isso levantamos então a possibilidade de ser necessário um período de incubação extrínseco maior que 14 dias nessa espécie. Para resolver essa questão realizamos a coleta dos mosquitos e da saliva também aos 21 dias após a infecção mas, ao examinarmos nossos dados fica claro que as taxas de infecção dos insetos são similares nos dois períodos analisados (Fisher's exact test; $P > 0,05$) (**Tet**: 5 positivos aos 14 dias e 6 positivos aos 21 dias; **wFlu**: 8 positivos aos 14 dias e 10 positivos aos 21 dias; dados não apresentados graficamente).

Apesar de uma porcentagem consideravelmente maior de saliva positiva ser encontrada no grupo Tet, os valores também não foram estatisticamente significativos (Fisher's exact test; $P > 0,05$). Ainda assim, a presença do Dengue vírus também pôde ser detectada em uma pequena porcentagem do material coletado de mosquitos da linhagem wFlu (**Figura 22**).

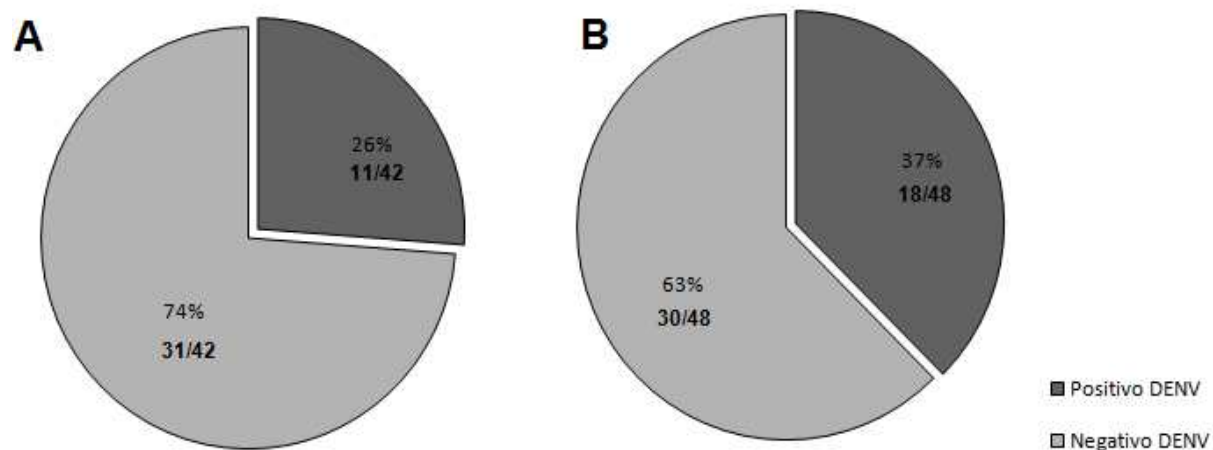


Figura 21: Porcentagem de infecção nos mosquitos *Ae. fluviatilis* utilizados para coleta da saliva no experimento de competência vetorial. Uma nova infecção dos mosquitos *Ae. fluviatilis* foi realizada com a titulação viral 10^6 PFU/mL. Menor susceptibilidade da linhagem Tet (A) pode ser observada em comparação a linhagem wFlu (37%) (B). Os valores representam o total de mosquitos analisados 14 e 21 dias após infecção. Os números em destaque representam a razão de mosquitos infectados/ mosquitos coletados.

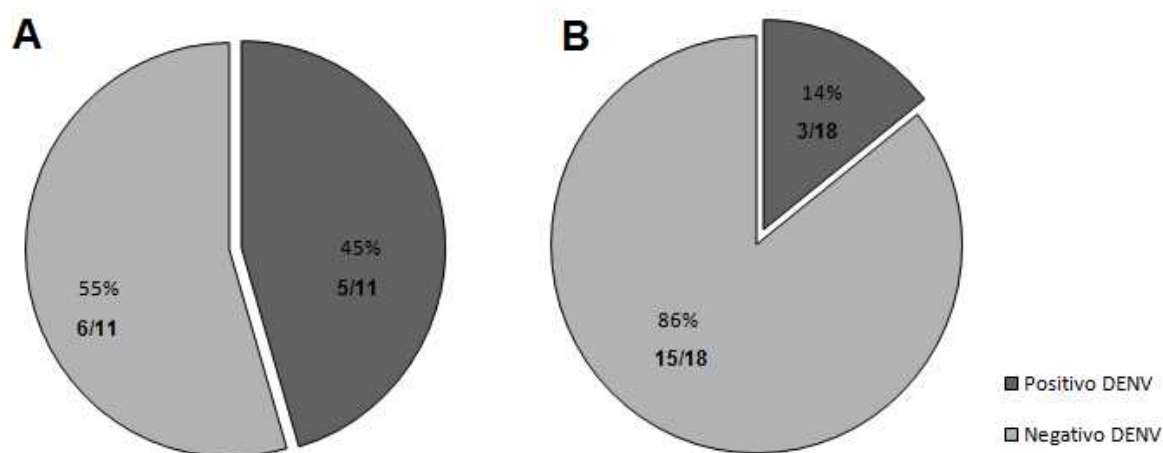


Figura 22: Presença do vírus Dengue na saliva de mosquitos *Ae. fluviatilis*. A saliva dos mosquitos foi coletada aos 14 e 21 dias pós-infecção e posteriormente injetada via intratorácica em mosquitos da linhagem wFlu. A fatia mais escura do gráfico representa as amostras positivas coletadas dos mosquitos da linhagem Tet (A) e wFlu (B). Valores representam o total de salivas analisadas aos 14 e 21 dias após infecção. Os números em destaque cada no gráfico representam a razão de salivas infectadas/ mosquitos infectados.

6 DISCUSSÃO

6.1 Efeito da carga parasitária na capacidade de interferência de *Wolbachia* ao *P. gallinaceum*

Diferentes metodologias foram utilizadas para analisarmos o efeito da carga de *P. gallinaceum* na capacidade de interferência de cepas nativas e artificiais de *Wolbachia*, levando em consideração o efeito desses fatores na suscetibilidade de infecção e também na carga de oocistos. Apesar de mais condizente com as situações naturais, nossa proposta de infecção dos mosquitos diretamente na ave apresentou limitações, como por exemplo, a impossibilidade de se manter parasitemias semelhantes entre as aves e entre os experimentos. Apesar de termos mantido as infecções por passagens recentes e utilizado animais de idades semelhantes, ainda foi visto grande variação entre os experimentos. Estudos têm demonstrado que a resposta imune das aves durante a fase aguda da infecção por malária é um processo dinâmico e complexo (ELLIS et al., 2015), sendo assim a imunidade como um fator individual de cada ave possivelmente fez com que grandes diferenças nas parasitemias fossem observada entre elas. Para reduzir a influência desses fatores desenvolvemos outra metodologia, procedemos com a coleta do sangue da ave, processamento deste para retirada do soro e geração de diversas faixas de parasitemia e infecção simultânea dos grupos de mosquitos ao mesmo tempo.

Ao analisarmos a associação wFlu e *Ae. fluviatilis* vimos que os níveis de susceptibilidade foram similares independentemente das parasitemias utilizadas; este resultado foi o mesmo para as duas metodologias testadas e demonstra que a via de infecção, seja ela artificial ou natural, não leva a mudanças na taxa de infecção. Adicionalmente constatamos que essa espécie é naturalmente capaz de sustentar uma infecção com o *P. gallinaceum*, assim como outros trabalhos com esse modelo que demonstraram que a proporção de infecção com esse patógeno no *Ae. fluviatilis* é bastante elevada, com taxas variáveis de infecção entre os experimentos (CAMARGO, 1983). Apesar de não levar a mudanças entre os experimentos com a cepa wFlu, a utilização

de duas metodologias foi determinante para os resultados observados com a cepa wMel. Nos experimentos utilizando a metodologia de infecção natural não foi observado nenhum efeito das parasitemias na susceptibilidade do *Ae. aegypti*, entretanto quando foi realizada alimentação artificial *Wolbachia* levou à redução da infecção diante da menor parasitemia utilizada (**Figura 17**). Apesar desse padrão ter sido observado nos dois experimentos realizados, os resultados foram estatisticamente significativos somente no primeiro experimento. O uso de diferentes metodologias não levou a diferentes resultados no que diz respeito à carga de oocistos para as cepas wMel e wFlu onde constatamos que aumentos na parasitemia levará a um aumento da quantidade de parasitos observado nos intestinos. Variações de oocistos de acordo com a parasitemia também foram observadas em outros trabalhos com esse modelo (CAMARGO; 1983).

Embora tenhamos observado uma tendência de não haver efeito da parasitemia na capacidade de interferência de *Wolbachia*, em determinados experimentos foram observadas algumas exceções. Em um experimento usando a metodologia de infecção natural no *Ae. fluviatilis* foi observada elevada susceptibilidade para a linhagem wFlu e diminuição da carga de oocistos, diante da maior parasitemia avaliada (5,6%) (**Figuras 9 e 10**). Usando esta mesma metodologia vimos efeito significativo em um dos experimentos com *Ae. aegypti* na infecção com duas diferentes parasitemias. Interessantemente estes dados foram vistos nos experimentos onde foi necessária a mudança da ave utilizada. Em outro experimento de alimentação artificial com *Ae. fluviatilis* foi observado diminuição da carga de oocistos também na infecção com a carga parasitária mais elevada (12%). Contudo em outros experimentos de infecção natural foram utilizadas parasitemias mais elevadas do que as citadas anteriormente e não constatamos mudanças em nenhum dos parâmetros analisados.

Dentre os aspectos que podem ter levado a esses diferentes resultados pode-se citar as complicações em manter suficiente o número de mosquitos durante os diferentes experimentos, uma vez que as fêmeas não alimentadas foram descartadas e existiu mortalidade dos mosquitos ao longo do período necessário para observação dos oocistos. Sendo assim em alguns casos,

como no segundo experimento de infecção artificial, onde foi visto diferença entre as linhagens na maior parasitemia, o número de mosquitos que tiveram os intestinos dissecados na linhagem sem *Wolbachia* foi consideravelmente maior em relação a linhagem wFlu o que pode levar a grande influência nos resultados.

Além do número de mosquitos analisados, a taxa de gametócitos é outro fator determinante no contexto da infecção dos mosquitos, pois somente esses se desenvolverão no inseto vetor levando a fecundação e formação de oocistos (ABRAHAM; JACOBS-LORENA, 2004; VLACHOU et al., 2006; SMITH et al., 2014). Neste estudo vimos que existe correlação direta entre a parasitemia e as taxas de formação de gametócitos (**Figura 14**), e destas com o número de oocistos observado nos intestinos de *Ae. fluviatilis*, corroborando o que foi descrito em outros estudos com este modelo (CAMARGO, 1983). Entretanto é importante ressaltar também que a contagem da parasitemia e da gametocitemia foi realizada através de microscopia óptica, o que não permite identificar a viabilidade dos parasitos. Sendo assim, as mudanças de susceptibilidade observadas em determinados experimentos podem estar associadas com aspectos específicos da cinética de infecção pelo *P. gallinaceum* no hospedeiro vertebrado, aspectos individuais dos mosquitos, fatores presentes no sangue das aves e até mesmo com a infectividade dos parasitos.

A análise da susceptibilidade e da carga de oocistos mostrou que a cepa wFlu não é capaz de induzir um efeito consistente diante da infecção por *P. gallinaceum* no *Ae. fluviatilis*, de forma que não conseguimos comprovar a existência de uma capacidade latente de interferência nessa associação nativa. Outro estudo com essa mesma associação mostrou não haver evidência da capacidade de bloqueio da cepa wFlu e ocasionalmente foi relatado um aumento do número de oocistos em mosquitos *Ae. fluviatilis* comparado com as linhagens tratadas com tetraciclina para remoção de *Wolbachia* (BATON et al., 2013). Mas em nosso trabalho a wFlu não foi associada com aumento significativo da proporção de indivíduos infectados, ou com um aumento da carga de oocistos em nenhum dos experimentos, tal como foi visto em 2 de 4 experimentos realizados por Baton e colaboradores (2013). De qualquer forma,

existem trabalhos descrevendo que associações nativas não induzem interferência ao *Plasmodium*, como por exemplo na relação entre *Cx. pipiens* e *P. relictum*, outro parasito da malária aviária, no qual há diferenças na probabilidade de infecção entre linhagens de mosquitos infectados ou não com *Wolbachia* (ZÉLÉ et al., 2012, 2014). Ainda assim, trabalhos adicionais são necessários para compreender como as cepas nativas de *Wolbachia* podem responder ao *Plasmodium*.

Apesar de haverem algumas exceções (DODSON et al., 2014; MURDOCK et al., 2014) sabemos que em geral as infecções artificiais de *Wolbachia* em um novo hospedeiro são mais efetivas na inibição de diferentes patógenos em comparação a infecções naturais entre hospedeiro e endossimbionte (ZUG; HAMMERSTEIN, 2015). Entretanto em nosso trabalho também não vimos consistente capacidade de interferência ao *P. gallinaceum* no mosquito *Ae. aegypti* transinfectado com a cepa wMel. Os experimentos de infecção semi-natural mostraram que o status de infecção por *Wolbachia* e a parasitemia são fatores que não modificam a porcentagem de mosquitos que adquirem infecção, e somente em um dos experimentos de infecção artificial foi observado uma redução da susceptibilidade em mosquitos wMel que receberam a menor parasitemia avaliada (**Figura 17**). A participação da *Wolbachia* na redução da carga de oocistos também foi inconsistente.

Diferente da nossa hipótese inicial o conjunto dos resultados mostrou que a cepa wMel, mesmo estando em alta densidade no hospedeiro, não é capaz de levar a interferência ao *P. gallinaceum* diante da infecção com elevadas parasitemias. Seu fenótipo de interferência foi ainda mais dinâmico do que na associação com a cepa natural wFlu, uma vez que observamos redução da infecção mediada por *Wolbachia* diante de algumas parasitemias e houveram ainda casos de a bactéria levar a indução do aumento de oocistos. Esses resultados elucidam como o fenótipo de interferência ao *Plasmodium* não é universal, e sim contexto dependente podendo variar de acordo com as espécies de parasito e vetor envolvidas na associação (HUGHES et al., 2014). Nesse sentido existem relatos onde foram detectados efeitos de cepas artificiais na interferência ao *Plasmodium*; a cepa virulenta wMelPop por exemplo causa grande interferência na infecção por *P. gallinaceum* no

mosquito *Ae. aegypti*, foi observado que a susceptibilidade dos mosquitos mudou de 74% em mosquitos controles para 42% nos mosquitos com *Wolbachia* sendo também comprovado que a presença da bactéria também foi capaz de reduzir consideravelmente o numero de oocistos (MOREIRA et al., 2009).

Outros trabalhos reforçam que associações não nativas entre *Wolbachia* e hospedeiro apresentam maior potencial para uso no controle da malária. Bian e colaboradores realizaram uma transinfecção em *An. stephensi* com a cepa wAlbB que se mostrou estável. Nesta associação o mosquito se mostrou refratário ao *P. falciparum* com diminuição da carga de oocistos nos intestinos e redução de 3,7 vezes das cargas de esporozoítos nas glândulas salivares (BIAN et al., 2013). No contexto da infecção transiente, isto é, uma infecção por *Wolbachia* somente nos tecidos somáticos do inseto, foi demonstrado que a cepa wMelPop pode inibir o desenvolvimento de *P. berghei* em *An. stephensi* indicando que a criação de uma linhagem de mosquitos *Anopheles* com uma infecção estável pela cepa wMelPop seria interessante como ferramenta para o controle da malária (KAMBRIS et al., 2009, 2010)

Nosso estudo apresenta evidências de que wFlu e wMel não são efetivas para o bloqueio do *P. gallinaceum*, tendo sido observado o que ambas apresentam respostas semelhantes diante da infecção. Este fator não constitui problema expressivo dado que essa espécie não é um patógeno de importância a saúde humana sendo utilizado apenas como um modelo para estudo do fenótipo de interferência de *Wolbachia*. Entretanto essa característica será um impedimento para o uso dessas cepas em medidas de controle da malária, caso esse padrão ainda seja observado para outras espécies de *Plasmodium*, em especial as responsáveis pela doença humana. Também deve ser levado em consideração que podem existir grandes diferenças na capacidade de interferência das cepas de *Wolbachia* frente à infecção com parasitos de malária humana em relação à malária aviária. E ainda não se pode descartar a possibilidade de uma mudança de resposta frente a um processo de transinfecção, tal como já foi comprovado para outras cepas de *Wolbachia*, de forma que cepas que não levavam a nenhum efeito passam a demonstrar forte capacidade de interferência em novos hospedeiros

(BIAN et al., 2010). Outro fato importante de ser destacado, é que em nossos experimentos somente checamos a infecção dos mosquitos até a fase de oocistos o que não descarta um efeito da *Wolbachia* mais tardio, impactando na carga de esporozoítos.

6.2 Efeito da titulação viral na capacidade de interferência de *Wolbachia* ao Dengue Vírus

Para analisar o efeito da dose viral na interferência ao dengue vírus realizamos uma infecção artificial com o vírus obtido através de cultivo celular que foi diluído a partir de uma titulação de 10^6 PFU/mL. Os resultados indicaram altas taxas de infecção pelo vírus dengue nos mosquitos *Ae. aegypti* sem *Wolbachia* (Tet) somente nos grupos que receberam a maior titulação viral do experimento, e a medida que reduzimos a titulação viral observamos uma queda drástica na susceptibilidade dos mosquitos Tet. Os resultados obtidos podem ter acontecido em decorrência da baixa concentração final que pode ter sido insuficiente para ultrapassar as barreiras biológicas dos mosquitos no controle da infecção. Aos 7 dias pós-infecção as taxas de infecção nos mosquitos da linhagem Tet foram de 73% na maior titulação viral, caindo para 6% na segunda carga patogênica (10^5 PFU/mL); e aos 14 dias pós-infecção esses valores caíram de 65% para 18%. Por sua vez o *Ae. aegypti* transinfectado com a cepa wMel mostrou consistente capacidade de interferência ao vírus, conforme já havia sido comprovado em outros trabalhos (HOFFMANN et al., 2011; FRENTIU et al., 2014) não tendo sido observadas amostras positivas para Dengue.

Surpreendentemente observamos considerável susceptibilidade ao Dengue vírus ao analisarmos a infecção do mosquito *Ae. fluviatilis*. Os dados mostraram que um número maior de mosquitos adquirem infecção na linhagem wFlu em relação a linhagem Tet, aos sete dias pós infecção diante da maior titulação viral avaliada o que não acontece aos 14 dias de infecção onde não houve diferença de susceptibilidade ao dengue entre as duas linhagens (**Figura 19**).. Assim como no experimento realizado com *Ae. aegypti* também foi observada redução do número de amostras positivas quando os mosquitos

realizaram o repasto sanguíneo com o vírus mais diluído; da primeira para a segunda diluição as taxas de infecção nos mosquitos wFlu caíram de 65% para 31% aos 7 dias, e de 61% para 5% aos 14 dias pós infecção (**Figura 20**).

Nossos dados deixaram claro que a carga viral é um aspecto determinante para a susceptibilidade das duas espécies, entretanto foi um ponto limitante para avaliar nossa hipótese, uma vez que nas menores diluições não foram encontradas amostras positivas. Não observamos também diferença entre as cargas virais nos mosquitos positivos. Em um trabalho similar Mousson e colaboradores (2012) avaliaram o efeito de diferentes titulações virais de DENV-2 (10^4 , 10^5 , 10^6 , e 10^7 PFU/mL) na infecção em *Ae. albopictus*, e viram que após a infecção sanguínea com as diferentes cargas virais o número de cópias virais totais nos indivíduos também não foi diferente entre as linhagens com e sem *Wolbachia* (MOUSSON et al., 2012).

As variáveis temporais e intrínsecas ao vírus associadas com a transmissão do Dengue vírus aos mosquitos ainda não são completamente compreendidas, no entanto existem trabalhos que elucidam a importância de uma quantidade mínima de vírus ingerida necessária para estabelecer uma infecção nos mosquitos. Foi apontado que a dose de vírus (sorotipo 2) necessária para infecção de 50% dos mosquitos está entre 6,29 a 7,52 log₁₀ copias de RNA/mL de plasma (NGUYET et al., 2013). Tais valores são similares às maiores titulações utilizadas em nosso estudo e explicariam também a baixa taxa de amostras positivas nas diluições menores. Além do estabelecimento da infecção, a titulação é importante na disseminação e na transmissão do vírus. Foi demonstrado, por exemplo, que a taxa de infecção com dengue nas glândulas salivares de *Ae. albopictus*, aumentaram de 12% para 38% com o aumento de dez vezes na titulação viral (HADDAD et al., 2012).

O nível de viremia no ser humano necessário para infectar o *Aedes aegypti*, assim como o período em que os casos da doença permanecem infecciosos para os mosquitos ainda não estão completamente elucidados (NGUYET et al., 2013). No contexto do nosso estudo mostramos que titulações virais de 10^6 e 10^5 PFU/mL não foram capazes de modificar o fenótipo de

interferência da cepa wMel (**Figura 20**), enquanto que nas menores titulações não foi possível encontrar amostras positivas para Dengue nos mosquitos controle. Entretanto são necessários mais estudos na tentativa de compreender se titulações mais altas seriam capazes de mudar esse cenário; possivelmente a exposição de mosquitos transinfectados com wMel a titulações virais mais altas induziria uma capacidade de bloqueio um pouco menos efetiva, ao passo que o aumento da susceptibilidade ainda seja observado na relação entre wFlu e *Ae. fluviatilis*. Ainda que em menor concentração em relação aos mosquitos sem a bactéria, Ye e colaboradores (2015) mostraram que uma pequena proporção de mosquitos wMel de campo podem adquirir infecção na saliva. Esta infecção foi diretamente relacionada com a titulação de vírus utilizada, tendo sido mostrado que mosquitos infectados com uma titulação de 10^6 PFU/ml apresentavam 2,6 vezes menos vírus na saliva em relação a mosquitos infectados na titulação 10^7 PFU/ml (YE et al., 2015); esses dados reforçam a importância de estudar a relação das titulações virais com a capacidade de interferência de *Wolbachia*.

Outros fatores podem influenciar a infecção dos mosquitos e consequentemente os resultados observados. Dentre eles flutuações na temperatura diária, os genótipos do mosquito e dos vírus (ARMSTRONG; RICO-HESSE, 2001; NGUYET et al., 2013). Foi comprovado que dois genótipos de DENV-2 levam a diferentes fenótipos de infecção e disseminação entre mosquitos *Ae. aegypti*, sendo este mais susceptível à infecção por uma cepa asiática (SE) em comparação à cepa americana (SEA), constatando que pequenas diferenças genéticas entre os vírus podem ter profundas consequências para a infecção além de implicações epidemiológicas (ARMSTRONG; RICO-HESSE, 2001). Adicionalmente a metodologia de infecção artificial pode levar a taxas de infecção variáveis e mostrar capacidade de interferência diferente da que seria observada em condições naturais (FERGUSON et al., 2015). Neste trabalho utilizamos vírus de passagem de laboratório, de um único sorotipo que foi adicionado em sangue humano recém-coletado. Apesar deste procedimento ser eficaz no contexto dos nossos objetivos, não se pode descartar que esse modelo não reproduz com precisão a infecção por Dengue no hospedeiro humano.

Ao se tratar de relações nativas os fenótipos de interferência são tipicamente fracos, mas pode ser observada uma variação de forma que não seja constatada nenhuma capacidade de interferência de *Wolbachia* ou ocasionalmente havendo o aumento das taxas de infecções nos hospedeiros que abrigam a bactéria (BATON et al., 2013). Neste estudo relatamos a primeira evidência de uma cepa nativa de *Wolbachia* sendo capaz e levar ao aumento das taxas de infecção pelo Dengue vírus; constatamos que cepa *wFlu* induz aumento da infecção nos mosquitos aos 7 dias e não leva a nenhum efeito de interferência aos 14 dias, ao passo que a capacidade de bloqueio ao vírus é consistente na cepa *wMel*, independentemente da carga viral analisada.

Dodson e colaboradores (2014) observaram aumento da susceptibilidade ao WNV no mosquito *Cx. tarsalis*, também aos sete dias pós-infecção, mas em infecção transiente com a cepa *wAlbB* (DODSON et al., 2014). Outros trabalhos têm apontado o mesmo efeito diante da infecção por espécies de *Plasmodium*, tal como visto para mosquitos *An. gambiae*, *An. stephensi*, e *Cx. pipiens*, diante da infecção com *Plasmodium berghei*, *P. yoelii*, e *P. relictum*, respectivamente (ZELÉ et al., 2014; HUGHES et al., 2012). Porém ainda não há trabalhos mostrando casos de transinfecções estáveis por cepas de *Wolbachia* que levaram ao aumento da susceptibilidade a patógenos. Esses trabalhos em conjunto com nossos dados mostram que *Wolbachia* nem sempre leva a inibição de patógenos em seus hospedeiros e o aumento da susceptibilidade é dependente das espécies envolvidas e também da natureza de infecção isto é, se bactéria apresenta uma relação nativa, transiente ou uma transinfecção em seu hospedeiro (DODSON et al., 2014).

As bactérias intracelulares podem alterar a fisiologia do hospedeiro de várias maneiras, levando inclusive a manipulações que podem alterar a resposta imune dos hospedeiros (KAMBRIS et al., 2009; BIAN et al., 2010; PAN et al., 2012). A indução da resposta imune como fator responsável pela capacidade de interferência não é um efeito tipicamente associado a cepas nativas de *Wolbachia* (RANCÈS et al., 2012). Entretanto existe a possibilidade da bactéria levar a inibição de genes imunes na tentativa de ser mantida no hospedeiro (ZUG; HAMMERSTEIN, 2015). Tal fato foi descrito na infecção transiente em *Cx. tarsalis* onde a cepa *wAlbB* leva a redução da ativação de

genes ativadores da via Toll e esse fato foi diretamente associado com aumento das taxas de infecção por WNV (DODSON et al., 2014). Entretanto no caso do nosso modelo, existe outro estudo que tem demonstrado que a cepa wFlu não induz mudanças na expressão de genes dos hospedeiro *Ae. fluviatilis* (CARAGATA et al., 2016).

Outra possibilidade para explicar os resultados observados é de que *Wolbachia* talvez influencie a microbiota intestinal de seus hospedeiros, fator que também exerce papel importante na resistência dos mosquitos à infecção. A linhagem Tet passa por um processo de recuperação da flora intestinal que é realizada através da reintrodução da água de criação da linhagem wFlu e também com a utilização da mesma dieta durante muitas gerações, entretanto não está claro se ainda podem existir diferenças na composição de sua microbiota como um fator remanescente do processo de tratamento com antibiótico. As linhagens podem ainda ter divergido ao longo das gerações fazendo com que a diferença na suscetibilidade ao vírus fosse observada devido a diferentes backgrounds genéticos (HUGHES et al., 2011; MURDOCK et al., 2014; ZÉLÉ et al., 2014).

Os resultados do nosso trabalho contrastam com outras relações naturais onde é observado o efeito da *Wolbachia* na redução das cargas virais e na disseminação de diferentes arbovírus, como constatado por Glaser e colaboradores (2010) na relação entre a cepa nativa wPip, *Cx. pipiens* e vírus do Oeste do Nilo (GLASER; MEOLA, 2010), e em outros trabalhos com populações geograficamente isoladas de *Ae. albopictus* onde foi observado a capacidade de *Wolbachia* em limitar a transmissão do vírus dengue (MOUSSON et al., 2012). Nossos dados mostraram ainda que a cepa wFlu apresenta um padrão de resposta ao vírus Dengue diferente em relação a cepa wMel. Ao fazermos uma análise geral fica claro também que ambas as cepas apresentaram resposta distinta para os dois patógenos uma vez que frente à infecção por *P. gallinaceum* a susceptibilidade dos hospedeiros não foi dependente da carga parasitária o que não aconteceu no caso da infecção com o vírus. Essas conclusões são reforçadas por demais dados da literatura que têm indicado que a capacidade de interferência de *Wolbachia* contra arbovírus tende a ser preponderante em relação a capacidade de interferência contra

espécies de *Plasmodium* (MOREIRA et al., 2009; WALKER et al., 2011 BIAN et al., 2013).

6.3 Interferência a patógenos das cepas wFlu e wMel e suas implicações para o uso no controle de doenças transmitidas por vetores

Em nosso trabalho objetivamos fazer uma caracterização da capacidade de bloqueio de duas cepas de *Wolbachia* frente à infecção com diferentes patógenos, para identificar se existe um padrão no qual a carga parasitária possa influenciar esse fenótipo de acordo com a natureza da infecção por *Wolbachia* no hospedeiro. Entretanto, vimos que para a infecção com *P. gallinaceum* não houve efeito das parasitemias na susceptibilidade dos mosquitos independente desses apresentarem infecção nativa ou exógena pela bactéria. Foi comprovado que as cepas wFlu e wMel tem um padrão similar de resposta ao *P. gallinaceum* onde não é observado forte capacidade de interferência ou efeito das cargas parasitárias; por outro lado isso não aconteceu na infecção com vírus Dengue, uma vez que wMel levou a forte interferência. Esse fato está relacionado com a característica de *Wolbachia* de levar a fenótipos de interferência de acordo com a cepa, espécie de patógeno e hospedeiro envolvidos na associação (KAMBRIS et al., 2009; ZUG; HAMMERSTEIN, 2015)

No caso da infecção com o Dengue vírus constatamos que as duas cepas analisadas têm diferentes padrões de resposta, havendo forte capacidade de bloqueio para a cepa wMel, o que não é observado para a cepa wFlu que apresenta potencial capacidade de levar a um aumento da infecção pelo vírus. Os mecanismos que levam ao aumento da susceptibilidade a patógenos mediada por *Wolbachia* não são claros, entretanto existe a possibilidade de a bactéria induzir a um aumento da replicação do vírus nos estágios iniciais de infecção, potencialmente levando a um menor período de incubação extrínseco e expansão das taxas de reprodução do vírus (DODSON et al., 2014; MURDOCK et al., 2014). Esse fator poderia explicar porque maiores taxas de infecção foram observadas nos mosquitos infectados com a cepa wFlu aos 7 dias pós-infecção mas não aos 14 dias. A participação de

Wolbachia na modulação da resposta imune é outro fator que pode estar diretamente correlacionado, já tendo sido demonstrado em infecção transiente que a bactéria pode levar à diminuição da expressão de genes de ativação da via Toll (DODSON et al., 2014).

Alternativamente, podem existir fatores ambientais capazes de levar ao aumento da susceptibilidade dos mosquitos. Um estudo demonstrou, por exemplo, que em mosquitos *An. stephensi* com uma infecção transiente com a cepa wAlbB ocorre redução da carga de oocistos de *P. yoelli* aos 28°C enquanto que aumento do número de parasitos no intestino é observado aos 24 °C (MURDOCK et al., 2014). Nosso trabalho foi inteiramente conduzido sob condições de insetário com temperaturas médias de 27°C $\pm$ 1°C e, é possível que essas condições também tenham influenciado o desenvolvimento do *P. gallinaceum* no vetor, sendo um fator que contribuiu para o desenvolvimento da infecção e impediu que qualquer capacidade de interferência fosse observada. É provável ainda que os fenótipos de interferência da cepa wFlu sejam diferentes em situações de campo onde as temperaturas são variáveis.

A capacidade de bloqueio a patógenos é observada principalmente em casos de transinfecção, que levam a ativação da resposta imune e altas densidades de *Wolbachia*. Esses processos não ocorrem em interações nativas onde a bactéria e hospedeiro apresentam longa história evolutiva. Devido a esse aspecto alguns autores têm sugerido que a capacidade de interferência a patógenos talvez seja um fenômeno temporário, que acontece em consequência da alta densidade inicial de *Wolbachia*, podendo desaparecer gradualmente após seu período de adaptação com o patógeno e o hospedeiro. Além do mais a capacidade de bloqueio a patógenos pode reduzir a pressão seletiva sob as populações infectadas facilitando a permanência da bactéria nas populações de novos hospedeiros (ZUG; HAMMERSTEIN, 2015). Diante disso as relações nativas devem ser consideradas uma chave para entender o que pode acontecer com os hospedeiros transinfectados em longo prazo (ZELÉ et al., 2014).

Com base nessas teorias, um dos questionamentos do nosso estudo foi a possibilidade de haver uma mudança na interferência a patógenos conferida

pela cepa wMel no mosquito *Ae. aegypti*, de forma que essa associação se torne semelhante a uma infecção nativa como a existente entre wFlu e o *Ae. fluviatilis*. Mudanças no fenótipo de interferência poderiam ocorrer gradualmente sugerindo que a cepa wFlu poderia conferir bloqueio a patógenos em determinadas circunstâncias, como por exemplo diante da infecção com uma baixa carga parasitária. Entretanto, não observamos capacidade latente de interferência da cepa wFlu ao *P. gallinaceum* nem mesmo diante da infecção com parasitemia subpatente, e vimos também que as cargas parasitárias não foram elevadas o bastante para modificar o padrão de resposta bem estabelecido da cepa wMel contra o vírus Dengue.

Os efeitos da transinfecção da cepa wMel em *Ae. aegypti* em populações de duas áreas da Austrália tem se mostrado persistentes após três anos da finalização do processo de soltura. O acompanhamento dessas populações detectou que a interferência ao vírus dengue e os demais efeitos no fitness do hospedeiro não foram alterados durante esse período mostrando que a capacidade de bloqueio conferida por *Wolbachia* provavelmente não será rapidamente perdida (FRENTIU et al., 2014; HOFFMANN et al., 2014). Da mesma forma, estudos em modelo de *Drosophila* tem mostrado que associações de longo prazo entre vetor, vírus e *Wolbachia* podem levar a contínua capacidade de interferência. A invasão da cepa wMel em *D. melanogaster* tem se mantido estável por um longo período de tempo e ainda é possível observar proteção contra *Drosophila C* vírus (TEIXEIRA et al., 2008; RAINEY et al., 2014). Em contrapartida, já existem evidências da mudança dos fenótipos conferidos por *Wolbachia* após sua adaptação nos hospedeiros, como relatado para a cepa wMelPop que ao ser reintroduzida em *D. melanogaster* após uma longa série de passagens em linhagens de células de mosquitos, passou a não mais conferir efeitos negativos na longevidade das moscas e mostrou níveis reduzidos de incompatibilidade citoplasmática (MCMENIMAN et al., 2008). Há ainda outros casos descrevendo mudanças drásticas nos efeitos de *Wolbachia* nos hospedeiros. Em um trabalho preliminar foi constatado que a cepa wRi levava a redução das taxas de fecundidade em *D. simulans*. 20 anos após essa descrição um novo estudo foi realizado com moscas coletadas em campo e foi observado que *Wolbachia* passou a conferir

vantagem reprodutiva, curiosamente, as linhagens mantidas em laboratório utilizadas no estudo anterior ainda apresentavam déficit de fecundidade (WEEKS et al., 2007). Essas mudanças podem acontecer em decorrência da evolução dos genomas dos hospedeiros em resposta a infecção por *Wolbachia*, ou até mesmo por mudanças no genoma da própria bactéria (HOFFMANN et al., 2015).

A escolha da cepa de *Wolbachia* a ser aplicada em intervenções de controle deve ser feita com cautela e levar em consideração o balanço entre a capacidade de bloqueio de *Wolbachia* ao patógeno (os patógenos que serão transmitidos por determinado vetor em uma área de soltura) e os efeitos que ela pode levar ao fitness do hospedeiro (OSEI-POKU et al., 2012). Neste trabalho verificamos que no caso do *Ae. fluviatilis*, *Wolbachia* não influencia na infecção com o *P. gallinaceum* e pode até mesmo levar ao aumento da susceptibilidade ao vírus dengue demonstrando que esta cepa não seria uma boa candidata para uso como medidas de controle de doenças. Entretanto não se pode descartar que estamos tratando de uma infecção nativa, e que existe a possibilidade de mudança do comportamento dessa cepa após um processo de transinfecção para um novo hospedeiro.

Mudanças dos efeitos de interferência de *Wolbachia* em novos hospedeiros já foram descritas, como no caso da cepa *wAlbB* que induz a inibição da disseminação do Dengue em *Ae. aegypti*, mas não em seu hospedeiro natural *Ae. albopictus* (BIAN et al., 2010). Outros estudos mostraram que apesar de a cepa nativa dessa espécie não reduzir a multiplicação do vírus no corpo do mosquito ela é capaz de limitar a transmissão na saliva de algumas populações de mosquitos (MOUSSON et al., 2012). E posteriormente, a introdução estável com a cepa de *wMel* nesse vetor levou a forte capacidade de interferência tanto no corpo quanto na saliva tornando o *Ae. albopictus* refratário ao vírus (BLAGROVE et al., 2012; MOUSSON et al., 2012). Essas diferenças elucidam a importância de se estudar diversas interações entre cepas de *Wolbachia* e seus hospedeiros para compreender o potencial biológico dos mesmos e buscar fenótipos desejados para medidas de controle. Sendo assim o estudo da cepa *wFlu* não deve ser descartado, até mesmo porque a transferência de cepas de *Wolbachia* entre

espécies proximamente correlacionadas é um processo que pode ter maiores taxas de sucesso (OSEI-POKU et al., 2012).

6.4 Competência vetorial do *Ae. fluviatilis*

Estudamos neste trabalho a infecção do *Ae. fluviatilis* com o vírus dengue com o objetivo primário de identificar diferenças e semelhanças na resposta dessa associação nativa em relação a associação artificial entre wMel e *Ae. aegypti*. Entretanto, diante da susceptibilidade observada ao Dengue, suspeitamos da possibilidade dessa espécie apresentar algum grau de competência vetorial para esse vírus. Repetimos então os experimentos de infecção, somente com a titulação viral mais elevada, para confirmar os resultados do experimento anterior e avaliar a presença do vírus na saliva.

Os dados mostraram uma taxa de infecção maior nos mosquitos com *Wolbachia* (37%) em relação à linhagem Tet (26%) que, apesar de não significativo, corrobora os dados previamente observados aos sete dias pós-infecção. No experimento onde avaliamos a influência das diferentes cargas virais foi encontrado 65% e 61% de susceptibilidade dos mosquitos da linhagem wFlu aos 7 e 14 dias pós infecção, enquanto que na linhagem Tet a taxa de infecção foi de 21% e 55%, respectivamente. Apesar da diferença entre os valores observados nos experimentos, os resultados mostraram que a infecção no mosquito é uma característica persistente. A variabilidade dos resultados pode estar relacionada a características individuais dos diferentes grupos de mosquitos ou relacionada a fatores da alíquota de vírus utilizada. Variações nas taxas de suscetibilidade também foram observadas diante da infecção com o *P. galinaceum*.

Também conseguimos detectar a presença do vírus em parte das salivas coletadas, o que sugere que o *Ae. fluviatilis* pode ser um vetor da dengue. Esse é o primeiro trabalho a verificar a capacidade desta espécie em adquirir infecção com o vírus dengue, existindo grande escassez de dados sobre a participação desse mosquito na transmissão de outros patógenos de importância para a saúde humana. No que concerne a associação com arboviroses esta espécie foi apontada somente como responsável por infecções silvestres de febre amarela (DAVIS E SHANNON, 1931; SOPER,

1933). Nesse sentido, contrastamos os hábitos do *Ae. fluviatilis* em relação ao *Ae. aegypti* e ainda que neste estudo tenhamos constatado a presença do vírus na saliva dessa espécie o fato de ela não apresentar hábitos predominantemente urbanos (FORATINI; RABELO, 1960) torna menor a sua probabilidade de contato com um ser humano infectado que apresente viremia suficiente para transmissão do vírus para o mosquito. Entretanto alguns autores já têm classificado o *Ae. fluviatilis* como em estado de “domesticação” sendo possível de ser encontrada próxima a habitações urbanas em focos mistos com o *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus* (ROTFAULT, 1976; LOPES et al., 1993; CORREA et al., 2014). Sendo assim essa espécie poderia se transformar em um vetor em potencial caso ocorra uma modificação em sua distribuição, vindo essa a tornar-se mais urbana, como tem ocorrido com *Ae. albopictus* (LI et al., 2014).

Não é rica a literatura em informações sobre a biologia desta espécie seja em condições naturais ou experimentais. Alguns autores apontam que esse mosquito realiza a alimentação sanguínea preferencialmente em animais, entretanto estudos sobre a preferência alimentar do *Ae. fluviatilis* em condições de laboratório mostraram que o homem pode ser o hospedeiro preferencial da espécie em 61,3% das vezes em relação a outros animais (FORATINNI, 2002; ROTFAULT, 1976). Com base nesses dados é possível sugerir que em caso de contato entre homem e *Ae. fluviatilis* e se uma das partes estiver infectada com o vírus, pode ocorrer um ciclo de transmissão, uma vez que nossos resultados mostraram que o vírus pode ser encontrado na saliva dessa espécie.

Em nosso estudo constatamos maior susceptibilidade dos mosquitos naturalmente infectados com a cepa wFlu, entretanto as salivas coletadas apresentaram menor taxa de infecção em relação a linhagem Tet (45% para a linhagem Tet e 14% para a linhagem wFlu). Mousson e colaboradores observaram dados similares na relação nativa entre *Wolbachia* e *Ae. albopictus*, onde foi constatado que as cepas wAlb também não impedem a replicação do vírus dengue mas levam à infecção viral reduzida nas glândulas salivares limitando a transmissão (MOUSSON et al., 2012). Tal fato pode estar associado com a distribuição da bactéria nos tecidos do hospedeiro. Moreira e colaboradores (2009) analisaram o tropismo da cepa wFlu no *Ae. fluviatilis*, e

constatarem que dentre outros tecidos a bactéria estava presente na cabeça dos mosquitos (MOREIRA et al., 2009). Dessa forma, nosso resultado poderia ser explicado caso haja suficiente densidade de *Wolbachia* nas glândulas salivares, onde ocorre forte sítio de interação entre a bactéria e o vírus (FRENTIU et al, 2014; WALKER et al., 2011). Dessa forma, mostramos que a presença de *Wolbachia* nativa nesse caso poderia levar a redução da infecção seja impedindo a invasão nas glândulas salivares ou levando a diminuição da carga viral fazendo com que o *Ae. fluviatilis* nunca fosse incriminado como vetor natural do Dengue vírus.

Em nosso trabalho realizamos a detecção de vírus direto da saliva dos mosquitos que foram induzidos à salivação, ou através da detecção do vírus em mosquitos injetados com a saliva previamente coletada. Entretanto, não foi observada diferença nas taxas de infecção entre as duas metodologias testadas e comprovamos a possibilidade do uso do kit High Pure Viral Nucleic Acid (Roche) para extração de RNA com este tipo de amostra. Nossos resultados confirmam também que a metodologia de coleta de saliva proposta foi eficiente, uma vez que através desta também detectamos salivas de mosquitos *Ae. aegypti* positivas. Outros estudos de competência vetorial de mosquitos diferem predominantemente na metodologia de extração do RNA viral da saliva coletada, havendo diversos kits disponíveis para essa finalidade. Castro e colaboradores (2004), por exemplo, utilizaram metodologia semelhante a deste trabalho para a coleta do material e encontraram 48% de positividade nas salivas de *Ae. albopictus* e 23% de positividade nas salivas de *Ae. aegypti* (CASTRO et al., 2004). A extração do RNA foi realizada através de utilização de kit (QIAmp Viral mini Kit – Qiagen ®), e a busca do vírus foi realizada por RT-PCR. Posteriormente os autores realizaram também a tentativa de reisolar o vírus em células C6-36 a partir das salivas coletadas, entretanto não obtiveram êxito nos resultados (CASTRO et al., 2004).

Outra metodologia proposta por Ye e colaboradores (2015) propõe a coleta das salivas em solução de açúcar explorando o fato dos mosquitos expectorarem vírus ao se alimentarem. O RNA do material recolhido foi extraído com utilização do Kit Pure Link Pro 96 (Life Technologies ®), seguindo as instruções do fabricante os autores encontraram 62% de infecção nas

salivas de mosquitos *Ae. aegypti* selvagens e 6% de infecção nas salivas de mosquitos Infectados com a cepa wMel (YE et al., 2015). A metodologia proposta por aqueles autores também é interessante, pois o processamento da saliva antes do uso dos kits elimina a necessidade de se trabalhar com amostras de pequenos volumes como as obtidas no nosso trabalho.

Demais estudos com o mosquito *Ae. aegypti* optam pela dissecação das glândulas salivares, e a extração de RNA dos tecidos através do método químico de Trizol, sendo observadas taxas de infecção variáveis entre 46 a 85% em mosquitos sem *Wolbachia*, nas diferentes réplicas dos experimentos (AMUZU et al., 2015). Apesar de ser uma metodologia interessante, dificuldades na realização no procedimento de dissecação das glândulas levam a grande perda de amostras, adicionando ao fato de que a glândula pode estar positiva mas o vírus não ser expectorado, por várias razões. Além disso a escolha da nossa metodologia foi baseada no fato de a utilização de kits de extração serem mais eficazes do que outros métodos, evitando falsos negativos. Nossas taxas de infecção nas salivas foram de 45% em mosquitos sem *Wolbachia* e apenas 18% nos mosquitos com a bactéria, esses valores no entanto não foram diferentes estatisticamente possivelmente devido ao número reduzido de amostras (11 para linhagem Tet e 18 para wFlu). A porcentagem de salivas infectadas observada neste estudo foi menor do que em outros trabalhos, mas há a ressalva de o material testado nesse experimento pertencer ao *Ae. fluviatilis*. Não há também indicações de que esses resultados estejam relacionados à eficiência da metodologia do estudo uma vez que foi possível detectar o vírus em grande parte das salivas coletadas do mosquito *Ae. aegypti*.

6.5 Direções futuras

Neste trabalho estudamos a influência de diferentes cargas parasitárias na capacidade de bloqueio de cepas nativas e exógenas de *Wolbachia* diante da infecção pelo *P. gallinaceum* e pelo vírus dengue, para entender se existem diferenças e semelhanças nos seus padrões de resposta. Baseado na relação entre densidade de *Wolbachia* e força da capacidade de interferência, supostamente, baixas parasitemias e titulações de vírus possivelmente

permitiriam a ocorrência do fenótipo de interferência aos patógenos para a cepa wFlu. Por outro lado, as cargas parasitárias de *P. gallinaceum* não seriam relevantes para bloqueio mediado para a cepa wMel, e mosquitos positivos seriam encontrados na infecção com maiores titulações do dengue vírus. A obtenção de dados com base em nossas hipóteses é importante, pois forneceria informações adicionais a respeito do funcionamento do fenótipo de interferência permitindo também a melhor compreensão da dinâmica de transmissão de patógenos para os mosquitos e como esta pode ser modificada pela presença da *Wolbachia*.

Devido ao fato de não termos determinado nenhuma capacidade de interferência da cepa wFlu ao *P. gallinaceum* ou ao vírus dengue, inicialmente sugerimos que se houve a capacidade de bloqueio da cepa wFlu a patógenos esta foi perdida ao longo da história evolutiva entre a bactéria e o hospedeiro. Essa teoria ressalta a importância da contínua vigilância das espécies que são transinfectadas com objetivos de soltura para estratégias de controle de doenças. Entretanto foi observado pequeno nível de bloqueio ao vírus dengue na saliva de mosquitos *Ae. fluviatilis*, o que pode significar a existência de uma capacidade latente de interferência indicando que acontece de acordo com a espécie de patógeno. Para investigar melhor essa hipótese deverá ser avaliado se a cepa wFlu pode influenciar nos níveis de esporozoítos de *P. gallinaceum* na saliva dessa espécie.

Adicionalmente vimos que a cepa wMel tem maior potencial de interferência ao dengue vírus em relação ao *P. gallinaceum*, pois constatamos que os títulos virais mais elevados não foram capazes de modificar o fenótipo da cepa wMel no *Ae. aegypti*. Houve 100% de bloqueio na titulação de 10^6 PFU/mL, enquanto que as titulações mais baixas não foram capazes de levar a infecção sequer nos mosquitos sem *Wolbachia*, tornando necessária a realização de mais experimentos para testar nossa hipótese. A influência da carga viral ainda deverá ser realizada com isolados virais mais infectivos, que apresentem titulações mais elevadas ou ainda com sorotipos que levam a capacidade de bloqueio menos efetiva (FERGUSON *et al.*, 2015). Foi demonstrado que mosquitos de campo infectados com a cepa wMel são capazes de adquirir infecção no abdômen quando o sangue de pacientes

apresenta elevadas viremias (FERGUSON *et al.*, 2015). Com base nesses dados acreditamos que uma metodologia que realize a concentração do vírus, através de metodologia de ultracentrifugação, e o oferecimento dessas titulações virais elevadas aos mosquitos talvez seja capaz de levar a alguma mudança no fenótipo de interferência desta cepa. Esses experimentos forneceriam uma imagem mais completa do efeito dos títulos virais na capacidade de interferência.

Nosso trabalho mostrou também uma evidência preliminar sobre a competência vetorial do *Ae. fluviatilis*, contudo algumas ressalvas em relação aos experimentos ainda devem ser resolvidas. Primeiramente, deve ser considerado que nossos ensaios foram realizados somente com um sorotipo de dengue, não podendo ser descartado que a susceptibilidade do mosquito bem como o impacto das diferentes cepas de *Wolbachia* na interferência ao vírus pode ser sorotipo dependente. Isso foi demonstrado por Ferguson (2015) que constatou que há maior capacidade de interferência da wMel para o sorotipo 4 no abdômen dos mosquitos *Ae. aegypti* infectados, enquanto que efeito intermediário foi demonstrado para os sorotipos 2 e 3, e menor efeito dessa cepa foi constatado para o bloqueio do DENV1. Com esses dados pode-se suspeitar que em novos experimentos com DENV1 talvez seja observada maiores taxas de infecção no *Ae. fluviatilis*. Além disso, nossos estudos foram conduzidos em condições constantes (27°C e umidade relativa de 70%) e alguns estudos mostram que a transmissão da dengue pode ser também dependente da temperatura de forma que variações na faixa de 26°C a 30°C podem levar a variações na velocidade da replicação viral e na capacidade de bloqueio (CARRINGTON; SIMMONS, 2014; MURDOCK *et al.*, 2014)

Nossa metodologia para análise da competência vetorial consistiu na realização da busca do vírus na saliva, entretanto não realizamos a quantificação absoluta do mesmo, tal procedimento deverá ser incluído em estudo posterior a fim de comparar os níveis de infecção na saliva do *Ae. fluviatilis* em relação ao *Ae. aegypti* para compreender se esses valores podem ser suficientes para levar a infecção em um hospedeiro humano. Finalmente metodologias baseadas em hibridização fluorescente *in situ* tal como realizado

por Moreira e colaboradores (2009) esclareceriam a dinâmica de infecção por dengue em *Ae. fluviatilis*. Isso permitiria avaliar se os fenótipos observados envolvem competição por recursos celulares e se a presença do vírus está presente nos mesmos tecidos onde *Wolbachia* ocorre em menor densidade, ou está ausente.

7 CONCLUSÃO

O presente estudo demonstra o efeito das mudanças nas cargas parasitárias na capacidade de bloqueio mediada por diferentes cepas de *Wolbachia*, dado que tal fator é importante para uma melhor descrição desse efeito nos hospedeiros. Com base nos nossos resultados pode-se concluir que:

- Variações na carga parasitária não levam à considerável mudança na capacidade de bloqueio;
- Apesar de terem diferentes tipos de associação com os hospedeiros, sendo uma nativa e uma exógena, as cepas wFlu e wMel não apresentam consistente capacidade de interferência ao *P. gallinaceum*
- As cepas estudadas apresentam diferentes padrões de resposta frente à infecção com o Dengue de forma que foi visto que a cepa wMel apresenta forte capacidade de interferência ao vírus, enquanto que a cepa wFlu pode induzir ao aumento da infecção nas titulações elevadas aos sete dias pós infecção.
- O efeito das cargas parasitárias na susceptibilidade dos mosquitos é específico para os diferentes patógenos, pois não foram relatadas diferentes taxas de infecção dos mosquitos ao *P. gallinaceum*, mas houve queda no número de mosquitos infectados com baixas titulações do vírus dengue.
- É possível detectar a presença do vírus na saliva do mosquito *Ae. fluviatilis* contudo em menor porcentagem em comparação com os mosquitos sem *Wolbachia*, indicando que a cepa wFlu pode levar a uma modesta capacidade de interferência em seu hospedeiro natural.
- Os resultados permitem supor que o *Ae. fluviatilis* pode ser um vetor da dengue, é necessária uma análise completa de sua participação na transmissão da dengue com estudos mais aprofundados envolvendo diferentes sorotipos, genótipos e condições de infecção. Esses resultados destacam a importância do estudo de cepas nativas para a melhor compreensão das relações entre *Wolbachia* e hospedeiro, e para desvendar demais fatores que influenciam o fenótipo de interferência a patógenos.

REFERÊNCIAS

ABRAHAM, E. G.; JACOBS-LORENA, M. Mosquito midgut barriers to malaria parasite development. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 34, n. 7, p. 667–671, 2004.

AHMED, M. Z.; LI, S. J.; XUE, X.; et al. The Intracellular Bacterium *Wolbachia* Uses Parasitoid Wasps as Phoretic Vectors for Efficient Horizontal Transmission. **PLoS Pathogens**, v. 11, n. 2, p. 1–19, 2015.

ALMEIDA, F. DE; MOURA, A. S.; CARDOSO, A. F.; et al. Effects of *Wolbachia* on fitness of *Culex quinquefasciatus* (Diptera; Culicidae). **Infection, Genetics and Evolution**, v. 11, n. 8, p. 2138–2143, 2011.

AMUZU, H. E.; SIMMONS, C. P.; MCGRAW, E. A. Effect of repeat human blood feeding on *Wolbachia* density and dengue virus infection in *Aedes aegypti*. **Parasites & Vectors**, v. 8, n. 1, p. 246, 2015.

ARAÚJO, H.; CARVALHO, D.; IOSHINO, R.; COSTA-DA-SILVA, A.; CAPURRO, M. *Aedes aegypti* Control Strategies in Brazil: Incorporation of New Technologies to Overcome the Persistence of Dengue Epidemics. **Insects**, v. 6, n. 2, p. 576–594, 2015.

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 (Larchmont, N.Y.)**, v. 1, n. 2, p. 159–168, 2001.

BÄCK, A. T.; LUNDKVIST, A. Dengue viruses - an overview. **Infection ecology & epidemiology**, v. 3, p. 1–21, 2013.

BALDINI, F.; SEGATA, N.; POMPON, J.; et al. Evidence of natural *Wolbachia* infections in field populations of *Anopheles gambiae*. **Nature communications**, v. 5, p. 3985, 2014.

BALDO, L.; WERREN, J. H. Revisiting *Wolbachia* Supergroup Typing Based on WSP: Spurious Lineages and Discordance with MLST. **Current Microbiology**, v. 55, n. 1, p. 81–87, 2007.

BATON, L. A.; PACIDÔNIO, E. C.; GONÇALVES, D. D. S.; MOREIRA, L. A. 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, p. e59619, 2013.

BELINATO, T. A.; MARTINS, A. J.; VALLE, D. Fitness evaluation of two Brazilian *Aedes aegypti* field populations with distinct levels of resistance to the organophosphate temephos. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 7, p. 916–922, 2012.

BHATT, S.; GETHING, P. W.; BRADY, O. J.; et al. The global distribution and

burden of dengue. , v. 496, n. 7446, p. 504–507, 2013.

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

BIAN, G.; XU, Y.; LU, P.; XIE, Y.; XI, Z. The Endosymbiotic Bacterium *Wolbachia* Induces Resistance to Dengue Virus in *Aedes aegypti*. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 4, p. e1000833, 2010.

BLAGROVE, M. S. C.; ARIAS-GOETA, C.; FAILLOUX, A.-B.; SINKINS, S. P. *Wolbachia* strain *wMel* induces cytoplasmic incompatibility and blocks dengue transmission in *Aedes albopictus*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 1, p. 255–260, 2012.

BOYCE, R.; LENHART, A.; KROEGER, A.; et al. *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) for the control of dengue vectors: Systematic literature review. **Tropical Medicine and International Health**, v. 18, n. 5, p. 564–577, 2013.

BRAGA, I. A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 16, n. 4, p. 279–293, 2007.

BROGDON, W. G.; MCALLISTER, J. C. Insecticide resistance and vector control. **Emerging Infectious Diseases**, v. 4, n. 4, p. 605–613, 1998.

BURT, A. Heritable strategies for controlling insect vectors of disease. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 369, n. 1645, p. 20130432, 2014.

CAMARGO, E. P. Malária , maleita , paludismo. **Ciência e Cultura - Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência**, v. vol.55, n. 2317-6660, p. 26–29, 2003.

CAMARGO, Mariana Vitoria Tasón de; KRETTLI, Antoniana Ursine. *Aedes fluviatilis* (Lutz), a new experimental host for *Plasmodium gallinaceum* Brumpt. **The Journal of Parasitology**, v. 64, n. 5, p. 924-925, out. 1981.

CAMARGO, Mariana Victoria Tasón de. *Aedes fluviatilis* (Lutz), um novo hospedeiro experimental do *Plasmodium gallinaceum* Brumpt, 1935. 1977. 61f. Tese (Doutorado em Parasitologia)–Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1977.

CARAGATA, E. P.; RANCÈS, E.; HEDGES, L. M.; et al. Dietary Cholesterol Modulates Pathogen Blocking by *Wolbachia*. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 6, p. e1003459, 2013.

CARRINGTON, L. B.; SIMMONS, C. P. Human to mosquito transmission of dengue viruses. **Frontiers in Immunology**, v. 5, n. JUN, p. 1–8, 2014.

CARVALHO, D. O.; NIMMO, D.; NAISH, N.; et al. Mass Production of

Genetically Modified *Aedes aegypti* for Field Releases in Brazil. **Journal of Visualized Experiments**, , n. 83, p. 1–10, 2014.

CASTRO, M. G. DE; NOGUEIRA, R. M. R.; SCHATZMAYR, H. G.; MIAGOSTOVICH, M. P.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. 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. December, p. 809–814, 2004.

CHANG, X.; ZHONG, D.; FANG, Q.; et al. Multiple resistances and complex mechanisms of *Anopheles sinensis* mosquito: a major obstacle to mosquito-borne diseases control and elimination in China. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 8, n. 5, p. e2889, 2014.

CLEC'H, W. LE; CHEVALIER, F. D.; GENTY, L.; et al. Cannibalism and Predation as Paths for Horizontal Passage of *Wolbachia* between Terrestrial Isopods. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, p. e60232, 2013.

CÔNSOLI RAGB, LOURENÇO-OLIVEIRA R. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. **Editores FIOCRUZ**; 1998

COLLINS, F.S.;SKAI, R.K. VERNICK, K.D. et AL. Genetic selection of a *Plasmodium* – refractory strains of the malaria vector *Anopheles gambiae*. **Science**, 234, 607-10, 1986.

D'AMATO, C.; TORRES, J. P. M.; MALM, O. DDT (Dicloro difenil tricloroetano): Toxicidade e contaminação ambiental - Uma revisão. **Química Nova**, v. 25, n. 6 A, p. 995–1002, 2002.

DEGALLIER, N.; MARCUS, J.; TEIXEIRA, S.; et al. *Aedes albopictus* may not be vector of dengue virus in human epidemics in Brazil. **Revista Saúde Pública**, v. 37, n. 3, p. 386–387, 2003.

DODSON, B. L.; HUGHES, G. L.; PAUL, O.; et al. *Wolbachia* Enhances West Nile Virus (WNV) Infection in the Mosquito *Culex tarsalis*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 7, p. e2965, 2014.

DUTRA, H. L. C.; SANTOS, L. M. B. DOS; CARAGATA, E. P.; et al. From Lab to Field: The Influence of Urban Landscapes on the Invasive Potential of *Wolbachia* in Brazilian *Aedes aegypti* Mosquitoes. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 4, p. 1–22, 2015.

EVANS, O.; CARAGATA, E. P.; MCMENIMAN, C. J.; et al. Increased locomotor activity and metabolism of *Aedes aegypti* infected with a life-shortening strain of *Wolbachia pipiensis*. **The Journal of experimental biology**, v. 212, n. Pt 10, p. 1436–1441, 2009.

FERGUSON, M.N; KIEN, D.T.H; CLAPHAM, H.; et al. Modeling the impact on virus transmission of *Wolbachia*-mediated blocking of dengue virus

infection of *Aedes aegypti*. **Science Translational Medicine**, v 7, pp. 279, 2015

FORATTINI, Oswaldo Paulo. **Culicidologia Médica**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2002.

FRANZ, A.; SANCHEZ-VARGAS, I.; ADELMAN, Z.; 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, n. 11, p. 4198–4203, 2006.

FRENTIU, F. D.; ROBINSON, J.; YOUNG, P. R.; MCGRAW, E. A.; O'NEILL, S. L. *Wolbachia*-Mediated Resistance to Dengue Virus Infection and Death at the Cellular Level. **PLoS ONE**, v. 5, n. 10, p. e13398, 2010.

FRENTIU, F. D.; ZAKIR, T.; WALKER, T.; et al. Limited Dengue Virus Replication in Field-Collected *Aedes aegypti* Mosquitoes Infected with *Wolbachia*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 2, p. e2688, 2014.

FU, G.; LEES, R. S.; NIMMO, D.; et al. Female-specific flightless phenotype for mosquito control. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 10, p. 4550–4554, 2010.

GALLER, R; BONALDO, M.C; ALVEZ, A.M.B. Desenvolvimento de vacinas contra dengue. In: VALLE, D; PIMENTA, D.N; CUNHA, R.V. **Dengue teorias e práticas**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2015. p187

GLASER, R. L.; MEOLA, M. A. The Native *Wolbachia* Endosymbionts of *Drosophila melanogaster* and *Culex quinquefasciatus* Increase Host Resistance to West Nile Virus Infection. **PLoS ONE**, v. 5, n. 8, p. e11977, 2010.

GLOWSKA, E.; DRAGUN-DAMIAN, A.; DABERT, M.; GERTH, M. New *Wolbachia* supergroups detected in quill mites (Acari: Symbionidae). **Infection, Genetics and Evolution**, v. 30, p. 140–146, 2015. Elsevier B.V.

GREENWOOD, B. M.; FIDOCK, D. A; KYLE, D. E.; et al. Review series Malaria—progress, perils, and prospects for eradication. , v. 118, n. 4, 2008.

GUBLER, D. J. Resurgent vector-borne diseases as a global health problem. **Emerging infectious diseases**, v. 4, n. 3, p. 442–450, 1998.

GUY, B.; BRIAND, O.; LANG, J.; SAVILLE, M.; JACKSON, N. Development of the Sanofi Pasteur tetravalent dengue vaccine: One more step forward. **Vaccine**, 2015. Elsevier Ltd.

HEDGES, L. M.; BROWNLIE, J. C.; O'NEILL, S. L.; JOHNSON, K. N. *Wolbachia* and virus protection in insects. **Science**, v. 322, n. 5902, p. 702, 2008.

HOFFMANN, A A; MONTGOMERY, B. L.; POPOVICI, J.; et al. Successful

establishment of Wolbachia in Aedes populations to suppress dengue transmission. **Nature**, v. 476, n. 7361, p. 454–457, 2011. Nature Publishing Group.

HOFFMANN, A. A.; ITURBE-ORMAETXE, I.; CALLAHAN, A. G.; 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.

HOFFMANN, A. A.; ROSS, P. A.; RAŠIĆ, G. Wolbachia strains for disease control: ecological and evolutionary considerations. **Evolutionary Applications**, v. 8, n. 8, p. n/a–n/a, 2015.

HUGHES, G. L.; KOGA, R.; XUE, P.; FUKATSU, T.; RASGON, J. L. Wolbachia Infections Are Virulent and Inhibit the Human Malaria Parasite Plasmodium Falciparum in Anopheles Gambiae. **PLoS Pathogens**, v. 7, n. 5, p. e1002043, 2011.

HUGHES, G. L.; RASGON, J. L. Transinfection: A method to investigate Wolbachia-host interactions and control arthropod-borne disease. **Insect Molecular Biology**, v. 23, n. 2, p. 141–151, 2014.

HUGHES, G. L.; RIVERO, A.; RASGON, J. L. Wolbachia Can Enhance Plasmodium Infection in Mosquitoes: Implications for Malaria Control? **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 9, p. e1004182, 2014.

HUIGENS, M. E.; ALMEIDA, R. P. DE; BOONS, P. A. H.; LUCK, R. F.; STOUTHAMER, R. Natural interspecific and intraspecific horizontal transfer of parthenogenesis-inducing Wolbachia in Trichogramma wasps. **Proceedings. Biological sciences / The Royal Society**, v. 271, n. March, p. 509–515, 2004.

HURK, A. F. VAN DEN; HALL-MENDELIN, S.; PYKE, A. T.; et al. Impact of Wolbachia on Infection with Chikungunya and Yellow Fever Viruses in the Mosquito Vector Aedes aegypti. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 11, p. e1892, 2012.

HURWITZ, I.; FIECK, A.; READ, A.; et al. Paratransgenic control of vector borne diseases. **International journal of biological sciences**, v. 7, n. 9, p. 1334–44, 2011.

HUSSAIN, M.; LU, G.; TORRES, S.; et al. Effect of Wolbachia on Replication of West Nile Virus in a Mosquito Cell Line and Adult Mosquitoes. **Journal of Virology**, v. 87, n. 2, p. 851–858, 2013.

JIN, C.; REN, X.; RASGON, J. L. The virulent Wolbachia strain wMelPop efficiently establishes somatic infections in the malaria vector Anopheles gambiae. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 10, p. 3373–3376, 2009.

JOSHI, D.; MCFADDEN, M. J.; BEVINS, D.; ZHANG, F.; XI, Z. Wolbachia strain wAlbB confers both fitness costs and benefit on *Anopheles stephensi*.

Parasites & Vectors, v. 7, n. 1, p. 336, 2014.

KAMBRIS, Z.; BLAGBOROUGH, A. M.; PINTO, S. B.; et al. *Wolbachia* Stimulates Immune Gene Expression and Inhibits *Plasmodium* Development in *Anopheles gambiae*. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 10, p. e1001143, 2010.

KAMBRIS, Z.; COOK, P. E.; PHUC, H. K.; SINKINS, S. P. Immune activation by life-shortening *Wolbachia* and reduced filarial competence in mosquitoes. **Science (New York, N.Y.)**, v. 326, n. 5949, p. 134–6, 2009.

KRAEMER, M. U. G.; SINKA, M. E.; DUDA, K. A.; et al. The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*. **eLife**, v. 4, p. e08347, 2015.

LAZARO A., A.; HAN, W. W.; MANRIQUE-SAIDE, P.; et al. Community Effectiveness of Copepods for Dengue Vector Control: Systematic Review. **Tropical Medicine & International Health**, v. 20, n. 6, p. n/a–n/a, 2015.

LEPAGE, D.; BORDENSTEIN, S. R. *Wolbachia*: Can we save lives with a great pandemic? **Trends in Parasitology**, v. 29, n. 8, p. 385–393, 2013. Elsevier Ltd.

LI, Y.; KAMARA, F.; ZHOU, G.; et al. Urbanization Increases *Aedes albopictus* Larval Habitats and Accelerates Mosquito Development and Survivorship. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 11, 2014.

LOPES, J.; SILVA, M. A. N.; BORSATO, A. M.; OLIVEIRA, V. D.; OLIVEIRA, F. J. D. A. *Aedes* (Stegomyia) *aegypti* L. e a culicídeofauna associada em área urbana da região sul do Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 27, n. 5, p. 326–333, 1993.

LU, P.; BIAN, G.; PAN, X.; XI, Z. *Wolbachia* induces density-dependent inhibition to dengue virus in mosquito cells. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 7, p. 1–8, 2012.

MARCONDES, Carlos Brisola. **Entomologia médica e veterinária**. 2.ed. São Paulo:Editora Atheneu, 2011.

MARTINEZ, J.; LONGDON, B.; BAUER, S.; et al. Symbionts Commonly Provide Broad Spectrum Resistance to Viruses in Insects: A Comparative Analysis of *Wolbachia* Strains. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 9, p. e1004369, 2014.

MCGRAW, E. A.; O'NEILL, S. L. Beyond insecticides: new thinking on an ancient problem. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 3, p. 181–193, 2013. Nature Publishing Group.

MCMENIMAN, C. J.; LANE, R. V.; CASS, B. N.; et al. Stable Introduction of a Life-Shortening *Wolbachia* Infection into the Mosquito *Aedes aegypti*. **Science**, v. 323, n. 5910, p. 141–144, 2009.

MICIELI, V. M.; GLASER, R. L. Somatic *Wolbachia* (Rickettsiales)

Rickettsiaceae) Levels in *Culex quinquefasciatus* and *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) and Resistance to West Nile Virus Infection Somatic *Wolbachia* (Rickettsiales: Rickettsiaceae) Levels in *Culex quinquefasciatus* and. **Journal of medical entomology**, v. 51, n. 1, p. 189–199, 2014.

MIN, K. T.; BENZER, S. *Wolbachia*, normally a symbiont of *Drosophila*, can be virulent, causing degeneration and early death. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 20, p. 10792–10796, 1997.

MOREIRA, L. A.; ITURBE-ORMAETXE, I.; JEFFERY, J. A.; et al. A *Wolbachia* symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with dengue, Chikungunya, and *Plasmodium*. **Cell**, v. 139, n. 7, p. 1268–78, 2009.

MOUSSON, L.; MARTIN, E.; ZOUACHE, K.; et al. *Wolbachia* modulates Chikungunya replication in *Aedes albopictus*. **Molecular Ecology**, v. 19, n. 9, p. 1953–1964, 2010.

MOUSSON, L.; ZOUACHE, K.; ARIAS-GOETA, C.; et al. The Native *Wolbachia* Symbionts Limit Transmission of Dengue Virus in *Aedes albopictus*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 12, p. e1989, 2012.

MURDOCK, C. C.; BLANFORD, S.; HUGHES, G. L.; RASGON, J. L.; THOMAS, M. B. Temperature alters *Plasmodium* blocking by *Wolbachia*. **Scientific reports**, v. 4, p. 3932, 2014.

MUSSO, D.; NILLES, E. J.; CAO-LORMEAU, V. M. Rapid spread of emerging Zika virus in the Pacific area. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 20, n. 10, p. 1–5, 2014. European Society of Clinical Infectious Diseases.

NEVES, David Pereira et al. **Parasitologia Humana**. 11. ed. São Paulo: Atheneu, 2005.

NGUYEN, T. H.; NGUYEN, H. LE; NGUYEN, T. Y.; et al. Field evaluation of the establishment potential of wMelPop *Wolbachia* in Australia and Vietnam for dengue control. **Parasites & Vectors**, v. 8, n. 1, p. 563, 2015.

NGUYET, M. N.; DUONG, T. H. K.; TRUNG, V. T.; 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, n. 22, p. 9072–7, 2013.

NILES, W. J. *Mansonia crassipes* as the Natural Vector of Filarioids, *Plasmodium gallinaceum* and other Plasmodia of Fowls in Ceylon. **Nature**, v. 23, n. 4969, p. 411–412, 1965.

NJABO, K. Y.; CORNEL, A. J.; BONNEAUD, C.; et al. Parasite Associations in a Central African Rainforest. , v. 20, n. 5, p. 1049–1061, 2012.

NJABO, K. Y.; CORNEL, A. J.; SEHGAL, R. N.; et al. *Coquillettidia* (Culicidae,

Diptera) mosquitoes are natural vectors of avian malaria in Africa. **Malaria Journal**, v. 8, n. 1, p. 193, 2009.

OSBORNE, S. E.; ITURBE-ORMAETXE, I.; BROWNLIE, J. C.; O'NEILL, S. L.; JOHNSON, K. N. 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.

OSBORNE, S. E.; LEONG, Y. S.; O'NEILL, S. L.; JOHNSON, K. N. Variation in Antiviral Protection Mediated by Different *Wolbachia* Strains in *Drosophila simulans*. **PLoS Pathogens**, v. 5, n. 11, p. e1000656, 2009.

OSEI-POKU, J.; HAN, C.; MBOGO, C. M.; JIGGINS, F. M. Identification of *Wolbachia* Strains in Mosquito Disease Vectors. **PLoS ONE**, v. 7, n. 11, p. e49922, 2012.

PAN, X.; ZHOU, G.; WU, J.; et al. *Wolbachia* induces reactive oxygen species (ROS)-dependent activation of the Toll pathway to control dengue virus in the mosquito *Aedes aegypti*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 1, p. E23–E31, 2012.

PANCETTI, F. G. M.; HONÓRIO, N. A.; URBINATTI, P. R.; LIMA-CAMARA, T. N. Twenty-eight years of *Aedes albopictus* in Brazil: a rationale to maintain active entomological and epidemiological surveillance. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, n. 1, p. 87–9, 2015.

PIMENTA, P. F.; ORFANO, A. S.; BAHIA, A. C.; et al. An overview of malaria transmission from the perspective of Amazon *Anopheles* vectors. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 1, p. 23–47, 2015.

RAINEY, S. M.; SHAH, P.; KOHL, A.; DIETRICH, I. Understanding the *Wolbachia*-mediated inhibition of arboviruses in mosquitoes: progress and challenges. **Journal of General Virology**, v. 95, n. Pt_3, p. 517–530, 2014.

RAMIREZ-PUEBLA, S. T.; SERVIN-GARCIDUEAS, L. E.; ORMEO-ORRILLO, E.; et al. Species in *Wolbachia*? Proposal for the designation of “*Candidatus Wolbachia bourtzisii*”, “*Candidatus Wolbachia onchocercicola*”, “*Candidatus Wolbachia blaxteri*”, “*Candidatus Wolbachia brugii*”, “*Candidatus Wolbachia taylori*”, “*Candidatus Wolbachia collembolicola*” and “*Candidatus Wolbachia multihospitum*” for the different species within *Wolbachia* supergroups. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 38, n. 6, p. 390–399, 2015.

RANCÈS, E.; JOHNSON, T. K.; POPOVICI, J.; 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.

RANCÈS, E.; YE, Y. H.; WOOLFIT, M.; MCGRAW, E. A.; O'NEILL, S. L. The Relative Importance of Innate Immune Priming in *Wolbachia*-Mediated Dengue Interference. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 2, p. e1002548, 2012.

ROBERTO, A.; PALACIOS, R.; THOMÉ, B.; et al. Clinical evaluation strategies for a live attenuated tetravalent dengue vaccine. *v. 33*, p. 7121–7125, 2015.

ROTRAUT, A.G.B.C. Estudos sobre a biologia de *Aedes fluviatilis* (lutz), em laboratório. Tese (Mestrado em Parasitologia)—Instituto de Ciencias Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1976.

RICKLEFS, Robert E.; FALLON, Sylvia M. Diversification and host switching in avian malaria parasites. **The Royal Society**, v. 269 p. 885-892, mar. 2002.

SARIDAKI, A.; BOURTZIS, K. *Wolbachia*: more than just a bug in insects genitals. **Current Opinion in Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 67–72, 2010.

SINHA, S.; MEDHI, B.; SEHGAL, R. Challenges of drug-resistant malaria. **Parasite**, v. 21, p. 61, 2014.

SMITH, R. C.; VEGA-RODRÍGUEZ, J.; JACOBS-LORENA, M. The *Plasmodium* bottleneck: malaria parasite losses in the mosquito vector. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 5, p. 644–661, 2014.

SU, X; HAYTON, K; WELLEMS, T.E. Genetic Linkage and Association Analyses for Trait Mapping in *Plasmodium falciparum*. **Nature Reviews Genetics**, n.7, p 497-506,2007.

SVS. Boletim Epidemiológico. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica. **Ministério as saúde**, v. 46, p. 1–9, 2015.

SVS. Boletim Epidemiológico da Secretaria de Vigilância em Saúde. Malária: Monitoramento dos casos no Brasil em 2014. **Ministério da Saúde** v. 46, n 25, 2015

TAKASHIMA, E.; MORITA, M.; TSUBOI, T. Vaccine candidates for malaria: what's new? **Expert Review of Vaccines**, v. 15, n. 1, p. 1–3, 2016.

TEIXEIRA, M.G; COSTA, M.C.N; BARRETO, M.L. Epidemiologia da dengue. In: VALLE, D; PIMENTA, D.N; CUNHA, R.V. **Dengue teorias e práticas**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2015. p293

TEIXEIRA, L.; FERREIRA, Á.; ASHBURNER, M. The Bacterial Symbiont *Wolbachia* Induces Resistance to RNA Viral Infections in *Drosophila melanogaster*. **PLoS Biology**, v. 6, n. 12, p. e2, 2008.

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.

TURLEY, A. P.; MOREIRA, L. A.; O'NEILL, S. L.; MCGRAW, E. A. *Wolbachia* Infection Reduces Blood-Feeding Success in the Dengue Fever Mosquito, *Aedes aegypti*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 3, n. 9, p. e516, 2009.

VALLE, D; BELINATO, T.A; MARTINS, A.J. Controle químico do *Aedes aegypti*, resistência a inseticidas e alternativas. In: VALLE, D; PIMENTA, D.N; CUNHA, R.V. **Dengue teorias e práticas**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2015. p93

VLACHOU, D.; SCHLEGELMILCH, T.; RUNN, E.; MENDES, A.; KAFATOS, F. C. The developmental migration of *Plasmodium* in mosquitoes. **Current Opinion in Genetics and Development**, v. 16, n. 4, p. 384–391, 2006.

WALKER, T.; JOHNSON, P. H.; MOREIRA, L. A; et al. The wMel *Wolbachia* strain blocks dengue and invades caged *Aedes aegypti* populations. **Nature**, v. 476, n. 7361, p. 450–453, 2011. Nature Publishing Group.

WALKER, T.; MOREIRA, L. A. Can *Wolbachia* be used to control malaria? **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, p. 212–217, 2011.

WAN, S.-W.; LIN, C.-F.; WANG, S.; et al. Current progress in dengue vaccines. **Journal of Biomedical Science**, v. 20, n. 1, p. 37, 2013. Journal of Biomedical Science.

WANG, S.; JACOBS-LORENA, M. Genetic approaches to interfere with malaria transmission by vector mosquitoes. **Trends in biotechnology**, v. 31, n. 3, p. 185–93, 2013.

WEEKS, A. R.; TURELLI, M.; HARCOTBE, W. R.; REYNOLDS, K. T.; HOFFMANN, A. A. From parasite to mutualist: Rapid evolution of *Wolbachia* in natural populations of *Drosophila*. **PLoS Biology**, v. 5, n. 5, p. 0997–1005, 2007.

WERREN, J. H.; BALDO, L.; CLARK, M. E. *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, n. 10, p. 741–751, 2008.

WILKE, A. B. B.; MARRELLI, M. T. Paratransgenesis: a promising new strategy for mosquito vector control. **Parasites & Vectors**, v. 8, n. 1, p. 342, 2015. Parasites & Vectors.

WONG, P. S. J.; LI, M. Z. I.; CHONG, C. S.; NG, L. C.; TAN, C. H. *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse): A Potential Vector of Zika Virus in Singapore. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 8, p. 1–5, 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). World Malaria Report: 2013. , p. 253, 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Vector-borne diseases. **WHO Library Cataloguing-in-Publication Data**. Fact sheet N°387, 2014

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Dengue and severe dengue. **WHO Library Cataloguing-in-Publication Data**. Fact sheet N°117, 2014

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). World Malária report. **WHO Library Cataloguing-in-Publication Data**, 2015

WU, F.; LIU, Q.; LU, L. et AL. Distribution of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Northwestern China. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**. V.11, n8, p 1181-1186, 2011.

YE, Y. H.; CARRASCO, A. M.; FRENTIU, F. D.; et al. *Wolbachia* Reduces the Transmission Potential of Dengue-Infected *Aedes aegypti*. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 6, p. e0003894, 2015.

ZÉLÉ, F.; NICOT, A.; BERTHOMIEU, A.; et al. *Wolbachia* increases susceptibility to *Plasmodium* infection in a natural system. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 281, p. 20132837, 2014.

ZÉLÉ, F.; NICOT, A.; DURON, O.; RIVERO, A. Infection with *Wolbachia* protects mosquitoes against *Plasmodium*-induced mortality in a natural system. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 25, n. 7, p. 1243–1252, 2012.

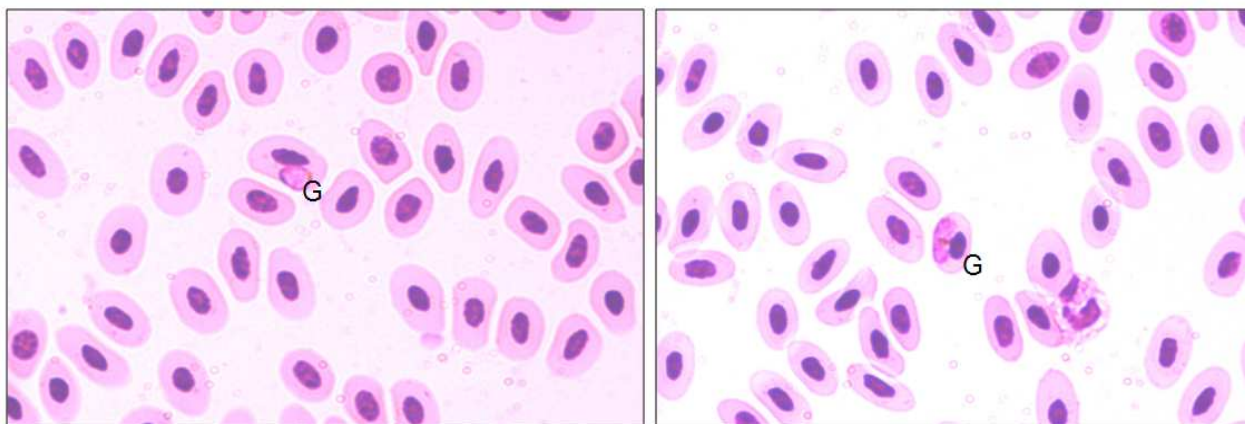
ZOFOU, D.; NYASA, R. B.; NSAGHA, D. S.; et al. Control of malaria and other vector-borne protozoan diseases in the tropics: enduring challenges despite considerable progress and achievements. **Infectious diseases of poverty**, v. 3, n. 1, p. 1, 2014.

ZUG, R.; HAMMERSTEIN, P. Still a Host of Hosts for *Wolbachia*: Analysis of Recent Data Suggests That 40% of Terrestrial Arthropod Species Are Infected. **PLoS ONE**, v. 7, n. 6, p. e38544, 2012.

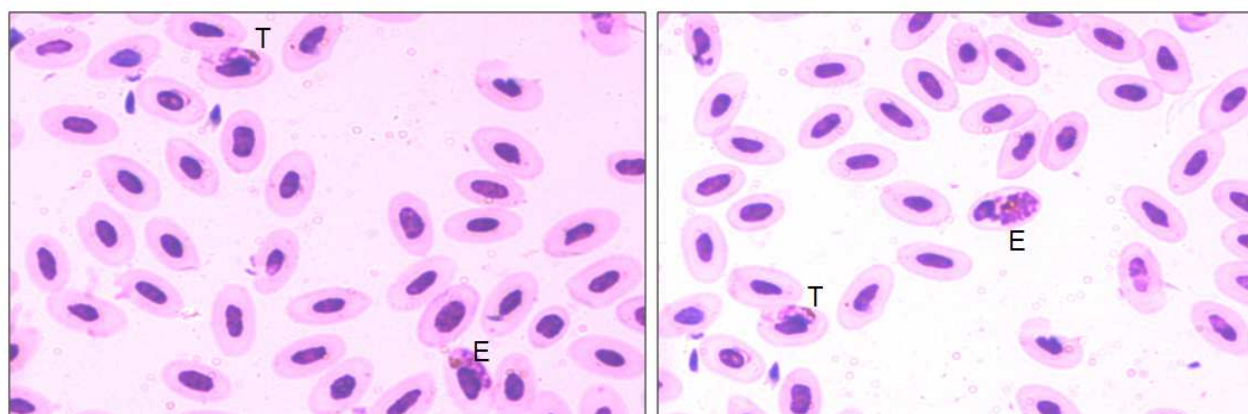
ZUG, R.; HAMMERSTEIN, P. Bad guys turned nice? A critical assessment of *Wolbachia* mutualisms in arthropod hosts. **Biological Reviews**, v. 90, n. 1, p. 89–111, 2015.

ANEXO 1

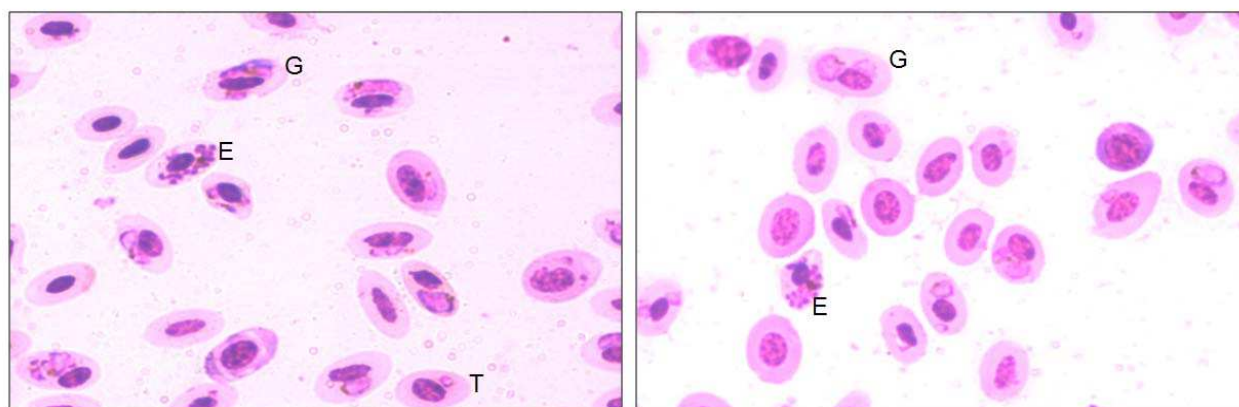
Esfregaço de células sanguíneas de aves infectadas com *P. gallinaceum*



Anexo 1.1: Foto ilustra infecção de ave com baixa parasitemia (0,2%), em destaque pode-se observar gametócitos (G), formas sexuais do parasito. Aumento de 1000X. □



Anexo 1.2: Destaque para Trofozóito (T) e Esquizonte (E), formas assexuadas do parasito. Aumento de 1000X. □



Anexo 1.3: Exemplo de esfregaço de aves com elevada parasitemia (35,4% e 40,1% respectivamente). É possível observar grande número de parasitos, em diferentes formas evolutivas, além da deformação de algumas hemácias cujo núcleo é deslocado e a célula adquire aspecto arredondo. Destaque para Trofozóito (T), Esquizonte (E) e Gametócito (G). Aumento de 1000X.

ANEXO 2

Protocolo de infecção de células C6/36 com vírus Dengue

O processo de infecção começa com pelo menos uma garrafa T25cm² de células C6/36 com confluência de 70-80%.

1. Retirar o meio completamente;
2. Pegar o tubo de vírus congelado e ao descongelar jogar em cima das células. Deixar homogeneizando lentamente por aproximadamente 1 hora;
3. Adicionar meio L15 com 10% de SFB inativado. Incubar a 28°C. Observar dia a dia a formação de efeito citopático nas células até que se observe 50% de Efeito citopático (ECP).
4. Recolher o sobrenadante em um tubo de 50mL (deixar em gelo);
5. Congelar a garrafa no -70°C por 1 hora.
6. Descongelar a garrafa e juntar o material com o sobrenadante armazenado no tubo de 50mL.
7. Centrifugar à 2.500rpm por 10 min a 4°C; Coletar apenas o sobrenadante em microtubos com volume aproximado de 1mL.

Se o objetivo é a produção de vírus para alimentação oral de mosquitos:

1. Assim que a garrafa apresentar cerca de 20% de efeito citopático transferir todo o conteúdo para uma garrafa T75cm².
2. Adicionar mais células saudáveis (cerca de 1×10^7). Acompanhar a progressão da formação do efeito citopático.
3. Quando atingir 20% novamente transferir todo o conteúdo para garrafa T175cm² adicionando mais células saudáveis (uma garrafa de T75cm²).
4. A coleta do vírus deve ser realizada conforme descrito anteriormente quando for observado 50% de efeito citopático.