

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

**Uso da cepa *wMel* de *Wolbachia* como forma alternativa de  
controle do vírus Zika**

por

HEVERTON LEANDRO CARNEIRO DUTRA

Belo Horizonte  
2017

TESE DCS – CPqRR

H. L. C. DUTRA

2017

HEVERTON LEANDRO CARNEIRO DUTRA

**Uso da cepa *wMel* de *Wolbachia* como forma alternativa de  
controle do vírus Zika**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências – área de concentração Biologia Celular e Molecular

Orientação: Dr. Luciano Andrade Moreira

Belo Horizonte

2017



HEVERTON LEANDRO CARNEIRO DUTRA

**Uso da cepa *w*Mel de *Wolbachia* como forma alternativa de controle do vírus Zika**

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em Ciências da saúde do Centro de Pesquisas René Rachou, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências – área de concentração Biologia Celular e Molecular

**Banca examinadora:**

Dr. Luciano Andrade Moreira (CPqRR/FIOCRUZ) Presidente

Dr. Paulo Filemon Paolucci Pimenta (CPqRR/FIOCRUZ) Titular

Dr. Carlos Eduardo Calzavara Silva (CPqRR/FIOCRUZ) Titular

Dr. Rafael Maciel-de-Freitas (IOC/FIOCRUZ) Titular

Dr. João Trindade Marques (UFMG) Titular

Dr. Luis Eduardo Martinez Villegas (CPqRR/FIOCRUZ) Suplente

Tese defendida e aprovada em Belo Horizonte 14/02/2017

“O talento vence jogos, mas só o trabalho em equipe  
ganha campeonatos. ”

Michael Jordan

## DEDICATÓRIAS

Dedicado à minha namorada, e minha família, em especial a minha mãe Maria das Graças pelo apoio incondicional em todos os momentos da minha vida. Dedicado a todos professores que passaram pela minha vida, pois graças a seus ensinamentos fui capaz de enxergar mais longe.

## AGRADECIMENTOS

A minha mãe Maria das Graças. Um exemplo de perseverança e carinho. Todas as minhas conquistas na vida só foram possíveis porque antes de mais nada, pude contar com seu apoio.

Te amo!!

A minha namorada Bruna por se fazer presente durante toda esta jornada insana do Doutorado. Um exemplo de companheirismo, amor, compreensão e carinho dos quais poucos homens tem o prazer de receber na vida.

Ao meu orientador Dr. Luciano Andrade Moreira. Obrigado por nunca duvidar do meu potencial todos estes anos em que convivemos juntos. Todas as conquistas que obtive durante minha passagem pelo Centro de Pesquisas René Rachou – FIOCRUZ só foram possíveis graças à sua confiança e companheirismo. Obrigado por ser este pesquisador incrível e exemplo de caráter profissional e pessoal!

A todos os membros (atuais e passados) do Grupo de Pesquisas Mosquitos Vetores: Endossimbiontes e Interação Patógeno-Vetor pela convivência diária e pelo excelente trabalho em equipe, o qual tornou possível a chegada antecipada deste dia. Aproveito para fazer um agradecimento especial a aqueles os quais estive mais envolvido durante esta jornada:

Ao Dr. Eric Caragata pelos ensinamentos e discussões extremamente produtivas ao longo desta jornada, e por se provar uma amizade sincera dentro e fora do ambiente de trabalho. Um exemplo de profissionalismo e dedicação que eu irei me espelhar por toda vida.

A Silvia Rodrigues por se provar uma aluna extremamente competente e dedicada da qual muito me orgulho. Sua ajuda foi fundamental!

A Dra. Marcele Rocha pelos ensinamentos em cultivo celular, e por sempre me ajudar não importa a hora ou data.

A todo apoio fornecido pelo Msc. Thiago Nunes e Simone Mansur dos quais sem a ajuda este trabalho nunca teria sido completado na velocidade que foi!

Ao Dr. Fabiano Carvalho por sempre ser uma amizade sincera e um ouvido amigo nos momentos em que eu precisei.

A Eliane Moreira e Mariana Magalhães por sempre me acudir em momentos de desespero, prontas a me ajudar com os temidos compromissos burocráticos!

Ao Laboratório de RNA de Interferência da UFMG, em especial ao Dr. João Marques e a Dra. Tatiane Toledo por toda ajuda nos experimentos de imunofluorescência.

A Dra. Zélia Maria Profeta da Luz, atual diretora do CPqRR – FIOCRUZ por nos fornecer meios de ampliar a estrutura física do nosso laboratório, permitindo assim um maior conforto e capacidade de trabalho.

### **AGRADECIMENTOS ÀS INSTITUIÇÕES FINANCIADORAS**

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelos recursos financeiros que permitiram o desenvolvimento deste projeto.

A Fundação Bill & Melinda Gates pelos recursos financeiros e suporte técnico que também permitiram o desenvolvimento deste e de projetos paralelos.

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

Ao Ministério da Saúde (Secretaria de Vigilância em Saúde – SVS e Departamento de Ciência e Tecnologia da Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos – DECIT/SCTIE).

## RESUMO

As doenças transmitidas por mosquitos correspondem a uma das principais causas de morbidade e mortalidade humana em áreas tropicais e subtropicais do mundo. Dentre estas, *Dengue vírus* (DENV) é de longe o arbovírus mais importante, causando cerca de 100 milhões de casos sintomáticos a cada ano em 125 países ao redor do mundo. Entretanto, através da recente associação com casos de desordens congênitas e neurológicas, *Zika vírus* (ZIKV) também emergiu como uma doença transmitida por vetor, de grande importância clínica, expandindo sua presença em mais de 70 países em apenas alguns anos. Analisando-se em conjunto, o impacto na saúde humana causado por apenas estes dois vírus enfatiza a necessidade de abordagens inovadoras para controlar as populações de mosquito, especialmente *Aedes aegypti*, o vetor primário de ambas doenças em áreas urbanas. Dada a habilidade de reduzir ou até mesmo bloquear a infecção de uma variedade de patógenos, *Wolbachia* é uma estratégia promissora a qual está sendo testada contra doenças transmitidas por mosquitos. Neste trabalho, através da infecção oral das linhagens de *Ae. aegypti* contendo (wMel\_Br) ou não (Br) *Wolbachia*, com dois distintos isolados de ZIKV atualmente circulantes no Brasil, nós demonstramos que a cepa wMel de *Wolbachia* é um forte inibidor da infecção por ZIKV, reduzindo a prevalência, intensidade, disseminação e transmissão deste vírus. Ademais, através da coinfeção destas mesmas linhagens de mosquito com dois sorotipos distintos de DENV e ZIKV (DENV-1 / ZIKV; DENV-3 / ZIKV), nós demonstramos que *Wolbachia* ainda interfere fortemente no desenvolvimento viral, apresentando níveis similares de inibição ao observado na mono-infecção por ZIKV, e que está infecção por *Wolbachia* causa a ativação de genes específicos de imunidade do hospedeiro. Finalmente, nós mostramos a existência de competição assimétrica entre os vírus, com distintos níveis de dominância. De forma geral, nossos resultados salientam o uso promissor da cepa wMel de *Wolbachia* como uma ferramenta limitante da transmissão de arbovírus em campo.

Palavras-chave: *Wolbachia*, dengue, Zika, coinfeção

## ABSTRACT

Mosquito-transmitted diseases are one of the leading causes of human morbidity and mortality in tropical and subtropical areas of the world. Amongst these, *Dengue virus* (DENV) is by far the most important arboviral agent, causing around 100 million symptomatic cases a year in 125 countries worldwide. However, through recent association with cases of congenital and neurological disorders, *Zika virus* (ZIKV) has also emerged as a vector-borne disease of great clinical importance, expanding its presence to over 70 countries worldwide in just a few years. Taken together, the burden on human health resulting from only these two viruses emphasizes the need for new and innovative approaches for controlling mosquito populations, especially *Aedes aegypti*, the primary vector of both diseases in urban settings. Given its ability to reduce, or even block infection with a variety of pathogens, the bacterial endosymbiont *Wolbachia* is a promising strategy that is currently being trialed against mosquito-transmitted diseases. Here, through orally challenging *Wolbachia*-infected (wMel\_Br) and uninfected (Br) lineages of *Ae. aegypti* mosquitoes with two distinct ZIKV isolates currently circulating in Brazil, we show that the wMel strain of *Wolbachia* is a strong inhibitor of ZIKV infection, lowering viral prevalence, intensity, dissemination and transmission. Furthermore, by co-infecting these same mosquito lineages with two distinct DENV serotypes and ZIKV (DENV-1 / ZIKV; DENV-3 / ZIKV), we show that *Wolbachia* still greatly impairs viral development, displaying a similar level of viral inhibition to what was observed with ZIKV mono-infection, and that *Wolbachia* infection causes the upregulation of specific host immune genes. Finally, we show asymmetric competition between viruses, with distinct dominance levels. Taken together, our results highlight the promising use of the wMel strain of *Wolbachia* as tool for limiting arbovirus transmission in the field.

Keywords: *Wolbachia*, dengue, Zika, co-infection

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> distribuição de <i>Ae. aegypti</i> nas Américas durante o período de 1930-2011	23
<b>Figura 2:</b> mapa da distribuição dos vetores <i>Ae. aegypti</i> (A) e <i>Ae. albopictus</i> (B) no continente europeu	31
<b>Figura 3:</b> distribuição da incidência de Zika e casos notificados a) e confirmados b) de microcefalia no Brasil durante 2016	34
<b>Figura 4:</b> mapa com casos autóctones de ZIKV em humanos até dezembro de 2016	35
<b>Figura 5:</b> fêmea do mosquito <i>Ae. aegypti</i> durante o repasto sanguíneo	42
<b>Figura 6:</b> ciclo de vida de <i>Ae. aegypti</i>	43
<b>Figura 7:</b> principais vias de resposta imune em mosquitos	45
<b>Figura 8:</b> tipos de incompatibilidade citoplasmática (IC)	54
<b>Figura 9:</b> repasto sanguíneo artificial de <i>Ae. aegypti</i> em alimentador de vidro	64
<b>Figura 10:</b> ensaio de salivação de fêmeas do <i>Ae. aegypti</i>	65
<b>Figura 11:</b> avaliação da dinâmica do fenótipo antiviral da cepa wMel frente à infecção por ZIKV	72
<b>Figura 12:</b> Infecção por <i>Wolbachia</i> restringe a infecção por ZIKV em mosquitos <i>Ae. aegypti</i> .	76
<b>Figura 13:</b> prevalência da infecção por ZIKV e DENV-1 nos tecidos das linhagens wMel_Br e Br de <i>Ae. aegypti</i>	79
<b>Figura 14:</b> <i>Wolbachia</i> restringe a infecção e disseminação de ZIKV e DENV-1 em mosquitos <i>Ae. aegypti</i> no período analisado de 4 a 21 dpi (A-D)	81
<b>Figura 15:</b> dinâmica de infecção por DENV-1 e ZIKV em <i>Ae. aegypti</i> com (wMel_Br) e sem (Br) <i>Wolbachia</i> no período analisado de 4 a 21 dpi	82
<b>Figura 16:</b> quantificação de ZIKV e DENV-1 em cenários de coinfeção em <i>Ae. aegypti</i> com (wMel_Br) e sem (Br) <i>Wolbachia</i> no período analisado de 4 a 21 dpi	84
<b>Figura 17:</b> razão entre o número de cópias virais de DENV-1 e ZIKV em cenários de coinfeção em <i>Ae. aegypti</i> com (wMel_Br) e sem (Br) <i>Wolbachia</i> no período analisado de 4 a 21 dpi	85
<b>Figura 18:</b> prevalência da infecção por ZIKV e DENV-3 nos tecidos das linhagens wMel_Br e Br de <i>Ae. aegypti</i>	88
<b>Figura 19:</b> <i>Wolbachia</i> restringe a infecção e disseminação de ZIKV e DENV-3 em mosquitos <i>Ae. aegypti</i> no período analisado de 4 a 21 dpi (A-D)	90

<b>Figura 20:</b> dinâmica de infecção por DENV-3 e ZIKV em <i>Ae. aegypti</i> com (wMel_Br) e sem (Br) <i>Wolbachia</i> no período analisado de 4 a 21 dpi	91
<b>Figura 21:</b> quantificação de ZIKV e DENV-3 em cenários de coinfeção em <i>Ae. aegypti</i> com (wMel_Br) e sem (Br) <i>Wolbachia</i> no período analisado de 4 a 21 dpi	92
<b>Figura 22:</b> razão entre o número de cópias virais de DENV-3 e ZIKV em cenários de coinfeção em <i>Ae. aegypti</i> com (wMel_Br) e sem (Br) <i>Wolbachia</i> no período analisado de 4 a 21 dpi	93
<b>Figura 23:</b> verificação da infectividade da saliva de <i>Ae. aegypti</i> coinfectados com DENV-3 e ZIKV no período analisado de 4 a 21 dpi (A-D)	95
<b>Figura 24:</b> prevalência da infecção por ZIKV, DENV-1 e DENV-3 na cabeça + tórax das linhagens wMel_Br e Br de <i>Ae. aegypti</i>	96
<b>Figura 25:</b> detecção via IFA de DENV-1 no intestino de <i>Ae. aegypti</i> a 7dpi	98
<b>Figura 26:</b> detecção via IFA de DENV-3 no intestino de <i>Ae. aegypti</i> a 7dpi	99
<b>Figura 27:</b> detecção via IFA de ZIKV no intestino de <i>Ae. aegypti</i> a 7dpi	100
<b>Figura 28:</b> Relação entre densidade de <i>Wolbachia</i> e infecção viral	101
<b>Figura 29:</b> regulação de genes de imunidade em resposta à infecção por DENV-1 e ZIKV em <i>Ae. aegypti</i> contendo <i>Wolbachia</i>	104

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> potenciais espécies de mosquitos vetores de ZIKV	39
<b>Tabela 2:</b> competência vetorial para ZIKV de algumas espécies de mosquitos	41
<b>Tabela 3:</b> Efeito de interferência a patógenos (IP) em mosquitos contendo diversas cepas e tipos de associação de <i>Wolbachia</i>	56
<b>Tabela 4:</b> identificação do vírus e seu respectivo título viral utilizado nos experimentos de infecção de mosquitos	62
<b>Tabela 5:</b> identificação dos genes utilizados no ensaio de expressão gênica, e suas respectivas funções conhecidas	70
<b>Tabela 6:</b> Efeitos de <i>Wolbachia</i> na prevalência de ZIKV	74
<b>Tabela 7:</b> porcentagem de redução na prevalência de infecção por DENV-1 e ZIKV causada pela presença de <i>Wolbachia</i> nos tecidos das linhagens wMel_Br e Br	77
<b>Tabela 8:</b> porcentagem de coinfeção por DENV-1 e ZIKV nos tecidos das linhagens wMel_Br e Br	78

<b>Tabela 9:</b> porcentagem de redução na prevalência de infecção por DENV-3 e ZIKV causada pela presença de <i>Wolbachia</i> nos tecidos das linhagens wMel_Br e Br	86
<b>Tabela 10:</b> porcentagem de coinfeção por DENV-3 e ZIKV nos tecidos das linhagens wMel_Br e Br	87

### LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

<b>μL</b> - microlitros
<b>Cas9</b> – CRISPR associated gene 9
<b>CDC</b> – <i>Center for Disease Control and Prevention</i>
<b>cDNA</b> – DNA complementar
<b>CHIKV</b> – <i>Chikungunya virus</i>
<b>CRISPR</b> - <i>clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>
<b>DENV</b> – <i>Dengue virus</i>
<b>DNA</b> – ácido desoxirribonucleico
<b>dpi</b> – dias pós-infecção
<b>ECDC</b> – <i>European Center for Disease Control and Prevention</i>
<b>IFA</b> – Indirect fluorescence assay
<b>HEGS</b> – <i>homming endonuclease genes</i>
<b>mM</b> – milimolar
<b>ng</b> - nanogramas
<b>OMS</b> – Organização Mundial de Saúde
<b>PAHO</b> – Organização Pan-Americana de Saúde
<b>PFU</b> – unidades formadoras de placa
<b>RIDL</b> – <i>release of insects carrying a dominant lethal gene</i>
<b>RNA</b> – ácido ribonucleico
<b>Rps17</b> – Proteína ribossomal S17
<b>RT-PCR</b> – transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase
<b>RT-qPCR</b> - transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase quantitativa
<b>SE</b> – Semana epidemiológica
<b>SFB</b> – soro fetal bovino
<b>SGB</b> – síndrome de Guillain-Barré
<b>sgRNA</b> – <i>single guide RNA</i>
<b>SIT</b> – <i>sterile insect technique</i>
<b>WD0513</b> – proteína hipotética expressa exclusivamente na cepa wMel de <i>Wolbachia</i>

**WNV** – *West Nile virus*

**YFV** – *Yellow Fever virus*

**ZIKV** – *Zika virus*

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	18
1.1 Arboviroses	18
1.2 Coinfecção viral: ocorrência e fatores associados a seu surgimento	19
1.3 Dengue: uma breve visão geral	21
1.4 <i>Zika virus</i> no mundo: histórico e situação atual	23
1.4.1 Relevância	23
1.4.2 História	24
1.4.2.1 Isolamento viral em primatas não-humanos	24
1.4.2.2 Isolamento viral em mosquitos	25
1.4.2.3 Isolamento viral em humanos	25
1.4.3 Epidemiologia	26
1.4.3.1 Inquéritos sorológicos	26
1.4.3.2 África e Ásia	26
1.4.3.3 Oceania	27
1.4.3.4 Europa	29
1.5 <i>Zika virus</i> nas Américas: histórico e situação atual	32
1.6 Ecologia do <i>Zika virus</i>	36
1.6.1 Hospedeiros e reservatórios naturais	36
1.6.2 Vetores	37
1.6.3 O <i>Aedes aegypti</i>	42
1.6.3.1 O sistema imune	43
1.7 Breve relato sobre formas clássicas de controle de vetores	46
1.7.1 Controle mecânico	46
1.7.2 Controle químico	46
1.8 Novas formas de controle do vetor sendo desenvolvidas em laboratório	48
1.8.1 <i>Homing endonuclease genes</i> (HEGS)	48
1.8.2 CRISPR/Cas9	49
1.9 Formas alternativas de controle do vetor já aplicadas em campo	50
1.9.1 A técnica dos insetos estéreis (SIT)	51
1.9.2 Liberação de insetos carregando um gene letal dominante (RIDL)	52
1.9.3 A bactéria <i>Wolbachia</i>	53
1.9.4 O uso de <i>Wolbachia</i> no controle de arboviroses	55

1.9.4.1 Estratégias alternativas de controle envolvendo o uso de <i>Wolbachia</i>	57
1.9.4.1.1 A estratégia auto-limitante	57
1.9.4.1.2 A estratégia autossustentável	58
<b>2 JUSTIFICATIVA</b>	58
<b>3 OBJETIVOS</b>	59
3.1 Objetivo geral	59
3.2 Objetivos específicos	59
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b>	60
4.1 Criação dos mosquitos	60
4.2 Isolamento, cultivo de ZIKV / DENV e avaliação de bloqueio <i>in vitro</i> de ZIKV por <i>Wolbachia</i>	61
4.3 Infecção dos mosquitos com ZIKV e DENV	62
4.4 Coleta de saliva	64
4.5 Confirmação da infectividade da saliva contendo ZIKV e / ou DENV	65
4.6 Análise de ZIKV / DENV e <i>Wolbachia</i> via qPCR	65
4.7 Microscopia de fluorescência	67
4.7.1 Imunofluorescência indireta	67
4.7.2 Anticorpos e marcadores fluorescentes	68
4.8 Expressão gênica	68
4.9 Análises estatísticas	71
<b>5 RESULTADOS</b>	71
5.1 Efeito <i>in vitro</i> de <i>Wolbachia</i> sobre a infecção por ZIKV	71
5.2 Efeito de <i>Wolbachia</i> sobre a competência vetorial de <i>Ae. aegypti</i> monoinfectados com dois distintos isolados de ZIKV	72
5.3 Efeito de <i>Wolbachia</i> sobre a competência vetorial de <i>Ae. aegypti</i> coinfectados com DENV e ZIKV	77
5.3.1 Coinfecção ZIKV + DENV-1	77
5.3.2 Coinfecção ZIKV + DENV-3	86
5.4 Coinfecção DENV e ZIKV: dados preliminares do experimento nº 3	95
5.5 Expressão de genes de imunidade em resposta à infecção viral	102
<b>6 DISCUSSÃO</b>	105
6.1 A relação <i>Wolbachia</i> e ZIKV em mosquitos <i>Ae. aegypti</i>	105
6.2 <i>Wolbachia</i> reduz a competência vetorial de <i>Ae. aegypti</i> mono e coinfectado por ZIKV e DENV.	107

6.3 Ativação de genes de imunidade em resposta à presença de <i>Wolbachia</i> e infecção viral	98 114
<b>7 CONCLUSÃO</b>	117
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	118
<b>ANEXOS</b>	140
Anexo I - Projeto: Desenvolvimento de uma dieta artificial para mosquitos infectados por <i>Wolbachia</i>	140
Anexo II - Projeto: Paratransgênese como uma ferramenta no controle de Malária	140
Anexo III - Produção científica	141

## 1 INTRODUÇÃO

### 2

#### 2.1 Arboviroses

Os arbovírus, nomenclatura derivada do termo em inglês *Arthropod-borne virus*, são em sua maioria vírus contendo RNA como material genético, [com a única exceção até hoje conhecida do vírus da febre suína africana (*African swine fever virus*), o qual possui DNA como base de seu genoma (ŠMIETANKA *et al.*, 2016)]. Eles são mantidos na natureza através de um ciclo biológico de transmissão entre hospedeiros vertebrados e artrópodes vetores hematófagos (dieta baseada em sangue) como mosquitos, flebotomíneos, triatomíneos, pulgas e carrapatos. Em termos de impacto na saúde pública, acredita-se que entre os anos de 1990-2013, as doenças transmitidas por tais vetores representaram mundialmente um valor de 58% na taxa DALY (do inglês *Disability Adjusted Life Years*), indicador criado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e que representa os anos de vida perdidos, seja por morte prematura ou incapacidade, em relação à esperança de vida (STANAWAY *et al.*, 2016).

A transmissão de determinado patógeno pode ser dividida em duas categorias: a decorrente de um 1) vetor mecânico e de um 2) vetor biológico. No primeiro caso, o artrópode apenas transporta o agente infeccioso, sem que ocorra a replicação do mesmo nos seus órgãos. Tais patógenos se dispersam através do contato físico entre as partes infectadas do corpo do vetor e o animal vertebrado. Já os vetores biológicos são aqueles que agem não apenas transportando o organismo patogênico, mas participando ativamente no seu ciclo de vida, onde o agente infeccioso deve se desenvolver dentro do organismo do hospedeiro antes de ser transmitido (definição de vetor mecânico e biológico – *European Food Safety Authority*: <http://tinyurl.com/z3tclf5> [acessado em 05 de janeiro, 2017]).

O foco desta tese será nos vetores biológicos, nos quais a transmissão de determinado patógeno para o hospedeiro vertebrado (no caso humanos) ocorre pela saliva durante o repasto sanguíneo. Neste modo de transmissão, a competência vetorial (capacidade do vetor em adquirir, manter e transmitir determinado agente infeccioso) é diretamente afetada por fatores intrínsecos de origem genética (discutidos a seguir) e os de origem física como as barreiras teciduais.

Dentre estas barreiras teciduais pode-se citar a barreira de infecção do intestino, a barreira de escape do intestino, a barreira de infecção da glândula salivar e a barreira de escape da glândula salivar (BLACK IV *et al.*, 2002). No caso de mosquitos, para se haver uma infecção bem-sucedida, o agente infeccioso deve 1) iniciar a infecção no intestino, 2)

expandir-se pelo epitélio deste tecido, 3) disseminar-se via hemocele, para os órgãos secundários, 4) infectar e desenvolver-se nos diversos órgãos além do intestino, 5) atingir as glândulas salivares, e por fim 6) atingir os dutos salivares de forma a ser transmitido horizontalmente para um hospedeiro vertebrado, como extensivamente discutido em (FRANZ *et al.*, 2015).

Vale ainda ressaltar a existência da transmissão destes agentes da mãe para a sua prole (transmissão vertical ou materna) (MARTINS *et al.*, 2012; THANGAMANI *et al.*, 2016a), além da transmissão venérea do macho infectado para a fêmea, durante a cópula (MAVALE *et al.*, 2010), de forma que o impacto epidemiológico dessas vias é controverso (GRUNNILL; BOOTS, 2016).

Na natureza, de forma geral, os arbovírus circulam entre animais silvestres, no que é conhecido como ciclo de transmissão silvestre (ou silvático), causando doenças em humanos e animais domésticos de forma acidental (conhecidos como eventos de *spillover*) (KREUDER JOHNSON *et al.*, 2015). Esses eventos são relativamente raros, mas podem se tornar mais frequentes devido a fatores intrínsecos e / ou extrínsecos. No primeiro caso, agora discutindo os de origem genética, pode-se citar mudanças na eficiência de transmissão de algumas espécies vetoras causado pela rápida taxa evolutiva apresentada por vírus de RNA (WEAVER, S C, 2005).

No que diz respeito aos fatores externos, as mudanças na dinâmica populacional do inseto vetor pelo uso abusivo de inseticidas químicos (MACIEL-DE-FREITAS *et al.*, 2014), mudanças climáticas (CAMPBELL *et al.*, 2015; GOULD & HIGGS, 2009; SHUMAN, 2010), desmatamento (GOULD & HIGGS, 2009) e o aumento na frequência do tráfego de pessoas (KILPATRICK & RANDOLPH, 2012), dentre outros, são fatores de grande importância. Em conjunto, ambos fatores acabam por elevar o risco de que a transmissão de determinado patógeno evolua de um ciclo silvestre para urbano (ou antroponótico), envolvendo o homem, aumentando consideravelmente o potencial epidêmico da doença (WEAVER, S C, 2005), como foi o caso do *Dengue virus* (DENV), discutido abaixo.

## **1.2 A Coinfecção viral: ocorrência e fatores associados ao seu surgimento**

Antes de adentrar na revisão sobre os variados aspectos de DENV e *Zika virus* (ZIKV), principalmente no que diz respeito à interação ao nível do vetor entre esses diferentes vírus, deve-se discutir a questão da coinfecção viral. Com relação à epidemiologia de DENV e ZIKV, fica claro em diversos cenários epidemiológicos como o Brasil, a co-circulação dos dois vírus no ambiente, vide os números de casos reportados mensalmente pelo Ministério da Saúde, de forma que em várias cidades, são registrados casos de doenças causadas por ambos

os agentes infecciosos (atualização semanal dos boletins epidemiológicos disponibilizados pelo Ministério da Saúde: <http://tinyurl.com/jfy2ldg> [acessado: 07 de janeiro, 2017]).

No que diz respeito à DENV, em regiões endêmicas, onde todos os quatro tipos virais estão presentes, o que se observa é a variação periódica na predominância de cada tipo. No Brasil, avaliando retrospectivamente a ocorrência dos quatro tipos virais, observa-se que em 2014, 82% das amostras de pacientes analisadas apresentavam infecção por DENV-1, seguido de 16% de infecção por DENV-4. No ano seguinte, a predominância de DENV-1 subiu para 93% das amostras analisadas, acompanhada de 4% de infecção por DENV-4. Por fim, no ano de 2016, o último boletim epidemiológico sobre a questão revela que DENV-1 ainda continua sendo o tipo viral dominante no país (90%), entretanto DENV-4 acabou perdendo o posto de segundo colocado em predominância de infecção, para DENV-2 (5,7%) (atualização semanal dos boletins epidemiológicos disponibilizados pelo Ministério da Saúde: <http://tinyurl.com/jfy2ldg> [acessado: 07 de janeiro, 2017]).

A extinção e emergência de novos sorotipos e seus respectivos genótipos virais ao longo dos anos pode ser atribuída a diferentes fatores, sejam eles 1) eventos estocásticos associados a gargalos genéticos no tamanho da população viral ou 2) diferenças na eficiência de transmissão associadas a mutações ao nível nucleotídico. Em 2005, Myat e colaboradores observaram que a extinção dos genótipos asiáticos de DENV-1 pertencentes ao clado A, seguido do estabelecimento dos clados B e C do mesmo sorotipo viral não estava associado à seleção natural positiva ao nível de aminoácidos, ou nucleotídeos, ou estruturas secundárias de RNA, mas sim à eventos estocásticos alternados envolvendo períodos de seca e chuva, o que afetou diretamente a população de mosquitos vetores (MYAT *et al.*, 2005).

Ademais, fatores como a herança imune adquirida após uma infecção também afeta diretamente a prevalência de determinado sorotipo viral em detrimento a outro, como já descrito em estudo publicado na Tailândia (ZHANG *et al.*, 2005). Com relação ao segundo caso, Armstrong e colaboradores demonstraram em 2001 que populações de *Aedes aegypti* coletadas no Texas – EUA e Iquitos – Peru apresentaram uma maior susceptibilidade de infecção aos genótipos invasores asiáticos de DENV-2 do que os genótipos americanos, corroborando a predominância de um genótipo particular de DENV-2 asiático em algumas localidades das Américas, em detrimento de um certo genótipo americano (ARMSTRONG & RICO-HESSE, 2001).

Assim como este estudo de 2001 atribuiu mudanças ao nível nucleotídico como responsável pela eficiência de transmissão de diferentes genótipos de DENV-2, diversos autores já demonstraram o papel de mutações deletérias e seleção natural positiva como fatores importantes de modelagem da dinâmica da população viral circulante (BENNETT *et*

*al.*, 2006; DUONG *et al.*, 2013). Ademais, fatores como eficiência de replicação viral em humanos, responsável por controlar o nível de viremia no paciente, juntamente com a interação genótipo x genótipo entre hospedeiro vertebrado e vetor são essenciais na distribuição das linhagens virais (LAMBRECHTS *et al.*, 2009; NGUYET *et al.*, 2013).

Por fim, com relação ao vetor, já se observou na natureza a presença de tanto *Ae. aegypti* quanto *Aedes albopictus* infectados por múltiplos sorotipos e seus respectivos genótipos de DENV na Tailândia (THAVARA *et al.*, 2006) e no Brasil (PESSANHA *et al.*, 2011). Destaque para o fato de que o estudo brasileiro foi realizado na cidade de Belo Horizonte, onde detectou-se que aproximadamente 11% das 293 larvas de *Ae. aegypti* analisadas estavam coinfetadas (22 larvas coinfetadas com DENV-1 e DENV-2; 10 larvas coinfetadas com DENV-2 e DENV-3). Acredita-se que tal fato possa ocorrer quando o vetor realiza vários repastos sanguíneos em mais de um paciente infectado com diferentes tipos virais, ou então ainda em um mesmo paciente portando mais de um tipo de DENV (BHARAJ *et al.*, 2008; FIGUEIREDO *et al.*, 2011).

### **1.3 Dengue: uma breve visão geral**

Os casos de dengue são causados pelo vírus envelopado DENV, o qual possui RNA fita simples, senso-positivo e genoma de aproximadamente 11kb. Pertencentes ao gênero *Flavivirus* e família *Flaviviridae*, esses são agrupados em quatro sorotipos geneticamente distintos (DENV 1-4), os quais subdividem-se em distintos genótipos (CHEN & VASILAKIS, 2011). O vírus é transmitido de forma autóctone (transmissão local) por mosquitos do gênero *Aedes* em regiões tropicais e subtropicais do mundo.

No que diz respeito às manifestações clínicas da infecção por DENV em humanos, a doença se caracteriza como sendo complexa, com a ocorrência de quadros totalmente assintomáticos a uma ampla variedade de sintomas comuns a demais infecções virais (GUBLER, 1998a). Em casos sintomáticos, a maioria dos pacientes apresentam um quadro febril subto, o qual persiste por 2 a 7 dias, acompanhado de dores nas articulações (artralgia), nos músculos (mialgia), além de dor de cabeça, de garganta e possíveis manchas avermelhadas pelo corpo (do inglês, *rash*) (GUBLER, 1998a).

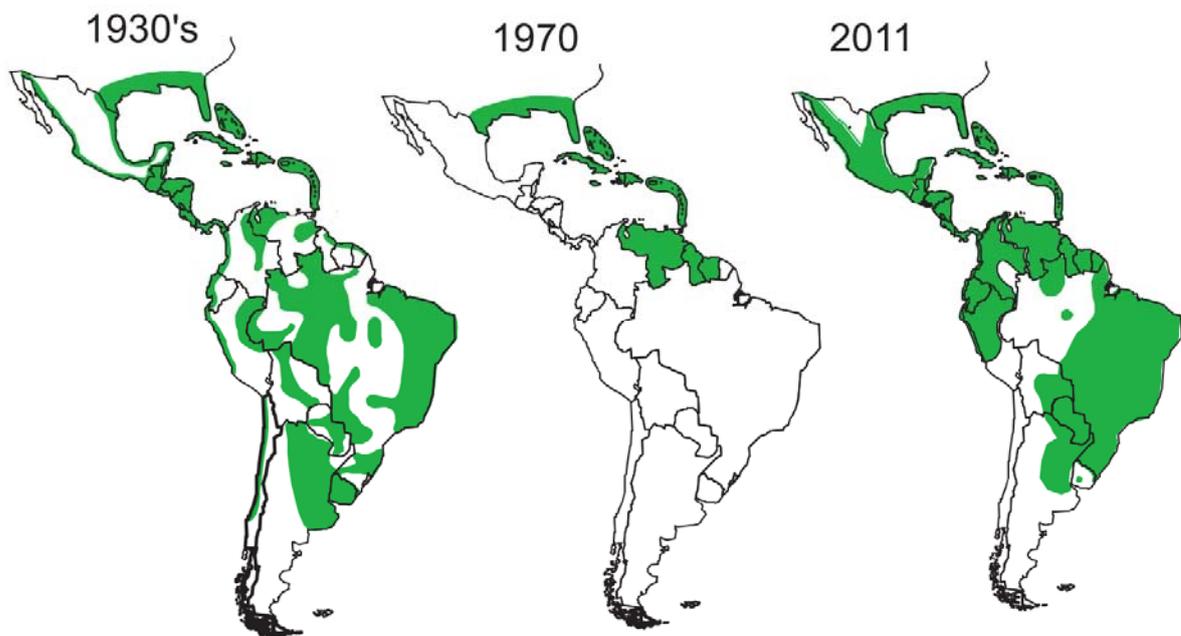
Ademais, a doença pode evoluir para um quadro hemorrágico (dengue severa), resultante de uma baixa quantidade de plaquetas circulantes no sangue (trombocitopenia) e elevada permeabilidade vascular (GUBLER, 1998a). Estima-se que a taxa de letalidade gire em torno de 0,5% - 3,5% no continente asiático (HALSTEAD *et al.*, 1999).

Estima-se que existam cerca de 100 milhões de casos sintomáticos de dengue a cada ano, com 4 bilhões de pessoas, em 125 países, vivendo em áreas em que a transmissão é endêmica (BRADY *et al.*, 2012). Em termos de saúde pública, os gastos com essa doença também são elevados, de forma que somando-se as medidas de controle do vetor e os cuidados com os enfermos, estipula-se que DENV custe aos cofres públicos mundiais de 8 a 9 bilhões de dólares anualmente (SHEPARD *et al.*, 2016), sendo que apenas no Brasil, estima-se que os valores variem de 370 milhões a 1,2 bilhões de dólares por ano (MARTELLI *et al.*, 2015).

O histórico de transmissão de dengue em humanos é antigo. Casos concretos da doença já eram descritos nos trópicos durante o século XVIII (HOWE, 1979). Ademais, vários aspectos relacionados à origem e evolução de DENV ainda permanecem um mistério, entretanto, dados epidemiológicos de uma doença febril similar à dengue já eram descritos nos primórdios das dinastias chinesas, (265-992 D.C.) (GUBLER, 2011).

Evidências sugerem que inicialmente a transmissão de DENV seguia o ciclo silvestre, tendo o vírus se adaptado ao ambiente urbano e semiurbano de transmissão entre humanos ao longo da história (WEAVER & REISEN, 2010). DENV provavelmente originou-se na África, e foi introduzido nos trópicos durante o período colonial, expandindo ainda mais a sua distribuição durante a Segunda Guerra Mundial e subsequente expansão comercial (GUBLER, 2011). Dengue atualmente é endêmica em diversos países das Américas; Sul e Sudeste da Ásia e no Pacífico Ocidental, com casos esporádicos acontecendo na Europa (STANAWAY *et al.*, 2016) e América do Norte, sendo a maioria dos casos nestas duas últimas regiões, alóctones (importados – adquiridos fora do país de residência) (REZZA, 2014).

A América Latina serve como um bom exemplo de ressurgimento de dengue. Iniciado em 1947, houve um programa eficaz de erradicação de vetores sob o comando da Organização Pan-Americana de Saúde (PAHO) envolvendo 19 países latino-americanos, o que levou a um acentuado declínio no número de casos da doença (GUBLER, 2011). Entretanto, com o fim do programa na década de 1970, dengue ressurgiu acompanhada de grandes surtos epidêmicos. A partir dos anos 1990, ainda na América Latina, o principal vetor da doença, o mosquito *Ae. aegypti* reconquistou a sua distribuição inicial, estando presente em virtualmente todos os países da região (STANAWAY *et al.*, 2016) (Fig. 1).



**Figura 1: distribuição de *Ae. aegypti* nas Américas durante o período de 1930-2011.**

Fonte: Gubler, 2011.

Atualmente, o Brasil é o país da América Latina mais afetado por dengue, com o vetor *Ae. aegypti* bem estabelecido por todo o país (Boletim Epidemiológico divulgado pelo Ministério da Saúde: <http://tinyurl.com/hn3bmbs> [acessado em 09 de janeiro, 2017]). Em 2015 (completadas as 52 semanas epidemiológicas – [SE]) foram registrados quase 1,7 milhões de casos prováveis da doença no país, já em 2016, até o mês de novembro (SE = 49), foram registrados virtualmente o mesmo número de casos da enfermidade (Boletim Epidemiológico divulgado pelo Ministério da Saúde: <http://tinyurl.com/jno38tt> [acessado em 09 de janeiro, 2017]).

## **1.4 Zika virus no mundo: histórico e situação atual**

### **1.4.1 Relevância**

Nos últimos anos, uma série de arboviroses restritas a determinadas regiões do globo se tornaram verdadeiras pandemias, como é o caso do Vírus do Oeste do Nilo (WNV – *West Nile virus*), *Chikungunya virus* (CHIKV) (GUBLER, 2002) e mais recentemente, ZIKV (SAIZ *et al.*, 2016). Traçar a sequência de eventos desde a descoberta de determinado patógeno até o estado atual de conhecimento sobre o mesmo, além de exercer papel crucial no entendimento da doença, atua como ferramenta de grande relevância na elaboração de políticas de saúde pública direcionadas. Prova disso é a atual pandemia do ZIKV, o qual desde a sua descoberta em 1947 até dezembro de 2015, possuía menos de 300 artigos

indexados no banco de dados Pubmed. Já em 2017, até o mês de janeiro, o número de publicações sobre o tema chegou próximo a 2150.

No que tange a relevância epidemiológica de ZIKV, deve-se citar, antes de mais nada, as manifestações clínicas causadas por esta arbovirose. Assim como DENV, a grande maioria dos casos de Zika são assintomáticos (como poderá ser observado mais adiante no item 1.4.3, no que diz respeito aos dados epidemiológicos). Entretanto, os pacientes que apresentam sintomas da doença desenvolvem um quadro febril autolimitante acompanhado de febres e dores de cabeça, o qual dura em torno de 7 dias. Ainda de forma similar à infecção por DENV, o paciente infectado com ZIKV pode apresentar artralgia, mialgia e dor retro-orbital. Alguns enfermos ainda apresentam quadro de conjuntivite e *rash* (FLORES *et al.*, 2016).

O grande alarde gerado em torno de ZIKV nos anos recentes, diz respeito a sua associação a quadros neurológicos como a Síndrome de Guillain-Barré (SGB), o qual afeta os nervos periféricos do sistema nervoso, levando a quadros de paralisia, e complicações fetais (microcefalia) que culminam em uma diminuição no tamanho do cérebro de recém-nascidos, associada a degenerações no trato espinhal e calcificações no córtex cerebral (FLORES *et al.*, 2016; OLIVEIRA MELO *et al.*, 2016).

## **1.4.2 História**

### **1.4.2.1 Isolamento viral em primatas não-humanos**

Durante os anos de 1914 a 1970, diversos vírus foram isolados (ou seja: detectados, amplificados em cultivo celular, concomitante à sua caracterização e classificação) por um grupo de pesquisadores britânicos e americanos, em um programa de pesquisa sobre a ocorrência natural de febre amarela (YFV – *Yellow fever virus*) em Uganda, patrocinado pela Fundação Rockefeller. Dentre os achados, se encontrava o *Zika virus* (DICK; KITCHEN; HADDOW, 1952).

Em abril de 1947, seis gaiolas sentinelas contendo macacos rhesus (*Macaca mulata*) foram colocadas no dossel da floresta de Ziika, perto do Lago Victoria, em Uganda, por G. W. A. Dick, área onde presumidamente estes macacos serviriam como potencial hospedeiro para a população local de mosquitos, conhecida por transmitir YFV. Após alguns dias, o macaco sentinela nº 776, ao apresentar quadro febril, teve amostra de sangue coletada e inoculada em camundongos *Swiss* (intracerebral e intraperitoneal), e via subcutânea em outro macaco do mesmo gênero (nº 771). Dos animais inoculados, todos os camundongos injetados via cerebral apresentaram sinais de doença 10 dias após infecção (dpi). Posterior homogeneização do tecido cerebral destes camundongos levou ao isolamento de diversos vírus, dentre eles a

linhagem *Zika virus* 776 (nomeado em consideração à área e ao macaco em que foi isolado). Interessante notar que durante o período de observação, nenhum sintoma de infecção foi observado tanto no macaco nº 776 quanto no nº 771, porém ZIKV foi isolado no soro de ambos, cerca de um mês após contato com o vírus (DICK & HADDOW, 1952; DICK, 1953).

#### **1.4.2.2 Isolamento viral em mosquitos**

No ano de 1948, período subsequente ao primeiro isolamento de ZIKV, o pesquisador S. F. Kitchen ao tentar isolar YFV de mosquitos na floresta de Ziika, obteve grupo de mosquitos *Aedes africanus* infectados com ZIKV, especulando-se assim que este vírus estava sendo mantido de forma endêmica via ciclo silvestre envolvendo mosquitos e diferentes espécies de macacos (13 espécies catalogadas nesta floresta, na época). Sessenta e oito mosquitos desta espécie foram coletados, macerados e o produto inoculado em camundongos e macaco rhesus (nº. 758). Dois camundongos apresentaram sintomas de infecção, de forma que o primeiro morreu 6 dpi e o segundo apresentou sintomas 14 dpi. A linhagem de ZIKV isolada desses mosquitos foi denominada ZIKV (E/1). O macaco 758 permaneceu assintomático, porém, ao se inocular o seu soro via cerebral em três camundongos *swiss*, dois morreram e um se tornou sintomático (DICK & HADDOW, 1952).

Estudos posteriores demonstraram que as linhagens isoladas em primatas e mosquitos (ZIKV 776 e ZIKV E/1, respectivamente) produziam a mesma resposta no teste de neutralização cruzada, e o resultado diferia do perfil obtido por YFV e DENV. Ademais, fora do continente Africano, ZIKV foi isolado pela primeira vez em mosquitos *Ae. aegypti* em 1969, na Malásia (MARCHETTE *et al.*, 1969).

#### **1.4.2.3 Isolamento viral em humanos**

Acreditava-se que somente sete anos após a detecção de ZIKV em primatas não-humanos é que o vírus foi isolado no homem. Três pacientes com sintomas de icterícia buscaram ajuda médica e tiveram a confirmação de infecção por ZIKV via ensaio de anticorpos neutralizantes. Ao se inocular, individualmente, o soro desses enfermos em camundongos, conseguiu-se isolar vírus em apenas um dos casos: uma garota nigeriana de 10 anos de idade (MACNAMARA, 1954). Entretanto, dados recentes sugerem que o primeiro isolamento viral de ZIKV em humanos aconteceu em Uganda, por Simpson em 1964, 10 anos após o primeiro relato errôneo em humanos por Macnamara, onde alega-se que o isolamento viral publicado em 1954 foi de um vírus similar à ZIKV, denominado *Spondeweni virus* (WIKAN & SMITH, 2017).

Um estudo na década de 1970 demonstrou que 40% da população da Nigéria possuía anticorpos neutralizantes contra ZIKV, demonstrando assim a elevada prevalência de infecção por este vírus no país (FAGBAMI, 1979). Fora do continente africano, o vírus foi detectado pela primeira vez em humanos em 1977-1978, em residentes da Indonésia (OLSON *et al.*, 1981).

### 1.4.3 Epidemiologia

#### 1.4.3.1 Inquéritos sorológicos

Existe na literatura científica, uma série de metodologias para o diagnóstico molecular de infecções virais as quais são extensamente discutidas, como revisado por Domingos e Moreli (DOMINGO *et al.*, 2011; MORELI & DA COSTA, 2013), entretanto, abordarei a seguir os levantamentos sorológicos para arboviroses, mais especificamente *Flavivirus*, de forma que existe uma gama de metodologias aplicadas na literatura, das quais a mais utilizada é a inibição de hemaglutinação (KOKERNOT *et al.*, 1965).

A interpretação dos resultados sorológicos para *flavivirus* é difícil devido ao alto grau de reação cruzada que ocorre dentro deste grupo, como demonstrado em testes onde o soro de pacientes foi testado por diferentes técnicas (FAGBAMI, 1979; KIRYA & OKIA, 1977) ou até mesmo pela mesma metodologia (METTLER *et al.*, 1971). Além disto, nem sempre os painéis de levantamento sorológico em estudos antigos incluíam antígenos para ZIKV, somente para vírus mais próximos (DICKINSON *et al.*, 1965), o que faz com que os dados epidemiológicos de ZIKV devam ser interpretados com certa cautela. Contudo, fica evidente que ZIKV é endêmico da África e algumas áreas do sudeste asiático, como confirmado pelo isolamento do vírus em vetores e hospedeiros vertebrados em cada uma destas regiões (MUSSO & GUBLER, 2016).

Ademais, até o presente momento de redação desta tese, 71 países ao redor do mundo relataram casos de circulação autóctone ativa do vírus em seus países, 29 deles apresentando quadros de microcefalia (OMS – Boletim epidemiológico sobre Zika no mundo: <http://tinyurl.com/jshn94j> [acessado: 13 de janeiro, 2017]).

#### 1.4.3.2 África e Ásia

Estudos sorológicos e entomológicos relataram surtos de ZIKV em várias partes da África, desde o seu primeiro isolamento em 1964 em Uganda (SIMPSON, 1964). O vírus já foi isolado em países como Quênia (GESER *et al.*, 1970), Serra Leoa (ROBIN & MOUCHET, 1975), Senegal (MONLUN *et al.*, 1993) e República Central da África

(SALUZZO *et al.*, 1981), de forma que considerando os estudos publicados, a soroprevalência para ZIKV variou de 1,3-52% na população desse continente.

De acordo com o último boletim liberado pela OMS, há atualmente registros de circulação ativa de ZIKV no continente africano apenas em Cabo Verde, onde foram registrados de acordo com a última atualização disponível até o momento, englobando os meses de outubro de 2015 a maio de 2016, 7557 casos suspeitos da doença, relatando-se três casos de microcefalia e nenhum registro da SGB (OMS – Boletim epidemiológico: <http://tinyurl.com/gqcpzu4> [acessado: 11 de janeiro, 2017]). Entretanto, vale ressaltar que muito provavelmente os casos de ZIKV na África são subestimados, visto que ocorrem em áreas onde há co-circulação de DENV e CHIKV, doenças que apresentam sintomatologia similar à ZIKV e que pecam pela falta de ensaios sorológicos de reação cruzada, visando caracterizar a infecção viral existente (GRARD *et al.*, 2014).

No que tange o continente asiático, os dados epidemiológicos antigos também devem ser considerados com cautela, devido à prevalência de estudos baseados em sorologia. Dito isto, na década de 1950, houveram registros de ZIKV em vários países do continente, destacando-se: Índia, (SMITHBURN *et al.*, 1954), Malásia (MARCHETTE *et al.*, 1969), Filipinas (HAMMON *et al.*, 1958), Vietnã e Tailândia (POND, 1963), com a existência de anticorpos para a infecção por ZIKV variando entre 8-75% na população, dependendo da área estudada.

Mais recentemente, alguns casos esporádicos de ZIKV foram documentados no Cambódia (HEANG *et al.*, 2012), em um turista que retornava da Indonésia (KWONG *et al.*, 2013), e alguns casos positivos em pessoas que adquiriram a doença na Tailândia (BUATHONG *et al.*, 2015), além disto, transmissão local de ZIKV foi registrada em dois pacientes no Vietnã (OMS - Boletim epidemiológico: <http://tinyurl.com/hckffw8> [acessado: 11 de janeiro, 2017]).

#### **1.4.3.3 Oceania**

Até o ano de 2006, apenas 14 casos humanos de infecção por ZIKV haviam sido registrados no mundo. Porém, em 2007, na Ilha de Yap, pertencente a um dos quatro Estados da Micronésia, houve a primeira grande epidemia da doença, durando três meses e de origem até o momento desconhecida. Inicialmente creditava-se o surto à DENV, dado a semelhança de sintomas entre as duas arboviroses, e também devido ao fato de que DENV já havia circulado anteriormente na ilha (DURAND *et al.*, 2005; SAVAGE *et al.*, 1998), porém ao longo do surto, esta hipótese foi descartada.

Durante o surto, foram registrados 185 casos suspeitos de ZIKV, dos quais 26,5% confirmados laboratorialmente, 31,9% catalogados como casos prováveis (onde há resultados laboratoriais equívocos), e 38,9% continuaram suspeitos. Ao todo, RNA de ZIKV foi detectado em 15 de 45 soros de pacientes coletados até 10 dias após início dos sintomas da doença (MUSSO & GUBLER, 2016). Análises sorológicas em 557 indivíduos indicaram que 74% das pessoas testadas tiveram contato com ZIKV, onde 37,7% dessas eram sintomáticas. Acredita-se, com base em dados sorológicos posteriores, que aproximadamente 73% da população da ilha teve contato com ZIKV, das quais 18% foram sintomáticas. Não houve neste surto, uma única internação registrada por conta da doença, assim como nenhum caso grave ou morte (DUFFY *et al.*, 2009).

Posteriormente, um estudo de filogenia demonstrou que o vírus responsável pelo surto em Yap, denominado linhagem EC Yap (EC = *epidemiological consensus*, do inglês), obtido a partir do isolamento de RNA viral do soro de quatro pacientes, originou-se no sudeste asiático. Esta conclusão tornou-se ainda mais plausível devido a curta distância geográfica entre a Ilha de Yap e os países da Indonésia e Malásia (HADDOW. *et al.*, 2012).

Desde a epidemia de ZIKV na Ilha de Yap, o vírus se espalhou rapidamente pelo mundo. Em 2013 ocorreu o segundo grande surto da doença, desta vez na Polinésia Francesa, país anteriormente ameaçado somente pela circulação de DENV (CAO-LORMEAU. *et al.*, 2014). Acredita-se que ZIKV tenha sido introduzido neste país de forma independente, a partir da Ásia, não sendo uma extensão da linhagem circulante em Yap (GATHERER & KOHL, 2016).

Os casos na Polinésia Francesa tiveram início em outubro de 2013, onde membros de uma família apresentaram sintomas típicos de uma infecção viral. Ao serem testados pela técnica molecular de RT-PCR, os enfermos apresentaram resultado negativo para DENV, CHIKV e *WNV*, além de resultados duvidosos para ZIKV. Entretanto, duas semanas após o ocorrido, outro paciente foi diagnosticado positivamente para ZIKV via RT-PCR (CAO-LORMEAU *et al.*, 2014) e o resultado confirmado via sequenciamento da região codificadora da proteína PrM/E (LANCIOTTI *et al.*, 2008).

Concomitante à confirmação do primeiro caso de ZIKV no país, autoridades sanitárias da Polinésia Francesa relataram um aumento no número de pacientes sintomáticos, atingindo um pico de 30.000 casos suspeitos da doença e cerca de 11% da população do país afetada (CAO-LORMEAU. *et al.*, 2014; MUSSO & CAO-LORMEAU, 2014), com uma taxa de infecção variando entre 50 a 66% (AUBRY *et al.*, 2015). Acredita-se que a magnitude da doença foi devida a dois fatores: ausência de uma imunidade prévia ao vírus pela população, e a alta densidade de vetores competentes para transmissão de ZIKV (AUBRY *et al.*, 2015).

Importante notar que pela primeira vez as autoridades registraram um aumento de vinte vezes no número de casos da SGB, mas sem que qualquer associação direta com ZIKV tenha sido experimentalmente demonstrada (OEHLER *et al.*, 2014).

Subsequente ao surto epidêmico na Polinésia Francesa, aconteceram surtos em países como Nova Caledônia e Ilhas Cook. Na Nova Caledônia, os casos foram importados da Polinésia Francesa em novembro de 2013, e em janeiro de 2014 houve o primeiro caso autóctone da doença no país, culminando em 1385 casos (0,8% da população) laboratorialmente confirmados (DUPONT-ROUZEYROL *et al.*, 2015). Acredita-se que fatores como diferentes populações de vetores (*Ae. aegypti* e *Aedes polynesiensis* na Polinésia Francesa vs. apenas *Ae. aegypti* na Nova Caledônia), associado a diferenças climáticas (ausência de clima frio na Polinésia Francesa vs. clima frio na Nova Caledônia) e nas políticas de controle de doenças contribuíram para a diferença observada na prevalência da doença entre os países.

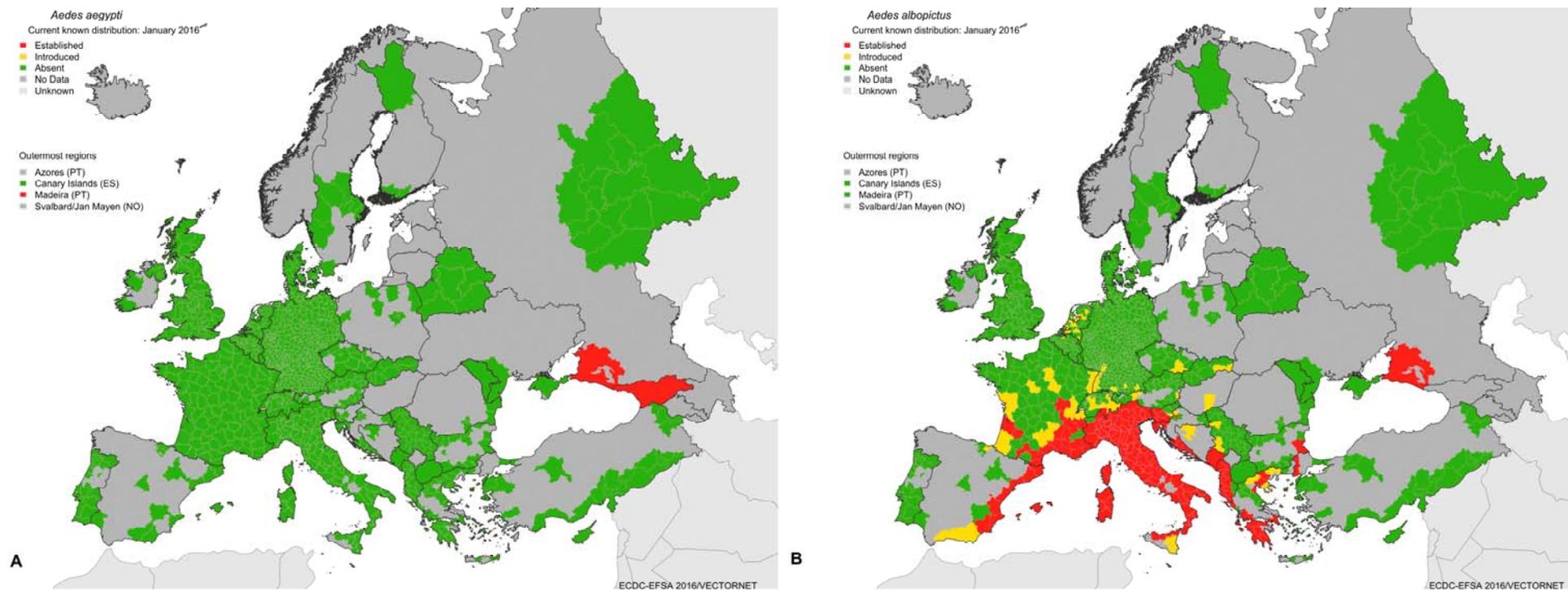
Paralelamente, a Austrália registrou em 2012 o primeiro caso de infecção por ZIKV no país, em um turista ao retornar de viagem da Indonésia (KWONG *et al.*, 2013). Desde então só há registros de casos alóctones (importados) da doença. Isto não exclui o risco de transmissão local, visto que o país possui o vetor *Ae. aegypti* estabelecido em algumas regiões (governo da Austrália – Departamento de Saúde “*Zika fact sheet*”: <http://tinyurl.com/z6jftwu> [acessado 9 de janeiro, 2017]).

#### **1.4.3.4 Europa**

Até a data de redação deste trabalho, não há registro de casos autóctones de ZIKV no continente europeu. Todos os casos registrados até o momento foram importados de pessoas que viajaram para países os quais o vírus estava circulando. O primeiro caso de ZIKV na Europa foi registrado no final de 2013, na Alemanha, em um residente de 50 anos que acabara de voltar de viagem da Tailândia (TAPPE *et al.*, 2014). Desde então, casos alóctones de ZIKV têm se espalhado pelo velho continente, atingindo países como Noruega, Itália, Espanha, Eslovênia, Finlândia, Portugal, dentre outros (de um total de 21 países até janeiro, 2017, segundo a OMS - <http://tinyurl.com/hp52gh5> [acessado: 15 de janeiro, 2017]), incluindo casos de transmissão sexual da doença, o qual teve o seu primeiro relato confirmado na França (HILLS *et al.*, 2016).

Não se deve excluir de imediato o risco de circulação local de ZIKV na Europa, visto que existe um estabelecimento de *Ae. aegypti* em parte da Rússia ocidental (Fig. 2A). Além disto, o mosquito *Aedes albopictus*, capaz de transmitir a doença (CHOUIN-CARNEIRO *et al.*, 2016; GRARD *et al.*, 2014; HEITMANN *et al.*, 2017) se encontra estabelecido em

diversas partes do velho continente, principalmente na área do Mediterrâneo (KRAEMER *et al.*, 2015; MEDLOCK *et al.*, 2012) (Fig. 2B). Prova do risco deste vetor se dá inclusive pela confirmação de casos autóctones de CHIKV na França (DELISLE *et al.*, 2015) e na Itália (REZZA *et al.*, 2007), além de DENV na Croácia (GJENERO-MARGAN *et al.*, 2011).



**Figura 2: mapa da distribuição dos vetores *Ae. aegypti* (A) e *Ae. albopictus* (B) no continente europeu.** Verde = vetor ausente; amarelo = vetor introduzido; vermelho = vetor estabelecido. Adaptado de *European Centre for Disease Prevention and Control* ([www.ecdc.europa.eu](http://www.ecdc.europa.eu)) [acessado: 15 de janeiro, 2017].

## 1.5 Zika virus nas Américas: histórico e situação atual

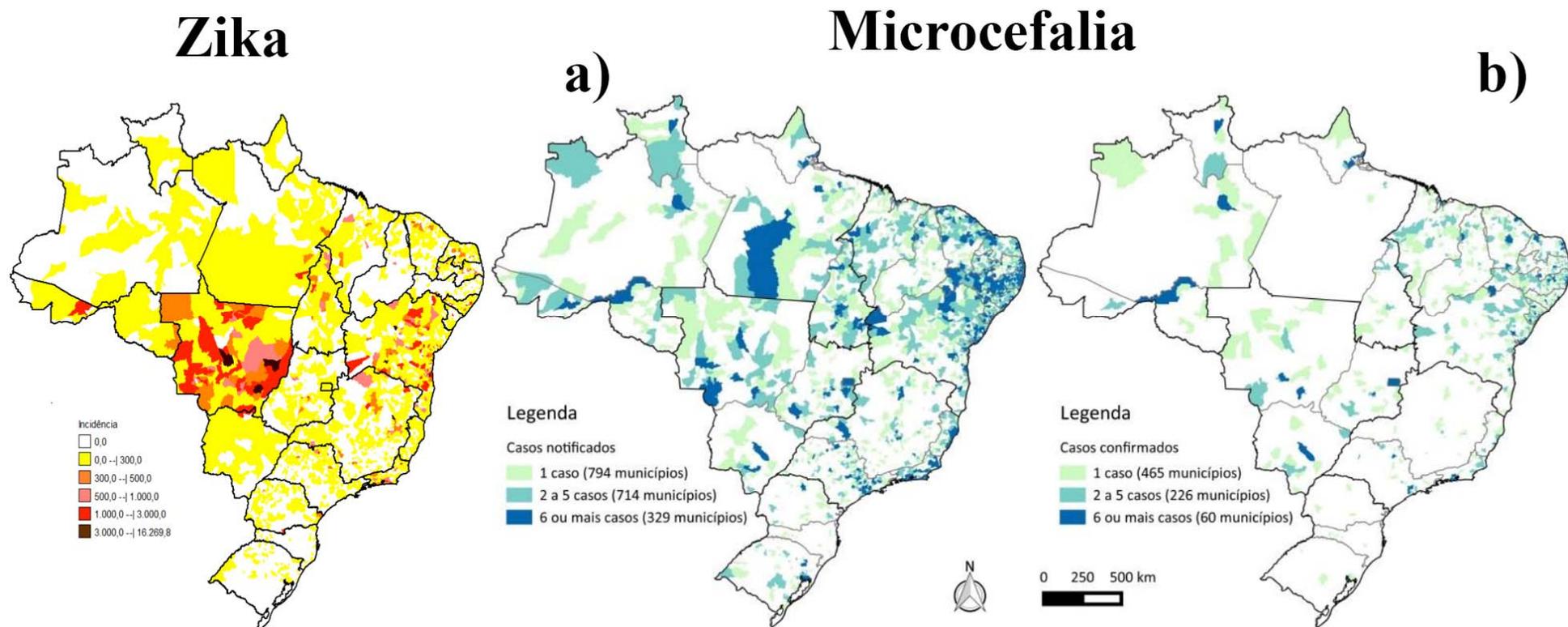
ZIKV é de fato uma nova ameaça ao continente americano (DYER, 2015; FAUCI; MORENS, 2016; GATHERER & KOHL, 2016). Os primeiros relatos de pacientes com um quadro de doença exantemática associado à conjuntivite e artralgia começaram a surgir ainda no final de 2014 no Brasil (CARDOSO *et al.*, 2015), primeiro país afetado pela doença no continente. Em fevereiro de 2015, o Ministério da Saúde confirmou um surto no quadro de doença exantemática no país, afetando milhares de pessoas principalmente na região Nordeste, nos estados do: Maranhão, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Paraíba e Sergipe (ECDC, 2015). Em abril do mesmo ano, veio a confirmação de casos autóctones de ZIKV (CAMPOS *et al.*, 2015; ZANLUCA *et al.*, 2015).

Acredita-se que até o final de 2015, os casos suspeitos de ZIKV variaram de 440.000 a 1.300.000 (HENNESSEY *et al.*, 2016), com o vírus circulando em 18 estados (OMS – Boletim epidemiológico Zika: <http://tinyurl.com/hb3hscb> [acessado: 14 de janeiro, 2017]). Já em 2016, até o mês de novembro, casos autóctones da doença foram confirmados em todos os 26 estados do Brasil (Fig. 3), com aproximadamente 212 mil casos prováveis (boletim epidemiológico do Ministério da Saúde: <http://tinyurl.com/jno38tt> [acessado: 14 de janeiro, 2017]).

Além dos casos convencionais de ZIKV no Brasil, o vírus foi associado com microcefalia (CALVET *et al.*, 2016; OLIVEIRA MELO *et al.*, 2016) e a SGB (ARAUJO & NASCIMENTO, 2016; BRASIL *et al.*, 2016), esta última inicialmente proposta durante o surto na Polinésia Francesa (CAO-LORMEAU *et al.*, 2016). Até o dia 31 de dezembro de 2016, foram notificados cerca de 11 mil casos suspeitos de microcefalia no Brasil, dos quais 2366 já foram confirmados (Fig. 3A e 3B). Com relação à SGB, o último boletim epidemiológico da OMS indica que entre o período de janeiro a novembro de 2015 houveram no Brasil cerca de 2000 casos registrados desta síndrome (OMS - Boletim epidemiológico de SGB: <http://tinyurl.com/zzthek3> [acessado: 14 de janeiro, 2017]).

Traçando-se a rota de dispersão de ZIKV, inicialmente acreditava-se que o vírus fora introduzido no Brasil durante a Copa do Mundo, a qual aconteceu durante os meses de junho e julho de 2014, entretanto, nenhum país endêmico para a arbovirose participou da competição (MUSSO, 2015). Isto não exclui totalmente a possibilidade de introdução do vírus nesta época, dado que torcedores advindos de países endêmicos para a doença possam ter vindo ao país e assim introduzido o vírus. Entretanto, um estudo posterior sugeriu que o vírus possa ter entrado no país durante o *IV FVa'a World Elite and Club Sprint Championship*, campeonato internacional de canoagem que aconteceu em agosto de 2014 no Rio de Janeiro e possuía participantes de quatro países endêmicos para ZIKV: Nova Caledônia, Polinésia

Francesa, Ilhas Cook e Ilha de Páscoa (MUSSO, 2015), fato reforçado por evidências moleculares as quais também sugerem que a linhagem circulante no país é de origem asiática (FARIA *et al.*, 2016).



**Figura 3: distribuição da incidência de Zika e casos notificados a) e confirmados b) de microcefalia no Brasil durante 2016.** Adaptado de boletins epidemiológicos para: Zika (<http://tinyurl.com/jno38tt>) e microcefalia (<http://tinyurl.com/hm2ag4g>) [acessados: 14 de janeiro, 2017].

Desde os relatos iniciais no Brasil, até o mês de janeiro de 2017, 50 países ou territórios do continente americano já relataram casos autóctones de infecção por ZIKV (CDC – lista de países e territórios com transmissão autóctone de ZIKV: <http://tinyurl.com/z7q6l43> [acessado: 12 de janeiro, 2017]) (Fig. 4). Isto fez com que a OMS declarasse no início de 2016, ZIKV como uma questão de emergência em saúde pública (OMS – Declaração de Zika como emergência em saúde pública: <http://tinyurl.com/z3ewuyy> [acessado: 12 de janeiro, 2017]), perdendo este *status* ao final deste mesmo ano (OMS – Atualização do *status* de Zika: <http://tinyurl.com/hw1925y> [acessado: 12 de janeiro, 2017]).



**Figura 4: mapa com casos autóctones de ZIKV em humanos até dezembro de 2016.** Center for Disease Prevention and Control - CDC, 2017 ([www.cdc.gov](http://www.cdc.gov)) [acessado: 15 de janeiro, 2017].

Apesar da epidemia de ZIKV ter acontecido majoritariamente em países / territórios caribenhos e da América do Sul e Central, casos autóctones da doença foram registrados nos Estados Unidos, onde até janeiro de 2017 houveram 216 casos em Estados americanos, e 4650 casos importados (CDC – Página dedicada ao vírus Zika: <http://tinyurl.com/jjj5bcw> [acessado: 14 de janeiro, 2017]), além de 439 casos alóctones no Canadá durante o mesmo

período (governo do Canadá – Página dedicada ao vírus Zika: <http://tinyurl.com/zfnccyz> [acessado: 14 de janeiro, 2017]).

O fato de os vetores de ZIKV estarem presentes em baixa densidade em ambos os países (CHAMPION & VITEK, 2014; GIORDANO *et al.*, 2015), não exclui a capacidade da doença de se estabelecer e alastrar em tais localidades. A ocorrência de casos de transmissão local em regiões dos Estados Unidos, assim como a competência de suas populações de mosquitos do gênero *Aedes* em transmitir o vírus (WEGER-LUCARELLI *et al.*, 2016), além do histórico de transmissão local de outros *flavivirus* em ambos territórios (MARTÍN-ACEBES & SAIZ, 2012; MURRAY *et al.*, 2013; RADKE *et al.*, 2012) ainda mantém ambos os países em alerta.

## **1.6 Ecologia do Zika virus**

### **1.6.1 Hospedeiros e reservatórios naturais**

Apesar da participação de humanos no ciclo de transmissão de ZIKV já ser conhecida, a maioria das arboviroses circula no ambiente sem a dependência do homem, nos conhecidos ciclos silvestres (THIBOUTOT *et al.*, 2010). Não raramente, essas doenças podem sair de um ciclo de transmissão silvestre para o ciclo humano, devido à proximidade deste com o vetor (CHARREL *et al.*, 2007; MACIEL-DE-FREITAS *et al.*, 2006).

Estudos sorológicos na Ásia demonstraram que ao se testar ambos humanos e orangotangos, a prevalência de anticorpos contra ZIKV foi quase seis vezes maior em humanos. Os autores sugerem que os orangotangos, nesta região, possam ter sido infectados com o vírus a partir de um ciclo silvestre recém-estabelecido, atuando assim como hospedeiros do vírus na natureza (KILBOURN *et al.*, 2003; WOLFE *et al.*, 2001).

Ademais, também através de sorologia, diversos pesquisadores foram capazes de detectar anticorpos contra ZIKV em morcegos (ANDRAL *et al.*, 1968), ovelhas, cabras e roedores (DARWISH *et al.*, 1983). A interpretação de tais dados deve ser cautelosa, devido a inerente reatividade cruzada entre *flavivirus* como já citado, entretanto, estes estudos sugerem que ZIKV não possui uma clara associação com uma única espécie em particular. Vale ressaltar até o momento, a escassez de estudos buscando-se isolar o vírus em hospedeiros não-primatas, deixando ainda obscuro o papel que outras espécies possuem na distribuição da doença (HAYES, 2009).

Acredita-se que no continente africano, ZIKV é mantido circulando no ambiente via associação entre mosquitos e animais silvestres, no ciclo silvático da doença. Entretanto, em áreas como a Ilha de Yap e Polinésia Francesa (HADDOW *et al.*, 2012), teoriza-se que o vírus seja mantido em dependência com humanos, de forma que este tenha se adaptado ao

homem como hospedeiro final. Porém, até o momento não foram conduzidos estudos envolvendo animais silvestres em tais localidades, o que não exclui então a possível existência de outros hospedeiros ou possíveis reservatórios naturais.

### 1.6.2 Vetores

O ciclo natural de transmissão de ZIKV envolve majoritariamente a picada de fêmeas de mosquitos do gênero *Aedes* (DIAGNE *et al.*, 2015; LI, *et al.*, 2012), entretanto, outras espécies em potencial exercem papel na disseminação da doença (Tab. 1). Como citado anteriormente, o vírus foi isolado pela primeira vez em *Ae. africanus* no ano de 1948 (DICK *et al.*, 1952), na África, vetor que realiza repasto sanguíneo preferencialmente em humanos, mas inclui em sua dieta: roedores, aves e répteis, os quais podem agir como reservatórios naturais da doença (HADDOW *et al.*, 1964). Desde então, ZIKV tem sido majoritariamente isolado em *Ae. aegypti*, seu principal vetor (MARCHETTE *et al.*, 1969), e em *Ae. albopictus* (GRARD *et al.*, 2014).

Determinada espécie só pode ser denominada vetor de uma doença se a sua capacidade de transmitir o patógeno for verificada. No caso de *Ae. aegypti*, este teve a sua competência vetorial comprovada pela primeira vez em 1956, em experimentos envolvendo camundongos e macacos, onde demonstrou-se que o período extrínseco de incubação do vírus (intervalo de tempo entre a infecção do vetor e quando ele se torna capaz de transmitir o patógeno) no vetor foi de aproximadamente 15 dias (BOORMAN; PORTERFIELD, 1956).

Com relação à *Ae. albopictus*, sua competência vetorial também foi demonstrada como sendo eficiente por diferentes estudos (PAUPY *et al.*, 2009; WONG. *et al.*, 2013). Um deles demonstrou que em 7 dpi, 73% dos mosquitos *Ae. albopictus* possuíam partículas virais infecciosas em sua saliva. Tal fato associado à ampla distribuição de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* (KRAEMER *et al.*, 2015), sugerem que esses vetores sejam responsáveis pela maioria dos casos observados no mundo. Entretanto, o papel de demais vetores ainda precisa ser confirmado, como discutido abaixo.

Recentemente, um estudo identificou o mosquito *Culex quinquefasciatus* como potencial vetor de ZIKV, algo ainda controverso. Guedes e colaboradores, em um artigo ainda em produção demonstraram que ao infectar artificialmente este vetor, houve infecção com ZIKV até mesmo quando uma baixa carga viral foi oferecida (sem que a infecção conseguisse atingir a glândula salivar). Ao se oferecer uma carga viral elevada, *Cx. quinquefasciatus* foi capaz de se infectar e de transmitir o vírus em sua saliva, como detectado em ensaios de salivação a 7 e 14 dpi; infecção viral esta confirmada por microscopia eletrônica das

glândulas salivares deste mosquito. Por fim, estes autores ainda detectaram ZIKV em *Cx. quinquefasciatus* coletados em campo (GUEDES *et al.*, 2016).

O trabalho pioneiro brasileiro sobre *Cx quinquefasciatus* fez com que houvesse uma busca por populações susceptíveis desta mesma espécie nas mais diversas partes do mundo. Estudo realizado com populações naturais deste mosquito na cidade do Rio de Janeiro demonstraram que *Cx quinquefasciatus* desta localidade não são capazes de transmitir ZIKV (FERNANDES *et al.*, 2016).

Resultado semelhante foi observado em populações de mosquitos da Flórida, nos Estados Unidos (HUANG *et al.*, 2016) na Itália e Alemanha (BOCCOLINI *et al.*, 2016; HEITMANN *et al.*, 2017). Entretanto, estudo conduzido na China demonstrou que a população local deste vetor foi capaz de se infectar e transmitir ZIKV, como observado por Guedes e colaboradores no Brasil (GUO *et al.*, 2016), o que levanta a questão da interação genótipo x genótipo entre vírus e vetor, descrito anteriormente na introdução deste trabalho, como possível fator governante da infecção nesta espécie, além de indicar o potencial epidemiológico deste mosquito na ocorrência de ZIKV no mundo.

**Tabela 1: potenciais espécies de mosquitos vetores de ZIKV.** Adaptado de Saiz *et al.* 2016

<b>Espécie</b>	<b>Argumento em favor da categorização como vetor</b>	<b>Origem e ano da primeira identificação (Referência)</b>
<i>Aedes africanus</i>	Isolamento*	Zika Forest (Uganda), 1948 (Dick et al., 1952)
<i>Aedes aegypti</i>	Isolamento	Malaysia, 1966 (Marchette et al., 1969)
<i>Aedes luteocephalus</i>	Isolamento	Saboya Forest (Senegal), 1968 (Haddow et al., 2012; Diallo et al., 2014)
<i>Aedes vittatus</i>	Isolamento	Senegal 1968 (Haddow et al., 2012)
<i>Aedes dalzieli</i>	Isolamento	Senegal 1968 (Haddow et al., 2012)
<i>Aedes metallicus</i>	Isolamento	Senegal 1968 (Haddow et al., 2012)
<i>Mansonia uniformis</i>	Isolamento	Senegal 1968 (Haddow et al., 2012)
<i>Aedes fowleri</i>	Isolamento	Senegal 1968 (Haddow et al., 2012)
<i>Aedes minutus</i>	Isolamento	Senegal 1968 (Haddow et al., 2012)
<i>Aedes neoafricanus</i>	Isolamento	Senegal 1968 (Haddow et al., 2012)
<i>Aedes tarsalis</i>	Isolamento	Senegal 1968 (Haddow et al., 2012)
<i>Aedes apicoargenteus</i>	Isolamento	Central African Republic, 1969 (Diagne et al., 2015)
<i>Aedes furcifer-taylori</i>	Isolamento	Bandia (Senegal), 1969 (Diallo et al., 2014)
<i>Annopheles gambiae s.l.</i>	Isolamento	Bandia (Senegal), 1969 (Diallo et al., 2014)
<i>Aedes opok</i>	Isolamento	Central African Republic, 1976–1980 (Berthet et al., 2014)
<i>Aedes taylori</i>	Isolamento	Kédougou region (Senegal), 1988–1991 (Monlun et al., 1993)
<i>Aedes albopictus</i>	Epidemiológico**	Gabon, 2007 (Grard et al., 2014)
<i>Aedes hirsutus</i>	Epidemiológico	Kédougou region (Senegal), 2011, (Diallo et al., 2014)
<i>Aedes unilineatus</i>	Epidemiológico	Kédougou region (Senegal), 2011, (Diallo et al., 2014)
<i>Culex perfuscus</i>	Epidemiológico	Kédougou region (Senegal), 2011, (Diallo et al., 2014)
<i>Anopheles coustani</i>	Epidemiológico	Kédougou region (Senegal), 2011, (Diallo et al., 2014)

\* Critério de isolamento: baseado na detecção em mosquitos individuais e posterior cultivo viral em cultura de células.

\*\*Critério epidemiológico: baseado apenas na detecção viral em *pools* de mosquitos.

Laboratorialmente, além das principais espécies supracitadas, outras já tiveram a sua competência vetorial testada (Tab. 2). Isto acaba por levantar a importância em se verificar a distribuição de vetores no mundo, de forma a se evitar a transmissão local de ZIKV e outras arboviroses em áreas onde o vetor se encontra presente.

Apesar da sua distribuição predominante em países de clima tropical, recentemente foi predito que o mosquito *Ae. aegypti* possa em breve colonizar algumas regiões do sudeste europeu, assim como locais de clima temperado na América do Norte e Austrália (KRAEMER *et al.*, 2015; MESSINA *et al.*, 2016). Contrário à *Ae. aegypti*, o mosquito *Ae. albopictus*, além de também seguir um padrão de estabelecimento em países tropicais, teve a sua circulação confirmada na América do Norte, Austrália, algumas partes da África e no sudeste da Europa, onde nas últimas duas décadas foi capaz de se dispersar para a França, Alemanha, Itália e Espanha (DYER, 2016; PAUPY *et al.*, 2009). Isto se deve principalmente à sua capacidade de hibernar e sobreviver (capacidade conhecida pelo termo técnico de diapausa) em climas de temperaturas mais amenas (THOMAS *et al.*, 2012).

Um estudo entomológico conduzido na Ilha de Yap demonstrou que devido à sua abundância e a prévia associação com casos de DENV na ilha (SAVAGE *et al.*, 1998), *Aedes hensilii* foi provavelmente o vetor responsável pelos casos de ZIKV em 2007, especialmente após se comprovar a sua (ainda que baixa) competência vetorial para esta arbovirose (LEDERMANN *et al.*, 2014). Já na segunda grande epidemia de ZIKV, na Polinésia Francesa, além de *Ae. aegypti*, outro vetor foi acusado como parcialmente responsável pela transmissão da doença, o mosquito *Ae. polynesiensis* (GUILLAUMOT, 2005).

Durante o surto, pesquisadores coletaram 238 fêmeas de *Ae. polynesiensis*, 286 de *Cx. quinquefasciatus* e 2039 de *Ae. aegypti*, onde encontraram via RT-PCR, apenas um *pool* de fêmeas de *Ae. aegypti* infectado. Além do mais, estudos posteriores de competência vetorial na região demonstraram uma taxa de disseminação de 75% de ZIKV em *Ae. Aegypti*, porém apenas 8% das fêmeas apresentaram infecção na glândula salivar (MUSSO & GUBLER, 2016).

Interessante ainda ressaltar que em um estudo realizado em 2011, no Senegal, coletou-se um grande número de mosquitos de diferentes espécies, de forma a se verificar a presença de ZIKV. De um total de 1700 *pools* de mosquitos, 31 foram positivos para o vírus. Porém, o que mais chama a atenção foi a detecção de machos de *Aedes furcifer* e *Aedes vittatus* infectados pelo vírus, sugerindo a transmissão vertical de ZIKV (DIALLO *et al.*, 2014), fato corroborado por demais pesquisadores (THANGAMANI *et al.*, 2016b).

**Tabela 2: competência vetorial para ZIKV de algumas espécies de mosquitos. Adaptado de Waddell *et al.* 2016.**

País	Ano em que o estudo foi conduzido	Espécie de Mosquito	Taxa de Infecção	Taxa de disseminação						Taxa de transmissão				Proporção Infectado	Proporção de ZIKV disseminado
				3dpi	5dpi	8dpi	10dpi	15dpi	20-60dpi	4dpi	7dpi	10dpi	15dpi		
Senegal	2015	<i>Ae. aegypti</i>	Maior 10dpi	0%			0-10%	0-50%						55%	5.80%
		<i>Ae. unilineatus</i>	Maior 10dpi		0-10%									18.70%	5.30%
		<i>Ae. vittatus</i>	Maior 10dpi	0%			0-100%	0-100%					20-50%	14.40%	27%
		<i>Ae. luteocephalus</i>	Maior 15dpi	0%				0-100%					20-50%	75%	42.20%
Senegal	2011/04-2011/12	<i>Ae. aegypti</i> , <i>Ae. africanus</i> , <i>Ae. dalzielii</i> , <i>Ae. furcifer</i> , <i>Ae. vittatus</i> , <i>Cx. perfuscus</i> , <i>Ae. taylori</i> , <i>Ae. hirsutus</i> and <i>Ae. metallicus</i> , <i>Ae. unilineatus</i> , <i>Ma. Unif</i> , <i>An. coustani</i> , <i>An. andoustani</i>													
Senegal	1976	<i>Ae. aegypti</i>											88%	79-100% (7-30dpi)/ Título 2-6	
Nigéria	1956	<i>Ae. aegypti</i>					10 <sup>3.4</sup>							10 <sup>4.7 to 5.6</sup>	
Ásia															
Singapura	2013	<i>Ae. albopictus</i>	100% em 3dpi	25%+	50%+	100%+	100%+	100%+					Primeiro Isolado +	100%+	
Singapura	2012	<i>Ae. aegypti</i>	87.5% em 3 dpi, 100% em 6 dpi	obs 4 dpi +	62%+		100%+	100%+							
Ilhas Yap	2007/04-2007/07	<i>Ae. (Stegomyia) hensilii</i>	7.1% (4,9 título)		0%										
			80% (5,7 título)		12.5% (5,7 título)										
			86.1% (5,9 título)		22.5% (5,9 título)										

\* log<sub>10</sub> PFU/mL, 70% umidade relativa e 28°C, dpi = dias pós-infecção, + taxa de disseminação = Razão entre o número de glândulas salivares e o número total de mosquitos com intestinos infectados.

### 1.6.3 O *Aedes aegypti*

O mosquito *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) é o principal vetor de DENV, CHIKV e ZIKV no mundo. O mosquito possui coloração clara, localização doméstica e associação antropofílica (TAKKEN & VERHULST, 2011). Em sua forma adulta apresenta o corpo levemente enegrecido, com escamas ornamentais formando um padrão de manchas / faixas prateadas ao longo do corpo, com presença de duas listras no formato de lira em seu tórax (Fig. 5).

Possui hábitos preferencialmente diurnos, realiza o repasto sanguíneo especialmente (mas não de forma exclusiva) durante as primeiras horas da manhã e, ao entardecer. A fêmea hematófaga atua de forma persistente sobre a sua fonte preferencial de alimentação: os humanos (TAKKEN & VERHULST, 2011). Esta se alimenta mais de uma vez durante o período de oviposição (discordância gonotrófica), em especial quando é perturbada antes que tenha se alimentado por completo (BARATA *et al.*, 2001).



**Figura 5: fêmea do mosquito *Ae. aegypti* durante o repasto sanguíneo.**

Fonte: Vectorbase.org [acessado: 08 de janeiro, 2017].

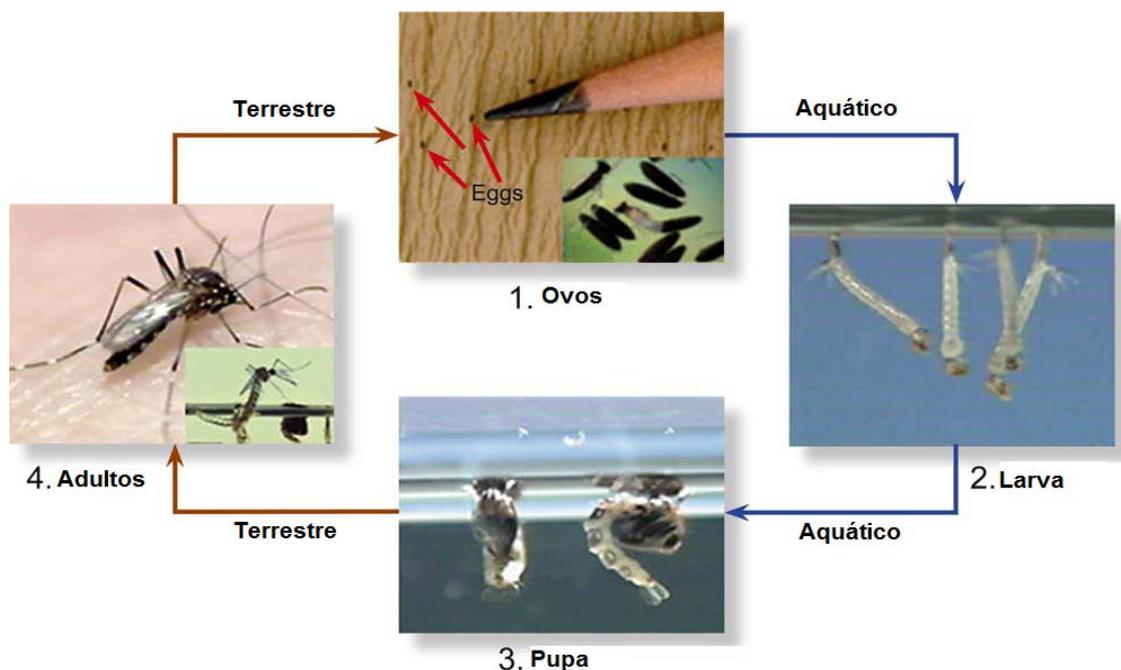
Os ovos de *Ae. aegypti* podem ser encontrados tanto em criadouros naturais como em vãos de rochas, cascas de frutas e internódios de bambus, quanto em criadouros artificiais, que incluem caixas d'água, pneus, latas, recipientes plásticos, piscinas, entre outros. (Fundação Oswaldo Cruz – criadouros naturais e artificiais de *Ae. aegypti*: <http://tinyurl.com/hcgcsd3> [acessado: 16 de janeiro, 2017]).

O ciclo de desenvolvimento de *Ae. aegypti* possui quatro diferentes estágios, sendo: ovo, larva (4 estádios: L1-L4), pupa e inseto adulto, dividido em duas fases: aquática e alada

(na figura representada pelo termo “terrestre”) (Fundação Oswaldo Cruz – ciclo de vida de *Ae. aegypti*: <http://tinyurl.com/hcgcsd3> [accessado: 16 de janeiro, 2017]) (Fig. 6).

O ciclo tem início quando as fêmeas depositam os ovos na parede interna de depósitos com água parada, levando à eclosão dos ovos assim que estes entram em contato com a água (após o período necessário para completar o desenvolvimento do embrião no ambiente seco). Essas larvas alimentam-se de microrganismos e matéria orgânica particulada, trocando sua cutícula corpórea por três vezes, indo do estágio L1 ao L4 até realizarem metamorfose e se transformarem em pupas. Em seguida ocorrem diversas mudanças fisiológicas e anatômicas, levando ao surgimento dos mosquitos adultos, os quais atingem o meio terrestre, (fase aquática para a alada).

Todo o ciclo de vida aquático do mosquito, seja ele macho ou fêmea, leva cerca de 7~10 dias (sendo que os machos geralmente completam primeiro o seu desenvolvimento) no meio ambiente, dependendo de fatores como densidade larval, a taxa de alimentação das larvas e a temperatura ambiente (MOORE & WHITACRE, 1972).



**Figura 6: ciclo de vida de *Ae. aegypti*.** Modificado de CDC - <http://tinyurl.com/hmbogl8> [accessado: 08 de janeiro, 2017].

### 1.6.3.1 O sistema imune

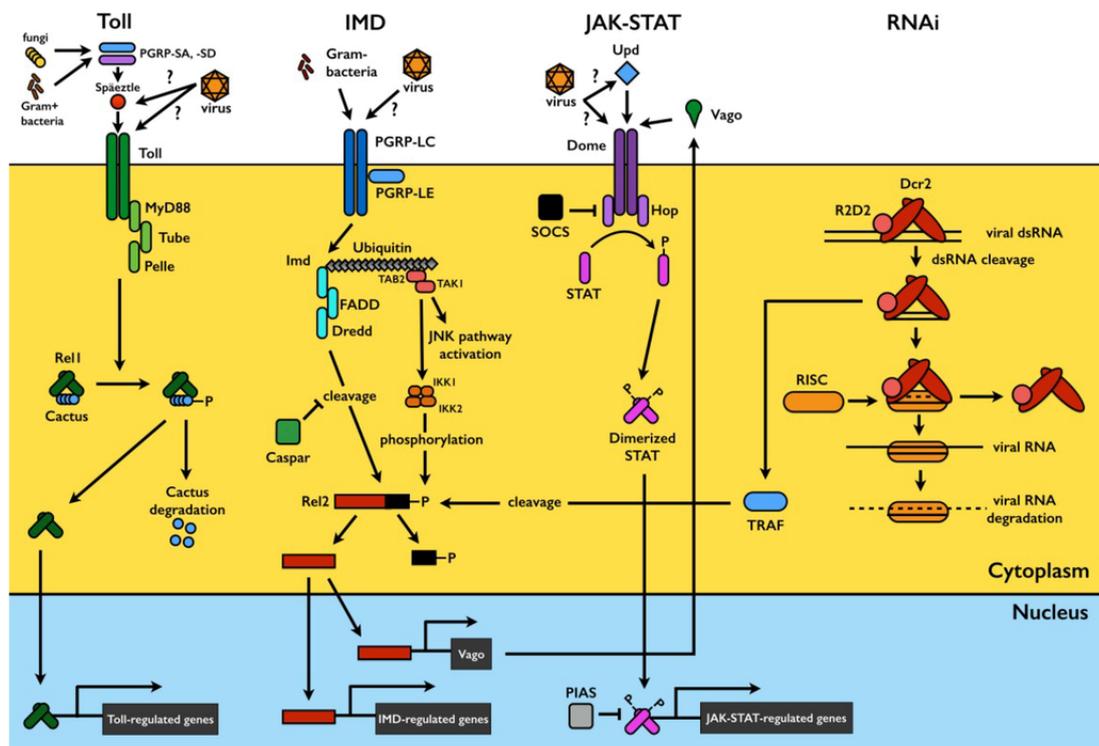
Em insetos, ao tratarmos da resposta por parte do hospedeiro a infecções provocadas por agentes externos, em especial mosquitos, foco desta tese, podemos dividir o tema em duas principais vias: a 1) resposta celular e a 2) resposta humoral.

No que diz respeito ao primeiro cenário, têm-se os hemócitos como sendo os principais responsáveis pelo combate ao agente infeccioso. Através da circulação constante pela hemolinfa, considerada o componente sanguíneo do inseto, estas células sanguíneas podem tanto fagocitar quanto encapsular o invasor, como forma de defesa (HILLYER *et al.*, 2003).

Com relação ao segundo cenário, a resposta a patógenos envolve melanização e secreção de peptídeos antimicrobianos (*antimicrobial peptides* – AMPs). Em insetos, a produção dessas moléculas efetoras está sob o controle de três principais vias de resposta imune, conhecidas como a via Toll, via da imunodeficiência (IMD) e a via de sinalização Janus Kinase/Transdutores de Sinal e Ativadores de Transcrição (JAK-STAT) (Fig.7), ativadas pela interação entre os receptores de reconhecimento de padrões (*pattern recognition receptors* - PRRs) e os padrões moleculares associados à patógenos (*pathogen associated molecular patterns* – PAMPs) (JUPATANAKUL *et al.*, 2014). PAMPs são porções conservadas entre diversos agentes infecciosos e que não estão presentes no hospedeiro (ex.: componentes da parede celular ou RNAs de dupla fita). Paralelamente a isto, existe também a ativação da via do RNA de interferência (RNAi), responsável pelo combate à infecção viral. Para mais informações sobre a via RNAi, favor referir-se a JUPATANAKUL *et al.*, 2014.

A via Toll, inicialmente descrita em *Drosophila melanogaster* (LEMAITRE *et al.*, 1996), é comumente associada à infecção por fungos e bactérias gram-positivas (LEMAITRE *et al.*, 1996), sendo também demonstrada a sua associação com a infecção viral (CHRISTOPHIDES *et al.*, 2002). Nesta via, após a interação entre o agente infeccioso e os PRRs, ocorre uma cascata proteolítica que culmina na ativação da citocina Späetzle, que por sua vez se liga ao receptor transmembranar da via toll. Este receptor irá interagir com a proteína adaptadora MyD88 juntamente com demais proteínas acessórias, levando à degradação do regulador negativo da via (Cactus). A degradação de Cactus por sua vez permite a translocação de Rel1 para o núcleo, levando à transcrição dos AMPs efetores (JUPATANAKUL *et al.*, 2014).

Estudos já demonstraram que em cenários de infecção por DENV, há a ativação de componentes-chave da via Toll, como Späetzle, Toll e Rel1A (XI *et al.*, 2008). Em *Ae. aegypti* já foi demonstrado inclusive que o silenciamento, via RNAi, de Cactus reduziu significativamente o título viral de DENV, enquanto que o silenciamento de MyD88 produziu efeito oposto (XI *et al.*, 2008).



**Figura 7: principais vias de resposta imune em mosquitos.** Retirado de JUPATANAKUL *et al.*, 2014.

A via IMD tem o seu papel reconhecido na defesa do organismo contra bactérias gram-negativas (GEORGEL *et al.*, 2001). Em *Drosophila*, assim como a via Toll, esta é ativada a partir da interação entre PRRs e PAMPs (AGGARWAL; SILVERMAN, 2008). Através de uma complexa cascata de sinalização intracelular envolvendo a proteína adaptadora IMD e diversas caspases / quinases, a via se ramifica em dois caminhos, o primeiro compartilha características com a via JAK-STAT, discutida a seguir, e o segundo culmina na ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B denominado Rel2 em mosquitos, o qual na sua forma ativa, expõe a região carboxi-terminal responsável pela translocação nuclear fazendo com que uma vez no núcleo, Rel2 ative a transcrição de AMPs (revisado em JUPATANAKUL *et al.*, 2014).

Dados indicam que em mosquitos, a ativação da via IMD, através do silenciamento por RNAi de Caspar, não resultou em alteração na carga viral de DENV no intestino (XI *et al.*, 2008). Porém alguns autores já demonstraram que houve um aumento na carga viral de DENV em *Ae. aegypti* silenciados para alguns componentes da via IMD, valendo ressaltar que estes mosquitos eram naturalmente resistentes à infecção pelo vírus (SIM *et al.*, 2013).

Por fim, com relação à via JAK-STAT, esta também foi inicialmente caracterizada em *D. melanogaster* (ARBOUZOVA; ZEIDLER, 2006). De forma resumida, a ativação desta via ocorre quando o peptídeo não-pareado Upd se liga (no meio extracelular) ao receptor

transmembrar Dome. Isto faz com que haja a dimerização deste receptor, seguida de uma série de eventos de fosforilação de quinases associadas ao receptor (Janus kinases [JAKs]). JAKs então fosforilam a porção citoplasmática de Dome, gerando sítios de recrutamento para as proteínas STAT. As STATs após recrutadas são fosforiladas pelo complexo Dome/JAK o que resulta na ativação das mesmas. Após a ativação, os dímeros de STAT se translocam para o núcleo e induzem a expressão de genes efetores (ARBOUZOVA; ZEIDLER, 2006).

Já foi demonstrado que no caso de *D. melanogaster*, a via JAK-STAT modula o perfil de infecção por *Drosophila C virus* (DCV), reduzindo a carga viral e assim aumentando a sobrevivência das moscas (DOSTERT *et al.*, 2005). Já em *Ae. aegypti*, estudos demonstraram que o silenciamento, via RNAi, da via JAK-STAT, causou um aumento da infecção por DENV no intestino do mosquito. De forma contrária, a super-expressão da via, através do silenciamento da proteína PIAS (regulador negativo da via), causou uma queda na carga viral (SOUZA-NETO *et al.*, 2009).

## **1.7 Breve relato sobre formas clássicas de controle de vetores**

### **1.7.1 Controle mecânico**

A forma mais simples e eficiente de combate a vetores responsáveis pela transmissão de patógenos é o controle ativo dos focos de criação do mosquito. A eliminação da água parada em recipientes naturais (cascas de frutas, vãos de rochas, internódios de bambus, entre outros) e artificiais (caixa d'água, pneu, vaso de planta, vaso sanitário, entre outros) evita o surgimento do mosquito adulto e com isso interrompe o ciclo de transmissão e contaminação.

A eficiência de tal estratégia depende diretamente do engajamento da população para que não deixe água acumular, sendo necessários apenas 10 minutos semanais para a remoção dos focos de criação do mosquito e redução dos casos da doença, como observado em estudo realizado em Cingapura, onde interrompeu-se o pico de epidemia no país com ações semanais da população dentro de suas residências, por apenas 10 minutos, para limpeza dos criadouros de *Ae. aegypti* (FIOCRUZ – 10 minutos contra a dengue - <http://tinyurl.com/hvferlq>).

### **1.7.2 Controle químico**

Uma das maiores revoluções no combate aos vetores com potencial danoso a humanos foi a criação de compostos químicos com ação inseticida. Atualmente os inseticidas, cuja origem pode ser orgânica ou inorgânica, correspondem, após o controle mecânico ativo pela população, à maior parte do combate ao vetor por parte da vigilância epidemiológica em todo o mundo (GUBLER, 1998b).

Dentre os inseticidas mais utilizados mundialmente, destaca-se a classe dos organofosforados descobertos subsequentemente ao desenvolvimento dos organoclorados, que têm como principais representantes o temephos para o combate de larvas e o malation para o combate de insetos adultos. Existe ainda a classe dos piretroides, compostos bastante estáveis e que, assim como os organofosforados, são biodegradáveis e não se acumulam em tecidos, apresentando o preço como desvantagem em relação aos demais (VALLE, 2007). Entretanto ambas as classes já apresentam elevados casos de resistência em diversas regiões do mundo, incluindo o Brasil (BELLINATO *et al.*, 2016).

Atualmente, os inseticidas reguladores do desenvolvimento de insetos (*insect growth regulators* - IGRs, em inglês) se destacam no combate a vetores por conterem substâncias que retardam ou até mesmo inibem o crescimento de artrópodes (MULLA, 1995). Apresentam baixa toxicidade a humanos e baixa reatividade perante a biota não-alvo, como peixes, aves, incluindo invertebrados (MULLA, 1995). Os IGRs dividem-se em duas classes, os análogos do hormônio juvenil e os inibidores da síntese de quitina.

Atualmente, um método inovador no uso de tal classe de composto químico, consiste na aplicação do IGR Pyriproxifen em criadouros de mosquitos, de forma que assim que o vetor entra em contato com a água, este irá se impregnar com o composto e transporta-lo pelo meio ambiente, contaminando um criadouro adjacente ao entrar em contato com o mesmo, assim dispersando o composto químico pela natureza. Esta estratégia está sendo aplicada no Brasil, mais especificamente na cidade de Manacapuru, no estado do Amazonas, onde observou-se uma queda drástica no contingente populacional de mosquitos selvagens do gênero *Aedes* (ABAD-FRANCH *et al.*, 2017).

Para uma detalhada revisão sobre o uso de IGRs e seus mecanismos de ação, acesse <http://tinyurl.com/zlomvbo> [Avaliação do efeito da seleção com inibidor de síntese de quitina e da exposição a doses parcialmente letais de inseticidas em populações de campo de *Aedes aegypti* – tese de doutorado, Thiago Belinato, 2012].

Em áreas altamente afetadas por arboviroses como o Brasil, a evolução do perfil de resistência a inseticidas pode ocorrer de forma acelerada, acarretando consequências indesejadas (MACIEL-DE-FREITAS *et al.*, 2014). Prova disto é a documentação de resistência em todas as principais espécies vetoras do mundo, permitindo que a população local de mosquitos se restabeleça rapidamente (ARSLAN *et al.*, 2016; MULAMBA *et al.*, 2014). No campo, uma variedade de mecanismos de resistência já foram selecionados em populações naturais, incluindo sequestro metabólico ou detoxificação do composto químico (elevada produção, ou indução de carboxiesterases, esterases, glutatona-S-transferases, e monoxigenases dependentes da enzima de detoxificação P450), além de mutações pontuais

capazes de tornar o sítio-alvo de inseticidas menos sensível ao componente ativo dos compostos químicos (como acetilcolinesterases, receptores dos canais de sódio) (VALLE, 2007).

Tomadas em conjunto, a seleção do fenótipo de resistência aos inseticidas químicos acaba por exigir metodologias alternativas que sejam eficazes no combate das arboviroses transmitidas por insetos vetores ao redor do mundo. Abaixo iniciaremos a discussão de estratégias inovadoras que estão sendo desenvolvidas em laboratório, assim como métodos já aplicados em campo.

## **1.8 Novas formas de controle do vetor sendo desenvolvidas em laboratório**

### **1.8.1 *Homing endonuclease genes* (HEGS)**

Em se tratando de abordagens genéticas para o controle de arboviroses ainda em fase de desenvolvimento, restritas apenas ao ambiente controlado de laboratório, têm-se a utilização de *Homing endonuclease genes* (HEGS), os elementos genéticos do tipo egoísta como uma estratégia interessante cujos resultados de prova de conceito demonstraram-se eficazes.

Descobertos inicialmente em fungos, estes genes codificam endonucleases capazes de reconhecer e clivar sequências específicas de DNA de aproximadamente 30 pb. Após a clivagem, os HEGS se introduzem nestas sequências específicas de forma a se proteger de sua própria ação de clivagem. Em heterozigotos, a HEG inserida em uma cópia do gene (um cromossomo) irá se clivar e se inserir na outra cópia deste gene, resultando em um indivíduo homozigoto. Como é possível criar HEGS capazes de clivar sequências específicas, logo há a possibilidade de se criar elementos que irão interferir diretamente nos genes envolvidos na competência vetorial (WINDBICHLER *et al.*, 2011), assim como pode-se utilizar tal abordagem com o intuito de reduzir o tamanho populacional, seja via esterilização ou redução do tempo de vida dos mosquitos (BURT, 2003; DEREDEC *et al.*, 2011).

Estudos buscando provar a viabilidade da técnica já foram realizados em *D. melanogaster*, no qual o desenvolvimento do esperma, assim como a linhagem germinativa da fêmea foram alvo de modificação (CHAN *et al.*, 2011), onde também se observou que a eficiência de tal técnica é extremamente sensível a variações de temperatura (CHAN *et al.*, 2013), o que pode afetar diretamente a aplicabilidade de tal estratégia em campo. O sistema de *gene drive* utilizando HEGS também já foi aplicado *in vivo* em *Anopheles gambiae*, onde se observou que a eficiência de transformação foi ainda maior que em *D. Melanogaster*, ao se utilizar a mesma endonuclease (WINDBICHLER *et al.*, 2011).

Entretanto, apesar de promissor, o uso de tal técnica tem caído drasticamente em desuso, perdendo espaço para técnicas mais simples e com um menor custo, como o sistema de edição gênica CRISPR/Cas9.

### 1.8.2 CRISPR/Cas9

CRISPR, do inglês *clustered, regularly interspaced short palindromic repeats* (repetições palindrômicas curtas agrupadas e regularmente espaçadas) caracteriza-se como sendo uma série de aproximadamente 20-50 pares de base repetidas, separadas por espaçadores únicos de tamanho similar, antecedidas por uma sequência líder rica em nucleotídeos adenina e timina (*TATA box*; uma região promotora). Estas regiões foram descritas pela primeira vez em 1987 em *Escherichia coli*, entretanto, somente em 2007, 20 anos após a sua descoberta é que pesquisadores demonstraram o seu papel na imunidade adaptativa de bactérias (BARRANGOU *et al.*, 2007).

Atualmente, o sistema CRISPR é dividido em duas classes. Enquanto a classe I utiliza múltiplas proteínas associadas à região CRISPR, as chamadas Cas (do inglês *CRISPR associated genes*) para degradar ácidos nucleicos invasores, a classe II, descoberta em *Streptococcus pyogenes* e adaptada para edição gênica em células de mamíferos (CONG *et al.*, 2013; JINEK *et al.*, 2012; MALI *et al.*, 2013) utiliza uma única endonuclease denominada Cas9 (MAKAROVA *et al.*, 2015), a qual possui dois sítios catalíticos (HuvC e HNH).

Mecanicamente falando, o sistema de classe II de CRISPR/Cas9 apenas requer, portanto, dois componentes para atuar: a endonuclease de DNA Cas9 e uma pequena sequência específica de RNA denominada RNA guia (do inglês *single guide RNA*). Após a ligação do *sgRNA* à endonuclease Cas9, esta será direcionada para uma região específica no genoma, clivando a dupla fita de DNA-alvo, no que é conhecido como corte-duplo (do inglês: *double strand break*). Isto irá ativar o sistema de reparo celular de forma a corrigir o corte feito, através do sistema de reparo não-homólogo (do inglês *non-homologous end joining* (NHEJ). Durante este processo, pares de base são inseridos ou deletados do DNA genômico na sequência do corte, causando mutações do tipo *indels* (inserção/deleção), o que geralmente resulta em alterações no códon de leitura (do inglês: *frameshift*), causando a desativação do gene de interesse (WRIGHT *et al.*, 2016).

Recentemente, pesquisadores têm criado diferentes tipos de Cas9 visando aumentar a especificidade da técnica. Um destes avanços diz respeito à modificação, via engenharia genética, de Cas9, criando a Cas9 nickase. Esta Cas9 geneticamente modificada possui atividade de endonuclease em apenas um de seus sítios catalíticos, ou seja, ela realiza o corte em apenas uma das fitas de DNA. A ideia por detrás do uso da Cas9 nickase, é a introdução

de dois desses complexos proteicos ao mesmo tempo, cada um com o seu *sgRNA*, de forma que cada uma destas endonucleases realizará apenas um corte, fazendo com que o sistema de reparo do hospedeiro passe a ser por homologia, o que reduz drasticamente a chance de erro no reparo pela maquinaria do hospedeiro, e conseqüentemente, mutações indesejadas (WRIGHT *et al.*, 2016).

No que diz respeito a insetos vetores, o sistema CRISPR/Cas9 já está sendo aplicada em algumas espécies (REEGAN *et al.*, 2016), incluindo o mosquito *Ae. aegypti* onde ao realizar o *knockout* do gene determinante de machos (*Nix*), foi possível criar machos fenotipicamente feminizados (HALL *et al.*, 2015). Entretanto é em mosquitos do gênero *Anopheles* que os estudos estão mais avançados. Gantz e colaboradores, ao trabalharem com *An. stephensi*, conseguiram uma taxa de transmissão de genes anti-*Plasmodium* de 99,5% em populações selvagens em poucas gerações (GANTZ *et al.*, 2015). Já Hammond e colaboradores, ao trabalharem com *An. gambiae*, conseguiram uma taxa similar de transmissão, entretanto estes autores utilizaram três genes ligados à fertilidade das fêmeas. No mesmo estudo, os autores conseguiram manipular a proporção sexual da prole, fazendo com que a taxa de machos na população fosse de aproximadamente 90%, o que por sua vez teria a capacidade de reduzir drasticamente a população de campo em poucas gerações, de forma similar à técnica de RIDL e SIT, discutidas abaixo (HAMMOND *et al.*, 2016).

### **1.9 Formas alternativas de controle do vetor já aplicadas em campo**

Em uma análise retrospectiva, percebe-se que uma parcela expressiva da comunidade científica tem focado apenas no desenvolvimento de vacinas e drogas como forma de controle de doenças transmitidas por insetos vetores. Entretanto, até o momento, não existe nenhuma vacina ou tratamento totalmente efetivo disponível de forma comercial para as principais arboviroses no mundo, com exceção da febre amarela, a qual ainda assim continua sendo uma ameaça cada vez mais presente (VASCONCELOS & MONATH, 2016).

No início do Século XX, guiada pelo controle efetivo de diversas populações de vetores, em especial os responsáveis pela transmissão de febre amarela e malária (GUBLER, 1998b), a comunidade científica estava relativamente otimista de que a erradicação de arboviroses era possível via o uso de inseticidas e drogas anti-patógenos. Entretanto, esta empolgação não perdurou. Associada a dificuldades financeiras e operacionais na aplicação de inseticidas no campo, a questão de resistência a inseticidas se tornou um problema real e crescente (GUBLER, 1998b).

Hoje, o aumento no número de casos de DENV, ZIKV, CHIKV, YFV e WNV ao redor do mundo tem demonstrado que políticas públicas de conscientização possuem pouco efeito

sobre a população. Além disto, apesar do uso de inseticidas ter se mostrado eficaz em determinados contextos no passado, faz-se necessário o uso de métodos complementares para o combate ao vetor. Os altos custos associados à aplicação dos agentes químicos podem tornar o seu uso impraticável, seja pela logística associada à aplicação nas áreas altamente urbanizadas até áreas remotas, ou pela seleção do fenótipo de resistência nas populações do vetor (MARCOMBE *et al.*, 2012; NKYA *et al.*, 2013).

Portanto, buscando-se desenvolver formas alternativas e eficientes de controle, as práticas desenvolvidas nos últimos anos e que estão sendo aplicadas em campo focam em duas formas principais para combater a doença: a redução da população de mosquitos e o bloqueio da transmissão do vírus pelo próprio mosquito.

### **1.9.1 A técnica de insetos estéreis (SIT)**

A técnica de insetos estéreis (*SIT* em inglês), inicialmente proposta em 1955 (KNIPLING, 1955), é a forma mais antiga e mais utilizada de modificação genética de vetores. Utiliza-se machos como base para o controle populacional. Estes são expostos à radiação gama ou a agentes químicos esterilizantes, o que causa uma série de danos a nível cromossômico, ou mutações dominantes letais no esperma destes indivíduos. Em seguida, faz-se a liberação maciça destes machos, em número idealmente muito superior aos machos presentes no ambiente. Após a cópula com fêmeas selvagens, não há produção de prole viável, reduzindo-se assim, ao longo do tempo, o contingente populacional de mosquitos (ALPHEY, 2014).

Alguns pontos devem ser levados em consideração na hora da liberação de machos nesta técnica. O primeiro é a garantia de que não ocorrerá a liberação de fêmeas, pois isto acarretaria no aumento da população de vetores e até na introdução de genes mutados via esterilização. Em segundo lugar, há a probabilidade que os machos não sejam completamente estéreis. Isso faz com que haja a transferência de genes mutados para a população selvagem.

Migração é outro ponto importante; caso não ocorra a eliminação total dos vetores no ambiente, novas liberações são necessárias para reduzir agora o novo contingente populacional resultante de migração entre áreas. Outra questão relevante é o fato de a técnica de *SIT* não afetar os bancos de ovos já depositados na natureza, o que faz com que após a eclosão dos mesmos, a população em determinada área se reestabeleça.

O controle via *SIT* já apresentou resultados positivos ao redor do mundo. Dentre estes, inclui-se a eliminação de *Anopheles albimanus*, um vetor local de malária, em uma área de 15km<sup>2</sup> em El Salvador (BENEDICT & ROBINSON, 2003), a eliminação de *Cochliomyia hominivorax* nos Estados Unidos, responsável por casos de miíase (KNIPLING, 1960), e por

sua vez, a eliminação da mosca Tsé-tsé em Zanzibar (VREYSEN *et al.*, 2000). Entretanto, nem sempre o uso de tal abordagem se mostrou eficaz. Uma revisão detalhada sobre fracassos e sucessos no uso de *SIT* na natureza ao longo das décadas pode ser encontrada em (BENEDICT & ROBINSON, 2003).

No que diz respeito aos anos recentes, alguns autores propõem o uso de *SIT* de forma individual (OLIVA *et al.*, 2012) ou concomitantemente com *Wolbachia* (ZHANG, D. *et al.*, 2015), de forma a se combater o mosquito *Ae. albopictus*, onde então a técnica de *SIT* seria aplicada inicialmente para reduzir o contingente populacional de mosquitos no campo, para só então iniciar a liberação de fêmeas portando a bactéria *Wolbachia*. Tal estratégia garantiria que a frequência de equilíbrio instável (termo referido como o menor contingente populacional a ser liberado para que *Wolbachia* se estabeleça no ambiente) fosse o menor possível, reduzindo assim o intervalo de tempo necessário para a liberação de mosquitos.

### **1.9.2 Liberação de insetos carregando um gene letal dominante (RIDL)**

A técnica de liberação de insetos carregando um gene letal dominante, ou *release of insects carrying a dominant lethal gene (RIDL)* em inglês, pode ser considerada como um aprimoramento da técnica de liberação de machos estéreis (*SIT*), desta vez tendo a fêmea como foco. Neste sistema, os machos carregam e transmitem (ao copularem com fêmeas selvagens) transgenes para a prole e conseqüentemente para a população.

Existem duas principais abordagens genéticas quando se trata de *RIDL*. Na primeira, o transgene construído atua reduzindo a expressão de um gene ativo na musculatura de voo das fêmeas. Como resultado, a prole dos machos transgênicos liberados não consegue voar, o que impede a sua alimentação ou cópula no meio ambiente (BARGIELOWSKI *et al.*, 2012).

A segunda abordagem envolve um transgene que induz a morte em uma determinada etapa de vida do vetor, seja no estágio de pupa (PHUC *et al.*, 2007), ou no estágio adulto (BARGIELOWSKI *et al.*, 2011). A criação desta linhagem de mosquitos em laboratório envolve um processo de seleção via uso de antibiótico. Nesse sistema, o transgene construído está sob controle de um repressor que é ativado na presença do antibiótico tetraciclina. A vantagem desta abordagem é que o efeito sob o *fitness* do macho transgênico é menor em comparação ao *SIT*, visto que a transcrição do transgene só acontece em fêmeas e em promotores específicos de determinados estágios de vida (WISE DE VALDEZ *et al.*, 2011).

No que diz respeito à aplicação da técnica, as liberações em campo começaram em 2009-2010, nas Ilhas Cayman, onde demonstrou-se supressão na ordem de 80% da população selvagem de *Ae. aegypti*. Neste estudo, ocorreu a liberação de machos de uma linhagem denominada OX513A. Interessante ressaltar o elevado montante de mosquitos necessário para

um controle eficaz. Neste trabalho, os autores liberaram 3,3 milhões de mosquitos ao longo de 23 semanas, equivalente a 4.000 mosquitos por hectare, na proporção de 10 mosquitos machos transgênicos para cada macho selvagem (HARRIS *et al.*, 2012). Este número massivo compensaria por vez os custos ao *fitness* do hospedeiro geneticamente modificado (BARGIELOWSKI *et al.*, 2011).

Cabe ressaltar que em campo, a taxa de dispersão destes mosquitos modificados varia de acordo com o ambiente analisado (BARGIELOWSKI *et al.*, 2011, 2012; LACROIX *et al.*, 2012; WINSKILL *et al.*, 2015), onde quanto maior a densidade populacional de hospedeiros, menor será a movimentação do vetor no ambiente. Entretanto, a publicação não incluiu resultados de monitoramento populacional dos mosquitos após cessarem as liberações.

No Brasil, as liberações da linhagem de machos transgênicos “OX513A” está a encargo da empresa OXITEC ([www.oxitec.com.br](http://www.oxitec.com.br)). O processo de soltura iniciou-se no interior da Bahia, e durou cerca de um ano. Na etapa inicial de liberação, a qual ocorreu três vezes por semana, durante seis semanas, liberou-se cerca de 10.000 machos transgênicos por vez. Os autores relatam que o uso de tal técnica reduziu em 95% a população selvagem de *Ae. aegypti*, na área de liberação (CARVALHO *et al.*, 2015).

### **1.9.3 A bactéria *Wolbachia***

*Wolbachia pipientis* foi observada pela primeira vez nos tecidos reprodutivos do mosquito *Cx. pipiens* e deste então, define-se o gênero *Wolbachia* como sendo organismos procariotos, gram-negativos, intracelulares obrigatórios, pertencentes à ordem Rickettsiales (HERTIG & WOLBACH, 1924) presente em cerca de 40% de todas as espécies conhecidas de artrópodes terrestres (ZUG & HAMMERSTEIN, 2012), e em 52% dos artrópodes aquáticos (SAZAMA *et al.*, 2017). Demonstrando-se recentemente, inclusive, a transferência horizontal ativa da bactéria entre plantas e artrópodes (LI *et al.*, 2016).

O primeiro trabalho a caracterizar fidedignamente tais bactérias foi publicado em 1924. Realizado em um estudo sazonal de dissecação que incluiu machos e fêmeas de *Cx. pipiens*, pelos pesquisadores Marshall Hertig e S. Burt Wolbach, a bactéria foi descrita como sendo “organismo gram-negativo, intracelular pleomórfico, em forma de bastonete, só observada nos ovários e nos testículos e que está presente nos ovos e consequentemente na progênie das fêmeas” (HERTIG & WOLBACH, 1924).

Na década de 1950, realizando cruzamentos com *Cx. pipiens*, Ghelelovitch observou incompatibilidade em determinados cruzamentos intraespecíficos, onde havia o nascimento de poucos indivíduos ou, não raramente, nenhum (GHELELOVITCH, 1952). Posteriormente, Laven determinou que este fator de incompatibilidade possuía na verdade um padrão de

herança citoplasmática (herança através das fêmeas e não dos machos). Tal fator passou então a ser chamado pelos autores de “incompatibilidade citoplasmática” (IC) (Fig. 8) (LAVEN, 1951).

Somente 20 anos após as descobertas da década de 1950 que se fez conexão entre incompatibilidade citoplasmática e *Wolbachia*, através de um experimento no qual os pesquisadores Yen e Barr curaram uma linhagem de *Cx. pipiens* com antibiótico. Com isso, voltaram a observar a produção normal de progênie pelas fêmeas nos cruzamentos onde estas estavam infectadas por *Wolbachia* e os machos curados (YEN & BARR, 1974).

O que antes havia sido observado somente em *Cx. pipiens*, passou a ser notado nos mais diversos grupos de insetos ao redor do mundo (WERREN *et al.*, 2008). Posteriormente, foi ainda demonstrado por diversos autores, a existência de IC bidirecional (Fig. 8), onde o cruzamento entre hospedeiros portando cepas distintas de *Wolbachia* também leva ao nascimento de poucos ou não raramente, nenhum indivíduo (DOBSON, 2004; MERÇOT & POINSOT, 2009; POINSOT *et al.*, 2003).

		FÊMEA				
		Infectada				
		A	B	AB		
MACHO	Infectado	A	✓	✓	✓	✓
		B	✗	✓	✗	✓
		AB	✗	✗	✓	✓
		AB	✗	✗	✗	✓

**Figura 8: tipos de incompatibilidade citoplasmática (IC).** A e B são infecções por apenas uma cepa de *Wolbachia* (A, B) ou duas cepas ao mesmo tempo (AB) em mosquitos. A área em azul representa IC unidirecional, área em verde IC bidirecional. “X” representa um cruzamento incompatível (não produz descendentes) e “V” um cruzamento compatível (produz descendentes). Adaptado de (HOFFMANN, 2005).

#### 1.9.4 O uso de *Wolbachia* no controle de arboviroses

Apesar de *Wolbachia* ser encontrada na natureza infectando pelo menos 40% de todas as espécies conhecidas de artrópodes terrestres, incluindo-se algumas espécies de mosquitos de importância médica, (ZUG & HAMMERSTEIN, 2012), destaca-se a sua completa ausência em *Ae. aegypti*, o principal vetor de arboviroses no mundo (BROWNSTEIN *et al.*, 2003). Recentemente na África encontrou-se na natureza, mosquitos do gênero *Anopheles*, mais especificamente as espécies *An. gambiae* e *Anopheles coluzzii*, naturalmente infectadas pela cepa *wAnga* de *Wolbachia* (BALDINI *et al.*, 2014; SHAW *et al.*, 2016).

A ausência de *Wolbachia* em *Ae. aegypti* foi contornada inicialmente em 2005 (XI *et al.*, 2005), via introdução estável (processo conhecido pelo termo transinfecção estável) da cepa *wAlbB*, originária de *Ae. albopictus*, a qual apresentou uma elevada taxa de IC. Posteriormente, McMeniman e colaboradores transinfetaram a cepa *wMelPop*, originária de *D. melanogaster* no mosquito (MCMENIMAN *et al.*, 2009). Em seguida, foi demonstrado que esta cepa possuía grande capacidade em interferir no desenvolvimento de DENV, CHIKV, YFV e inclusive *Plasmodium* (MOREIRA *et al.*, 2009; VAN DEN HURK *et al.*, 2012). Entretanto *wMelPop* compromete severamente o *fitness* do mosquito vetor, reduzindo assim a sua vantagem competitiva na natureza (YEAP *et al.*, 2011). Logo, outra linhagem de *Ae. aegypti* foi então gerada, desta vez contendo a cepa *wMel*, também originária de *D. melanogaster*. Esta por sua vez ainda exerce o efeito de interferência a patógeno no hospedeiro sem alterar severamente o seu *fitness* (WALKER *et al.*, 2011a), característica comprovada pela sua eficiente disseminação no campo (HOFFMANN *et al.*, 2011).

Atualmente, diversos estudos já buscaram analisar o efeito de interferência a patógenos causado por diferentes cepas de *Wolbachia*, seja via associações naturais, onde *Wolbachia* é encontrada naturalmente no hospedeiro, via associações transientes, onde a bactéria é artificialmente introduzida no vetor adulto, restringindo a sua distribuição aos tecidos somáticos, e por fim, as transinfecções estáveis, descritas acima. A tabela 3 abaixo resume os efeitos de diferentes cepas de *Wolbachia* sobre uma série de patógenos.

**Tabela 3: Efeito de interferência a patógenos (IP) em mosquitos contendo diversas cepas e tipos de associação de *Wolbachia*.** Adaptado de (JOHNSON, 2015).

Hospedeiro	Associação	Cepa	Patógeno	Efeito IP	Referência	
<i>Culex quinquefasciatus</i>	Natural	wPip	WNV	Carga viral e transmissão reduzidas	(GLASER, 2010)	
<i>Culex pipiens</i>	Natural	wPip	WNV	Sem efeito	(MICIELI, 2014)	
<i>Culex tarsalis</i>	Transiente	wAlbB	WNV	Infecção aumentada	(DODSON, 2014)	
<i>Aedes albopictus</i>	Natural	wAlbA e wAlbB	DENV	Sem efeito	(LU, 2012)	
			CHIKV	Sem efeito	(MOUSSON, 2010)	
	Transinfecção estável	wMel	DENV	Transmissão reduzida	(BLAGROVE, 2012)	
			CHIKV	Transmissão reduzida	(BLAGROVE, 2013)	
<i>Aedes polynesiensis</i>	Transinfecção estável	wAlbB	DENV	Carga viral reduzida. Transmissão reduzida (comparação com infecção natural por wPolA)	(BIAN, 2013)	
			DENV	Infecção, carga viral e transmissão reduzidas	(MOREIRA, 2009)	
			CHIKV	Infecção e carga viral reduzidas	(MOREIRA, 2009)	
			WNV	Infecção, carga viral e transmissão reduzidas	(HUSSAIN, 2013)	
	Transinfecção estável	wMelPop	YFV	Infecção e carga viral reduzidas	(VAN DEN HURK, 2012)	
			DENV	Taxa de infecção, disseminação carga viral e transmissão reduzidas	(WALKER, 2011a)	
			CHIKV	Infecção, disseminação e carga viral reduzidas	(ALIOTA, 2016)	
			wMel	WNV	Transmissão reduzida	(HUSSAIN, 2013)
			YFV	Carga viral reduzida	(VAN DEN HURK, 2012)	
			ZIKV	Infecção, disseminação e carga viral reduzidas	(ALIOTA, 2016) (DUTRA, 2016)	
<i>Aedes aegypti</i>	Transiente	wAlbB	WNV	Infecção, disseminação carga viral e transmissão reduzidas	(JOUBERT, 2017)	
			DENV	Infecção, disseminação carga viral e transmissão reduzidas	(BIAN, 2010)	
<i>Anopheles gambiae</i>	Transiente	wAlbB	<i>P. berghei</i>	Infecção aumentada	(HUGHES, 2012)	
<i>Anopheles coluzzii</i>	Natural	wAnga	<i>P. falciparum</i>	Correlação negativa entre presença de <i>Wolbachia</i> e <i>Plasmodium</i>	(SHAW, 2016)	

#### **1.9.4.1 Estratégias alternativas de controle envolvendo o uso de *Wolbachia***

As estratégias focadas no uso de *Wolbachia* para o controle de doenças transmitidas por vetores podem ser divididas em duas categorias: 1) estratégias autossustentáveis e 2) estratégias auto-limitantes (BURT, 2014).

##### **1.9.4.1.1 A estratégia auto-limitante**

Nesta estratégia de supressão populacional, mosquitos machos contendo *Wolbachia* são liberados no campo. Denominada “técnica do inseto incompatível (*Incompatible insect technique* - *IIT*, em inglês), esta abordagem faz uso do fenótipo da IC causada pela bactéria (descrita no item 1.9.3) (WERREN *et al.*, 2008), fazendo com que os machos liberados atuem como machos estéreis, de forma semelhante à estratégia *SIT* (descrita no item 1.9.1). Nesta estratégia denominada “liberação inundativa”, há a necessidade constante de se liberar um elevado número de mosquitos machos no campo para que a abordagem tenha sucesso, caso contrário, a população liberada irá decair em frequência e desaparecer ao longo do tempo.

A *IIT*, assim como qualquer outra estratégia, possui pontos positivos e negativos. Como benefício, tem o potencial de ser mais eficaz do que a *SIT*, devido ao fato de que esta abordagem não se baseia na utilização de radiação para esterilizar os machos, um processo que resulta em elevado custo ao *fitness* do hospedeiro (MCGRAW & O’NEILL, 2013). Já em se tratando dos pontos negativos, pode-se citar a necessidade constante de liberação de mosquitos no campo como um processo oneroso e limitante desta estratégia. Ademais, imigração é algo que deve ser sempre levado em consideração nesta abordagem (CURTIS *et al.*, 1982), devido à possibilidade de cruzamentos compatíveis entre machos contendo a bactéria e fêmeas selvagens de outras áreas as quais possuem a mesma cepa de *Wolbachia*.

A liberação acidental de fêmeas contendo *Wolbachia* é algo preocupante na estratégia do *IIT*, visto que isto acabaria por neutralizar o efeito de esterilidade causado pelos machos (HANCOCK, 2012; O’CONNOR *et al.*, 2012). Dados indicam que aproximadamente 1% de fêmeas são acidentalmente liberadas em conjunto com machos infectados devido à ineficiência das estratégias atuais em separar o sexo dos indivíduos utilizados (BALESTRINO *et al.*, 2014), restando ao desenvolvimento de mecanismos genéticos de sexagem como uma estratégia promissora (PAPATHANOS *et al.*, 2009).

Apesar do crescente interesse na estratégia do *IIT* como controle de arboviroses, esta abordagem já vem sendo utilizada em campo há mais de 40 anos, principalmente na agricultura para o controle de pragas, em várias partes do globo (APOSTOLAKI *et al.*, 2011; ZABALOU *et al.*, 2009; ZABALOU *et al.*, 2004). Seu uso iniciou-se na década de 1960, em Burma (Mianmar) e Índia, como forma de controle de *Cx. quinquefasciatus*, vetor da filariose

linfática (LAVEN, 1967), onde os pesquisadores eliminaram a população local deste vetor em apenas 12 semanas de liberação de mosquitos.

Atualmente, a estratégia do *IIT* vem produzindo resultados animadores no controle de *Cx. quinquefasciatus* (ATYAME *et al.*, 2011), *Cx pipiens palles* (CHEN *et al.*, 2013), no continente asiático, além do controle de *Ae.albopictus* nos Estados Unidos ([www.mosquitomate.com](http://www.mosquitomate.com)) e na China ([www.wolbachia.cn](http://www.wolbachia.cn)).

#### **1.9.4.1.2 A estratégia autossustentável**

Nesta abordagem de substituição da população, graças aos efeitos de bloqueio na replicação de patógenos discutidos no item 1.9.4, mosquitos fêmeas contendo a bactéria são liberadas no campo. Devido aos fenótipos de transmissão materna e IC causados por *Wolbachia*, há uma tendência inerente de que a frequência de mosquitos contendo o endossimbionte irá crescer ao longo do tempo, sendo necessária apenas algumas liberações de mosquitos por um período de tempo, no que é conhecido como “liberação inoculativa”. Esta forma de controle está sendo aplicada em várias partes do mundo como parte do programa sem fins lucrativos “Eliminar a Dengue” ([www.eliminatedengue.com](http://www.eliminatedengue.com)), inclusive no Brasil, sobre coordenação da FIOCRUZ.

Interessante citar que algumas abordagens têm sido propostas de forma a se maximizar a eficiência de ambas as estratégias baseadas em *Wolbachia* acima citadas (supressão / substituição da população). A liberação de mosquitos contendo *Wolbachia* e que sejam resistentes a inseticidas químicos como forma de garantir a dispersão da bactéria no ambiente (HOFFMANN & TURELLI, 2013) e a supressão prévia da população de mosquitos de campo, seja via *IIT* ou através da liberação de uma cepa distinta de *Wolbachia*, de forma a reduzir o contingente populacional selvagem e assim facilitar a dispersão da cepa de interesse de *Wolbachia* via liberação de um número menor de indivíduos.

Já se propôs ainda o uso da cepa virulenta *wMelPop*, como forma de reduzir a população de campo antes da liberação da cepa menos agressiva *wMel* na abordagem autossustentável (RITCHIE *et al.*, 2015).

## **2 JUSTIFICATIVA**

Após anos restrita a certas áreas do globo terrestre, causando casos esporádicos em humanos, Zika finalmente se tornou uma doença de grande relevância na saúde pública mundial. As infecções causadas por ZIKV foram acompanhadas por um aumento exacerbado nos casos da debilitante Síndrome de Guillain-Barré, juntamente com distúrbios de

desenvolvimento do feto, como a microcefalia (ARAUJO *et al.*, 2016; OLIVEIRA MELO *et al.*, 2016).

Associados ao aumento no fluxo de viagens, a ausência de imunidade prévia por parte da população, e a ampla distribuição do principal vetor da doença, o mosquito *Ae. aegypti*, Zika se tornou uma doença de proporções globais, afetando principalmente países das Américas (WIKAN & SMITH, 2016).

Apesar do grande esforço global para o rápido desenvolvimento de vacinas contra tal arbovirose (DOWD *et al.*, 2016; LAROCCA *et al.*, 2016), ainda não existe nenhum produto comercialmente disponível para se combater a doença. Ademais, é improvável que apenas a imunização da população será suficiente para erradicar o vírus de vez, como observado para doenças como a febre amarela, a qual continua apresentando risco a países como o Brasil (VASCONCELOS & MONATH, 2016). Portanto, o controle da população de vetores apresenta-se atualmente como a única forma disponível e eficaz ao controle de arboviroses.

Dentre as estratégias atualmente disponíveis, a bactéria endossimbionte *Wolbachia* apresenta-se como uma forma de controle promissora. Estudos anteriores demonstraram a capacidade desta em bloquear de forma eficiente a transmissão de arbovírus como DENV, CHIKV, YFV, WNV, incluindo patógenos *Plasmodium* (JOUBERT & O'NEILL, 2017; MOREIRA *et al.*, 2009; VAN DEN HURK *et al.*, 2012; WALKER *et al.*, 2011b).

Portanto, dado que diversas cepas de *Wolbachia* interferem no desenvolvimento de patógenos, nós hipotetizamos que a cepa wMel de *Wolbachia*, atualmente utilizada como parte alternativa de controle da dengue no Brasil, possa ser capaz de limitar a infecção pelo *flavivirus* ZIKV, e interferir na transmissão desta arbovirose por *Ae. aegypti*, assim como demonstrar-se eficiente em cenários onde o mesmo vetor esteja coinfestado por DENV, o qual *Wolbachia* já se mostrou eficiente em cenários de monoinfecção viral.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Avaliar a capacidade da cepa wMel de *Wolbachia* em reduzir a competência vetorial do *Ae. aegypti* mono e coinfestado por ZIKV e DENV.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Avaliar a capacidade de *Wolbachia* em bloquear a replicação de ZIKV, em cultura de células de *Aedes aegypti* (Aag2).
- Desafiar mosquitos contendo e não contendo *Wolbachia* (transinfecção estável), com dois recentes isolados circulantes de ZIKV no Brasil.

- Expor mosquitos contendo e não contendo *Wolbachia* a cenários de coinfeção envolvendo DENV-1, DENV-3 e ZIKV.
- Testar a capacidade dos mosquitos contendo *Wolbachia* em bloquear a infecção e a disseminação por ZIKV, DENV-1 e DENV-3.
- Realizar ensaios de salivação para detectar a presença de partículas virais na saliva do vetor.
- Testar a infectividade da saliva de *Ae. aegypti* infectados com ZIKV, DENV-1 e DENV-3.
- Checar a densidade de *Wolbachia*, via PCR em tempo real, e a sua relação com a carga viral nos mosquitos contendo a bactéria.
- Verificar, via imunofluorescência, o perfil de infecção de ZIKV, DENV-1 e DENV-3 no intestino de mosquitos contendo ou não *Wolbachia*.
- Avaliar a resposta de determinados genes de imunidade, e a sua relação com a infecção viral em mosquitos contendo *Wolbachia*.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Criação dos mosquitos

Todos os experimentos envolveram duas linhagens de *Ae. aegypti*. A primeira (wMel\_Br) foi gerada através da introdução da cepa wMel de *Wolbachia* no *background* genético dos mosquitos brasileiros através de retrocruzamento (DUTRA *et al.*, 2015). Os experimentos foram realizados 35 gerações após o retrocruzamento inicial. A segunda, (Br), designação criada para indicar mosquitos brasileiros selvagens, (com o *background* genético brasileiro, não infectados por *Wolbachia*) foi uma linhagem F<sub>1</sub> (ou seja, a primeira geração de descendentes da geração parental) selvagem derivada de material coletado de ovitrampas no bairro da Urca, RJ, Brasil no início de 2016. Essa linhagem nunca teve qualquer contato com mosquitos infectados por *Wolbachia*.

Por 25 gerações antes dos experimentos, 200 machos brasileiros F<sub>1</sub>-F<sub>2</sub> para cada 600 fêmeas wMel\_Br foram introduzidos nas gaiolas da colônia de wMel\_Br a cada geração, para prevenir efeitos de endogamia e manter o *background* genético similar entre as duas linhagens. Todos os mosquitos foram mantidos em insetário com condições climáticas controladas como anteriormente descrito (DUTRA *et al.*, 2015).

## 4.2 Isolamento, cultivo de ZIKV / DENV e avaliação de bloqueio *in vitro* de ZIKV por *Wolbachia*

Os vírus dengue utilizados neste trabalho pertencem aos sorotipos DENV-1 e DENV-3 (genomas não sequenciados). Ambos foram isolados em soro humano coletado de pacientes sintomáticos da cidade de Contagem, MG, Sudeste do Brasil. DENV-1 isolado em 2015 (pelo nosso laboratório, sob a responsabilidade da Dr. Marcele Rocha) (DENV1/*H. sapiens*/Brasil/MV09/2015), e DENV-3 em 2013 (cedido pelo Dr. João Marques - UFMG) (DENV3/*H. sapiens*/Brasil/MG20/2013).

Já os genótipos do *Zika virus* aqui utilizados foram isolados em 2015 em soro humano coletado de dois pacientes sintomáticos, o primeiro de Recife, PE, no Nordeste do Brasil (ZIKV/*H. sapiens*/Brasil/BRPE243/2015) (genoma sequenciado - código de acesso: KX197192.1), e o segundo em Sumaré, SP, no Sudeste do país (ZIKV/*H. sapiens*/Brasil/SPH/2015), descrito em 2016 (FARIA *et al.*, 2016). Ambos isolados virais foram gentilmente cedidos pelo Departamento de Virologia e Terapia Experimental (Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães /FIOCRUZ) e pelo Laboratório de Isolamento Viral (Instituto Evandro Chagas), respectivamente.

Estoques virais foram passados em linhagens celulares de *Ae. albopictus* (C6/36) crescidas em meio Leibowitz L-15 suplementado com soro fetal bovino 10% (SFB), 1% penicilina/estreptomicina (Gibco), e mantidos a 28°C, como anteriormente descrito (HAMEL *et al.*, 2015). O sobrenadante fresco das células C6/36 infectadas foi coletado de 5 a 7 dias pós-infecção e usados para infectar via oral os mosquitos, sem ter sido previamente congelado, visto que o processo de congelamento viral reduz efetivamente a taxa de infecção, disseminação e transmissão de ZIKV em *Ae. aegypti*, como recentemente demonstrado (WEGER-LUCARELLI *et al.*, 2016). Os títulos virais (em PFU/mL) de cada vírus utilizado para infecção estão representados na tabela 4.

Células de tecido embrionário de *Aedes aegypti* (*Aag2*) foram previamente transfectadas com a cepa *wMel* de *Wolbachia* (processo realizado na Austrália) (*Aag2\_wMel*). Em seguida, estas foram utilizadas no estudo da capacidade de bloqueio *in vitro* à ZIKV.

A manutenção celular consistiu na utilização de meio de cultura Schneider suplementado com 10% de soro fetal bovino, e armazenamento a 26-28 °C. Estas foram repicadas a cada 4-5 dias. O ensaio de bloqueio foi realizado em placas de cultura de 24 poços, utilizando as linhagens celulares *Aag2*, *Aag2\_wMel*.

Adicionou-se no experimento,  $5 \times 10^5$  células *Aag2* por poço. Após 16-18h, (adicionou-se o isolado viral ZIKV/*H. sapiens*/Brasil/BRPE243/2015 utilizando-se como base, MOI (multiplicidade de infecção – relação entre o número de partículas virais e o número de

células-alvo) de 0,01, em um volume final de 200 uL de meio de cultivo celular. Ao término do processo de adsorção viral (1h de incubação), acrescentou-se 300 uL de meio Schneider suplementado com 10% de SFB. Os sobrenadantes de cultura foram coletados a 0, 1, 3, 5 e 7 dpi e armazenados a -80 °C para posterior realização da quantificação viral pelo método de ensaio de placa. Controle de células constituiu de células *Aag2*, *Aag2\_wMel* acrescidas apenas de meio de cultivo, sem contato com vírus.

**Tabela 4: identificação do vírus e seu respectivo título viral utilizado nos experimentos de infecção de mosquitos**

Isolado viral	1º experimento (infecção)	2º experimento (coinfecção*)	3º experimento (coinfecção)
ZIKV/ <i>H. sapiens</i> /Brasil/BRPE243/2015	$5 \times 10^6$	$3,5 \times 10^8$	$2,5 \times 10^8$
ZIKV/ <i>H. sapiens</i> /Brasil/SPH/2015	$8,7 \times 10^3$	Não utilizado	Não utilizado
DENV1/ <i>H. sapiens</i> /Brasil/MV09/2015	Não utilizado	$3,5 \times 10^7$	$3 \times 10^6$
DENV3/ <i>H. sapiens</i> /Brasil/MG20/2013	Não utilizado	$4,5 \times 10^6$	$2,2 \times 10^7$

\* Este experimento contou apenas com grupos coinfecados, sem que houvesse em paralelo, a presença de grupos infectados por apenas um vírus.

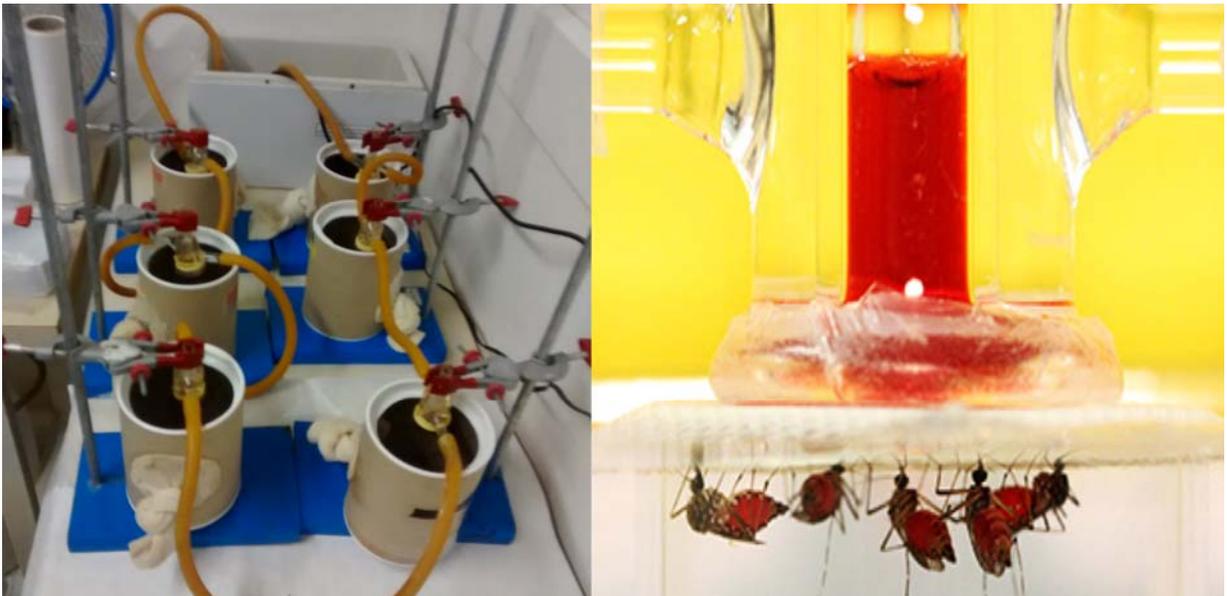
### 4.3 Infecção dos mosquitos com ZIKV e DENV

ZIKV e DENV foram coletados do sobrenadante de cultura de células de mosquito C6/36, e ressuspensos em sangue humano fresco de forma a se obter 2 partes de vírus e 1 parte de sangue humano total não-desfibrinado, quando se tratou apenas da infecção simples (monoinfecção – experimento nº 1), e 1 parte DENV: 1 parte ZIKV: 1 parte sangue humano nos experimentos de coinfecção viral (experimentos nº 2 e 3). Cultivo de células contendo apenas meio de cultura, sem nenhuma partícula viral foram utilizados como controle (intitulados “mock”). Importante ressaltar que apenas no experimento nº 2 (tab. 4), devido a um artefato matemático na titulação/diluição detectado ao fim do experimento, DENV-1 foi adicionado na proporção estimada de 300 partes virais para 1 parte de ZIKV.

Fêmeas adultas com quatro dias de vida foram deixadas sem qualquer fonte alimentar por 24h antes do repasto infectante, e em seguida, foram desafiadas com uma mistura de sangue-vírus por 1h usando alimentadores de vidro envoltos em intestino de porco, como membrana, e mantidos aquecidos a 37°C usando um banho-maria (Fig. 9). Após o repasto infectante, os mosquitos que não se alimentaram foram removidos.

Mosquitos infectados foram mantidos em contenção dupla (gaiolas dentro de gaiolas maiores) no infectório NB-2 (DOU – processo nº: 01200.6193/2001-16) do insetário do grupo de Mosquitos Vetores do CPqRR e tiveram acesso, *ad libitum*, a solução de sacarose a 10%. De 10 a 20 fêmeas foram coletadas a 1, 4, 7, 14 e 21 dpi, de acordo com os grupos descritos abaixo, e armazenadas a -80°C até que fossem processadas para os níveis de expressão gênica (item 4.8), imunofluorescência, (item 4.7), prevalência (nº de mosquitos / tecidos infectados em relação ao total analisado), a intensidade (carga viral presente nos mosquitos), dinâmica de infecção (variação da carga viral ao longo do tempo) e a taxa de transmissão viral (quantificação da carga viral presente na saliva do vetor/ infectividade da saliva).

- |                          |                   |
|--------------------------|-------------------|
| • wMel_Br: Mock          | Br: Mock          |
| • wMel_Br: ZIKV          | Br: ZIKV          |
| • wMel_Br: DENV-1        | Br: DENV-1        |
| • wMel_Br: DENV-3        | Br: DENV-3        |
| • wMel_Br: ZIKV + DENV-1 | Br: ZIKV + DENV-1 |
| • wMel_Br: ZIKV + DENV-3 | Br: ZIKV + DENV-3 |



**Figura 9: repasto sanguíneo artificial de *Ae. aegypti* em alimentador de vidro.:** Fonte: Imagem da esquerda por Marcele Rocha, imagem da direita por Conor McMeniman [<http://tinyurl.com/jhwkfxg> – acessado 22 de janeiro, 2017].

#### 4.4 Coleta de saliva

A saliva de cada mosquito foi coletada individualmente de mosquitos infectados (14 e 21 dpi), de acordo com protocolo previamente descrito, com leves modificações (ANDERSON *et al.* 2010). Resumidamente, um dia antes, mosquitos foram deixados sem qualquer fonte alimentar. No dia de coleta, fêmeas de *Ae. aegypti* foram anestesiadas via CO<sub>2</sub> e mantidas a 4°C enquanto suas patas e asas eram removidas. A probóscide de cada mosquito foi inserida em uma ponteira estéril de 10 µL contendo 5 µL de uma solução 1:1 de SFB estéril e 30% sacarose, permitindo-se que salivassem por 30 minutos (Fig. 10).

Mosquitos foram checados visualmente via realização de qualquer movimento, de forma a indicar que ainda estavam vivos. O conteúdo de cada ponteira foi coletado em tubos de 0,5 mL estéreis, e armazenados a -80°C antes de serem processados. No experimento nº 1, envolvendo apenas ZIKV, um terço das amostras de saliva foram usadas para microinjeção, enquanto que o restante foi usado para quantificação direta de partículas virais.



**Figura 10: ensaio de salivação de fêmeas do *Ae. aegypti*.** Descrição do procedimento encontra-se localizado no item 4.4.

#### **4.5 Confirmação da infectividade da saliva contendo ZIKV e/ou DENV**

Fêmeas de *Ae. aegypti* (F1 de mosquitos de campo) foram injetadas via intratorácica com a saliva coletada de fêmeas wMel\_Br ou Br infectadas com apenas ZIKV, no experimento de monoinfecção (Tab. 4 – experimento 1), e com DENV-3 e ZIKV nos experimentos de coinfeção (Tab. 4 – experimento 2), de forma a determinar se a saliva continha vírus infeccioso. Mosquitos foram injetados utilizando o nanoinjetor manual Nanoinject II (Drummond), como descrito anteriormente (MOREIRA *et al.*, 2009).

Cada amostra de saliva foi usada para inocular entre 4-14 mosquitos, com cada um recebendo de 138-345nL. No experimento de coinfeção, antes de se injetar a saliva, avaliou-se o *status* de infecção do mosquito doador via RT-qPCR, de forma a se correlacionar a detecção específica de determinado vírus na cabeça + tórax de *Ae. aegypti* com o perfil de infecção desenvolvido no mosquito nanoinjetado.

Para evitar contaminação, um capilar novo foi usado para cada saliva. Mosquitos foram coletados 5 dpi, e a presença ou ausência do vírus foi determinada via análise por RT-qPCR de em média 8 mosquitos individuais por grupo, de acordo com o método descrito abaixo. Os mosquitos foram processados inteiros.

#### **4.6 Análise de ZIKV/DENV e *Wolbachia* via qPCR**

Mosquitos adultos inteiros tiveram o corpo cortado em duas partes: cabeça/tórax e abdome, e estes foram homogeneizados e processados independentemente, como

anteriormente descrito (MOREIRA *et al.*, 2009). O RNA foi extraído dos tecidos dos mosquitos usando o kit *High Pure Viral Nucleic Acid* (Roche) seguindo recomendações do fabricante. Quantificou-se o RNA total diretamente de cada amostra individual de saliva, tendo como base o mesmo protocolo, porém utilizando metade do volume recomendado de cada reagente para cada etapa do processo de extração.

As amostras de RNA foram diluídas para 50 ng/μL em água livre de nuclease, e armazenadas a -80°C. Os níveis de ZIKV e / ou DENV nessas amostras foram quantificados via RT-qPCR usando o LightCycler<sup>®</sup> 96 (Roche) e iniciadores / sondas previamente descritos (ZIKV 835; ZIKV911c – ZIKV 860-FAM / DENV1-4) (FRENTIU *et al.*, 2014; LANCIOTTI *et al.*, 2008). A densidade de *Wolbachia* foi quantificada para todas as amostras *wMel\_Br* usando o gene *WD0513*, uma proteína hipotética, constitutivamente expressa e exclusiva da cepa *wMel* de *Wolbachia* (YEAP *et al.*, 2014). As condições de ciclagem foram as seguintes: etapa inicial de transcrição reversa a 50°C por 5 min.; inativação da transcriptase reversa / desnaturação inicial a 95°C por 20 seg, 35 ciclos a 95°C por 3 seg e 60°C por 30 seg. O volume total de reação foi de 10 μL (4x *TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix* (ThermoFisher Scientific), contendo 1 μM de cada par dos iniciadores e sondas, além de 125 ng de RNA molde).

Cada amostra foi testada em duplicada para ZIKV e / ou DENV, além de *Wolbachia*, via gene *WD0513*, e o gene ribossomal S17 (*rps17*) de *Ae. aegypti*, que serviu como controle da reação (MOREIRA *et al.*, 2009). As amostras foram analisadas por quantificação absoluta, via comparação com diluições seriadas de cada produto gênico, clonado e amplificado no plasmídeo pGEMT-Easy (Promega), de acordo com instruções do fabricante. Amostras de controle negativo foram normalizadas entre as placas, e usadas como referência para determinar o limite mínimo de positividade das amostras. Os níveis de ZIKV / DENV e *Wolbachia* foram calculados como número total de cópias por tecido ou por amostra de saliva.

As carcaças de *Ae. aegypti* provenientes do experimento de imunofluorescência (IFA) (descrito abaixo) foram utilizadas para se verificar a correlação entre a densidade de *Wolbachia* e o *status* de infecção dos respectivos intestinos processados via imunohistoquímica. O gene *WD0513* foi analisado em duplicata, e a sua expressão relativa média normalizada obtida através do Q-Gene (SIMON, 2003), utilizando o gene *rps17* do hospedeiro como referência. As condições de ciclagem foram as seguintes: uma etapa inicial de desnaturação a 95°C por 10 min, seguida por amplificação de 45 ciclos a 95°C por 15 seg e 60°C por 30 seg. O volume total de reação foi de 10 μL, composta por 3,34 μL de *FastStart Essential DNA Probes Master Mix* (Roche), 0,3 μL e 0,25 μL do par de iniciadores *rps17* e *WD0513* (10 μM), respectivamente, além de 0,06 μL de sonda *rps17* e 0,15 μL da sonda

WD0513 (10  $\mu$ M), ambas previamente descritas (DUTRA *et al.*, 2016; FRENTIU *et al.*, 2014), além de 3,34  $\mu$ L de água livre de nuclease e 1  $\mu$ L de DNA molde (aproximadamente 100 ng).

## **4.7 Microscopia de fluorescência**

### **4.7.1 Imunofluorescência indireta**

O ensaio de IFA foi realizado em duas etapas, sendo a primeira realizada no insetário do grupo de pesquisas Mosquitos vetores: endossimbiontes e interação patógeno-vetor (MV), no Centro de Pesquisas René Rachou – FIOCRUZ (CPqRR-FIOCRUZ). Nesta, após 7 dias da monoinfecção com distintos isolados virais (como descrito no item 3.3), 10 fêmeas de *Ae. aegypti* das linhagens wMel\_Br (contendo *Wolbachia*) e Br (sem *Wolbachia*) (com exceção do grupo Br – DENV-3, o qual continha menos indivíduos disponíveis, coletando-se então 5) foram anestesiadas com auxílio de CO<sub>2</sub> e mantidas em placa de Petri sobre o gelo durante o processamento. Logo em seguida, estas tiveram o seu intestino dissecado e submerso (individualmente) em 50 $\mu$ L de solução de tampão fosfato-salina (PBS) 1X gelada, em placa de 96 poços (fundo chato).

Após a dissecação de todos os intestinos, englobando todos os grupos do desenho amostral, os tecidos foram fixados em 50 $\mu$ L de solução paraformaldeído (PFA) 4% por 30 min à temperatura ambiente (TA). Em seguida, as amostras foram lavadas em solução de PBS 1X (3 lavagens de 5 min cada) e armazenadas a 4°C para início da imunomarcacão.

As carcaças de cada fêmea da linhagem wMel\_Br foram coletadas e identificadas (individualmente) de forma a se correlacionar o intestino com seu respectivo mosquito de origem, para posterior confirmação, via qPCR, da presença de *Wolbachia*. O DNA das amostras foi extraído via *squash buffer*, como previamente descrito (BATON *et al.*, 2013). A detecção da bactéria e o controle da reação se deram via utilização dos pares de iniciadores e sondas descritos no item 4.6.

Na segunda etapa da IFA, os intestinos pertencentes aos grupos monoinfectados fixados no CPqRR-FIOCRUZ foram transportados para o Laboratório de RNA de interferência, na Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e processados/analísados pela Dr. Tatiane Toledo, no Centro de Aquisição e Processamento de Imagens (CAPI) – ICB/UFMG, tomando como base metodologia previamente descrita (SALAZAR *et al.*, 2007). Brevemente, as amostras foram incubadas por 1 h em solução de bloqueio contendo PBS 1X + albumina do soro bovino (BSA) 1% + detergente Triton X-100 0,1%, sob constante agitação à TA.

Após etapa inicial, as amostras foram incubadas *overnight* com o anticorpo primário 4G2 (ATCC, HB-112), reativo contra a proteína de E do envelope viral de vírus do gênero *flavivirus* (incluindo DENV e ZIKV), diluído 50X em solução de bloqueio, sob agitação e a 4°C. Na manhã seguinte, as amostras foram lavadas em solução de bloqueio (5 vezes de 5 min cada), e incubadas por 1h com anticorpo secundário fluorescente e corantes (descritos abaixo) em suas respectivas diluições, sob agitação à TA. Posteriormente foram realizadas 2 lavagens de 1:30 h com solução de bloqueio seguidas de montagem em lâmina/lamínula com Hydromount (National Diagnostics). As lâminas foram mantidas protegidas de luz a 4°C para análises posteriores análises em microscópio Apotome.2 (Zeiss).

#### **4.7.2 Anticorpos e marcadores fluorescentes**

Os anticorpos secundários utilizados neste trabalho foram os seguintes: anticorpo cabra anti-IgG de camundongo conjugado com Alexa 488 (Molecular Probes) diluído 1:500; marcador de actina, Faloidina-rodamina (Molecular Probes) diluído 1:500 e por fim, marcador nuclear Hoechst 33342 (Trihydrochloride, Trihydrate – Molecular Probes) diluído 1:500.

#### **4.8 Expressão gênica**

O ensaio de expressão gênica foi realizado pelo Dr. Eric Caragata, colaborador do projeto e membro do grupo de pesquisas MV. Um total de 20 fêmeas com aproximadamente 7 dias de vida, pertencentes às linhagens wMel\_Br e Br foram coletadas 1 dia após infecção (1dpi) com os distintos isolados virais (DENV-1 / ZIKV – grupos monoinfectados e coinfectados). Não se utilizou neste experimento, o sorotipo 3 de dengue. Em paralelo, como controle de infecção, coletou-se 5 mosquitos de ambas as linhagens alimentados apenas com sobrenadante de cultivo viral (descrito no item 3.2) sem adição de vírus (grupo mock). Os mosquitos foram armazenados a -80°C.

As extrações de RNA total e a síntese de cDNA foram realizadas de acordo com protocolo previamente descrito (CARAGATA *et al.*, 2016). Brevemente, mosquitos foram homogeneizados em 200 µL de TRIzol (ThermoFisher Scientific) usando um mini beadbeater (Biospect products). As amostras foram quantificadas para os seus níveis de ácidos nucleicos, via NanoDrop 2000 UV – Vis spectrophotometer (ThermoFisher Scientific), e 1 µg de RNA total utilizado na síntese de cDNA seguindo recomendações do fabricante, via uso da enzima M-MLV transcriptase reversa (Promega). Ao término do processo, os cDNAs foram então diluídos (1:10) em água livre de nucleases e armazenados a -20°C.

Cinco genes foram analisados para todas as amostras. Suas identificações, respectivas funções conhecidas e sequência dos iniciadores utilizados (alguns desenhados através do

*software* Primer 3 V0.4.0 [www.bioinfo.ut.ee/primer3-04.0], outros obtidos a partir da literatura) estão descritas na tabela 5. A especificidade e eficiência de cada par de iniciadores foram testadas através da curva de dissociação e diluição seriada do cDNA (90-100% de eficiência obtida na concentração de cDNA utilizada nos experimentos), respectivamente.

Todos os genes foram analisados em duplicata, e a sua expressão relativa média normalizada obtida através do Q-Gene (SIMON, 2003), utilizando o gene *rps17* do hospedeiro como referência. As condições de ciclagem foram as seguintes: uma etapa inicial de desnaturação a 95°C por 5 min, seguida por amplificação de 35 ciclos a 95°C por 15 seg e 60°C por 30 seg. O volume total de reação foi de 10 µL, composta por 5 µL de SYBR Green PCR Master Mix (ThermoFisher Scientific), 0,5 µL de cada par dos iniciadores (10 µM), 2 µL de água livre de nuclease e 125 ng de RNA molde).

**Tabela 5: identificação dos genes utilizados no ensaio de expressão gênica, e suas respectivas funções conhecidas**

<b>ID</b>	<b>Gene</b>	<b>Função conhecida</b>	<b>Sequência dos iniciadores</b>
AAEL003832-RA	Defensina C	Peptídeo antimicrobiano	F - 5'-TTGTTTGCTTCGTTGCTCTTT-3' R - 5'-ATTCCTACACCGAACCCACT-3' (XI; RAMIREZ; DIMOPOULOS, 2008)
AAEL008415-RA	Proteína hipotética	Ligante de ácidos nucleicos	F - 5'-GGGATAGTTGCAACGTGGAG-3' R - 5'-GGGATAGTTGCAACGTGGAG-3'
AAEL009531-RA	Proteína Niemann-Pick tipo C-1b	Transportador intracelular de colesterol	F - 5'-ACACCTTTTGCGAATCCTGCCC-3' R - 5'-CATGGACGTTTCAGATGACCGGC-3'
AAEL011045-RA	Proteína da cutícula de pupa	Componente da cutícula de pupa	F - 5'-GGTGTCGTCCCATTTGGCC-3' R - 5'-CGGCTCTCGACCTGGGATTTTC-3'
AAEL015458-RA	Transferrina	Transporte celular de ferro	F - 5' GTTCCGGTACAACCTGGAGA-3' R - 5' TTCAGCTCGATCAGGGAAGT-3' (KAMBRIS <i>et al.</i> , 2009)

## 4.9 Análises estatísticas

A prevalência de ZIKV e DENV nos tecidos dos mosquitos (incluindo o ensaio de IFA) e amostras de saliva (somente ZIKV) foram comparadas usando o teste exato de Fisher. Os dados de intensidade de infecção e a relação entre densidade de *Wolbachia* e a presença de infecção viral no intestino (IFA) foram comparados utilizando o teste U de Mann-Whitney. O teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para se comparar a razão entre DENV e ZIKV nos tecidos analisados, acompanhado do pós-teste de Dunn nas análises que correlacionaram à densidade de *Wolbachia* e o tipo de infecção viral na IFA. O teste T não pareado foi utilizado na análise *in vitro* do efeito de *Wolbachia* sobre ZIKV. Todas essas análises supracitadas foram realizadas no Prism V6 (Graphpad).

Os dados de densidade de *Wolbachia* foram comparados entre mosquitos wMel\_Br infectados e não infectados para ambos os isolados de ZIKV através da análise multivariada de variância permutacional (PERMANOVA), via a função *adoni()* no Rstudio ([www.Rstudio.com](http://www.Rstudio.com)), através da interface GUSTA ME ([mb3is.megx.net/gustame](http://mb3is.megx.net/gustame)) (BUTTIGIEG & RAMETTE, 2014). A correlação de Spearman foi utilizada para determinar se houve uma correlação entre ZIKV e os níveis de *WD0513* em mosquitos wMel\_Br infectados por ZIKV (Prism V6).

Os níveis de expressão gênica normalizados foram tratados para a identificação e remoção de *outliers* via regressão robusta e remoção de *outliers* (**Robust regression and Outlier removal** – ROUT, do inglês), utilizando o coeficiente Q, responsável por delimitar o quão agressivo será a detecção/remoção de *outliers*, equivalente a 1% (dentro de uma variação disponível de 0,1% - 10%) (MOTULSKY & BROWN, 2006). Em seguida, a intensidade de expressão gênica foi comparada entre os grupos das linhagens wMel\_Br e Br através do teste U de Mann-Whitney também via Prism V6 (Graphpad).

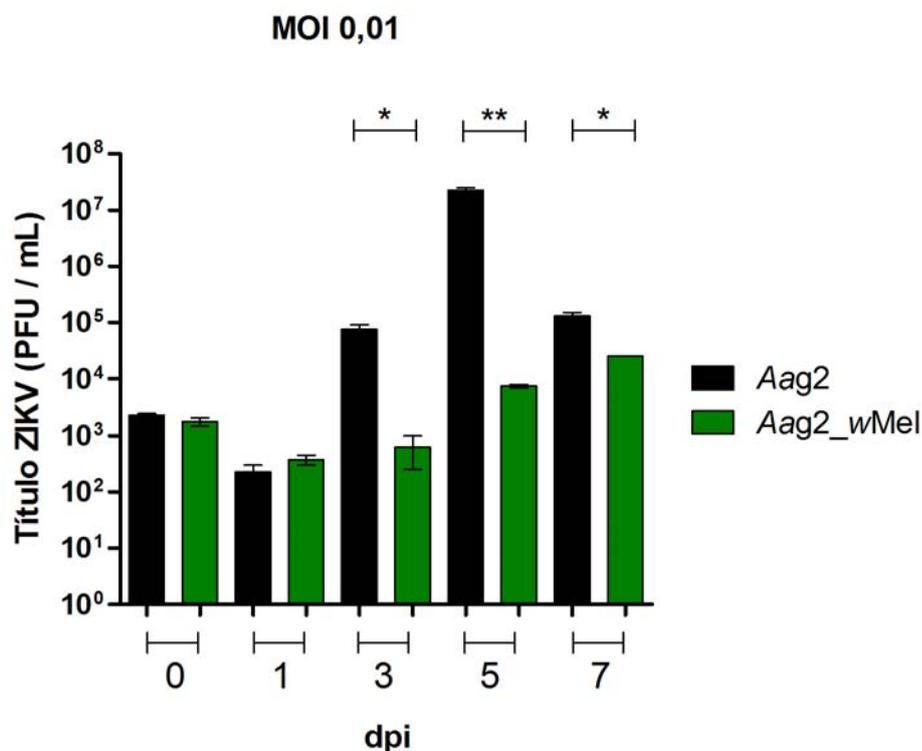
Os efeitos da infecção viral e presença / ausência de *Wolbachia* sob os níveis de expressão dos genes foram considerados utilizando-se modelos lineares de regressão (MLR) via SPSS V17 (IBM). Ademais, no experimento de IFA, quantificou-se a densidade bacteriana da cepa wMel de *Wolbachia* nas carcaças dos mosquitos os quais o intestino foi utilizado para a imunohistoquímica.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Efeito *in vitro* de *Wolbachia* sobre a infecção por ZIKV

Inicialmente, caracterizamos em cultura de células, a capacidade da cepa wMel de *Wolbachia* em bloquear a replicação de ZIKV (Fig. 11). Observou-se neste experimento

*Wolbachia* efetivamente reduziu a carga viral infectiva (teste T não pareado,  $P < 0,05$ ) a 3, 5 e 7 dpi, com exceção de 0 e 1 dpi (teste T não pareado,  $P > 0,05$ ).



**Figura 11: avaliação da dinâmica do fenótipo antiviral da cepa wMel frente a infecção por ZIKV.** Células *Aag2* contendo (*Aag2\_wMel* – barras verticais verdes) ou não (*Aag2* – barras verticais pretas) *Wolbachia* foram infectadas com ZIKV a 0,01 MOI e a dinâmica de infecção acompanhada ao longo de 7 dias. A quantificação do número de unidades formadoras de placa (PFU / mL) foi realizada em duplicata, via ensaio de placa. Barras pretas horizontais representam o intervalo mínimo e máximo observados. Valor de P obtido via Teste T não pareado, \* < 0,05.

## 5.2 Efeito de *Wolbachia* sobre a competência vetorial de *Ae. aegypti* monoinfectados com dois distintos isolados de ZIKV

A respeito da monoinfecção de *Ae. aegypti* com os isolados de ZIKV do Estado de Pernambuco (ZIKV/*H. sapiens*/Brasil/BRPE243/2015) e São Paulo (ZIKV/*H. sapiens*/Brasil/SPH/2015), observamos que a prevalência da infecção por ZIKV foi significativamente reduzida entre os mosquitos infectados por *Wolbachia* (Tabela 6, análise através do teste exato de Fisher,  $p < 0,0001$  a menos que indicado). Para o isolado BRPE (Figura 12A), *Wolbachia* reduziu a prevalência de ZIKV em 35% nos abdomens, apesar de que não houve diferença significativa para este tecido ( $p > 0,05$ ), em 100% na cabeça/tórax a 7 dpi, e em 65% e 90% a 14 dpi, respectivamente. Para o isolado SPH (Figura 12B),

*Wolbachia* reduziu a prevalência em 95% e 67% na cabeça/tórax e abdomens ( $p = 0,0002$ ), respectivamente, a 7 dpi, e em 74% e 68% na cabeça/tórax e abdomens, respectivamente, a 14 dpi.

Da mesma forma, a intensidade da infecção por ZIKV foi muito reduzida nos mosquitos *wMel\_Br* para ambos os tecidos e em ambos os tempos de coleta (teste U de Mann-Whitney,  $p < 0,0001$ ). Adicionalmente, nós observamos que os títulos medianos de ZIKV na cabeça/tórax dos mosquitos Br aumentaram ao longo do tempo para ambos os isolados (teste U de Mann-Whitney; BRPE,  $p < 0,0001$ ; SPH,  $p = 0,0094$ ), enquanto que não houve tal efeito nos mosquitos *wMel\_Br*.

Ao analisarmos a presença de partículas virais na saliva de mosquitos com (*wMel\_Br*) e sem (Br) *Wolbachia*, infectados com o isolado BRPE de ZIKV, de acordo com desenho experimental anteriormente descrito (item 4.4), observamos que a infecção por *Wolbachia* reduziu a prevalência de ZIKV nas amostras individuais de saliva em 55% (Teste exato de Fisher,  $p < 0,0001$ ) e a mediana de cópias de ZIKV em aproximadamente 5 logs (Teste U de Mann-Whitney,  $p < 0,0001$ ) (Fig. 12C).

**Tabela 6: Efeitos de *Wolbachia* na prevalência de ZIKV**

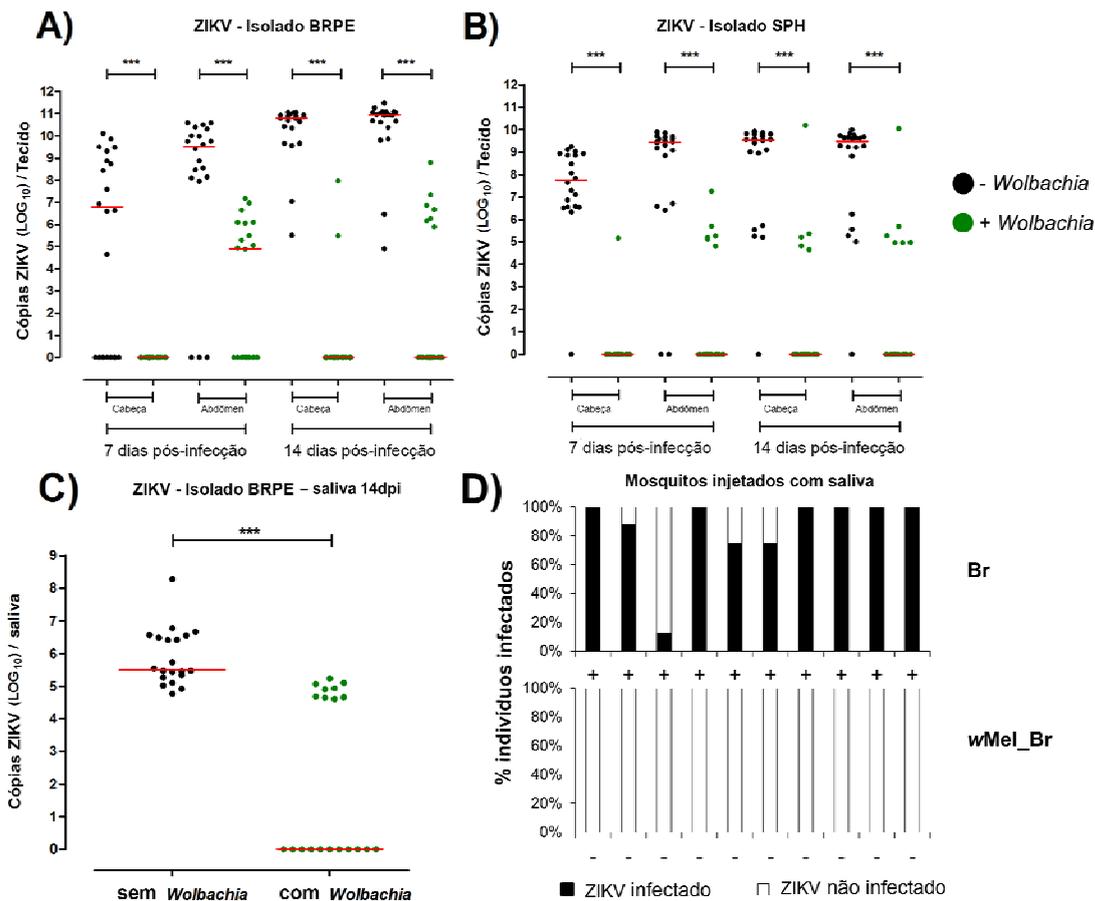
Isolado	Título ZIKV (UFP/mL)	Dias pós-infecção	wMel_Br	Br	wMel_Br	Br	wMel_Br	Br
			Taxa de infecção cabeça/tórax	Taxa de infecção abdome	Taxa de infecção saliva			
BRPE	5.0x10 <sup>6</sup>	7	0	65	55	85	-	-
		14	10	100	35	100	45	100
SPH	8.7x10 <sup>3</sup>	7	5	95	30	90		
		14	25	95	30	95	-	-

*Ae. aegypti* foram infectados oralmente com ZIKV fresco e de baixa passagem. Título viral inicial foi determinado pelo ensaio de formação de placa. Infecção na saliva foi examinada apenas a 14 dpi com o isolado BRPE. Taxas de infecção são dadas como porcentagens.  $N = 20$  por grupo, caso não especificado. ZIKV = Zika vírus. UFP = unidades formadoras de placa. BRPE = ZIKV/*H. sapiens*/Brasil/BRPE243/2015. SPH = ZIKV/*H. sapiens*/Brasil/SPH/2015. wMel\_Br = Infectado por *Wolbachia*. Br = Não infectado por *Wolbachia*

Dado a detecção de ZIKV na saliva de mosquitos de ambas as linhagens, buscamos investigar se as mesmas possuíam partículas infectivas, ou seja, se eram capazes de infectar novos mosquitos quando estes eram nanoinjetados com a saliva (delineamento experimental descrito no item 4.5).

No geral, a taxa de mortalidade entre os mosquitos injetados foi de 11,93%. A presença ou ausência de infecção por ZIKV foi determinada a 5 dpi em oito mosquitos injetados com cada saliva, somando uma média proporcional amostrada de 0,68. Dos 80 mosquitos injetados com saliva Br, 68 (85%) se tornaram infectados com ZIKV, com todas as amostras de saliva Br produzindo pelo menos um mosquito infectado. Em contraste, nenhum dos 80 mosquitos injetados com a saliva de *wMel\_Br* se tornou infectado (teste exato de Fisher,  $p < 0,0001$ ; razão probabilística 882,3 95% IC, 51,3-15187) (Fig. 12D).

Por fim, de forma a determinar se havia uma relação entre a densidade de *Wolbachia* e a prevalência e intensidade de ZIKV, nós medimos os níveis totais do RNA de *Wolbachia* nos mosquitos *wMel\_Br* utilizados nos ensaios de infecção com ZIKV, usando o ensaio de qRT-PCR descrita anteriormente (item 4.6). Observamos que a infecção por ZIKV explicou menos que 5% da variação na densidade de *Wolbachia* que foi observada entre mosquitos *wMel\_Br* infectados e não infectados por ZIKV a ambos 7 dpi ou 14 dpi e não foi um preditor significativo (PERMANOVA;  $p > 0,05$ ). Além do mais, nós não observamos relação entre a densidade de *Wolbachia* e a carga viral de ZIKV entre os mosquitos *wMel\_Br* que se tornaram infectados com o vírus (correlação de Spearman; cabeça/tórax,  $r = 0,5952$ ,  $p = 0,1323$ ; Abdomens,  $r = -0,01891$ ,  $p = 0,9210$ ).



**Figura 12: Infecção por *Wolbachia* restringe a infecção por ZIKV em mosquitos *Ae. aegypti*.** Mosquitos infectados por *Wolbachia* (círculos verdes) e não infectados (círculos pretos) foram desafiados via oral com os isolados de ZIKV (A) BRPE, ou (B) o SPH. Infecção por *Wolbachia* reduziu tanto a prevalência quanto a intensidade de infecção por ZIKV na cabeça/tórax e abdomens dos mosquitos a 7 e 14 dias pós-infecção. Saliva foi então coletada dos mosquitos infectados com o isolado BRPE de ZIKV, a 14 dpi (C), e nós observamos que a saliva dos mosquitos infectados por *Wolbachia* teve uma queda significativa na taxa de infecção salivar, e na carga viral mediana. (D) quando essas amostras de saliva foram injetadas em mosquitos Br não infectados com ZIKV, todas as amostras de saliva de BR continham vírus infeccioso, enquanto que nenhuma saliva de wMel\_Br produziu uma infecção subsequente (Colunas: preta = porcentagem infectado, branca = porcentagem não infectado; + = saliva continha vírus infeccioso, - = saliva não continha vírus infeccioso). Número absoluto de cópias de ZIKV foram quantificados via RT-qPCR. Nos painéis A-C, cada círculo representa tecido ou saliva de uma fêmea adulta ( $N = 20$  por grupo). Linhas vermelhas indicam a mediana de cópias de ZIKV. \*\*\* =  $P < 0,0001$ , análise pelo teste U de Mann-Whitney. No painel D, cada coluna representa mosquitos injetados com uma amostra de saliva.

### 5.3 Efeito de *Wolbachia* sobre a competência vetorial de *Ae. aegypti* coinfectedos com DENV e ZIKV

No presente trabalho, dado a correlação negativa observada entre a presença de *wMel* e ZIKV, nós então buscamos testar a capacidade desta mesma cepa de *Wolbachia* em reduzir a competência vetorial do *Ae. aegypti* mono e coinfectedos por dois distintos membros da família *flaviviridae*: ZIKV e DENV (ver item 4.2 para detalhes na obtenção de tais linhagens).

Mosquitos foram infectados artificialmente, via oral, com ZIKV / DENV-1 / DENV-3, (ver item 4.3 para detalhes sobre a infecção dos mosquitos) em dois experimentos independentes. Os dados de prevalência, intensidade, disseminação, potencial infectivo, dinâmica de infecção, IFA e expressão gênica foram analisados. Os resultados estão apresentados abaixo, agrupados de acordo com o sorotipo de DENV em estudo, de forma a se facilitar a leitura.

#### 5.3.1 Coinfecção ZIKV + DENV-1

O primeiro cenário de coinfeção envolveu DENV-1 ( $3,5 \times 10^7$  PFU/mL) e ZIKV ( $3,5 \times 10^8$  PFU/mL – Tab. 4). A prevalência de infecção por ambos arbovírus está representada para os abdomens (Fig. 13A), (responsável por indicar a taxa de infecção), onde houve uma baixa proporção de mosquitos de ambas linhagens infectados apenas com ZIKV. Já na cabeça + tórax (Fig. 13B) (responsável por indicar a taxa de disseminação), não houve em nenhuma das linhagens estudadas, a detecção isolada de ZIKV.

Em todos os intervalos de tempo analisados para ZIKV, *Wolbachia* reduziu a prevalência de infecção em no mínimo 50%. Paralelamente, em DENV-1, com exceção de 14 dpi (abdome) e 21 dpi, onde os valores de redução ficaram abaixo de 50%, o resultado obtido foi semelhante ao observado para ZIKV (Tab. 7).

**Tabela 7: porcentagem de redução na prevalência de infecção por DENV-1 e ZIKV causada pela presença de *Wolbachia* nos tecidos das linhagens *wMel\_Br* e *Br***

	4 dpi		7 dpi		14 dpi		21 dpi	
	Abd	Cab	Abd	Cab	Abd	Cab	Abd	Cab
<b>ZIKV</b>	91,6	ND	93,3	100	50	100	61,7	90,4
<b>DENV-1</b>	47,4	100	55,5	94,4	35,7	75	42,1	44,6

ND = efeito não observado devido à ausência de infecção em ambas linhagens: *wMel\_Br* e *Br*. Abd = abdome; Cab = cabeça + tórax; dpi = dias pós-infecção.

Ademais, analisou-se também a prevalência de coinfeção viral nas linhagens *wMel\_Br* e *Br* (Tab. 8), assim como a infecção tecidual predominante a cada intervalo de

tempo (Fig. 13C). Nestes dados, observou-se que no grupo contendo a bactéria, todos os intervalos de tempo apresentaram porcentagens de mosquitos simultaneamente coinfetados por DENV-1 e ZIKV iguais (4 dpi – cabeça) ou inferiores (demais intervalos) à linhagem sem a bactéria, com exceção do abdome a 14 dpi. A porcentagem de coinfeção nos diferentes tempos de coleta variou de 5 a 24% nos abdomens e de 0 a 5% para a cabeça + tórax em *wMel\_Br*. Em contrapartida, no grupo sem *Wolbachia* (Br) essa porcentagem variou de 35 a 83% nos abdomens e 0 a 55% na cabeça + tórax (Tab. 8).

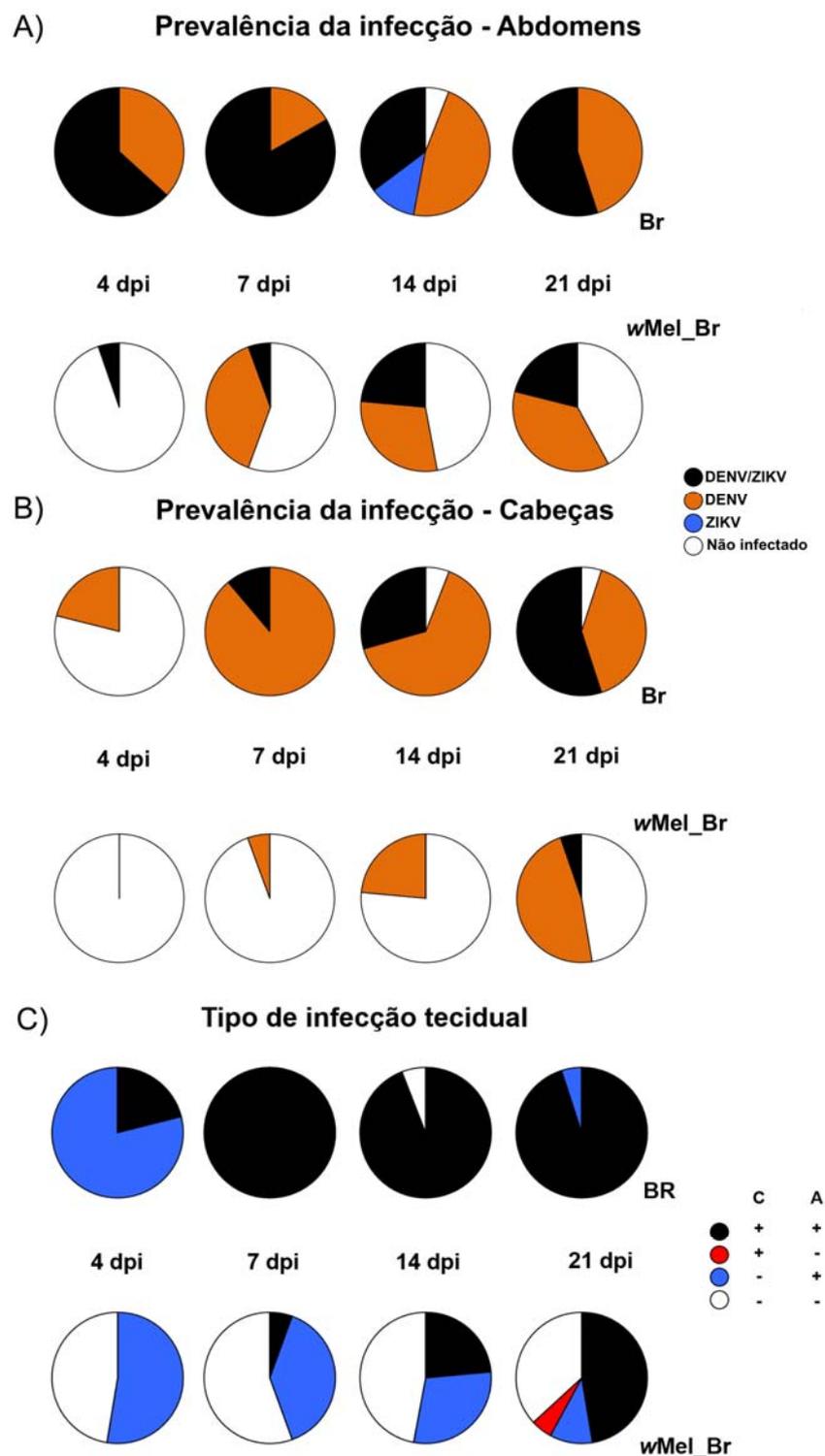
Na linhagem Br, com exceção de 4 dpi, todos os demais tempos de coleta registraram valores acima de 90% para a ocorrência de infecção por pelo menos um dos *flavivirus*, tanto na cabeça + tórax quanto no abdome. Já em *wMel\_Br* o cenário foi o oposto, com 36 a 56% dos indivíduos, ao longo de diferentes intervalos de tempo, negativos para a infecção viral no abdome e cabeça + tórax (Fig. 13C).

Analisando-se o efeito de *Wolbachia* sobre a prevalência de infecção nos diferentes tecidos, observou-se que com exceção da cabeça + tórax a 4 dpi (Teste exato de Fisher,  $P = 0,1050$ ), todos os tecidos, nos diferentes intervalos de tempo, apresentaram uma proporção de indivíduos infectados por DENV-1 e / ou ZIKV, inferior na linhagem *wMel\_Br* em comparação a Br (Teste exato de Fisher,  $P \leq 0,05$ ).

**Tabela 8: porcentagem de coinfeção por DENV-1 e ZIKV nos tecidos das linhagens *wMel\_Br* e Br**

	4 dpi		7 dpi		14 dpi		21 dpi	
	Abd	Cab	Abd	Cab	Abd	Cab	Abd	Cab
<b><i>wMel_Br</i></b>	5	0	6	0	24	0	21	5
<b>Br</b>	63	0	83	11	35	29	55	55

Abd = abdome; Cab = cabeça + tórax; dpi = dias pós-infecção.

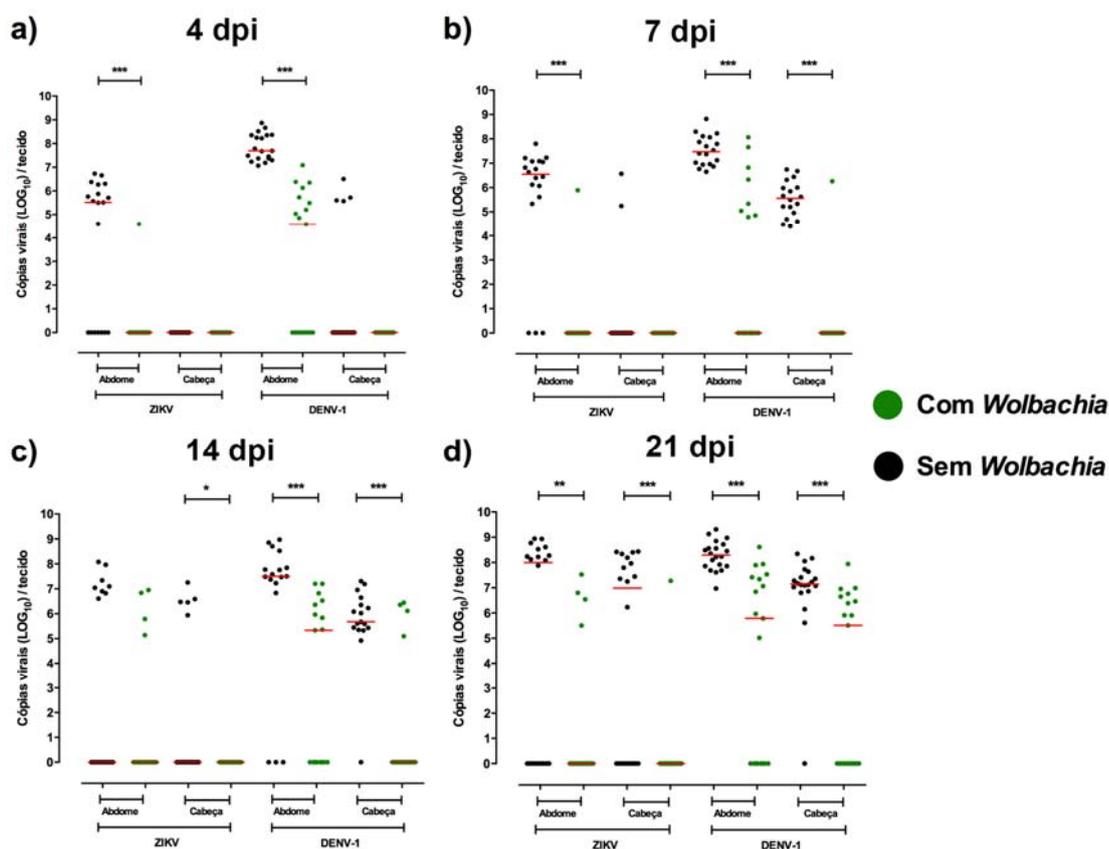


**Figura 13: prevalência da infecção por ZIKV e DENV-1 nos tecidos das linhagens *wMel\_Br* e *Br* de *Ae. aegypti*.** Gráficos de pizza representando a prevalência de infecção nos abdomens (A), cabeça + tórax (B), assim como a proporção de infecção tecidual (C) de *Ae. aegypti* da linhagem *wMel\_Br* (com *Wolbachia*) e *Br* (sem *Wolbachia*). Sinal negativo “-” representa ausência de infecção viral e sinal “+” representa presença. C: cabeça + tórax; A: abdome.

Assim como observado para a prevalência, viu-se que, com exceção de 14 dpi (Mann-Whitney;  $P = 0,0699$ ) para Zika (Fig. 14C), a intensidade de infecção por ZIKV e DENV-1 foram reduzidas no abdome de mosquitos *wMel\_Br* em todos os intervalos de tempo analisados (Mann-Whitney;  $P < 0,01$ ) (Fig. 14A-D).

Com relação à intensidade da disseminação da infecção, representada pela detecção dos vírus na cabeça + tórax dos mosquitos, a qual acontece em torno de 7 dpi para *flavivirus* (CHAN & JOHANSSON, 2012), houve também uma redução significativa no número de cópias virais detectadas em *wMel\_Br*, em comparação à mosquitos da linhagem Br, à medida em que a infecção progrediu (de 4 a 21 dpi) (Fig. 14A-D) para ambos os vírus estudados (Mann-Whitney;  $P < 0,05$ ).

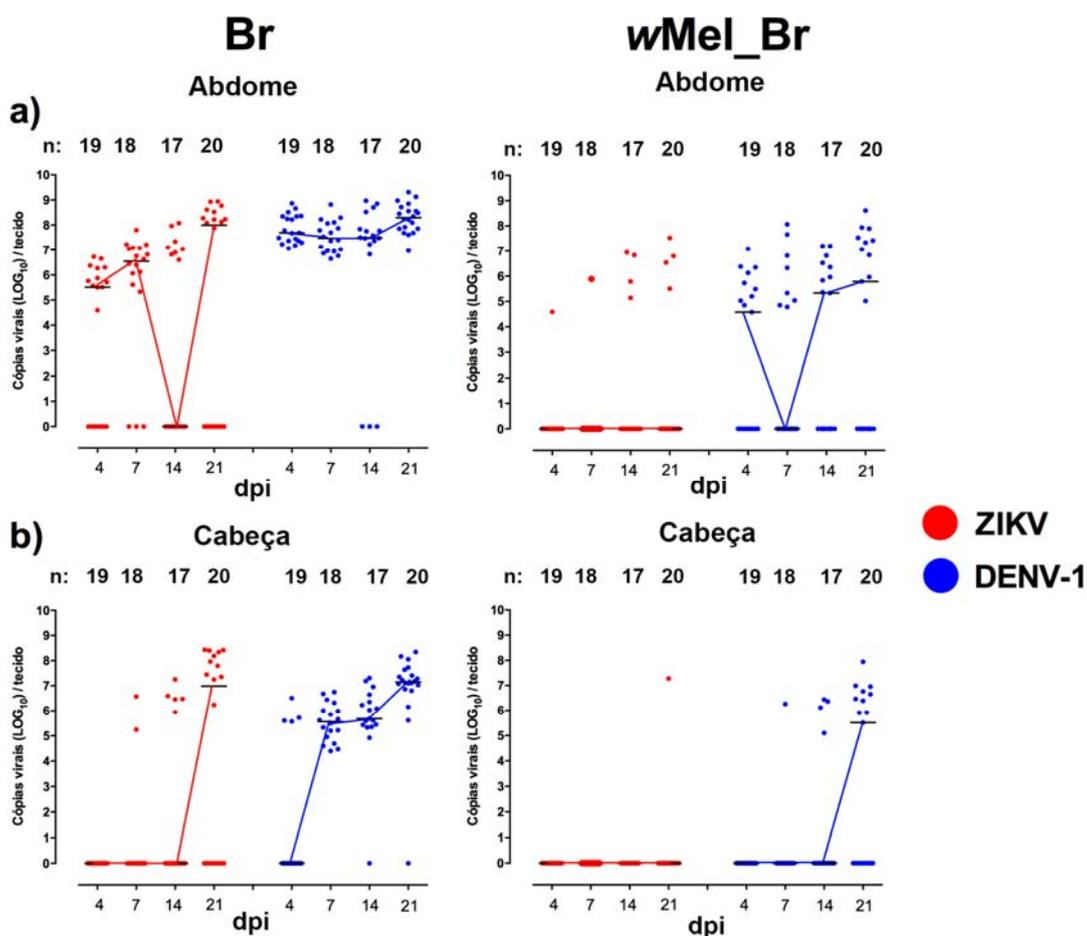
De forma crítica, a mediana de cópias virais na cabeça + tórax, fator importante ao se analisar o potencial de transmissão da doença em campo, permaneceu zerada em ZIKV ao longo de 21 dias para *wMel\_Br*, já para DENV-1 este valor elevou-se apenas a 21 dpi em mosquitos com a bactéria, permanecendo seu valor 42 vezes menor em comparação ao grupo de mosquitos sem *Wolbachia* (Br) (Mann-Whitney;  $P < 0,0001$ ) (Fig. 14D).



**Figura 14: *Wolbachia* restringe a infecção e disseminação de ZIKV e DENV-1 em mosquitos *Ae. aegypti* no período analisado de 4 a 21 dpi (A-D).** Mosquitos contendo (wMel\_Br - círculos verdes) ou não (Br - círculos pretos) *Wolbachia* foram infectados via oral com ZIKV e DENV-1. A quantificação absoluta do número de cópias virais (expresso como logaritmo do número de cópias virais por tecido) foi realizada via qRT-PCR. Cada grupo representado é composto pelo respectivo tecido de 19 fêmeas individuais. Linhas vermelhas horizontais representam a mediana de cópias virais. Valor de P obtido via Teste U de Mann-Whitney, \* < 0,05; \*\* < 0,01, \*\*\* < 0,001.

Ao longo de 21 dias, os abdomens de *Ae. aegypti* Br apresentaram um aumento na mediana de cópias virais de ZIKV (variação da mediana = 323 mil -  $9,88 \times 10^7$  cópias do genoma viral de ZIKV / tecido), com exceção do ponto de coleta 14 dpi, de forma que este valor permaneceu constantemente baixo para os mosquitos wMel\_Br (Fig. 15A). Já na cabeça + tórax dos mosquitos sem *Wolbachia*, houve um aumento gradual na proporção de fêmeas com infecção disseminada, onde a mediana do número de cópias virais aumentou apenas a 21 dpi (mediana =  $9,7 \times 10^6$  cópias do genoma viral de ZIKV / tecido), valor este que permaneceu baixo em wMel\_Br em todos os intervalos de tempo considerados (Fig. 15B).

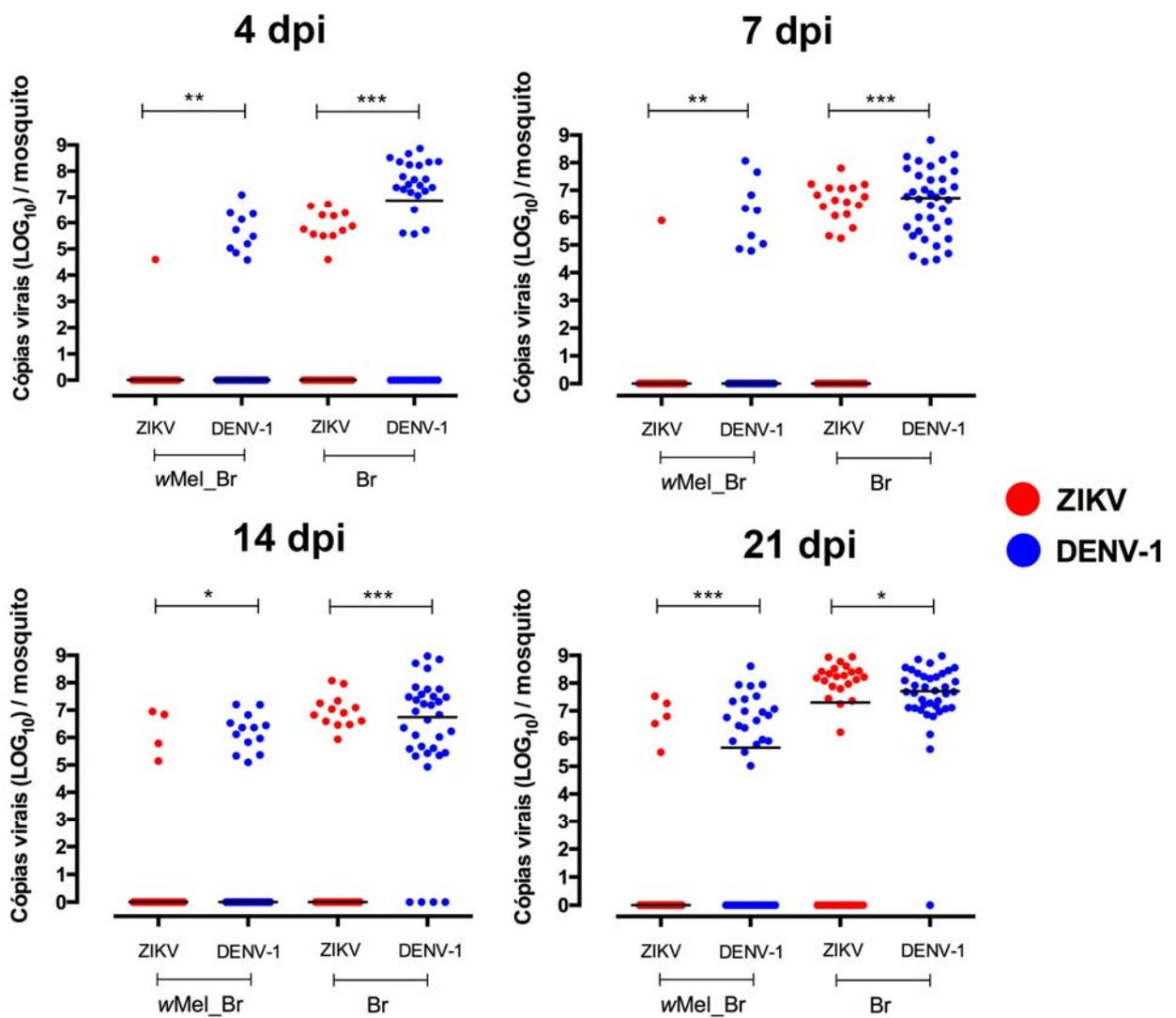
Para DENV-1, também ao se analisar a dinâmica do número mediano de cópias virais, nota-se que os valores aumentaram nos abdomens dos mosquitos Br ao longo de 21 dpi (variação da mediana =  $4,95 \times 10^7$  -  $1,98 \times 10^8$  cópias do genoma viral de DENV / tecido). Em contrapartida, em *wMel\_Br* a variação mediana foi de 536 mil -  $2,63 \times 10^7$  cópias do genoma viral de DENV / tecido, no mesmo intervalo de tempo (Fig. 15A). A cabeça + tórax foi o tecido que apresentou maior diferença na dinâmica viral entre os dois grupos analisados. Houve um aumento gradual de cópias do genoma viral de DENV-1 nos mosquitos sem *Wolbachia* (variação da mediana = 0 -  $1,4 \times 10^7$  cópias do genoma viral de DENV / tecido), valor mediano este que foi de apenas 326 mil cópias virais a 21 dpi para *Ae. aegypti* com a bactéria (Fig. 15B).



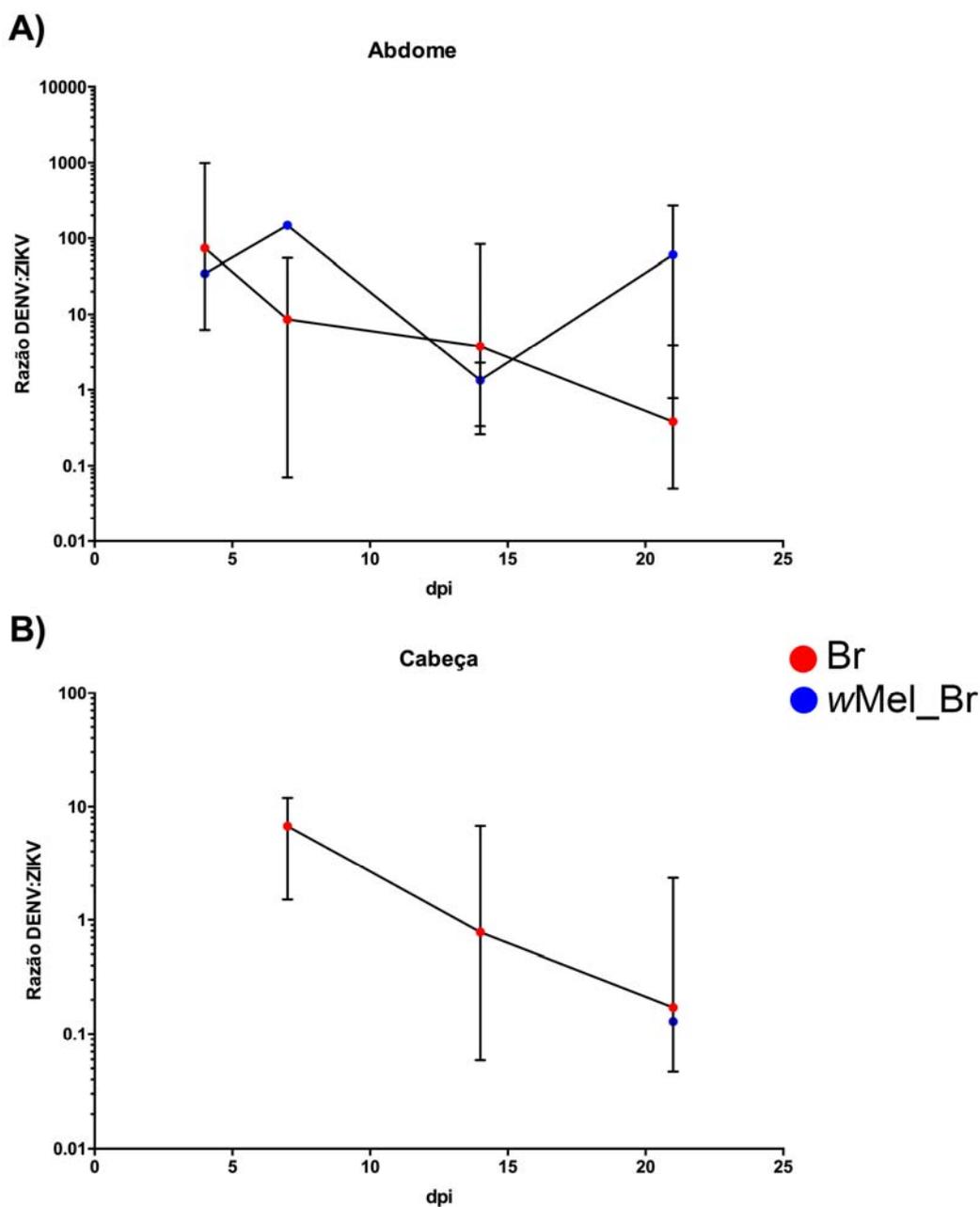
**Figura 15: dinâmica de infecção por DENV-1 e ZIKV em *Ae. aegypti* com (*wMel\_Br*) e sem (Br) *Wolbachia* no período analisado de 4 a 21 dpi.** Mosquitos contendo (*wMel\_Br*) ou não (Br) *Wolbachia* foram infectados via oral com ZIKV (círculos vermelhos) e DENV-1 (círculos azuis). A quantificação absoluta do número de cópias virais (expresso como logaritmo do número de cópias virais por tecido; A = Abdome, B = cabeça + tórax) foi realizada via qRT-PCR. Tamanho amostral (n) representado em cima de cada grupo. Linhas pretas horizontais representam a mediana de cópias virais.

No cenário de coinfeção viral, ao se considerar o mosquito inteiro, em ambos os grupos estudados (*wMel\_Br* e *Br*), nota-se que a mediana de cópias virais, assim como a proporção de mosquitos infectados por ZIKV, foi menor do que o observado para DENV-1 em todos os intervalos de tempo considerados (Mann-Whitney;  $P < 0,05$ ). Ademais, em todos os cenários, a carga viral em *wMel\_Br* foi menor do que a observada para o grupo *Br* (Mann-Whitney;  $P < 0,0001$ ) (Fig. 16).

Ao analisarmos a razão entre as cargas virais de DENV-1 e ZIKV em diferentes intervalos, percebe-se que à medida em que o tempo avança, há uma diminuição na proporção do número de cópias virais entre estes dois vírus na linhagem de mosquitos *Br*, tanto no abdome (Kruskal-Wallis;  $P < 0,0001$ ), quanto na cabeça + tórax (Kruskal-Wallis;  $P < 0,0001$ ), padrão este que não está presente nas fêmeas contendo *Wolbachia*. Na cabeça + tórax das fêmeas da linhagem *wMel\_Br*, a alta prevalência de indivíduos não infectados dificultou a análise (Fig.17).



**Figura 16: quantificação de ZIKV e DENV-1 em cenários de coinfeção em *Ae. aegypti* com (*wMel\_Br*) e sem (*Br*) *Wolbachia* no período analisado de 4 a 21 dpi.** Mosquitos contendo (*wMel\_Br*) ou não (*Br*) *Wolbachia* foram infectados via oral com ZIKV (círculos vermelhos) e DENV-1 (círculos azuis). A quantificação absoluta do número mediano de cópias virais (expresso como logaritmo do número de cópias virais por mosquito) foi realizada via qRT-PCR. Cada grupo representado é composto pela junção de dados do abdome e a cabeça + tórax. O tamanho amostral de cada grupo foi de 38, 36 e 34 tecidos a 4, 7 e 14 dpi, respectivamente. A 21 dpi, foram analisados 38 tecidos no grupo *wMel\_Br* e 20 no *Br*. Linhas pretas horizontais representam a mediana de cópias virais. Valor de P obtido via Teste U de Mann-Whitney, \* < 0,05; \*\* < 0,01, \*\*\* < 0,001.



**Figura 17: razão entre o número de cópias virais de DENV-1 e ZIKV em cenários de coinfeção em *Ae. aegypti* com (wMel\_Br) e sem (Br) *Wolbachia* no período analisado de 4 a 21 dpi.** Mosquitos contendo (wMel\_Br) ou não (Br) *Wolbachia* foram infectados via oral com ZIKV e DENV-1. A relação entre DENV-1 e ZIKV foi obtida a partir da quantificação absoluta do número de cópias virais realizada via qRT-PCR. \*,  $P < 0,05$ ; análises feitas via teste de Kruskal-Wallis.

### 5.3.2 Coinfecção ZIKV + DENV-3

O segundo cenário de coinfecção envolveu DENV-3 ( $4,5 \times 10^6$  PFU/mL) e ZIKV ( $3,5 \times 10^8$  PFU/mL) (Tab. 4). Assim como demonstrado para o sorotipo 1 de dengue (item 5.1.1), a prevalência da infecção de DENV-3 e ZIKV está representada para os abdomens (Fig. 18A) e cabeça + tórax (Fig. 18B). No primeiro tecido, ao se avaliar os mosquitos sem *Wolbachia*, a prevalência de fêmeas monoinfectadas por ZIKV ao longo do tempo variou de 7 a 13% (valor maior que o observado para DENV-1 e ZIKV, de forma que neste cenário de coinfecção, ZIKV só não foi identificado de forma isolada a 21 dpi).

Em contrapartida, ao se analisar os abdomens da linhagem *wMel\_Br*, percebe-se uma alta prevalência de indivíduos não infectados em todos os pontos de coleta (4 - 21 dpi). Esse resultado foi semelhante ao observado para a mesma linhagem na coinfecção envolvendo DENV-1 e ZIKV, entretanto aqui, para DENV-3 e ZIKV, a redução foi ainda maior (prevalência de indivíduos não infectados = 78-100% para DENV-3 / ZIKV, contra 42-95% para DENV-1 / ZIKV). A presença de *Wolbachia* foi responsável por reduzir a prevalência de infecção em todos os intervalos de tempo analisados (Tab. 9).

**Tabela 9: porcentagem de redução na prevalência de infecção por DENV-3 e ZIKV causada pela presença de *Wolbachia* nos tecidos das linhagens *wMel\_Br* e Br**

	4 dpi		7 dpi		14 dpi		21 dpi	
	Abd	Cab	Abd	Cab	Abd	Cab	Abd	Cab
<b>ZIKV</b>	85,19	ND	100	100	86,11	85	82,50	88,33
<b>DENV-3</b>	86,32	100	100	100	85,91	100	90	86

ND = efeito não observado devido à ausência de infecção em ambas linhagens, *wMel\_Br* e Br. Abd = abdome; Cab = cabeça + tórax; dpi = dias pós-infecção.

Por fim, verificou-se a ocorrência de infecção simultânea por DENV-3 e ZIKV nos tecidos de *Ae. aegypti* das linhagens *wMel\_Br* e Br (Tab. 10), assim como o tipo de infecção tecidual predominante a cada intervalo de tempo (Fig. 18C). Em todos os intervalos de tempo analisados, a linhagem *wMel\_Br* apresentou porcentagens de mosquitos coinfectados inferiores ao observado para a linhagem Br (com exceção da cabeça a 4 dpi, onde não houve, como esperado, infecção em ambos os grupos).

A porcentagem de coinfecção nos diferentes tempos de coleta variou de 0 a 11% nos abdomens e de 0 a 5% para a cabeça + tórax em *wMel\_Br* (de forma similar à observada para DENV-1 e ZIKV). Entretanto, no grupo sem *Wolbachia* (Br) essa porcentagem variou de 63 a 86% nos abdomens e 0 a 64% na cabeça + tórax (Tab. 10).

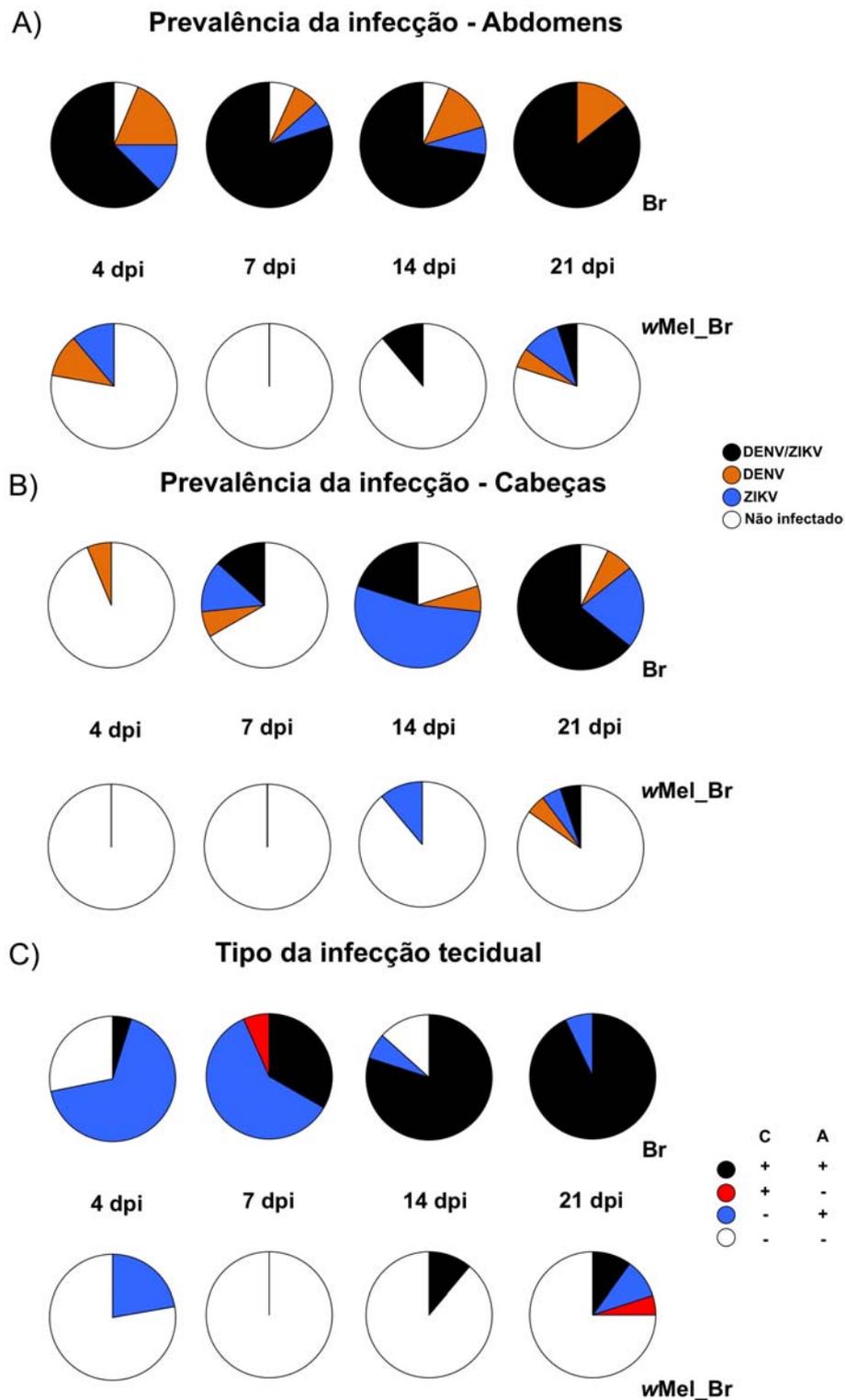
Ao se verificar a prevalência de infecção por DENV-3 e / ou ZIKV no abdome e na cabeça + tórax da linhagem Br, em todos os tempos de coleta, percebe-se que os valores de coinfeção viral observados variaram de 5 a 93% (Fig. 18C). Na linhagem wMel\_Br o cenário se manteve baixo, onde de 4 a 21 dias de coleta houve uma prevalência de infecção simultânea no abdome e na cabeça + tórax de *Ae. aegypti* por DENV-3 e / ou ZIKV de no máximo 11% (Fig. 18C).

Por fim, com exceção da cabeça + tórax a 4 dpi (Teste exato de Fisher,  $P > 0,05$ ), todos os tecidos, nos diferentes intervalos de tempo, apresentaram uma proporção de indivíduos infectados por DENV-3 e / ou ZIKV, inferior na linhagem wMel\_Br em comparação a Br (Teste exato de Fisher,  $P < 0,05$ ).

**Tabela 10: porcentagem de coinfeção por DENV-3 e ZIKV nos tecidos das linhagens wMel\_Br e Br**

	4 dpi		7 dpi		14 dpi		21 dpi	
	Abd	Cab	Abd	Cab	Abd	Cab	Abd	Cab
wMel_Br	0	0	0	0	11	0	5	5
Br	63	0	80	13	72	20	86	64

Abd = abdome; Cab = cabeça + tórax; dpi = dias pós-infecção.



**Figura 18: prevalência da infecção por ZIKV e DENV-3 nos tecidos das linhagens *wMel\_Br* e *Br* de *Ae. aegypti*.** Gráficos de pizza representando a prevalência de infecção nos abdomens (A), cabeça + tórax (B), assim como a proporção de infecção tecidual (C) de *Ae. aegypti* da linhagem *wMel\_Br* (com *Wolbachia*) e *Br* (sem *Wolbachia*). Sinal negativo “-” representa ausência de infecção viral e sinal “+” representa presença. C: cabeça + tórax; A: abdome.

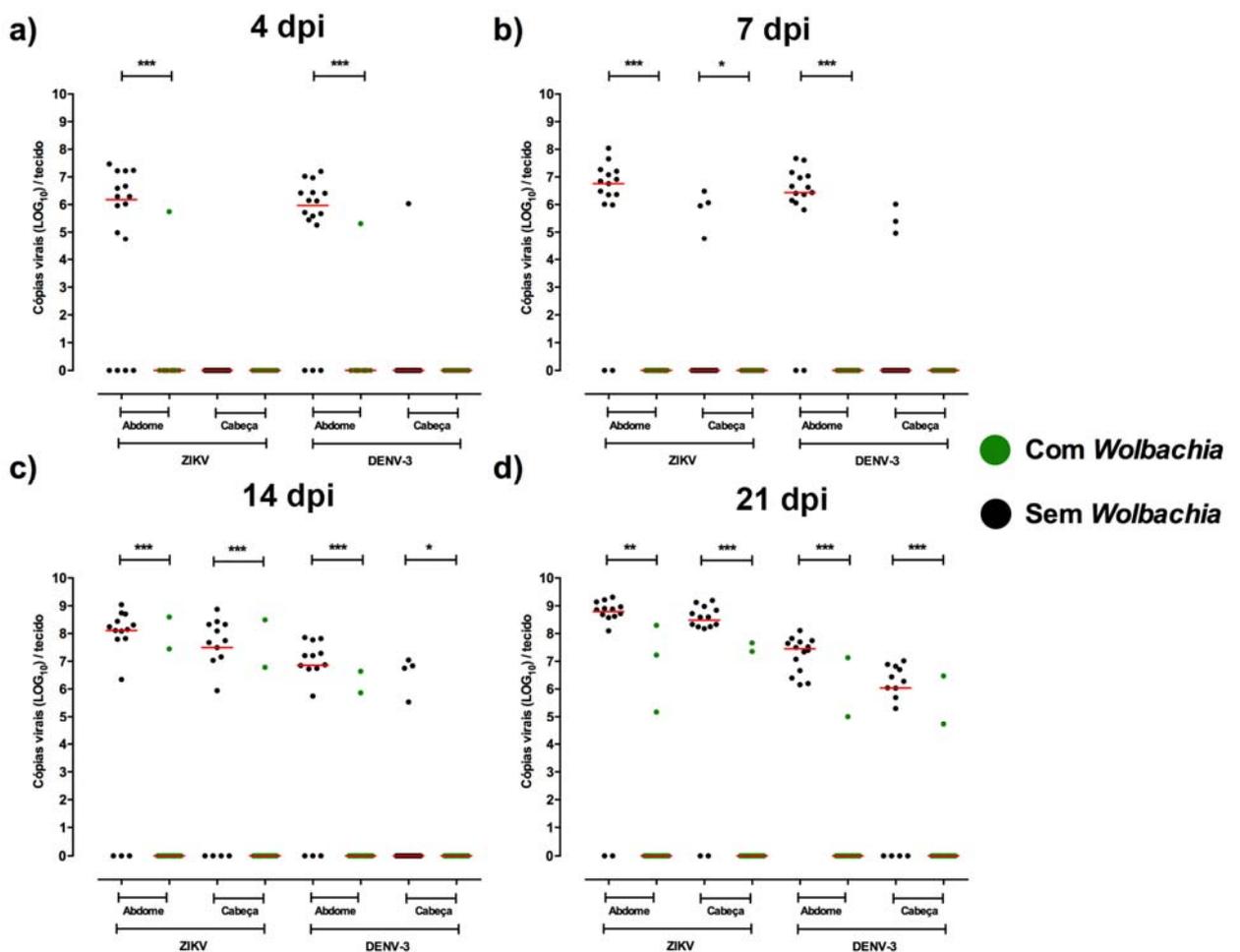
A capacidade de *Wolbachia* em interferir na replicação viral, demonstrada via análise da intensidade de infecção para DENV-1 e ZIKV, também é evidente ao considerarmos a coinfeção DENV-3 e ZIKV. Em todos os intervalos de tempo analisados (Fig. 19A-D), a intensidade de infecção foi significativamente menor na linhagem *wMel\_Br* em comparação à linhagem sem a bactéria (Br) tanto para DENV-3 quanto para ZIKV (Mann-Whitney;  $P < 0,001$ ).

Em se tratando da infecção na cabeça + tórax de *Ae. aegypti* de ambas as linhagens estudadas, observa-se que para ZIKV, *wMel\_Br* apresentou um valor mediano de infecção menor que o detectado para a linhagem Br a 7, 14 e 21 dpi (Mann-Whitney;  $P < 0,001$ ) (Fig. 19B-D). Já para DENV-3, a diferença começou a ser observada a 14 dpi, estendendo-se para 21 dpi (Mann-Whitney;  $P < 0,001$ ) (Fig. 19C-D).

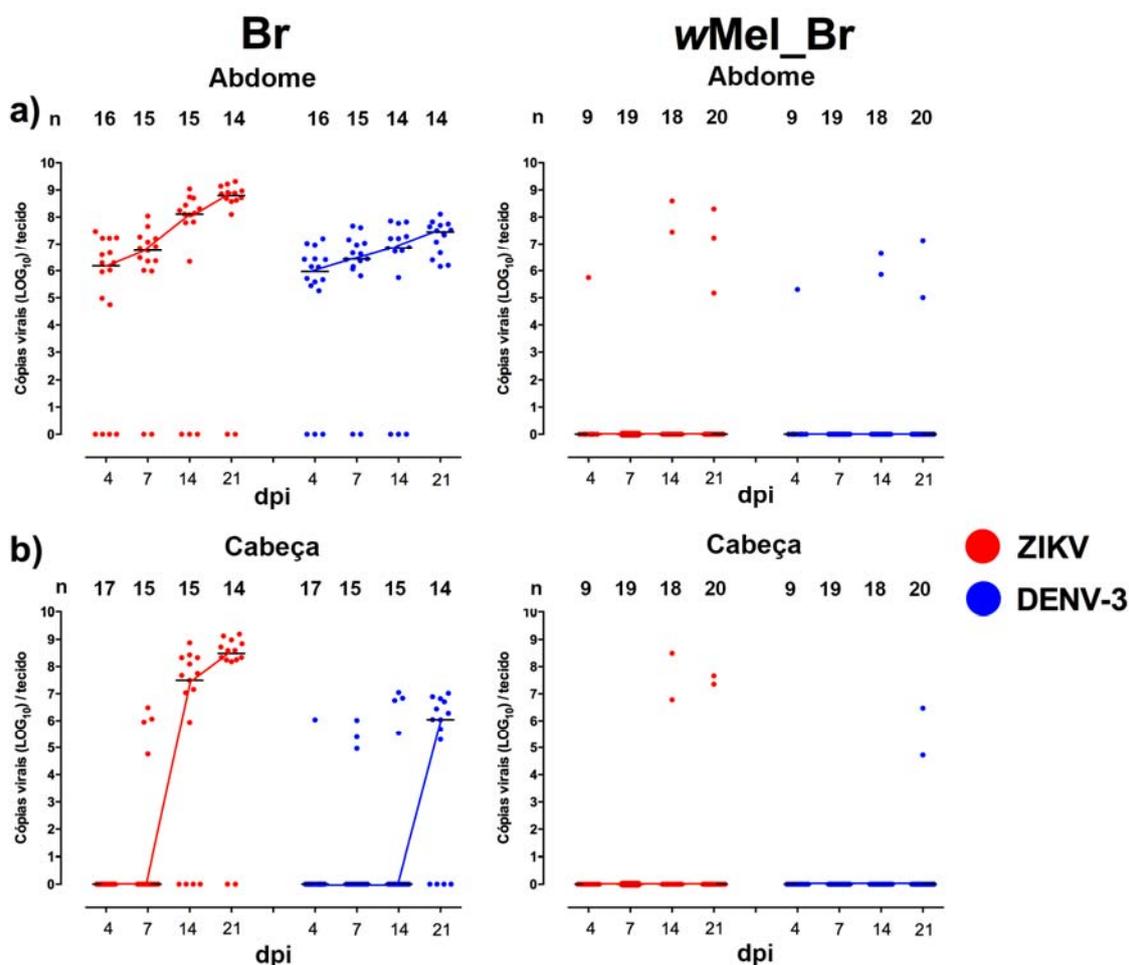
Por fim, assim como considerado para DENV-1 e ZIKV, observou-se que a mediana de cópias virais na cabeça + tórax de *Ae. aegypti* se manteve zerada em todos os intervalos de tempo considerados, porém desta vez ambos DENV-3 e ZIKV (Fig. 19A-D).

Com relação à dinâmica de infecção, os abdomens de *Ae. aegypti* Br apresentaram um aumento na mediana de cópias virais tanto para ZIKV (variação da mediana =  $1,51 \times 10^6$  -  $6,23 \times 10^8$  cópias ZIKV / tecido) quanto DENV-3 (variação da mediana =  $2,7 \times 10^6$  -  $5,13 \times 10^7$  cópias DENV / tecido) ao longo de 21 dias de infecção, permanecendo constantemente baixo para os mosquitos *wMel\_Br* (Fig. 20A).

Já na cabeça + tórax dos mosquitos sem *Wolbachia*, houve um aumento gradual na proporção de fêmeas com infecção disseminada, de forma que o número mediano de cópias virais aumentou a partir de 14 dpi para ZIKV (variação da mediana =  $3,12 \times 10^7$  -  $3,04 \times 10^8$  cópias ZIKV / tecido) e em 21 dpi para DENV-3 (mediana =  $1,1 \times 10^6$  cópias DENV / tecido), valor este que permaneceu baixo em *wMel\_Br* em todos os intervalos de tempo considerados (Fig. 20B).



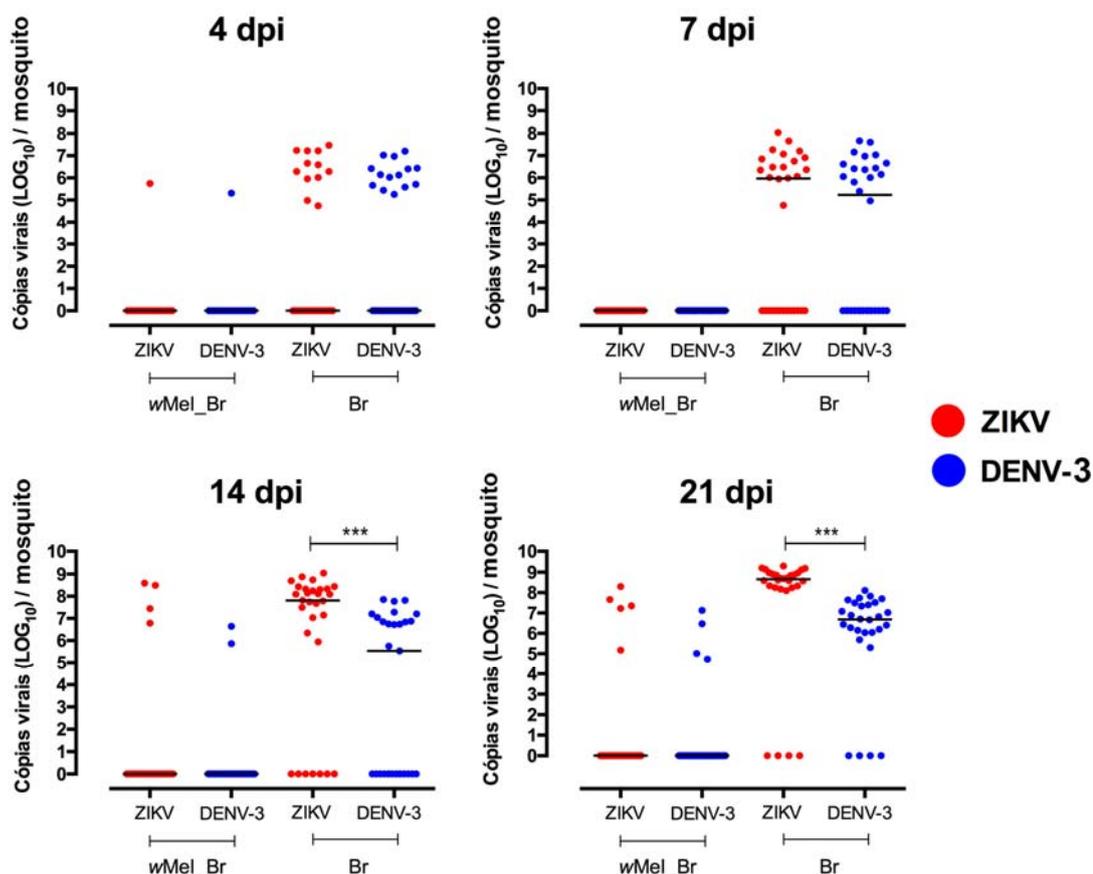
**Figura 19: *Wolbachia* restringe a infecção e disseminação de ZIKV e DENV-3 em mosquitos *Ae. aegypti* no período analisado de 4 a 21 dpi (A-D).** Mosquitos contendo (*w*Mel\_Br - círculos verdes) ou não (Br - círculos pretos) *Wolbachia* foram infectados via oral com ZIKV e DENV-1. A quantificação absoluta do número de cópias virais (expresso como logaritmo do número de cópias virais por tecido) foi realizada via qRT-PCR. Cada grupo representado é composto pelo respectivo tecido de 19, 18 e 17 fêmeas individuais a 4, 7 e 14 dpi, respectivamente. A 21 dpi, foram analisados 19 fêmeas individuais no grupo *w*Mel\_Br e 20 no Br (para cada tecido) Linhas vermelhas horizontais representam a mediana de cópias virais. Valor de P obtido via Teste U de Mann-Whitney, \*  $< 0,05$ ; \*\*  $< 0,01$ , \*\*\*  $< 0,001$ .



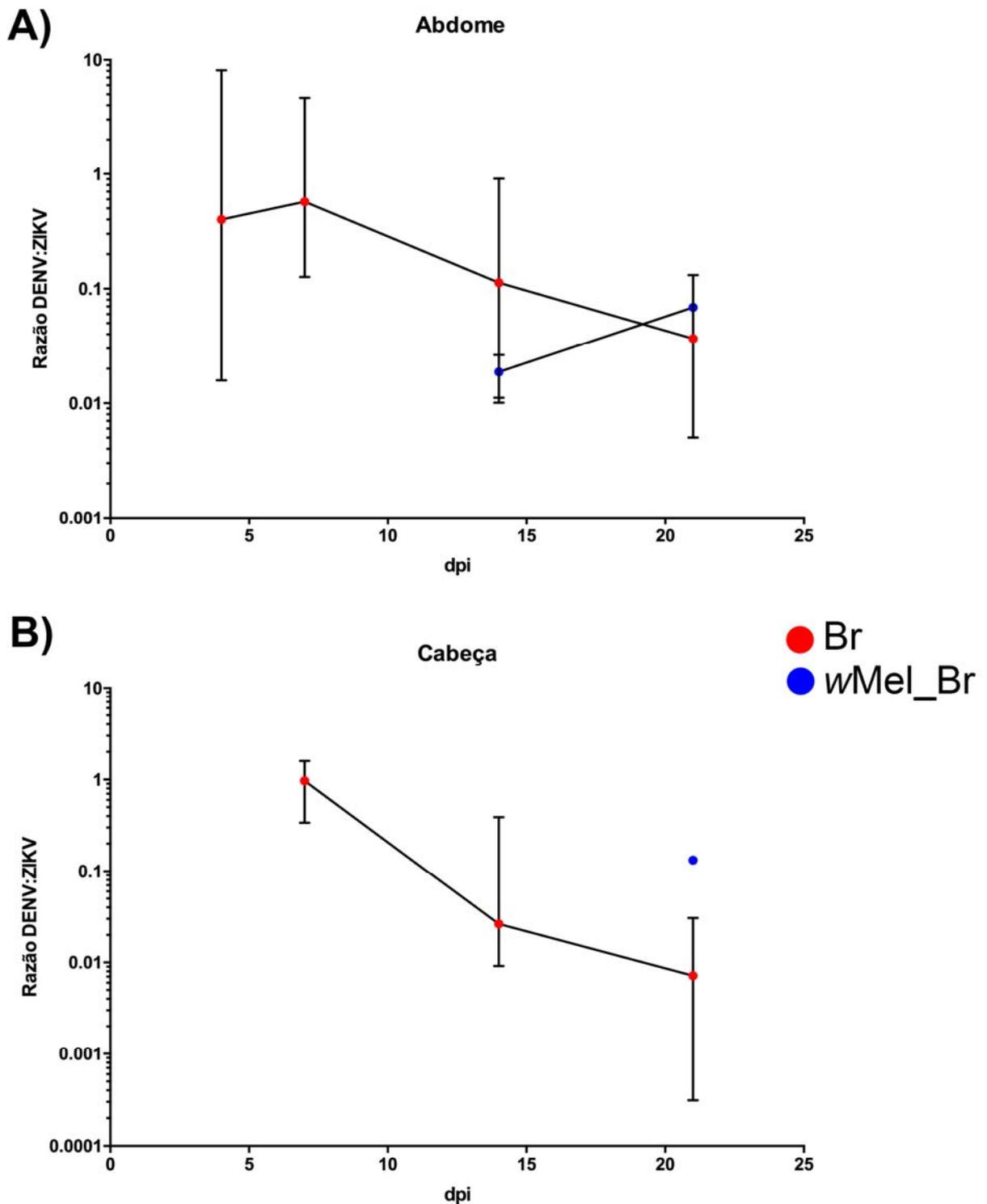
**Figura 20: dinâmica de infecção por DENV-3 e ZIKV em *Ae. aegypti* com (*wMel\_Br*) e sem (*Br*) *Wolbachia* no período analisado de 4 a 21 dpi.** Mosquitos contendo (*wMel\_Br*) ou não (*Br*) *Wolbachia* foram infectados via oral com ZIKV (círculos vermelhos) e DENV-3 (círculos azuis). A quantificação absoluta do número de cópias virais (expresso como logaritmo do número de cópias virais por tecido A = Abdome, B = cabeça + tórax) foi realizada via qRT-PCR. Tamanho amostral (n) representado em cima de cada grupo. Linhas pretas horizontais representam a mediana de cópias virais.

Ao considerarmos o mosquito inteiro das linhagens *wMel\_Br* e *Br*, ao contrário do que foi observado para DENV-1 e ZIKV onde os níveis de ZIKV foram menores que o do sorotipo 1 de dengue; na coinfeção envolvendo DENV-3 e ZIKV, a carga viral mediana de ZIKV foi maior que a de DENV-3 nas fêmeas de *Ae. aegypti* da linhagem *Br*, porém este efeito foi observado apenas nos intervalos de tempo de 14 dpi (Mann-Whitney;  $P = 0,0003$ ) e 21 dpi (Mann-Whitney;  $P < 0,0001$ ), nos demais, os níveis permaneceram estatisticamente semelhantes (Mann-Whitney;  $P > 0,05$ ). Não houve também qualquer diferenciação entre ambos arbovírus na linhagem *wMel\_Br* (Mann-Whitney;  $P > 0,05$ ). Em todos os casos, a carga viral em *wMel\_Br* foi inferior à *Br* (Mann-Whitney;  $P < 0,0001$ ) (Fig. 21).

Por fim, ao se verificar a razão entre as cargas virais de DENV-3 e ZIKV ao longo de 21 dias após infecção viral, nota-se o mesmo padrão de diminuição da proporção do número de cópias virais presentes entre DENV-1 e ZIKV (Fig. 20), para o abdome (Kruskal-Wallis;  $P < 0,0001$ ), e a cabeça + tórax (Kruskal-Wallis;  $P < 0,0001$ ) de mosquitos da linhagem Br. Este padrão está ausente na linhagem de *Ae. aegypti* contendo *Wolbachia*, onde mais uma vez, a alta prevalência de indivíduos não infectados dificultou a análise dos mosquitos inteiros (Fig. 22).



**Figura 21: quantificação de ZIKV e DENV-3 em cenários de coinfeção em *Ae. aegypti* com (wMel\_Br) e sem (Br) *Wolbachia* no período analisado de 4 a 21 dpi.** Mosquitos contendo (wMel\_Br) ou não (Br) *Wolbachia* foram infectados via oral com ZIKV (círculos vermelhos) e DENV-3 (círculos azuis). A quantificação absoluta do número mediano de cópias virais (expresso como logaritmo do número de cópias virais por mosquito) foi realizada via qRT-PCR. O tamanho amostral (n) foi de: 4 dpi (wMel\_Br = 18; Br = 33). 7 dpi (wMel\_Br = 38; Br = 30), 14 dpi (wMel\_Br = 36; Br = 30), 21 dpi (wMel\_Br = 40; Br = 28). Linhas pretas horizontais representam a mediana de cópias virais. Valor de P obtido via Teste U de Mann-Whitney, \*\*\* <0,001.



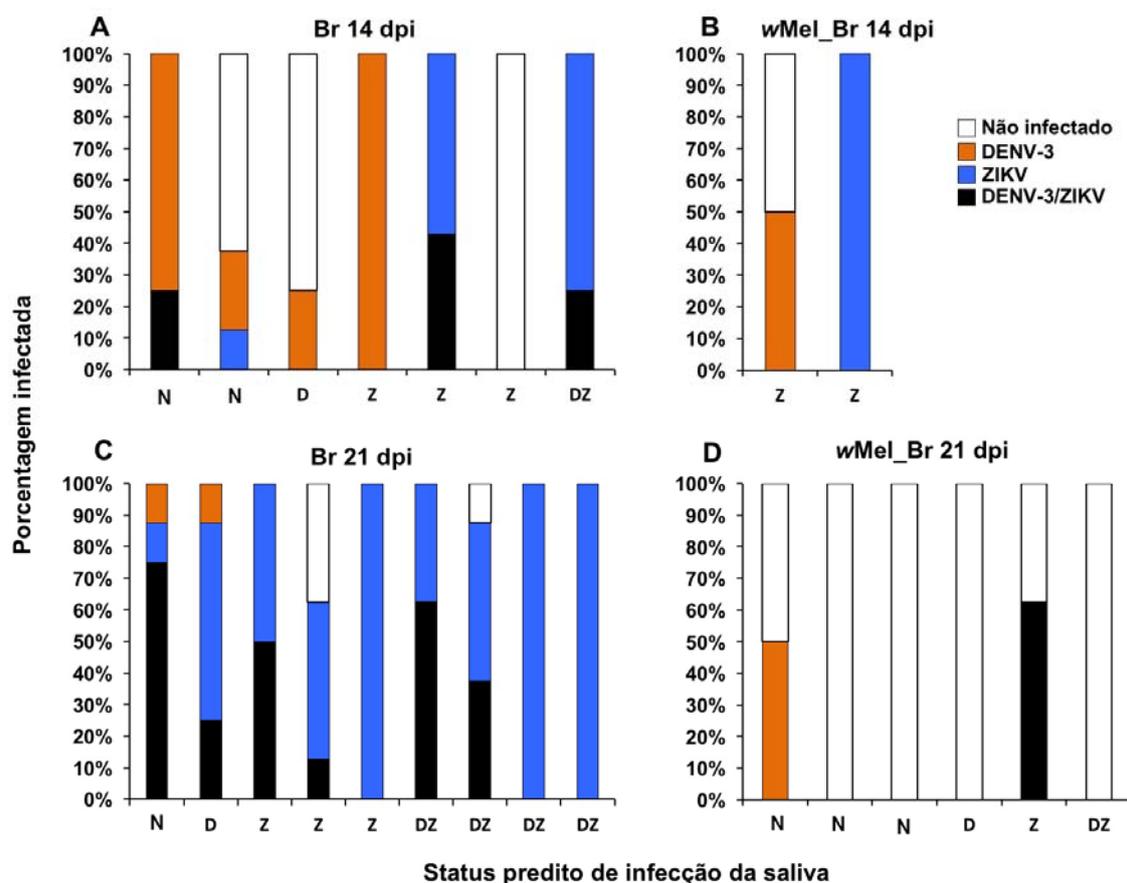
**Figura 22:** razão entre o número de cópias virais de DENV-3 e ZIKV em cenários de coinfecção em *Ae. aegypti* com (wMel\_Br) e sem (Br) *Wolbachia* no período analisado de 4 a 21 dpi. Mosquitos contendo (wMel\_Br) ou não (Br) *Wolbachia* foram infectados via oral com ZIKV e DENV-3. A relação entre DENV-3 e ZIKV e foi obtida a partir da quantificação absoluta do número de cópias virais realizada via qRT-PCR. \*,  $P < 0,05$ ; análises realizadas via o teste de Kruskal-Wallis.

O próximo passo consistiu em verificar a infectividade da saliva de mosquitos da linhagem wMel\_Br e Br coinfectados com DENV-3 e ZIKV (procedimento de coleta e nanoinjeção de saliva descritos nos itens 4.4 e 4.5). Ao todo, 24 amostras de salivas (16 provenientes da linhagem Br e 8 da linhagem wMel\_Br) foram utilizadas para nanoinjetar 187 mosquitos sem *Wolbachia* (Br). A maioria das amostras de saliva analisadas foram coletadas 21 dpi (11 amostras Br e 6 amostras wMel\_Br), de forma a garantir o cumprimento do período de incubação extrínseco do vírus (CHAN & JOHANSSON, 2012; KRAMER *et al.*, 2003; TJADEN *et al.*, 2013). Em paralelo, parte das amostras foram verificadas a 14 dpi (5 amostras Br e 2 amostras wMel\_Br) (Fig. 23).

Do total de mosquitos da linhagem Br selecionados como doadores de saliva (n = 16), a checagem prévia de infecção viral via RT-qPCR correlacionou-se com o perfil de infecção desenvolvido no mosquito injetado em apenas 31,25% das amostras (n = 5), sendo apenas uma delas proveniente de 14 dpi. Já na linhagem wMel\_Br, esta porcentagem de correlação foi igual a 37,5% (n = 3), sendo apenas 1 destas proveniente de 14 dpi (Fig. 23).

Para ZIKV, 22,2% das amostras preditas como positivas para este vírus (2 positivas em 9 avaliadas), resultaram em infecção por este vírus ao serem nanoinjetadas. Para DENV-3 este valor foi de 33,3% (1 positiva em 3 avaliadas). No caso da coinfeção DENV-3 / ZIKV, 50% das amostras (3 positivas em 6 avaliadas) resultaram no perfil de infecção predito. Por fim, para as amostras preditas como não infectadas, 33,3% resultaram no perfil esperado (2 positivas em 6 avaliadas). Logo, o índice de confiança na avaliação da cabeça + tórax como preditor de infecção viral a ser desenvolvida pelo hospedeiro nanoinjetado foi de 33,3% (Fig. 23).

Apesar do baixo índice de correlação entre o perfil de infecção predito e o obtido na nanoinjeção, fica evidente a baixa taxa de infectividade da saliva proveniente de *Ae aegypti* contendo a cepa wMel de *Wolbachia* em comparação ao grupo sem a bactéria (Fig. 23).



**Figura 23: verificação da infectividade da saliva de *Ae. aegypti* coinfetados com DENV-3 e ZIKV no período analisado de 4 a 21 dpi (A-D).** Mosquitos contendo (*wMel\_Br*) (B e D) ou não (*Br*) (A e C) *Wolbachia* tiveram a sua saliva coletada nos intervalos de tempo de 14 e 21 dpi, e injetada via intratorácica em mosquitos *Br*, após prévia caracterização do status de infecção de sua cabeça + tórax via qRT-PCR. Barras verticais representam entre 4-14 mosquitos inoculados com saliva de uma fêmea doadora. Mosquitos foram coletados 5 dpi, e a presença ou ausência do vírus foi determinada em mosquitos inteiros também via RT-qPCR. As siglas N; D, Z e DZ representam o status predito de infecção da saliva, baseado em análise da cabeça + tórax dos mosquitos onde N = não infectado; D = infectado por DENV-3, Z = infectado por ZIKV; DZ = coinfetado por DENV3 e ZIKV.

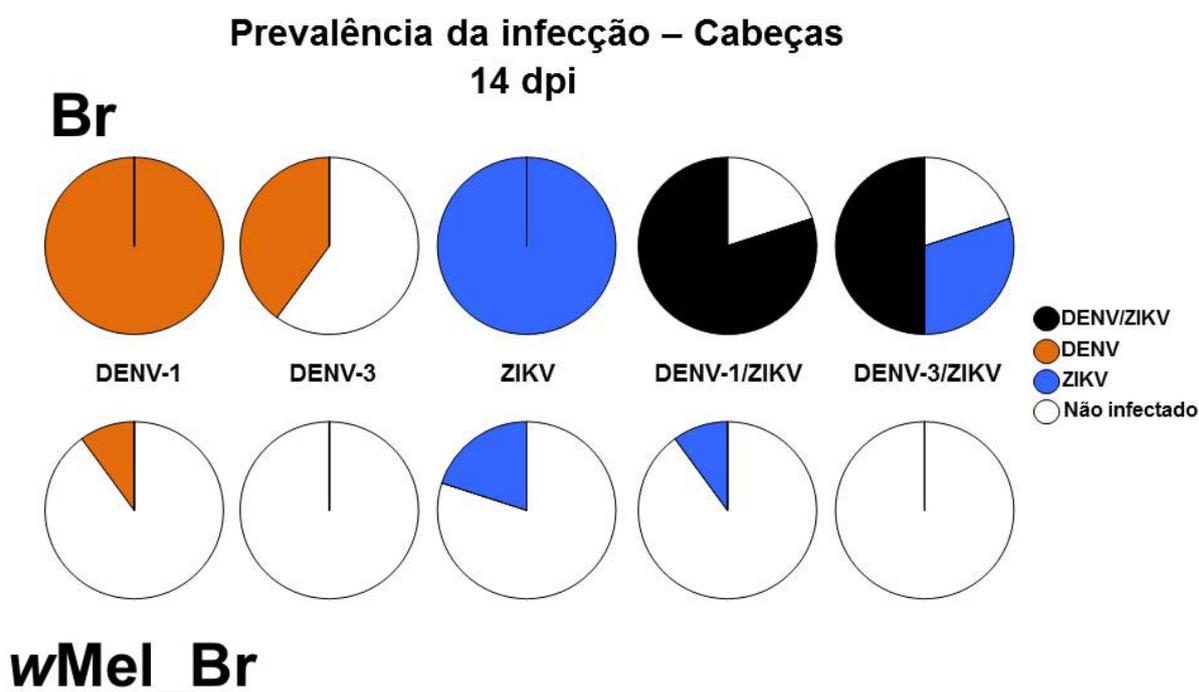
#### 5.4 Coinfecção DENV e ZIKV: dados preliminares do experimento nº 3

Por fim, de forma a se reafirmar os dados obtidos nos experimentos nº 1 e nº 2, demos início ao experimento nº 3, o qual envolveu DENV-1 ( $3 \times 10^6$  PFU/mL), DENV-3 ( $>10^6$  PFU/mL) e ZIKV ( $2,5 \times 10^8$  PFU/mL – Tab. 4). Os dados ainda são preliminares, de forma que até o momento, se avaliou a infecção em 7 (IFA) e 14 dpi (prevalência de infecção via RT-qPCR) levando-se em consideração a importância do tempo extrínseco de incubação e a transmissão viral em campo (CHAN & JOHANSSON, 2012; KRAMER *et al.*, 2003).

A prevalência de infecção por cada *flavivirus* está representada para a cabeça + tórax (preditor de disseminação da infecção) de *Ae. aegypti* (Fig. 24). Houve uma baixa proporção de mosquitos da linhagem wMel\_Br infectados (variação de 10% a 20% de infecção). Já na linhagem Br, a proporção de infectados foi maior (variando de 30 a 100% de infecção).

Na linhagem Br, todos os mosquitos avaliados a 14 dpi apresentaram infecção por DENV-1 e ZIKV nos grupos mono infectados, enquanto em DENV-3, a infecção foi de 40%. Em cenários de coinfeção, 80% dos indivíduos apresentaram-se como coinfectados (DENV-1 e ZIKV), já para DENV-3 e ZIKV, houve uma dominância de ZIKV, onde 40% das amostras estavam coinfectadas e outros 30% infectados apenas por ZIKV.

Ao comparar a prevalência de infecção entre as linhagens estudadas, viu-se que com exceção da monoinfecção por DENV-3 (Teste exato de Fisher,  $P = 0,0867$ ), todos os outros cenários apresentaram uma redução na proporção de indivíduos infectados por vírus, na presença de *Wolbachia* (Teste exato de Fisher,  $P \leq 0,05$ ).



**Figura 24: prevalência da infecção por ZIKV, DENV-1 e DENV-3 na cabeça + tórax das linhagens wMel\_Br e Br de *Ae. aegypti*.** Gráficos de pizza representando a prevalência de infecção na cabeça + tórax de *Ae. aegypti* da linhagem wMel\_Br (com *Wolbachia*) e Br (sem *Wolbachia*), provenientes do experimento nº 3.

De forma a corroborar o perfil de bloqueio observado nos mais distintos experimentos ao longo deste trabalho, via RT-qPCR, decidimos analisar via IFA, a detecção viral em

intestinos de *Ae. aegypti* nas linhagens wMel\_Br e Br a 7 dpi, usando como fêmeas do mosquito provenientes do experimento n° 3.

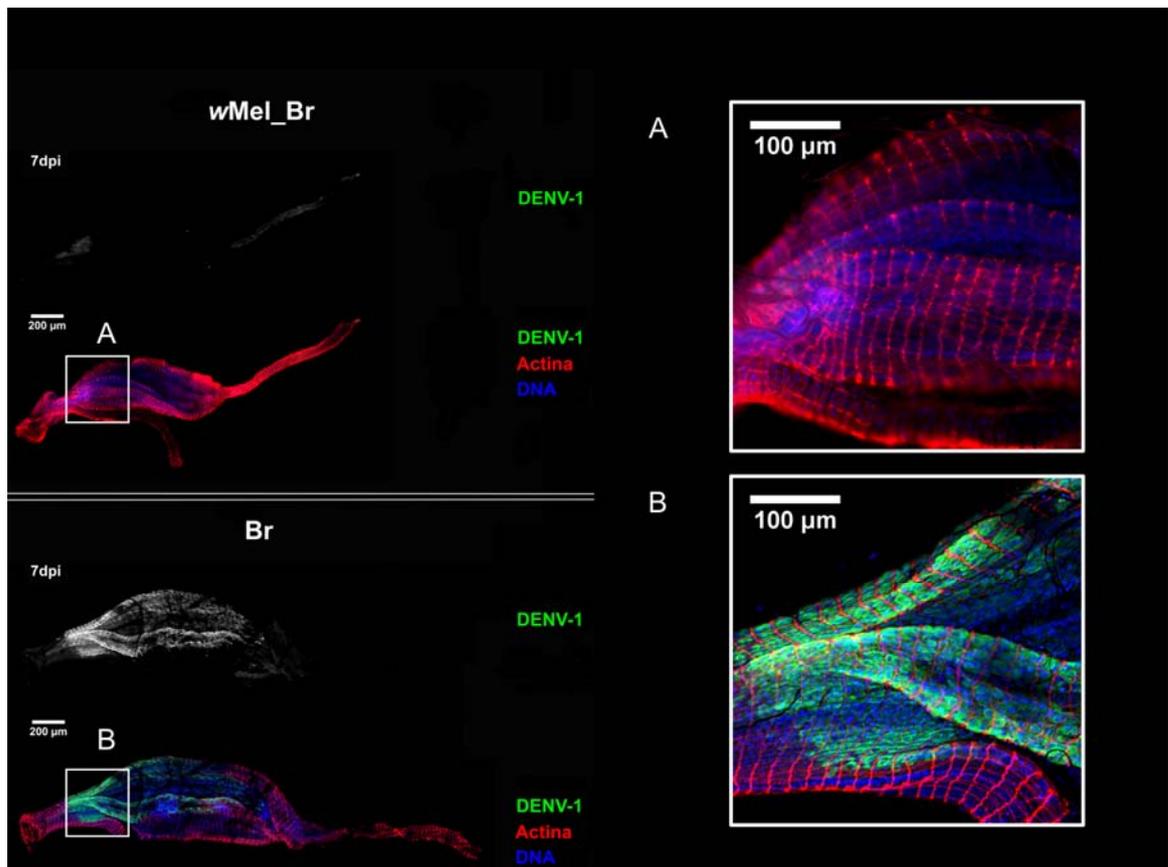
No cenário de monoinfecção por DENV-1, viu-se que em todos os intestinos onde *Wolbachia* se fez presente (n = 10), não foi detectado a presença de partículas virais. Em contraste, todos os intestinos da linhagem sem a bactéria (Br; n = 10), apresentaram-se como infectados pelo vírus (Teste exato de Fisher,  $P < 0,0001$ ) (Fig. 25).

Se tratando da monoinfecção por DENV-3, observou-se a existência de três perfis de “área de infecção viral do intestino”, em mosquitos da linhagem Br (n = 5), sendo estes classificados arbitrariamente por nós como:  $\leq 10\%$ , 25 a 50% e  $> 50\%$  de área infectada. Já para wMel\_Br (n = 10), observou-se apenas o perfil “ $\leq 10\%$ ”, sendo a proporção de infecção entre as duas linhagens (considerando apenas infectado vs. não-infectado, sem levar em consideração as taxas de infecção), estatisticamente distinta (Teste exato de Fisher,  $P = 0,0256$ ) (figs. 26).

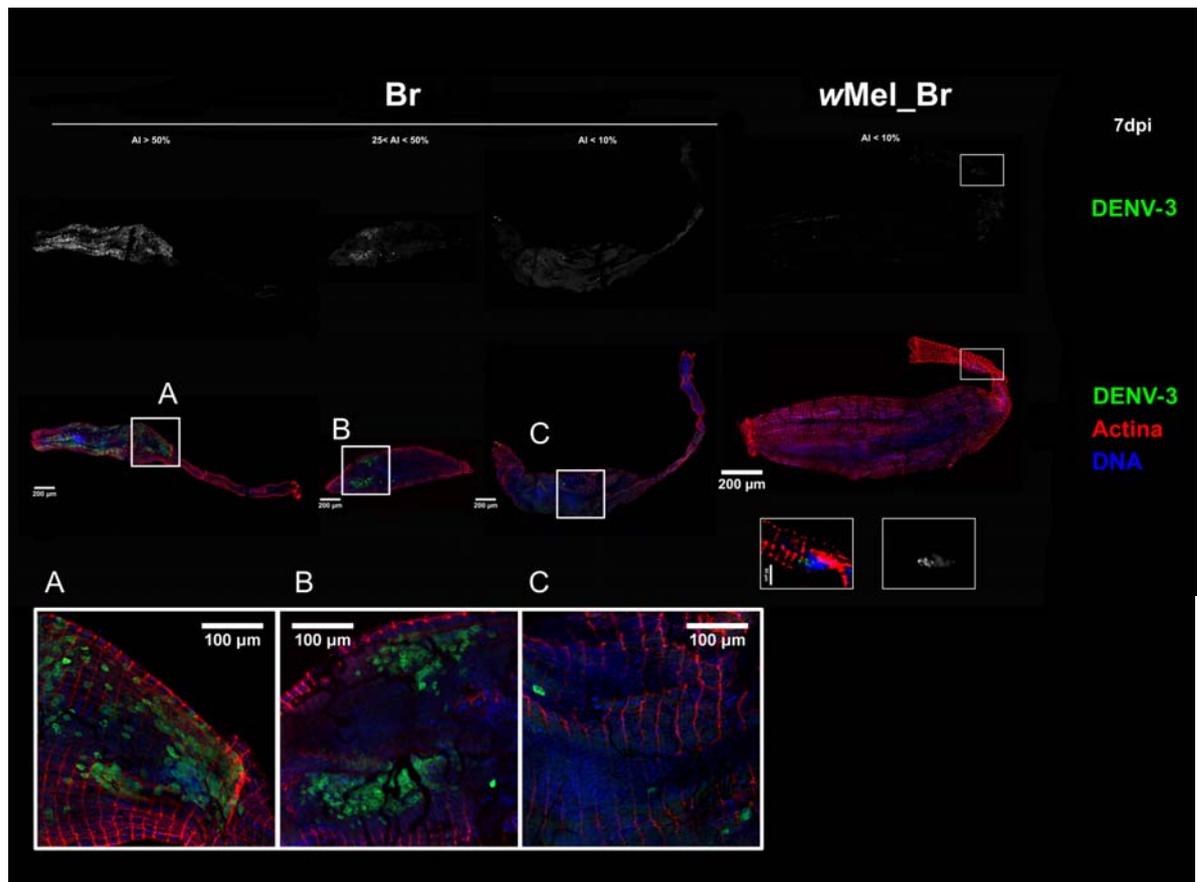
Com relação à ZIKV, houve também padrões distintos de área infectada, presente em ambas as linhagens estudadas (wMel\_Br = 10 intestinos analisados; Br = 10 intestinos analisados). Estes foram classificados também de forma arbitrária como:  $\leq 10\%$ ,  $< 25\%$ , 25 a 50% e por fim  $> 50\%$  de área infectada. Neste cenário, a cepa wMel de *Wolbachia* não reduziu a proporção de intestinos infectados (Teste exato de Fisher,  $P = 0,1409$ ) (Figs. 27).

Quantificou-se a densidade relativa de *Wolbachia* de forma a verificar se havia um padrão entre este parâmetro e o *status* de infecção dos intestinos pertencentes a *Ae. aegypti* da linhagem wMel\_Br (Fig. 28A), e entre a densidade desta bactéria e algum *flavivirus* específico (Fig. 28B). Escolhemos tal metodologia devido à dificuldade que encontramos em se realizar a marcação via histoquímica, desta bactéria nos intestinos de *Ae. aegypti*.

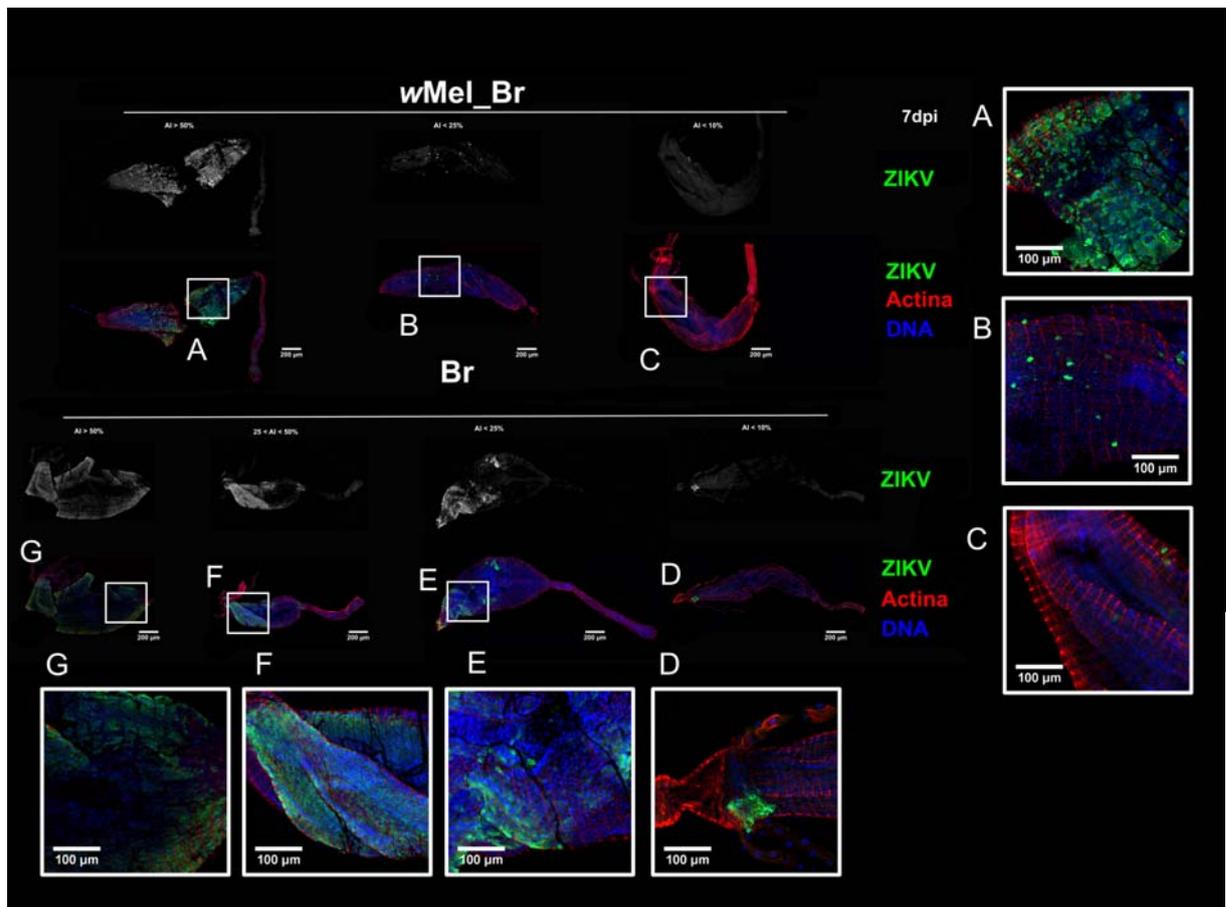
Não houve qualquer ligação entre a densidade bacteriana e o status da infecção (infectado ou não infectado por vírus), de forma que em ambos os grupos, a densidade bacteriana foi semelhante (Mann-Whitney,  $P = 0,9486$ ). (Fig. 28A). Além disto, não houve um padrão entre a presença de algum *flavivirus* específico e a densidade de *Wolbachia* observada (Kruskal-Wallis,  $P = 0,5991$ ) (Fig. 28B).



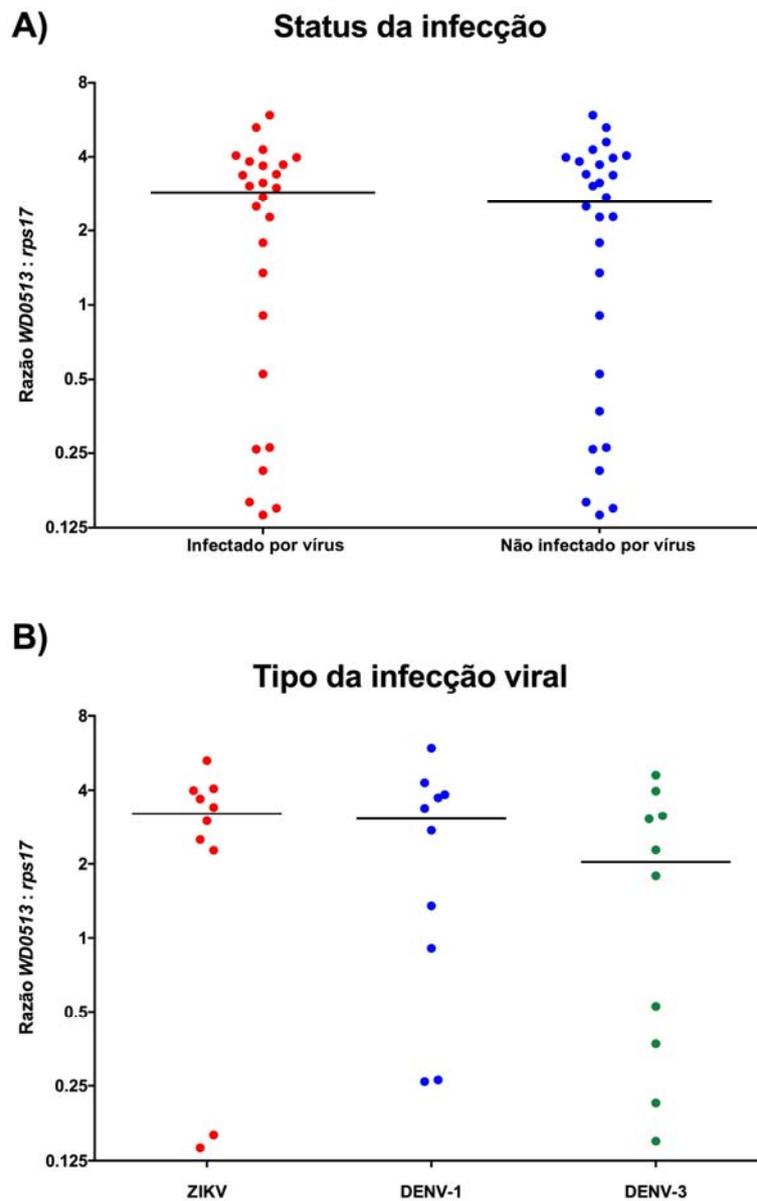
**Figura 25: detecção via IFA de DENV-1 no intestino de *Ae. aegypti* a 7dpi.** Mosquitos *Ae. aegypti* com (wMel\_Br) e sem (Br) *Wolbachia* realizaram repasto sanguíneo infectante com DENV-1, em seguida, tiveram seus intestinos dissecados a 7 dpi e testados via imunofluorescência com o anticorpo anti-*flavivirus* 4G2. Actina (vermelho) foi marcada com Faloidina-rodamina e DNA (azul) com Hoechst 33342 (descrição no item 4.7.2). Todos os intestinos aqui representados foram analisados utilizando aumento de 10X.



**Figura 26: detecção via IFA de DENV-3 no intestino de *Ae. aegypti* a 7dpi.** Mosquitos *Ae. aegypti* com (wMel\_Br) e sem (Br) *Wolbachia* realizaram repasto sanguíneo infectante com DENV-3, em seguida, tiveram seus intestinos dissecados a 7 dpi e testados via imunofluorescência com o anticorpo anti-*flavivirus* 4G2. Actina (vermelho) foi marcada com Faloidina-rodamina e DNA (azul) com Hoechst 33342 (descrição no item 3.7.2). Todas as imagens foram tiradas utilizando aumento de 10X. Imagem em destaque representa aumento de 63X. AI: área infectada, corresponde à porcentagem de infecção do epitélio intestinal em relação a toda área do órgão.



**Figura 27: detecção via IFA de ZIKV no intestino de *Ae. aegypti* a 7dpi.** Mosquitos *Ae. aegypti* com (wMel\_Br) e sem (Br) *Wolbachia* realizaram repasto sanguíneo infectante com ZIKV, em seguida, tiveram seus intestinos dissecados a 7 dpi e testados via imunofluorescência com o anticorpo anti-*flavivirus* 4G2. Actina (vermelho) foi marcada com Faloidina-rodamina e DNA (azul) com Hoechst 33342 (descrição no item 3.7.2). Todas as imagens foram tiradas utilizando aumento de 10X. AI: área infectada, corresponde à porcentagem de infecção do epitélio intestinal em relação a toda área do órgão.



**Figura 28: Relação entre densidade de *Wolbachia* e infecção viral.** Mosquitos contendo *Wolbachia* (*wMel\_Br*) foram infectados via oral com ZIKV, DENV-1 e DENV-3 (de forma independente), em seguida, tiveram seus intestinos dissecados a 7 dpi e testados via imunofluorescência. A quantificação relativa da densidade de *Wolbachia* (expresso como a razão entre o número de cópias do gene *WD0513* de *Wolbachia* e o gene ribossomal *rps17* de *Ae. aegypti*) foi realizada via qPCR (detalhe no item 4.6). Analisou-se o (A) *status* de infecção viral e o (B) tipo da infecção viral. Cada grupo representado é composto por  $\leq 10$  carcaças individuais. Linhas pretas horizontais representam a mediana do número relativo de cópias do gene *WD0513* em relação à *rps17*.

## 5.5 Expressão de genes de imunidade em resposta à infecção viral

No presente estudo avaliamos como a coinfeção por DENV-1 e/ou ZIKV afetaria a expressão de cinco genes em mosquitos *Ae. aegypti* das linhagens contendo *Wolbachia* (wMel\_Br) ou não (Br) (Fig. 29).

Em todos os cenários de infecção viral envolvendo a presença de wMel (destaque para o grupo mock, onde não havia a infecção por qualquer arbovírus), o gene Defensina-C (*defc*), um peptídeo antimicrobiano estimulado pelas vias de resposta imune IMD e Toll (CHENG *et al.*, 2015) foi altamente expresso (Fig. 29A) (Mann-Whitney;  $P < 0,001$ ). Vale destacar ainda que nos grupos onde a bactéria estava presente, a mediana de expressão de tal gene aumentou à medida que se passou do cenário de monoinfecção com DENV-1 para a monoinfecção com ZIKV, atingindo o seu pico de expressão no grupo de indivíduos coinfectados.

Ademais, Defensina-C teve a sua expressão reduzida em todos os cenários onde *Wolbachia* estava ausente (grupo Br), inclusive sendo este valor até seis vezes menor nos cenários de coinfeção (grupo DZ, no gráfico), em comparação à linhagem wMel\_Br.

Colpits e colaboradores demonstraram via estudo de microarranjo, que na presença de infecção viral, o gene AAEL008415-RA (descrito como ligante de ácidos nucleicos) teve sua expressão altamente induzida (COLPITTS *et al.*, 2011). Logo, buscamos caracterizar o seu perfil de expressão. Em todos os grupos onde havia a presença de vírus, este gene foi ativado, de forma que a sua expressão foi significativamente maior em indivíduos sem *Wolbachia* (Mann-Whitney;  $P < 0,01$ ) (Fig. 29B).

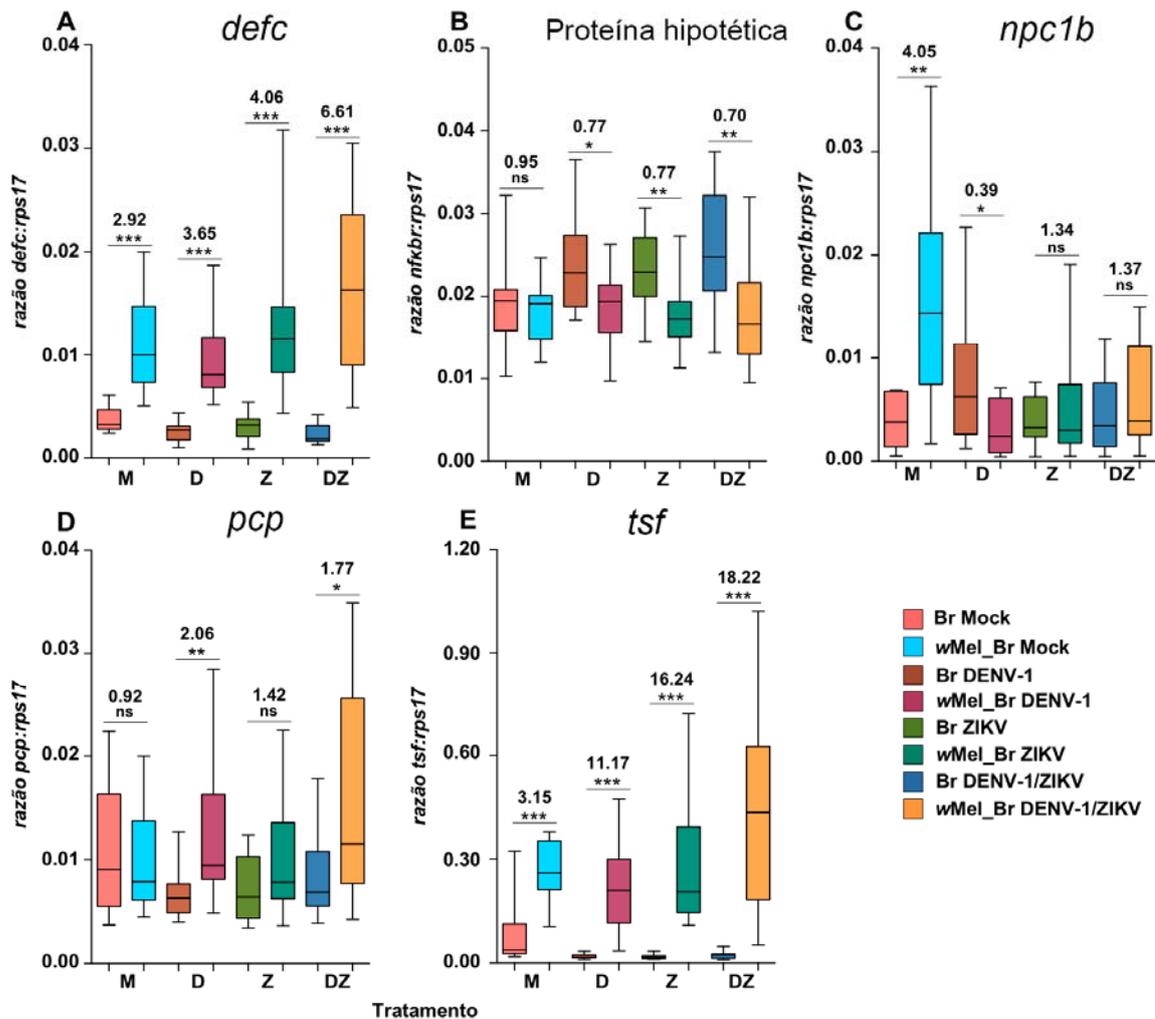
Estudos passados demonstraram que a proteína de ligação a lipídeo Niemann-Pick tipo C-1b (*npc1b*) apresenta-se como sendo agonista do vírus DENV, facilitando a infecção do organismo pelo vírus quando este gene está expresso em níveis elevados (JUPATANAKUL *et al.*, 2014). Ao se analisar este gene, observamos que na ausência de infecção viral (mock), o mesmo foi cerca de quatro vezes mais expresso em mosquitos contendo *Wolbachia* (Mann-Whitney;  $P < 0,01$ ), entretanto, na presença de DENV, este teve a sua expressão reprimida na linhagem wMel\_Br (Mann-Whitney;  $P < 0,05$ ) (Fig. 29C).

Demonstrou-se na literatura, a correlação entre a proteína de cutícula de pupa (*pcp*) e a infecção por WNV, onde a supressão de *pcp* levou a diminuição da carga viral (COLPITTS *et al.*, 2011). Aqui observamos que mosquitos contendo a cepa wMel de *Wolbachia* e infectados com DENV-1 apresentaram um aumento significativo na expressão deste gene em comparação aos mosquitos sem a bactéria (Mann-Whitney;  $P < 0,01$ ), de forma que este efeito foi ainda maior em cenários de coinfeção por DENV-1 e ZIKV (Mann-Whitney;  $P < 0,05$ ), embora inexistente no grupo em que não havia infecção viral (Fig. 29D).

Com relação à Transferrina (*tsf*), responsável pelo transporte celular de ferro, esta foi altamente expressa na linhagem *wMel\_Br*, e reprimida na linhagem sem a bactéria (Br) (Mann-Whitney;  $P < 0,001$ ), de forma que à medida que se passou da monoinfecção por DENV-1, para ZIKV, a diferenciação na ativação deste gene elevou-se em relação à linhagem Br, passando de um aumento de expressão de 11 vezes para 16, atingindo seu pico de expressão no cenário de coinfeção, onde este foi 18 vezes mais transcrito que o grupo sem *Wolbachia* (Fig. 29E).

Por fim, de forma a se analisar de forma independente, a contribuição de *Wolbachia*, assim como da infecção viral para padrão imune observado entre os genes selecionados, utilizamos modelos lineares de regressão (MLR).

De forma geral, concluiu-se que para todos os genes analisados, a presença de *Wolbachia* contribuiu significativamente para o perfil de expressão observado (MLR;  $P < 0,05$ ). Este mesmo padrão de interação foi detectado para os genes *defc*, *npc1b* e *tsf* (MLR;  $P < 0,01$ ;  $P < 0,05$ ;  $P < 0,01$ , respectivamente) ao considerar-se a contribuição da infecção viral, não sendo detectado para a proteína hipotética e o gene *pcp* (MLR;  $P > 0,05$ ). A interação entre *Wolbachia* e a infecção viral alterou o perfil imune apenas para os Defensina-C e Transferrina (MLR;  $P = 0,016$  para ambos).



**Figura 29: regulação de genes de imunidade em resposta à infecção por DENV-1 e ZIKV em *Ae. aegypti* contendo *Wolbachia*.** Os níveis de expressão de 5 genes de imunidade, Defensina-C (*defc*) (A), Proteína hipotética (B), Niemann-Pick tipo C-1b (*npc1b*) (C), Proteína da cutícula de pupa (*pcp*) (D) e Transferrina (*tsf*) (E) foram quantificados via RT-qPCR para mosquitos das linhagens com (wMel\_Br) e sem *Wolbachia* (Br) 1 dia após infecção com DENV-1 e ZIKV (monoinfecção e coinfecção). Os dados representam a razão (normalização) entre o nível de expressão do gene alvo e o gene constitutivamente expresso do hospedeiro, *rps17*. Os gráficos box & Wisker plot representam os valores medianos (linhas horizontais no interior das barras) observados para 15 mosquitos individuais em cada cenário de infecção, com exceção dos grupos “mocks” onde foram analisados 10 mosquitos. As linhas verticais partindo das barras indicam os valores mínimos e máximos observados. Os valores numéricos acima das linhas verticais de cada barra representam o número absoluto (*fold change*) na variação de expressão entre os grupos comparados. Valor de P obtido via Teste U de Mann-Whitney, \* < 0,05; \*\* <0,01, \*\*\* <0,001. M: mock; D: DENV-1; Z: ZIKV; DZ: DENV-1 + ZIKV

## 6 DISCUSSÃO

### 6.1 A relação *Wolbachia* e ZIKV em mosquitos *Ae. aegypti*

A recente pandemia causada pelo *Zika virus*, associada a desordens de ordem neurológica e gestacional pegou o mundo de surpresa (CHANG, C. *et al.*, 2016). A ausência de vacina ou drogas antivirais comercialmente disponíveis faz com que países extremamente afetados por tal arbovirose como Brasil, foquem no combate ao mosquito vetor como uma estratégia eficaz de combate à doença.

Dentre as várias abordagens alternativas atualmente disponíveis em campo, a bactéria endossimbionte *Wolbachia* apresenta-se como uma das mais promissoras (MCGRAW & O'NEILL, 2013). No que diz respeito ao uso autossustentável desta bactéria (ver item 1.9.4.1.2), têm-se o seu efeito de proteção antiviral conferida a mosquitos, e inicialmente descoberto em *D. melanogaster* (TEIXEIRA *et al.*, 2008), como um dos pilares de tal abordagem (CARAGATA *et al.*, 2016), e foco desta tese.

O efeito de interferência a patógenos causado pela presença de *Wolbachia* nunca foi observado para vírus cujo genoma é baseado em DNA. Em *D. melanogaster* já se demonstrou que a presença da bactéria teve um impacto pífio na infecção pelo *Vírus Iridescente de inseto 6*, um vírus de DNA (TEIXEIRA *et al.*, 2008). Ademais, alguns autores já associaram a presença de *Wolbachia* ao aumento do processo infeccioso na presença de baculovírus (genoma baseado em DNA) (GRAHAM *et al.*, 2012). Porém, em mosquitos, o único representante conhecido de DNA-vírus é o vírus da febre suína africana (*African Swine Fever virus*), responsável por infectar mosquitos do gênero *Anopheles* (TULMAN *et al.*, 2009).

Entretanto, após ser transinfectada de forma estável em *Ae. aegypti*, processo pelo qual uma associação artificial entre *Wolbachia* e hospedeiro é criada via injeção da bactéria no embrião em desenvolvimento, diversos autores já observaram o efeito de interferência à patógenos desta bactéria a vírus cujo material genético é baseado em RNA (CARAGATA *et al.*, 2016), incluindo DENV, CHIKV, YFV (MOREIRA *et al.*, 2009; VAN DEN HURK *et al.*, 2012). Interessante notar que este efeito já foi demonstrado também em sistemas onde *Wolbachia* é encontrada infectando naturalmente o mosquito (GLASER & MEOLA, 2010; MOUSSON *et al.*, 2010), e em infecções transientes, onde a bactéria é inserida artificialmente em mosquitos já adultos, sem que ocorra a passagem desta para a prole (JOUBERT & O'NEILL, 2017).

Portanto, dado que diversas cepas de *Wolbachia* interferem no desenvolvimento de patógenos, nós hipotetizamos que a cepa wMel, atualmente utilizada como parte alternativa autossustentável de controle da dengue no Brasil, possa ser capaz de limitar a infecção pelo *flavivirus* ZIKV, e interferir na transmissão desta arbovirose por *Ae. aegypti*.

O ensaio *in vitro* em cultivo celular demonstrou a habilidade da cepa wMel de *Wolbachia* em interferir de forma efetiva na replicação de ZIKV, sendo este valor estatisticamente significativo a 3, 5 e 7 dpi. Isto corrobora resultados prévios em cultivo celular, onde demonstrou a capacidade desta bactéria em interferir no desenvolvimento de DENV (FRENTIU *et al.*, 2010).

Nossos resultados *in vivo* de monoinfecção por dois distintos isolados de ZIKV em mosquitos *Ae. aegypti* indicam que a habilidade da infecção por *Wolbachia* em reduzir drasticamente a capacidade dos mosquitos em hospedar e transmitir uma gama de patógenos de importância médica, incluindo os vírus da dengue e Chikungunya (Caragata *et al.*, 2016; Moreira *et al.*, 2009, Walker *et al.*, 2011) também se estende para ZIKV.

Enquanto wMel não inibiu completamente a infecção por ZIKV, nós observamos um decréscimo similar na prevalência e intensidade da infecção similar ao de *Ae. aegypti* infectados com wMel e desafiados com sangue virêmico de pacientes com dengue, a qual foi considerado suficiente para reduzir drasticamente a transmissão viral (Ferguson *et al.*, 2015).

Adicionalmente, o fato de que nós não observamos um aumento na disseminação da infecção por ZIKV ao longo do tempo, e que a prevalência e infectividade de ZIKV na saliva dos mosquitos wMel\_Br foi significativamente reduzida, talvez possa indicar que, assim como para dengue, wMel estende o período extrínseco de incubação para ZIKV (YE *et al.*, 2015). Isso por sua vez iria provavelmente diminuir ainda mais as taxas gerais de transmissão de ZIKV, dado a pequena redução no tempo de vida associado à infecção por wMel (Walker *et al.*, 2011).

Nós observamos que a infecção pela cepa wMel de *Wolbachia* em *Ae. aegypti* inibiu drasticamente a infecção por ZIKV nos abdomens dos mosquitos, e também reduziu a disseminação da infecção nas cabeças e tórax e a prevalência de ZIKV na saliva dos mesmos. De forma mais importante, nossos resultados sugerem que saliva proveniente de mosquitos infectados por wMel não continha vírus infeccioso. Que esta inibição ocorreu para dois isolados de ZIKV recém circulantes no Brasil durante a epidemia de 2015, e para mosquitos com uma carga genética selvagem, sugere que wMel poderia reduzir drasticamente a transmissão de ZIKV nas populações de campo de *Ae. aegypti*, o que por sua vez provavelmente iria reduzir a frequência das patologias associadas à Zika em humanos, como discutido nos tópicos seguintes desta tese.

## 6.2 *Wolbachia* reduz a competência vetorial de *Ae. aegypti* mono e coinfectado por ZIKV e DENV.

Após os resultados positivos de proteção antiviral obtidos em *Ae. aegypti* infectados por dois distintos isolados de ZIKV, esta tese buscou investigar se a cepa *wMel* de *Wolbachia* também se demonstraria eficiente em cenários onde o mesmo vetor estivesse coinfectado por dois sorotipos de DENV (1 e 3), outro vírus da mesma família *flaviviridae* a qual ZIKV pertence, e onde *Wolbachia* já se mostrou eficiente em cenários de monoinfecção (WALKER *et al.*, 2011b).

Para que determinado cenário de coinfeção ocorra entre diferentes patógenos, é preciso que estes ocorram dentro da mesma região geográfica, infectem o mesmo hospedeiro e tenham como alvo (ao menos em parte de seu desenvolvimento) as mesmas células dentro do hospedeiro. DENV e ZIKV possuem todos estes critérios. Ambos os vírus estão dispersos pelas regiões tropicais e subtropicais do mundo, inclusive no Brasil (FAUCI & MORENS, 2016; SUAYA *et al.*, 2009), são transmitidos por mosquitos *Ae. aegypti*, onde inclusive infectam até mesmo órgãos como os ovários das fêmeas, possibilitando a sua transmissão vertical (MARTINS *et al.*, 2012; THANGAMANI *et al.*, 2016a).

Além disto, o fato de existirem tanto pacientes quanto vetores coinfectados por distintos vírus e seus respectivos genótipos virais na natureza (BHARAJ *et al.*, 2008; FIGUEIREDO *et al.*, 2011; PESSANHA *et al.*, 2011; THAVARA *et al.*, 2006), associado à discordância gonotrófica inerente de *Ae. aegypti* (capacidade da fêmea em realizar repasto em mais de um hospedeiro, durante um único lote de ovos produzidos) (CONSOLI & LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994) deixa claro a possibilidade de ocorrência do cenário proposto nesta tese.

Entretanto, até o momento, nenhum estudo avaliou o cenário de coinfeção em insetos vetores envolvendo ZIKV e outro vírus. Um estudo envolvendo a coinfeção com diferentes sorotipos de DENV (1 e 4) sem a presença de *Wolbachia*, observou, ao analisar apenas a taxa de disseminação viral (via análise da cabeça + tórax de *Ae. aegypti*) valores de coinfeção semelhantes ao por nós observados no mesmo tecido (VAZEILLE *et al.*, 2016).

Em *Cx pipiens*, WNV foi encontrado coexistindo com *Culex Flavivirus* (CxFV), um arbovírus presente mundialmente em mosquitos deste gênero, em 40% das amostras individuais de mosquitos de campo (NEWMAN *et al.*, 2011), demonstrando a possibilidade de coexistência viral em mosquitos de campo, não só nesta espécie, mas também em mosquitos do gênero *Aedes*, onde detectou-se a presença de coinfeção por DENV-2 e DENV-3 em fêmeas asiáticas de mosquitos *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* (THAVARA *et al.*, 2006).

De forma geral, observamos nos dados aqui apresentados, uma forte interferência da cepa *wMel* de *Wolbachia* na prevalência de coinfeção em dois cenários, **1)** DENV-1/ZIKV e **2)** DENV-3/ZIKV, ao se analisar fêmeas de mosquitos *Ae. aegypti* ao longo de 21 dias após infecção viral.

No cenário nº 1, a porcentagem de fêmeas coinfectadas nos diferentes tempos de coleta variou de 5 a 24% nos abdomens e de 0 a 5% para a cabeça + tórax em *wMel\_Br*. Estes valores observados para a linhagem contendo *Wolbachia* foram semelhantes ao observado no cenário nº 2 envolvendo DENV-3/ZIKV apenas para a cabeça e tórax (0 a 5% de coinfeção), enquanto que nos abdomens, o valor observado foi de 0 a 11%.

Com relação aos mosquitos sem a bactéria (Br), as taxas de coinfeção foram distintas para ambos os cenários. No 1º, envolvendo DENV-1 e ZIKV, a prevalência de coinfeção variou de 35 a 83% (48% de variação) nos abdomens e 0 a 55% (55% de variação) na cabeça + tórax. Já no cenário envolvendo DENV-3 e ZIKV, a coinfeção variou de 63-86% (23% de variação) nos abdomens e 0 a 64% (64% de variação) na cabeça + tórax.

A respeito da prevalência da infecção tecidual, ou seja, a detecção de pelo menos um dos vírus estudados, de forma simultânea, no abdome e na cabeça e tórax das fêmeas de *Ae. aegypti*, vimos que na linhagem sem *Wolbachia* (Br), houve uma menor variação na prevalência deste tipo de infecção no cenário nº 1 (DENV-1 / ZIKV – 79% [21 - 100%]) do que no cenário nº 2 (DENV-3 / ZIKV – 88% [5 - 93%]). Já para a linhagem *wMel\_Br*, o primeiro cenário apresentou uma variação de 41% (6 - 47%) ao longo do tempo (4 - 21dpi), enquanto o segundo cenário variou apenas 1% (10 - 11%) (Fig. 13C; 18C).

Nossos dados preliminares de prevalência de infecção na cabeça + tórax a 14 dpi (experimento nº 3) corroboram o observado nos experimentos nº 1 e 2 citados acima, onde houve uma maior proporção de indivíduos coinfectados no cenário envolvendo DENV-1 e ZIKV (80%) em relação ao observado para DENV-3 e ZIKV (40%) (Fig. 24).

A dinâmica de infecção viral seguiu um padrão mais constante tanto para DENV quanto para ZIKV, na coinfeção envolvendo DENV-3 e ZIKV. Houve neste cenário, com o passar do tempo (4 - 21 dpi), um aumento gradual da carga viral mediana nos indivíduos sem *Wolbachia*, acompanhado por progressão quase ausente na linhagem *wMel\_Br*. Entretanto, na coinfeção envolvendo DENV-1 e ZIKV, este padrão não ficou tão evidente (Figs. 15; 20).

Uma possível explicação para tamanha variação observada entre mosquitos sem *Wolbachia* pode ser atribuída ao fato de que no ato da infecção dos mosquitos, não se sabia o título viral. Tínhamos apenas uma noção baseada em RT-qPCR, a qual não diferencia partículas virais infectivas de não-infectivas. A adição de 300 partes de DENV-1 em relação a 1 parte de ZIKV, ao contrário da proporção 1:1 adicionada para o sorotipo 3 e ZIKV, pode ter

feito com que houvesse um desbalanço no título viral inicial, de forma que a competição interna por recursos do hospedeiro ficou assimétrica.

No que diz respeito à ZIKV no cenário de coinfeção DENV-3 e ZIKV, nossos dados de dinâmica viral corroboram os obtidos por Fernandes e colaboradores, onde viu-se um aumento na carga viral entre 7,14 e 21 dias após infecção de *Ae. aegypti* da cidade do Rio de Janeiro, tanto no abdome (infecção) quanto na cabeça (disseminação), inclusive com números medianos de cópias de ZIKV semelhantes ao obtidos por nós (FERNANDES *et al.*, 2016).

Interessante notar que mesmo com o erro metodológico acima citado, nós observamos que em ambos os casos de coinfeção, à medida que o tempo pós-infecção dos mosquitos *Ae. aegypti* sem *Wolbachia* avançou, houve uma diminuição gradativa na diferença no número de cópias virais entre DENV e ZIKV tanto no abdome quanto na cabeça (Fig 17; 22). Nos parágrafos a seguir, discutiremos os possíveis fatores que podem levar a ocorrência de tal fato.

O processo de infecção viral pode trazer atrelado a si, a competição por recursos do hospedeiro (READ & TAYLOR, 2001; RODENHUIS *et al.*, 2010). Desta forma, acredita-se que em um cenário de coinfeção, a competição por recursos energéticos do hospedeiro molde diretamente uma série de características inerentes do patógeno, como: desenvolvimento, virulência, transmissibilidade, os quais acabariam por afetar a dinâmica populacional deste agente infeccioso (ROODE *et al.*, 2005; NOWAK, 1995). Em se tratando de infecção por vírus, já foi demonstrado que fatores como a carga viral inicial e o intervalo de infecção são essenciais.

Em cenários de superinfecção (infecta-se o hospedeiro e, após um tempo pré-estabelecido, o infecta novamente) de *Aedes triseriatus* com duas linhagens do *La Crosse virus*, observou-se que a maioria dos mosquitos inicialmente infectados com a linhagem sensível a temperatura de tal vírus, se tornaram infectados novamente ao serem desafiados com a linhagem selvagem, 24h após a infecção inicial. Entretanto, quando o espaço entre as infecções passou para 72h, os mosquitos se tornaram resistentes à superinfecção, onde os autores acreditam que dentre outros fatores, a resposta imune do vetor teve grande influência na reinfecção (SUNDIN & BEATY, 1988).

Em se tratando de coinfeções, ou seja, a adição simultânea de diferentes vírus, Vazeille e colaboradores observaram ao infectar *Ae. aegypti* com distintos sorotipos de DENV (1 e 4), a predominância do sorotipo 4 sobre o 1, vantagem competitiva esta observada via alta taxa de infecção e disseminação de DENV-4 em detrimento de DENV-1, ao longo de 14 dpi (VAZEILLE *et al.*, 2016). Porém, ao se estudar a interação de DENV-2 e DENV-4 em cultura de células, envolvendo cenários de A) coinfeção e B) superinfecção, observou-se que

em A, ambos os vírus apresentaram uma taxa de replicação significativamente menor se comparada aos grupos monoinfectados, de forma que DENV-2 apresentou o pior desempenho. Já no cenário B, a replicação viral foi suprimida à medida que o tempo entre reinfeção do vetor aumentou, não havendo vantagem competitiva entre os sorotipos virais (PEPIN *et al.*, 2008).

Assim como demonstrado por diversos autores, *Wolbachia* é capaz de interferir no desenvolvimento do patógeno, protegendo assim o hospedeiro da infecção (ALIOTA; WALKER; *et al.*, 2016; GLASER & MEOLA, 2010; MOREIRA *et al.*, 2009; MOUSSON *et al.*, 2010; VAN DEN HURK *et al.*, 2012). Nos nossos experimentos, a análise de intensidade de infecção deixou claro que independente do cenário de coinfeção, a cepa *wMel* foi capaz de reduzir efetivamente a carga viral mediana nos mosquitos *Ae. aegypti*, tanto na análise de infecção viral (detecção de vírus no abdome), quanto de disseminação viral (detecção de vírus na cabeça + tórax).

Após o repasto sanguíneo do mosquito, o arbovírus deve primeiramente infectar as células do epitélio intestinal do vetor. Em seguida inicia-se o processo de maturação dos vírions fazendo com que estes necessitem se disseminar das células intestinais para a hemocele, via lâmina basal, e assim possam infectar órgãos secundários, como as glândulas salivares, estando então aptos a serem transmitidos a novos hospedeiros (FRANZ *et al.*, 2015).

Todo este processo é conhecido como período de incubação extrínseco do vírus (PIE), o qual para DENV e ZIKV, dura em média 7 a 14 dias, sendo governado por fatores 1) intrínsecos e 2) extrínsecos. No cenário nº 1, fatores como a interação genótipo x genótipo entre hospedeiro e patógeno, além da microbiota presente no vetor são essenciais. Já no segundo cenário, variações de temperatura e reservas energéticas do hospedeiro resultantes de estágios imaturos de desenvolvimento influenciam diretamente o PIE (BARA *et al.*, 2015; CHAN & JOHANSSON, 2012; TJADEN *et al.*, 2013).

Ao se considerar o conjunto dos quatro intervalos de tempo de coleta pós-infecção viral, os valores de redução obtidos na RT-qPCR da coinfeção DENV-3 e ZIKV foram superiores aos vistos para DENV-1 e ZIKV (redução mínima de 82,5% contra 50% para ZIKV; 85,9% contra 35,7% para DENV) (Tab. 4; 6 - Figs. 14, 16, 19, 21), porém isto não foi observado no ensaio de IFA, onde todos os intestinos da linhagem *wMel\_Br* analisados para DENV-1, foram negativos (Fig. 25), ao contrário do observado para DENV-3 e ZIKV (separadamente) (Figs. 26, 27).

De forma crítica, observamos no experimento nº 2 que após o cumprimento do PIE (logo, considerando a detecção viral na cabeça + tórax), a taxa de bloqueio da infecção viral

por wMel foi de 100% e 85% para ZIKV (na coinfeção por DENV-1 e por DENV-3, respectivamente), e 75% (DENV-1) a 100% (DENV-3) a 14 dpi. Já a 21 dpi, os resultados observados variaram de 90,4% - 88,33% para ZIKV (na coinfeção por DENV-1 e por DENV-3, respectivamente) e 44,6% (DENV-1) a 86% (DENV-3) (Tab. 7; 9).

Existem duas possibilidades para a baixa taxa de bloqueio de DENV-1 em relação à DENV-3, observada. A primeira diz respeito ao artefato metodológico na titulação/diluição feito na infecção de DENV-1 (descrito no item 4.3), onde já se foi demonstrado que a carga viral inicial exerce um grande papel na eficiência de bloqueio por *Wolbachia*, como já demonstrado na literatura para CHIKV (ALIOTA; WALKER; *et al.*, 2016), YFV (VAN DEN HURK *et al.*, 2012), DENV (FRENTIU *et al.*, 2010) e inclusive ZIKV (ALIOTA *et al.*, 2016). Como segunda possibilidade, e mais relevante a nosso ver, podemos citar o fato de que já foi descrito anteriormente que a cepa wMel de *Wolbachia* possui menor eficiência em bloquear a replicação de DENV-1 em comparação aos demais sorotipos virais (FERGUSON *et al.*, 2015).

Ao realizarmos os experimentos de verificação da infectividade da saliva de fêmeas de *Ae. aegypti* das linhagens wMel\_Br e Br mono infectados com um isolado de ZIKV (ZIKV/*H. sapiens*/Brasil/BRPE243/2015), observamos que a saliva dos mosquitos contendo *Wolbachia* não foi capaz de infectar mosquitos sem a bactéria, via nanoinjeção intratorácica.

Logo, dado os resultados descritos acima, em conjunto com os níveis de bloqueio da replicação viral descrito para o cenário de coinfeção, resolvemos, como uma extensão desta verificação de infectividade, coletar saliva de mosquitos das linhagens com (wMel\_Br) e sem (Br) *Wolbachia*, coinfectados com DENV-3 e ZIKV, os quais tiveram previamente a sua cabeça + tórax analisada via RT-qPCR para a detecção de partículas virais, e nanoinjetar no tórax de mosquitos sem a bactéria (procedimento de coleta e nanoinjeção de saliva descritos nos itens 4.4 e 4.5).

O resultado deste experimento (Fig. 23) nos mostrou que a análise prévia da cabeça + tórax, via RT-qPCR, para a detecção de partículas virais não funcionou como um bom preditor de seleção das salivas a serem injetadas, visto que apenas 33,3% das amostras apresentaram o perfil de infecção esperado. Como exemplo de tal afirmação, uma fêmea da linhagem Br que apresentou carga viral para ZIKV na cabeça + tórax (14 dpi), ao ter a sua saliva injetada em mosquitos Br, não foi capaz de infectar nenhum indivíduo.

Resultados semelhantes foram observados em fêmeas Br (sem *Wolbachia*) que se apresentaram como não infectados para ambos arbovírus na cabeça + tórax (14 dpi), porém ao terem a sua saliva injetada em mosquitos da mesma linhagem, fez com que estes apresentassem valores relevantes tanto de infecção para DENV-3 quanto para coinfeção

(DENV-3 e ZIKV). Este mesmo padrão se repetiu a 14 e 21 dpi em fêmeas da linhagem wMel\_Br (Fig 23).

Dentre as possíveis explicações para o resultado observado no ensaio de infectividade da saliva, pode-se citar as glândulas salivares como órgãos-chave na modulação do perfil infeccioso de arbovírus. Após a disseminação da infecção viral do intestino para os órgãos secundários, o vírus deve atingir as glândulas salivares para só então poder ser transmitido. Para que isto ocorra, o vírus deve antes ser capaz de lidar com as barreiras físicas impostas por este órgão, sendo elas a 1) barreira de infecção da glândula salivar (BIGS) e a 2) barreira de escape da glândula salivar (BEGS) (BLACK IV *et al.*, 2002).

A capacidade de determinado vírus em ultrapassar a BIGS pode ser dividida como sendo dose-dependente ou independente (HARDY *et al.*, 1983). Em *Culex tarsalis*, observou-se que a infecção pelo vírus da encefalomielite equina ocidental (*Western Equine Encephalomyelitis virus*) variou de acordo com a dose viral inicial (KRAMER *et al.*, 1981). Porém em *Aedes zoosophus* e *Aedes brelandi*, a infecção por *La Crosse virus* atingiu níveis elevados, independente da forma de infecção ou dose viral inicial (PAULSON *et al.*, 1989).

Portanto, dado que consideramos a análise da cabeça + tórax como preditor de infectividade viral, em detrimento da dissecação individual das glândulas salivares de *Ae. aegypti* e posterior tomada do padrão de infectividade deste tecido como referência para futuras infecções, é provável que as partículas virais detectadas na cabeça + tórax não tenham sido capazes de ultrapassar a BIGS e assim serem transmitidas via saliva para o vetor. Isto faz com que mosquitos previamente identificados como positivos para a infecção viral, potencialmente não tivessem expelido vírus na saliva.

Já no cenário onde o vírus foi ausente na cabeça + tórax do vetor, mas apresentou-se como infectivo na saliva do mesmo, pode-se especular que todas as partículas virais adentraram a BIGS, ultrapassaram a BEGS e assim foram transmitidas na saliva, sem que ficasse resquício viral neste tecido.

A respeito da relação entre *Wolbachia* e distintos arbovírus, até o momento os mecanismos exatos pelos quais esta bactéria exerce o fenótipo de interferência a patógeno não são completamente conhecidos, mas existem algumas pistas que ajudam a explicar o efeito.

Acredita-se que não exista apenas um único mecanismo de ação pelo qual *Wolbachia* interfere no desenvolvimento de patógenos, sendo o efeito, portanto, resultante de um conjunto de efeitos em pequena escala. Porém, independente da forma de infecção por *Wolbachia* (natural, transiente, transinfecção estável), o fator primordial responsável pela interferência é a densidade bacteriana, parâmetro este que varia de acordo com o tipo de associação existente entre hospedeiro e endossimbionte, onde de modo geral, infecções

naturais caracterizam-se por apresentar uma menor densidade bacteriana se comparado à transinfecções estáveis e transientes (DUTTON & SINKINS, 2004; JOUBERT & O'NEILL, 2017; OSBORNE *et al.*, 2012).

Em estudos envolvendo *D. melanogaster*, já se demonstrou que caso a densidade de *Wolbachia* seja reduzida, há uma perda do efeito de interferência a patógenos (OSBORNE *et al.*, 2012). Acreditava-se que a densidade bacteriana ao nível tecidual ou celular, era o grande responsável por modular a interação contra agentes infecciosos (FRENTIU *et al.*, 2010; JOHNSON, 2015). Entretanto, Amuzu e colaboradores ao quantificarem a densidade bacteriana da cepa *wMel* em diferentes tecidos de *Ae. aegypti*, e correlacionarem com a presença de infecção tecidual por DENV, concluíram que não há uma correlação linear direta entre o efeito de bloqueio ao vírus e à densidade de *Wolbachia* nos tecidos. Os autores acreditam que o efeito aparenta ser sistêmico e ligado a uma densidade bacteriana mínima que, quando ultrapassada, dá origem ao efeito antiviral (AMUZU & MCGRAW, 2016). Esta afirmação vai de encontro ao observado por nós na correlação da densidade relativa de *Wolbachia* na carcaça dos mosquitos da linhagem *wMel\_Br*, com a taxa de infecção observada na imunofluorescência (Fig. 28A), onde viu-se que a densidade bacteriana não afetou o perfil de infecção observado.

O segundo componente do efeito de interferência a patógenos diz respeito à competição por nutrientes. Dados recentes demonstraram que este efeito não está ligado aos níveis de carboidrato fornecido aos mosquitos, onde variações na concentração de sacarose oferecida a *Ae. aegypti* não alteraram o efeito de bloqueio ao vírus DENV (CARAGATA *et al.*, 2016). Entretanto, ao se tratar de lipídeos, tanto *Wolbachia* quanto vírus não possuem a maquinaria necessária para a produção deste nutriente, dependendo portanto, do hospedeiro (LEE *et al.*, 2008; VOLLMER *et al.*, 2013).

Caragata e colaboradores observaram uma elevada taxa de mortalidade causada por *Drosophila C vírus*, em *D. melanogaster* infectadas pelas cepas *wMelPop* e *wMelCS* (separadamente), criadas em dieta rica em colesterol, em comparação a indivíduos que eram criados em dietas convencionais. Segundo os autores, a competição por este nutriente contribuiu diretamente para proteção antiviral, onde dietas ricas em colesterol resultaram em uma diminuição na taxa de bloqueio por *Wolbachia* e um aumento no título viral (CARAGATA, *et al.*, 2013). O terceiro componente relacionado à proteção antiviral diz respeito à pré-ativação do sistema imune do hospedeiro, discutido abaixo (item 6.3).

Por fim, dados recentes discutem o papel genético por trás do mecanismo de interferência a patógenos, onde avaliou-se o papel de proteínas de ligação ao cromodomínio-helicase do DNA (*Cromodomain helicase DNA binding proteins – CHD*), uma classe de

enzimas remodeladoras de cromatina, responsáveis por interações entre o DNA. O estudo analisou CHD7 de *Ae. aegypti*, um homólogo do gene *kismet* em *D. Melanogaster*, o qual atua como fator de transcrição, demonstrando que este é utilizado por DENV como facilitador de infecção em fêmeas de *Ae. aegypti*. Os autores demonstraram que *Wolbachia* reprime a expressão deste gene, o que por sua vez faz com que a replicação viral seja inibida (ASAD *et al.*, 2016).

### **6.3 Ativação de genes de imunidade em resposta à presença de *Wolbachia* e infecção viral**

Em cenários de transinfecção de *Wolbachia*, já foi observado um aumento sistêmico na expressão de genes relacionados à imunidade do hospedeiro, de forma que este então estaria “preparado” para uma futura infecção, sendo esta teoria conhecida como “*immune priming*” (KAMBRIS *et al.*, 2009; MOREIRA *et al.*, 2009; PAN *et al.*, 2012; RANCÈS *et al.*, 2012).

Baseado em tal afirmação, diversos estudos buscaram analisar o papel do sistema imune em cenários de infecção viral e presença de *Wolbachia*. Dentre eles, destaca-se dados onde *Drosophila* (infecção natural) e mosquitos (transinfecção) contendo cepas distintas de *Wolbachia* (benigna – *wMel*; virulenta – *wMelPop*) demonstraram que o efeito de interferência a patógeno foi presente em ambos os organismos, de forma que no cenário de infecção natural não foi detectado a ativação do sistema imune do hospedeiro, apenas na transinfecção de *Ae. aegypti* (RANCÈS *et al.*, 2012, 2013; WONG *et al.*, 2011). Além do mais, foi em *Ae. aegypti* onde se correlacionou a presença de *Wolbachia* com o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), a qual está ligada à ativação da via Toll de imunidade, responsável por combater agentes infecciosos (PAN *et al.*, 2012).

Porém, dados indicam que esta ativação está diretamente relacionada ao tipo de associação entre *Wolbachia* e o hospedeiro. Em infecções naturais, *Wolbachia* mantém a homeostase *redox* do organismo, há um aumento da resposta imune baseada em ROS, porém isto é contrabalanceado pela ativação de genes relacionados à resposta antioxidante. Já em transinfecções, há a produção excessiva de ROS dependente da ativação do sistema imune, o qual devido à recente associação entre hospedeiro e bactéria, ainda não co-evoluiu para níveis estáveis (Zug & Hammerstein, 2015).

Acredita-se que na transinfecção de *Wolbachia*, a ativação do sistema imune possa não representar o principal mecanismo pelo qual o fenótipo de interferência a patógenos aconteça, mas que a ativação deste sistema sirva para exacerbar o efeito de bloqueio por parte da bactéria (RANCÈS *et al.*, 2012).

Nos experimentos de coinfeção, observou-se que três genes imunes foram significativamente expressos na presença da cepa *wMel* de *Wolbachia*. Cada um destes genes será discutido abaixo.

O primeiro deles foi defensina-C (*defc*), um peptídeo antimicrobiano ativado pelas vias Toll e IMD, expresso em cenários de infecção por distintos patógenos. Sua expressão em níveis elevados aqui observado corrobora o relatado em *Ae. aegypti* infectados com *wMel* (CARAGATA *et al.*, 2016; RANCÈS *et al.*, 2012) e *wAlbB* (BIAN *et al.*, 2010; PAN *et al.*, 2012) (Fig. 29A). Interessante citar que Pan e colaboradores demonstraram ainda para *wAlbB* que a ativação deste gene pela bactéria é um dos responsáveis diretos pelo fenótipo de interferência à replicação de DENV-2.

De forma crítica, ao se analisar mosquitos da linhagem *wMel\_Br*, observou-se um aumento de expressão de *defc* na infecção envolvendo ZIKV em relação à DENV-1, sendo o pico de expressão deste gene atingido quando ambos os vírus estavam presentes no vetor (Fig. 29A). Possivelmente, o aumento observado na expressão deste gene em cenários de coinfeção se deveu ao aumento da carga viral no hospedeiro causada pela presença simultânea de DENV-1 e ZIKV, o que por sua vez induziu um aumento diretamente proporcional na transcrição de *defc*.

Um estudo recente demonstrou que à medida que se introduziu concentrações crescentes de DENV-2 em cultura de células C6/36 (pertencentes a *Ae. albopictus*), houve um aumento proporcional na expressão de defensina (WASINPIYAMONGKOL *et al.*, 2015).

Ademais, novas associações entre patógeno e hospedeiro, antes inexistentes, em determinados casos podem acarretar em uma resposta exagerada por parte do sistema imune do hospedeiro à infecção (LONGDON *et al.*, 2015). Os primeiros casos autóctones de ZIKV no Brasil só foram relatados ao final de 2014 (CARDOSO *et al.*, 2015). Logo, a relação recente entre o *background* genético dos mosquitos *Ae. aegypti* brasileiros e o genótipo asiático de ZIKV poderia em partes explicar a resposta exacerbada detectada em *dfc*, quando este vírus esteve presente.

O segundo gene ativado na presença de *Wolbachia* (e reprimido na ausência da bactéria) é a Proteína de cutícula de pupa (*pcp*). Entretanto esta ativação ficou evidente apenas em cenários que envolviam a infecção viral, mais especificamente a presença de DENV-1 e a coinfeção DENV-1 / ZIKV (Fig. 29D). Este resultado corrobora os dados observados por Colpits e colaboradores, onde a infecção por *WNV* inibiu fortemente a expressão de *pcp*, de forma que a replicação viral foi inibida quando este gene foi super expresso (COLPITTS *et al.*, 2011).

Colpits não investigou em seu trabalho, a associação de *Wolbachia* sobre o efeito observado, algo por nós investigado. Logo, acreditamos que no cenário de infecção viral, a *Wolbachia* atua ativando a expressão de *pcp* de forma a inibir a replicação viral, e que assim como para o *dfc*, o efeito observado é dose dependente, vide o pico de expressão obtido na coinfeção DENV-1 e ZIKV.

O último dos três genes imunes altamente expressos na presença de *Wolbachia* (e reprimido em mosquitos sem a bactéria) codifica a proteína transferrina (*tsf*) (Fig. 29E), o qual foi recentemente associado à infecção por *wMel*, expressando-se em níveis menores em mosquitos mantidos em dieta restrita em carboidratos (solução de sacarose 1% vs. solução de sacarose 10% e 20%) (CARAGATA *et al.*, 2016). A ativação de *tsf* já foi associado à inibição da infecção por nematódeos filarióides (KAMBRIS *et al.*, 2009). Dado o resultado aqui obtido, hipotetizamos que a expressão de *tsf* também é dose dependente, sendo quase 20 vezes mais expresso na coinfeção viral, de forma que a ativação deste por *Wolbachia* poderia estar atuando como um fator limitante da infecção viral.

Já o gene da proteína hipotética (AAEL008415-RA) foi ativado na presença de infecção viral, mas a sua expressão foi inibida pela presença de *Wolbachia* (Fig. 29B). Até onde sabemos, este gene nunca foi testado em cenários envolvendo a presença de *Wolbachia* e infecção viral, porém, demonstrou-se que AAEL008415-RA foi ativado em mosquitos *Ae. aegypti* livres de *Wolbachia*, mas infectados com DENV (COLPITTS *et al.*, 2011; LONDONO-RENTERIA *et al.*, 2015). Portanto, acreditamos que AAEL008415-RA atue como um agonista da infecção viral, onde sua expressão atue reprimindo parte da resposta imune do hospedeiro. A presença de *Wolbachia* garantiria a repressão deste gene, e com isso, o controle da infecção viral. Sendo isto válido tanto para infecção por DENV, quanto ZIKV, vide resultado obtido.

Finalmente, o gene Niemann-Pick tipo C-1b (*npc1b*), associado à homeostase lipídica e absorção de esterol no intestino de *D. melanogaster* (CHANG *et al.*, 2006; VOGHT *et al.*, 2007), foi altamente transcrito em *Ae. aegypti* após o repasto infectante com DENV, o que fez com que a abundância de transcritos relacionados à peptídeos antimicrobianos e demais genes da via JAK-STAT de resposta imune, decaíssem. De forma crítica, o silenciamento de tal gene resultou na diminuição da carga viral deste vírus no intestino do hospedeiro. Isto sugere portanto que *npc1b* atue como agonista da infecção por DENV (JUPATANAKUL *et al.*, 2014).

Nosso resultado corrobora os dados observados por Jupatanakul no que diz respeito à monoinfecção por DENV-1, onde na linhagem de mosquitos brasileiros, houve uma maior ativação de *npc1b* frente a infecção viral. Entretanto, vimos que este gene foi super expresso

no grupo contendo *Wolbachia* mas sem infecção viral (*wMel\_Mock*). Uma possível explicação para tal fato, é que assim como o vírus, a *Wolbachia* não possui a maquinaria necessária para a produção de lipídeos, dependendo portanto do hospedeiro para a obtenção do mesmo (LEE *et al.*, 2008; VOLLMER *et al.*, 2013).

Portanto, dado que *npc1b* foi ativado significativamente em *wMel\_Mock*, e sua expressão foi 1,34-1,37 vezes maior no grupo de indivíduos contendo a bactéria em cenários de infecção viral (apesar de não significativo estatisticamente), pode-se hipotetizar que *Wolbachia* esteja induzindo a expressão deste gene, de forma a gerar um aumento no transporte lipídico por parte do hospedeiro, e assim obter acesso a tal nutriente. Esta necessidade energética por parte da bactéria é corroborada por Caragata e colaboradores, onde viu-se que tanto a cepa *wMel* quanto *wMelPop* diminuem a quantidade de colesterol livre disponível no organismo (CARAGATA *et al.*, 2014).

## 7 CONCLUSÃO

Através da caracterização da competência vetorial de *Ae. aegypti* contendo *Wolbachia*, fomos capazes de observar a eficiência da mesma em bloquear a prevalência, intensidade, infecção, disseminação e transmissão viral até mesmo em cenários de coinfeção, onde o hospedeiro foi desafiado simultaneamente contra ZIKV e dois sorotipos distintos de DENV.

Mostramos ainda que a capacidade de proteção antiviral de *Wolbachia* obtida via RT-qPCR foi corroborado pelo nosso experimento de imunofluorescência, e que este fenótipo provavelmente está associado com a ativação de determinados genes do sistema imune do hospedeiro. Finalmente, nós mostramos a existência de competição assimétrica entre os vírus, com distintos níveis de dominância. De forma geral, nossos resultados salientam o uso promissor da cepa *wMel* de *Wolbachia* como uma ferramenta limitante da transmissão de arbovírus em campo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABAD-FRANCH, F. *et al.* Mosquito-Disseminated Insecticide for Citywide Vector Control and Its Potential to Block Arbovirus Epidemics: Entomological Observations and Modeling Results from Amazonian Brazil. *PLOS Medicine*, v. 14, n. 1, p. e1002213, 2017.
- AGGARWAL, K.; SILVERMAN, N. Positive and negative regulation of the *Drosophila* immune response. *BMB reports*, v. 41, n. 4, p. 267–77, 30 abr. 2008.
- ALIOTA, M. T.; WALKER, E. C.; *et al.* The wMel Strain of *Wolbachia* Reduces Transmission of Chikungunya Virus in *Aedes aegypti*. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 10, n. 4, p. e0004677, 2016.
- ALIOTA, M. T.; PEINADO, S. A.; *et al.* The wMel strain of *Wolbachia* Reduces Transmission of Zika virus by *Aedes aegypti*. *Scientific Reports*, v. 6, n. 4, p. 28792, 1 jul. 2016.
- ALPHEY, L. Genetic control of mosquitoes. *Annual review of entomology*, v. 59, p. 205–24, 7 jan. 2014.
- AMUZU, H. E.; MCGRAW, E. A. *Wolbachia*-Based Dengue Virus Inhibition Is Not Tissue-Specific in *Aedes aegypti*. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 10, n. 11, p. e0005145, 17 nov. 2016.
- ANDERSON, S. L.; RICHARDS, S. L.; SMARTT, C. T. A simple method for determining arbovirus transmission in mosquitoes. *Journal of the American Mosquito Control Association*, v. 26, n. 1, p. 108–11, mar. 2010.
- ANDRAL, L. *et al.* Studies on yellow fever in Ethiopia. 3. Serological and virological studies of the woodland fauna. *Bulletin of the World Health Organization*, v. 38, n. 6, p. 855–61, 1968.
- APOSTOLAKI, A. *et al.* Transinfection of the olive fruit fly *Bactrocera oleae* with *Wolbachia*: towards a symbiont-based population control strategy. *Journal of Applied Entomology*, v. 135, n. 7, p. 546–553, 17 ago. 2011.
- ARAÚJO, L. M.; FERREIRA, M. L. B.; NASCIMENTO, O. J. Guillain-Barré syndrome associated with the Zika virus outbreak in Brazil. *Arquivos de neuro-psiquiatria*, v. 74, n. 3, p. 253–255, mar. 2016.
- ARBOUZOVA, N. I.; ZEIDLER, M. P. JAK/STAT signalling in *Drosophila*: insights into conserved regulatory and cellular functions. *Development (Cambridge, England)*, v. 133, n. 14, p. 2605–16, 15 jul. 2006.
- ARMSTRONG, P. M.; RICO-HESSE, R. Differential Susceptibility of *Aedes aegypti* to Infection by the American and Southeast Asian Genotypes of Dengue Type 2 Virus. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, v. 1, n. 2, p. 159–168, jun. 2001.

- ARSLAN, A. *et al.* Spatial distribution and insecticide susceptibility status of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in dengue affected urban areas of Rawalpindi, Pakistan. *Journal of vector borne diseases*, v. 53, n. 2, p. 136–43, 2016.
- ASAD, S.; HALL-MENDELIN, S.; ASGARI, S. Downregulation of *Aedes aegypti* chromodomain helicase DNA binding protein 7/Kismet by *Wolbachia* and its effect on dengue virus replication. *Scientific Reports*, v. 6, n. October, p. 36850, 2016.
- ATYAME, C. M. *et al.* Cytoplasmic incompatibility as a means of controlling *Culex pipiens quinquefasciatus* mosquito in the islands of the south-western Indian Ocean. *PLoS neglected tropical diseases*, v. 5, n. 12, p. e1440, dez. 2011.
- AUBRY, M. *et al.* Seroprevalence of arboviruses among blood donors in French Polynesia, 2011–2013. *International Journal of Infectious Diseases*, v. 41, p. 11–12, dez. 2015.
- BALDINI, F. *et al.* Evidence of natural *Wolbachia* infections in field populations of *Anopheles gambiae*. *Nature communications*, v. 5, p. 3985, 2014.
- BALESTRINO, F. *et al.* Validation of a new larval rearing unit for *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) mass rearing. *PLoS ONE*, v. 9, n. 3, 2014.
- BARA, J. *et al.* Effect of Larval Competition on Extrinsic Incubation Period and Vectorial Capacity of *Aedes albopictus* for Dengue Virus. *Plos One*, v. 10, n. 5, p. e0126703, 2015.
- BARATA, E. A. *et al.* *Aedes aegypti* (L.) population in an endemic area of dengue in the Southeast Brazil. *Revista de saúde pública*, v. 35, n. 3, p. 237–42, jun. 2001.
- BARGIELOWSKI, I. *et al.* Comparison of life history characteristics of the genetically modified OX513A line and a wild type strain of *Aedes aegypti*. *PloS one*, v. 6, n. 6, p. e20699, 2011.
- BARGIELOWSKI, I. *et al.* Flight performance and teneral energy reserves of two genetically-modified and one wild-type strain of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. *Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, N.Y.)*, v. 12, n. 12, p. 1053–8, dez. 2012.
- BARRANGOU, R. *et al.* CRISPR Provides Acquired Resistance Against Viruses in Prokaryotes. *Science*, v. 315, n. 5819, p. 1709–1712, 23 mar. 2007.
- BATON, L. A. *et al.* wFlu: characterization and evaluation of a native *Wolbachia* from the mosquito *Aedes fluviatilis* as a potential vector control agent. *PloS one*, v. 8, n. 3, p. e59619, jan. 2013.
- BELLINATO, D. F. *et al.* Resistance Status to the Insecticides Temephos , Deltamethrin , and Diflubenzuron in Brazilian *Aedes aegypti* Populations. v. 2016, 2016.
- BENEDICT, M. Q.; ROBINSON, A. S. The first releases of transgenic mosquitoes: an argument for the sterile insect technique. *Trends in parasitology*, v. 19, n. 8, p. 349–55, ago. 2003.

- BENNETT, S. N. *et al.* Molecular evolution of dengue 2 virus in Puerto Rico: positive selection in the viral envelope accompanies clade reintroduction. *Journal of General Virology*, v. 87, n. 4, p. 885–893, 1 abr. 2006.
- BHARAJ, P. *et al.* Concurrent infections by all four dengue virus serotypes during an outbreak of dengue in 2006 in Delhi, India. *Virology Journal*, v. 5, n. 1, p. 1, 9 jan. 2008.
- BIAN, G. *et al.* Replacing a native Wolbachia with a novel strain results in an increase in endosymbiont load and resistance to dengue virus in a mosquito vector. *PLoS neglected tropical diseases*, v. 7, n. 6, p. e2250, jun. 2013.
- BIAN, G. *et al.* The endosymbiotic bacterium Wolbachia induces resistance to dengue virus in *Aedes aegypti*. *PLoS pathogens*, v. 6, n. 4, p. e1000833, abr. 2010.
- BLACK IV, W. C. *et al.* Flavivirus susceptibility in *Aedes aegypti*. *Archives of Medical Research*, v. 33, n. 4, p. 379–388, 2002.
- BLAGROVE, M. S. C. *et al.* A Wolbachia wMel Transinfection in *Aedes albopictus* Is Not Detrimental to Host Fitness and Inhibits Chikungunya Virus. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 7, n. 3, p. e2152, 28 mar. 2013.
- BLAGROVE, M. S. C. *et al.* Wolbachia strain wMel induces cytoplasmic incompatibility and blocks dengue transmission in *Aedes albopictus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 109, n. 1, p. 255–60, 3 jan. 2012.
- BOCCOLINI, D. *et al.* Experimental investigation of the susceptibility of Italian *Culex pipiens* mosquitoes to Zika virus infection. *Eurosurveillance*, v. 21, n. 35, p. 30328, 1 set. 2016.
- BOORMAN, J. P.; PORTERFIELD, J. S. A simple technique for infection of mosquitoes with viruses; transmission of Zika virus. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 50, n. 3, p. 238–42, maio 1956.
- BRADY, O. J. *et al.* Refining the Global Spatial Limits of Dengue Virus Transmission by Evidence-Based Consensus. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 6, n. 8, p. e1760, 7 ago. 2012.
- BRAGA, I. A.; VALLE, D. *Aedes Aegypti* Insecticides, Mechanisms of Action and Resistance. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, v. 16, n. 4, p. 279–293, dez. 2007.
- BRASIL, P. *et al.* Guillain-Barré syndrome associated with Zika virus infection. *The Lancet*, v. 387, n. 10026, p. 1482, abr. 2016.
- BROWNSTEIN, J. .; HETT, E.; O'NEILL, S. . The potential of virulent Wolbachia to modulate disease transmission by insects. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 84, n. 1, p. 24–29, set. 2003.
- BUATHONG, R. *et al.* Detection of Zika Virus Infection in Thailand, 2012-2014. *The*

- American journal of tropical medicine and hygiene*, v. 93, n. 2, p. 380–3, ago. 2015.
- BURT, A. Heritable strategies for controlling insect vectors of disease. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 2014.
- BURT, A. Site-specific selfish genes as tools for the control and genetic engineering of natural populations. *Proceedings. Biological sciences*, v. 270, n. 1518, p. 921–8, 7 maio 2003.
- BUTTIGIEG, P. L.; RAMETTE, A. A guide to statistical analysis in microbial ecology: a community-focused, living review of multivariate data analyses. *FEMS microbiology ecology*, v. 90, n. 3, p. 543–50, dez. 2014.
- CALVET, G. *et al.* Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 16, n. 6, p. 653–660, jun. 2016.
- CAMPBELL, L. P. *et al.* Climate change influences on global distributions of dengue and chikungunya virus vectors. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, v. 370, n. 1665, 2015.
- CAMPOS, G. S.; BANDEIRA, A. C.; SARDI, S. I. Zika Virus Outbreak, Bahia, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, v. 21, n. 10, p. 1885–1886, out. 2015.
- CAO-LORMEAU, V.-M. *et al.* Emerging arboviruses in the Pacific. *The Lancet*, v. 384, n. 9954, p. 1571–1572, nov. 2014.
- CAO-LORMEAU, V.-M. *et al.* Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study. *The Lancet*, v. 387, n. 10027, p. 1531–1539, abr. 2016.
- CAO-LORMEAU, V. M. *et al.* Zika virus, French polynesia, South pacific, 2013. *Emerging infectious diseases*, v. 20, n. 6, p. 1085–6, jun. 2014.
- CARAGATA, E. P. *et al.* Competition for Amino Acids Between Wolbachia and the Mosquito Host, *Aedes aegypti*. *Microbial Ecology*, v. 67, n. 1, p. 205–218, 2014.
- CARAGATA, E. P. *et al.* Diet-Induced Nutritional Stress and Pathogen Interference in Wolbachia-Infected *Aedes aegypti*. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 10, n. 11, p. e0005158, 2016.
- CARAGATA, E. P. *et al.* Dietary cholesterol modulates pathogen blocking by Wolbachia. *PLoS pathogens*, v. 9, n. 6, p. e1003459, jun. 2013.
- CARAGATA, E. P.; DUTRA, H. L. C.; MOREIRA, L. A. Exploiting Intimate Relationships: Controlling Mosquito-Transmitted Disease with Wolbachia. *Trends in Parasitology*, v. 32, n. 3, p. 207–218, 2016.
- CARDOSO, C. W. *et al.* Outbreak of Exanthematous Illness Associated with Zika, Chikungunya, and Dengue Viruses, Salvador, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, v. 21, n.

12, p. 2274–2276, dez. 2015.

CARVALHO, D. O. *et al.* Suppression of a field population of *Aedes aegypti* in Brazil by sustained release of transgenic male mosquitoes. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 9, n. 7, p. 1–15, 2015.

CHAMPION, S. R.; VITEK, C. J. *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* Habitat Preferences in South Texas, USA. *Environmental Health Insights*, v. 2014, n. Suppl. 2, p. 35–42, 2014.

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

CHAN, Y.-S. *et al.* Insect Population Control by Homing Endonuclease-Based Gene Drive: An Evaluation in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, v. 188, n. 1, p. 33–44, 1 maio 2011.

CHAN, Y.-S. *et al.* Optimising Homing Endonuclease Gene Drive Performance in a Semi-Refractory Species: The *Drosophila melanogaster* Experience. *PLoS ONE*, v. 8, n. 1, p. e54130, 18 jan. 2013.

CHANG, C. *et al.* The Zika outbreak of the 21st century. *Journal of Autoimmunity*, v. 68, p. 1–13, abr. 2016.

CHANG, T.-Y. *et al.* Cholesterol sensing, trafficking, and esterification. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, v. 22, p. 129–157, 2006.

CHARREL, R. N.; DE LAMBALLERIE, X.; RAOULT, D. Chikungunya outbreaks-the globalization of vectorborne diseases. *The New England journal of medicine*, v. 356, n. 8, p. 769–71, 22 fev. 2007.

CHEN, L.; ZHU, C.; ZHANG, D. Naturally occurring incompatibilities between different *Culex pipiens pallens* populations as the basis of potential mosquito control measures. *PLoS neglected tropical diseases*, v. 7, n. 1, p. e2030, jan. 2013.

CHEN, R.; VASILAKIS, N. Dengue-Quo tu et quo vadis? *Viruses*, v. 3, n. 9, p. 1562–1608, 2011.

CHENG, G. *et al.* Mosquito Defense Strategies against Viral Infection. *Trends in Parasitology*, v. xx, p. 1–10, 2015.

CHOUIN-CARNEIRO, T. *et al.* Differential susceptibilities of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from the Americas to Zika virus. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. Submitted, p. 1–11, 2016.

CHRISTOPHIDES, G. K.; MEISTER, S.; XU, J. Immunity-Related Genes and Gene Families in *Anopheles gambiae*. *Science*, v. 298, n. 5591, p. 159–165, 2002.

COLPITTS, T. M. *et al.* Alterations in the *aedes aegypti* transcriptome during infection with west nile, dengue and yellow fever viruses. *PLoS Pathogens*, v. 7, n. 9, 2011.

CONG, L. *et al.* Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems. *Science*, v.

339, n. 6121, p. 819–823, 15 fev. 2013.

CONSOLI, R. A. G. B.; OLIVEIRA, R. L. DE. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. p. 228, 1994.

CURTIS, C. F. *et al.* A field trial on control of *Culex quinquefasciatus* by release of a strain integrating cytoplasmic incompatibility and a translocation. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, v. 31, n. 2–3, p. 181–190, 5 mar. 1982.

D GUEDES, D. R. *et al.* Zika virus replication in the mosquito *Culex quinquefasciatus* in Brazil. *PREPRINT*, 2016.

DARWISH, M. A. *et al.* A sero-epidemiological survey for certain arboviruses (Togaviridae) in Pakistan. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 77, n. 4, p. 442–5, 1983.

DE ROODE, J. C. *et al.* Dynamics of Multiple Infection and Within-Host Competition in Genetically Diverse Malaria Infections. *The American Naturalist*, v. 166, n. 5, p. 531–542, nov. 2005.

DELISLE, E. *et al.* Chikungunya outbreak in Montpellier, France, September to October 2014. *Euro surveillance: bulletin Européen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*, v. 20, n. 17, 2015.

DEREDEC, A.; GODFRAY, H. C. J.; BURT, A. Requirements for effective malaria control with homing endonuclease genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 108, n. 43, p. E874-80, 25 out. 2011.

DIAGNE, C. T. *et al.* Potential of selected Senegalese *Aedes* spp. mosquitoes (Diptera: Culicidae) to transmit Zika virus. *BMC infectious diseases*, v. 15, p. 492, 2015.

DIALLO, D. *et al.* Zika Virus Emergence in Mosquitoes in Southeastern Senegal, 2011. *PLoS ONE*, v. 9, n. 10, p. e109442, 13 out. 2014.

DICK, G. W. Epidemiological notes on some viruses isolated in Uganda; Yellow fever, Rift Valley fever, Bwamba fever, West Nile, Mengo, Semliki forest, Bunyamwera, Ntaya, Uganda S and Zika viruses. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 47, n. 1, p. 13–48, jan. 1953.

DICK; KITCHEN, S. .; HADDOW, A. . Zika Virus (I). Isolations and serological specificity. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 46, n. 5, p. 509–520, set. 1952.

DICKINSON, D. B. *et al.* Antibodies against certain arboviruses in sera from human beings and domestic animals from the south-western and north-western regions of the Cape Province of South Africa. *The South African journal of medical sciences*, v. 30, n. 1, p. 11–8, jul. 1965.

DOBSON, S. L. Evolution of Wolbachia cytoplasmic incompatibility types. *Evolution*;

- international journal of organic evolution*, v. 58, n. 10, p. 2156–66, out. 2004.
- DODSON, B. L. *et al.* Wolbachia Enhances West Nile Virus (WNV) Infection in the Mosquito *Culex tarsalis*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 8, n. 7, 2014.
- DOMINGO, C. *et al.* Molecular diagnosis of flaviviruses. *Future Virology*, v. 6, n. 9, p. 1059–1074, set. 2011.
- DOSTERT, C. *et al.* The Jak-STAT signaling pathway is required but not sufficient for the antiviral response of drosophila. *Nature Immunology*, v. 6, n. 9, p. 946–953, 7 set. 2005.
- DOWD, K. A. *et al.* Rapid development of a DNA vaccine for Zika virus. v. 3197, 2016.
- DUFFY, M. R. *et al.* Zika Virus Outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *New England Journal of Medicine*, v. 360, n. 24, p. 2536–2543, 11 jun. 2009.
- DUONG, V. *et al.* Genetic diversity and lineage dynamic of dengue virus serotype 1 (DENV-1) in Cambodia. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 15, p. 59–68, abr. 2013.
- DUPONT-ROUZEYROL, M. *et al.* Co-infection with Zika and dengue viruses in 2 patients, New Caledonia, 2014. *Emerging infectious diseases*, v. 21, n. 2, p. 381–2, fev. 2015.
- DURAND, M. A. *et al.* An outbreak of dengue fever in Yap State. *Pacific health dialog*, v. 12, n. 2, p. 99–102, set. 2005.
- DUTRA, H. L. C. *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, 2015.
- DUTRA, H. L. C. *et al.* Wolbachia Blocks Currently Circulating Zika Virus Isolates in Brazilian *Aedes aegypti* Mosquitoes. *Cell Host & Microbe*, v. 19, n. 6, p. 771–774, jun. 2016.
- DUTTON, T. J.; SINKINS, S. P. Strain-specific quantification of Wolbachia density in *Aedes albopictus* and effects of larval rearing conditions. *Insect molecular biology*, v. 13, n. 3, p. 317–22, jun. 2004.
- DYER, O. Sixty seconds on . . . Zika virus. *BMJ (Clinical research ed.)*, v. 352, p. i467, 2016.
- DYER, O. Zika virus spreads across Americas as concerns mount over birth defects. *Bmj*, v. 6983, n. December, p. h6983, 2015.
- ECDC. *Zika virus epidemic in the Americas: potential association with microcephaly and Guillain-Barré syndrome*. . [S.l: s.n.], 2015.
- FAGBAMI, A. H. Zika virus infections in Nigeria: virological and seroepidemiological investigations in Oyo State. *The Journal of hygiene*, v. 83, n. 2, p. 213–9, out. 1979.
- FARIA, N. R. *et al.* Zika virus in the Americas: Early epidemiological and genetic findings. *Science*, v. 5036, n. March, p. 1–9, 2016.
- FAUCI, A. S.; MORENS, D. M. Zika Virus in the Americas — Yet Another Arbovirus

Threat. *New England Journal of Medicine*, v. 374, n. 7, p. 601–604, 18 fev. 2016.

FERGUSON, N. M. *et al.* Modeling the impact on virus transmission of Wolbachia -mediated blocking of dengue virus infection of *Aedes aegypti*. *Science Translational Medicine*, v. 7, n. 279, p. 279ra37, 2015.

FERNANDES, R. S. *et al.* *Culex quinquefasciatus* from Rio de Janeiro Is Not Competent to Transmit the Local Zika Virus. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 10, n. 9, p. 1–13, 2016.

FIGUEIREDO, R. M. P. DE *et al.* Co-infection of Dengue virus by serotypes 3 and 4 in patients from Amazonas, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 53, n. 6, p. 321–323, 2011.

FLORES, M. S.; BURGESS, T. H.; RAJNIK, M. Zika virus: A primer for clinicians. *Cleveland Clinic Journal of Medicine*, v. 83, n. 4, p. 261–270, 2016.

FRANZ, A. *et al.* Tissue Barriers to Arbovirus Infection in Mosquitoes. *Viruses*, v. 7, n. 7, p. 3741–3767, 2015.

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

FRENTIU, F. D. *et al.* Wolbachia-mediated resistance to dengue virus infection and death at the cellular level. *PloS one*, v. 5, n. 10, p. e13398, jan. 2010.

GANTZ, V. M. *et al.* Highly efficient Cas9-mediated gene drive for population modification of the malaria vector mosquito *Anopheles stephensi*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 112, n. 49, p. E6736–E6743, 2015.

GATHERER, D.; KOHL, A. Zika virus: a previously slow pandemic spreads rapidly through the Americas. *The Journal of general virology*, v. 97, n. 2, p. 269–73, fev. 2016.

GEORGEL, P. *et al.* *Drosophila* immune deficiency (IMD) is a death domain protein that activates antibacterial defense and can promote apoptosis. *Developmental cell*, v. 1, n. 4, p. 503–14, out. 2001.

GESER, A.; HENDERSON, B. E.; CHRISTENSEN, S. A multipurpose serological survey in Kenya. 2. Results of arbovirus serological tests. *Bulletin of the World Health Organization*, v. 43, n. 4, p. 539–52, 1970.

GHELELOVITCH, S. Genetic determinism of sterility in the cross-breeding of various strains of *Culex autogenicus* Roubaud. *Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences*, v. 234, n. 24, p. 2386–8, 9 jun. 1952.

GIORDANO, B. V.; GASPAROTTO, A.; HUNTER, F. F. A Checklist of the 67 Mosquito Species of Ontario, Canada. *Journal of the American Mosquito Control Association*, v. 31, n. 1, p. 101–103, mar. 2015.

- GJENERO-MARGAN, I. *et al.* Autochthonous dengue fever in Croatia, August-September 2010. *Euro surveillance: bulletin Européen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*, v. 16, n. 9, 2011.
- 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, 5 ago. 2010.
- GOULD, E. A.; HIGGS, S. Impact of climate change and other factors on emerging arbovirus diseases. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 103, n. 2, p. 109–121, fev. 2009.
- GRAHAM, R. I. *et al.* *Wolbachia* in a major African crop pest increases susceptibility to viral disease rather than protects. *Ecology Letters*, v. 15, n. 9, p. 993–1000, set. 2012.
- GRARD, G. *et al.* Zika Virus in Gabon (Central Africa) - 2007: A New Threat from *Aedes albopictus*? *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 8, n. 2, 2014.
- GRUNNILL, M.; BOOTS, M. How important is vertical transmission of dengue viruses by mosquitoes (Diptera: Culicidae)? *Journal of Medical Entomology*, v. 53, n. 1, p. 1–19, 2016.
- GUBLER, D. J. Dengue, Urbanization and Globalization: The Unholy Trinity of the 21(st) Century. *Tropical medicine and health*, v. 39, n. 4 Suppl, p. 3–11, dez. 2011.
- GUBLER, D. J. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clinical microbiology reviews*, v. 11, n. 3, p. 480–96, jul. 1998a.
- GUBLER, D. J. Resurgent vector-borne diseases as a global health problem. *Emerging infectious diseases*, v. 4, n. 3, p. 442–50, 1998b.
- GUBLER, D. J. The Global Emergence/Resurgence of Arboviral Diseases As Public Health Problems. *Archives of Medical Research*, v. 33, n. 4, p. 330–342, 2002.
- GUEDES *et al.* Zika virus replication in the mosquito *Culex quinquefasciatus* in Brazil. PREPRINT. doi: 10.1101/073197, 2016.
- GUILLAUMOT, L. Arboviruses and their vectors in the Pacific--status report. *Pacific health dialog*, v. 12, n. 2, p. 45–52, set. 2005.
- GUO, X. *et al.* *Culex pipiens quinquefasciatus*: a potential vector to transmit Zika virus. *Emerging Microbes & Infections*, v. 5, n. 9, p. e102, 2016.
- HADDOW, A. D. *et al.* Genetic characterization of Zika virus strains: geographic expansion of the Asian lineage. *PLoS neglected tropical diseases*, v. 6, n. 2, p. e1477, 2012.
- HADDOW, A. J. *et al.* Twelve isolations of Zika virus from *Aedes* (*Stegomyia*) *africanus* (Theobald) taken in and above a Uganda forest. *Bulletin of the World Health Organization*, v. 31, p. 57–69, 1964.
- HALL, A. B. *et al.* A male-determining factor in the mosquito *Aedes aegypti*. *Science (New*

- York, N.Y.), v. 348, n. 6240, p. 1268–70, 12 jun. 2015.
- HALSTEAD, S. B. *et al.* Is there an inapparent dengue explosion? *Lancet (London, England)*, v. 353, n. 9158, p. 1100–1, 27 mar. 1999.
- HAMEL, R. *et al.* Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. *Journal of virology*, v. 89, n. 17, p. 8880–96, set. 2015.
- HAMMON, W. M.; SCHRACK, W. D.; SATHER, G. E. Serological survey for a arthropod-borne virus infections in the Philippines. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, v. 7, n. 3, p. 323–8, maio 1958.
- HAMMOND, A. *et al.* A CRISPR-Cas9 gene drive system targeting female reproduction in the malaria mosquito vector *Anopheles gambiae*. *Nature Biotechnology*, v. 34, n. 1, p. 78–83, 2016.
- HANCOCK, P. A; GODFRAY, H. C. J. Modelling the spread of Wolbachia in spatially heterogeneous environments. *Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society*, v. 9, n. 76, p. 3045–54, 7 nov. 2012.
- HARDY, J. L. *et al.* Intrinsic Factors Affecting Vector Competence of Mosquitoes for Arboviruses. *Annual Review of Entomology*, v. 28, n. 1, p. 229–262, jan. 1983.
- HARRIS, A. F. *et al.* Successful suppression of a field mosquito population by sustained release of engineered male mosquitoes. *Nature Biotechnology*, v. 30, n. 9, p. 828–830, 10 set. 2012.
- HAYES, E. B. Zika Virus Outside Africa. *Emerging Infectious Diseases*, v. 15, n. 9, p. 1347–1350, set. 2009.
- HEANG, V. *et al.* Zika virus infection, Cambodia, 2010. *Emerging infectious diseases*, v. 18, n. 2, p. 349–51, fev. 2012.
- HEITMANN, A. *et al.* Experimental transmission of Zika virus by mosquitoes from central Europe. *Eurosurveillance*, v. 22, n. 2, p. 30437, 12 jan. 2017.
- HENNESSEY, M.; FISCHER, M.; STAPLES, J. E. Zika Virus Spreads to New Areas — Region of the Americas, May 2015–January 2016. *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report*, v. 65, n. 3, p. 1–4, 22 jan. 2016.
- HERTIG, M.; WOLBACH, S. B. Studies on Rickettsia-Like Micro-Organisms in Insects. *The Journal of medical research*, v. 44, n. 3, p. 329–374.7, mar. 1924.
- HILLS, S. L. *et al.* Transmission of Zika Virus Through Sexual Contact with Travelers to Areas of Ongoing Transmission — Continental United States, 2016. *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report*, v. 65, n. 8, 26 fev. 2016.
- HILLYER, J. F.; SCHMIDT, S. L.; CHRISTENSEN, B. M. Rapid phagocytosis and melanization of bacteria and Plasmodium sporozoites by hemocytes of the mosquito Aedes

- aegypti. *The Journal of parasitology*, v. 89, n. 1, p. 62–69, 2003.
- HOFFMANN, A. A. Incompatible mosquitoes. *Nature*, v. 436, n. 7048, p. 189, 2005.
- HOFFMANN, A.; TURELLI, M. Facilitating Wolbachia introductions into mosquito populations through insecticide-resistance selection. ... *of the Royal ...*, n. April, 2013.
- HOFFMANN, A A *et al.* Successful establishment of Wolbachia in Aedes populations to suppress dengue transmission. *Nature*, v. 476, n. 7361, p. 454–7, 25 ago. 2011.
- HOWE, G. M. A world geography of human diseases. *Medical History*, v. 23, n. 2, p. 242, 1979.
- HUANG, Y.-J. S. *et al.* Culex Species Mosquitoes and Zika Virus. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, v. XX, n. Xx, p. vbz.2016.2058, 2016.
- HUGHES, G. L. *et al.* Wolbachia strain wAlbB enhances infection by the rodent malaria parasite Plasmodium berghei in Anopheles gambiae mosquitoes. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 78, n. 5, p. 1491–1495, 2012.
- HUSSAIN, M. *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. 851–8, jan. 2013.
- JINEK, M. *et al.* A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science*, v. 337, n. 6096, p. 816–821, 17 ago. 2012.
- JOHNSON, K. The Impact of Wolbachia on Virus Infection in Mosquitoes. *Viruses*, v. 7, n. 11, p. 5705–5717, 2015.
- JOUBERT, D. A.; O'NEILL, S. L. Comparison of Stable and Transient Wolbachia Infection Models in Aedes aegypti to Block Dengue and West Nile Viruses. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 11, n. 1, p. e0005275, 4 jan. 2017.
- JUPATANAKUL, N.; SIM, S.; DIMOPOULOS, G. Aedes aegypti ML and Niemann-Pick type C family members are agonists of dengue virus infection. *Developmental & Comparative Immunology*, v. 43, n. 1, p. 1–9, mar. 2014.
- KAMBRIS, Z. *et al.* 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.
- KILBOURN, A. M. *et al.* Health evaluation of free-ranging and semi-captive orangutans (Pongo pygmaeus pygmaeus) in Sabah, Malaysia. *Journal of Wildlife Diseases*, v. 39, n. 1, p. 73–83, jan. 2003.
- KILPATRICK, A. M.; RANDOLPH, S. E. Drivers, dynamics, and control of emerging vector-borne zoonotic diseases. *The Lancet*, v. 380, n. 9857, p. 1946–1955, 2012.
- KIRYA, B. G.; OKIA, N. O. A yellow fever epizootic in Zika Forest, Uganda, during 1972: Part 2: Monkey serology. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 71, n. 4, p. 300–303, jan. 1977.

- KNIPLING, E. F. Possibilities of insect control or eradication through the use of sexually sterile males. *Journal of Economic Entomology*, v. 48, n. 4, p. 459–462, 1955.
- KNIPLING, E. F. *The eradication of the screwworm*. [S.l: s.n.], 1960. v. 203.
- KOKERNOT, R. H. *et al.* Survey for antibodies against arthropod-borne viruses in the sera of indigenous residents of Angola. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 59, n. 5, p. 563–570, set. 1965.
- KRAEMER, M. U. G. *et al.* The global compendium of *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* occurrence. *Scientific data*, v. 2, p. 150035, 2015.
- KRAMER, L. D. *et al.* Dissemination barriers for western equine encephalomyelitis virus in *Culex tarsalis* infected after ingestion of low viral doses. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 30, n. 1, p. 190–197, 1981.
- KRAMER, L. D.; EBEL, G. D. Dynamics of Flavivirus Infection in Mosquitoes. *Advances in Virus Research*, v. 60, p. 187–232, 2003.
- KREUDER JOHNSON, C. *et al.* Spillover and pandemic properties of zoonotic viruses with high host plasticity. *Scientific reports*, v. 5, p. 14830, 2015.
- KWONG, J. C.; DRUCE, J. D.; LEDER, K. Zika virus infection acquired during brief travel to Indonesia. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, v. 89, n. 3, p. 516–7, set. 2013.
- LACROIX, R. *et al.* Open Field Release of Genetically Engineered Sterile Male *Aedes aegypti* in Malaysia. *PLoS ONE*, v. 7, n. 8, p. e42771, 27 ago. 2012.
- LAMBRECHTS, L. *et al.* Genetic specificity and potential for local adaptation between dengue viruses and mosquito vectors. *BMC Evolutionary Biology*, v. 9, n. 1, p. 160, 9 jul. 2009.
- LANCIOTTI, R. S. *et al.* Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. *Emerging infectious diseases*, v. 14, n. 8, p. 1232–9, ago. 2008.
- LAROCCA, R. A. *et al.* Vaccine protection against Zika virus from Brazil. *Nature*, v. 536, n. 7617, p. 474–478, 28 jun. 2016.
- LAVEN, H. Crossing Experiments with *Culex* Strains. *Evolution*, v. 5, n. 4, p. 370, dez. 1951.
- LAVEN, H. Speciation and evolution in *Culex pipiens*. *Genetics of insect vectors of disease*, 1967.
- LEDERMANN, J. P. *et al.* *Aedes hensilli* as a Potential Vector of Chikungunya and Zika Viruses. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 8, n. 10, p. e3188, 9 out. 2014.
- LEE, C.-J. *et al.* Cholesterol effectively blocks entry of flavivirus. *Journal of virology*, v. 82, n. 13, p. 6470–80, jul. 2008.

- LEMAITRE, B. *et al.* The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/Cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*, v. 86, n. 6, p. 973–983, 1996.
- LI, M. I. *et al.* Oral Susceptibility of Singapore *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (Linnaeus) to Zika Virus. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 6, n. 8, p. e1792, 28 ago. 2012.
- LI, S.-J. *et al.* Plant-mediated horizontal transmission of *Wolbachia* between whiteflies. *The ISME Journal*, p. 1–10, 2016.
- LONDONO-RENTERIA, B. *et al.* Dengue Virus Infection of *Aedes aegypti* Requires a Putative Cysteine Rich Venom Protein. *PLOS Pathogens*, v. 11, n. 10, p. e1005202, 22 out. 2015.
- LONGDON, B. *et al.* The causes and consequences of changes in virulence following pathogen host shifts. *PLoS pathogens*, v. 11, n. 3, p. e1004728, 2015.
- LU, P. *et al.* *Wolbachia* Induces Density-Dependent Inhibition to Dengue Virus in Mosquito Cells. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 6, n. 7, p. e1754, 24 jul. 2012.
- MACIEL-DE-FREITAS, R. *et al.* Movement of Dengue Vectors Between the Human Modified Environment and an Urban Forest in Rio de Janeiro. *Journal of Medical Entomology*, v. 43, n. 6, p. 1112–1120, 1 nov. 2006.
- MACIEL-DE-FREITAS, R. *et al.* Undesirable consequences of insecticide resistance following *Aedes aegypti* control activities due to a dengue outbreak. *PloS one*, v. 9, n. 3, p. e92424, jan. 2014.
- MACNAMARA, F. . Zika virus: A report on three cases of human infection during an epidemic of jaundice in Nigeria. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 48, n. 2, p. 139–145, mar. 1954.
- MAKAROVA, K. S. *et al.* An updated evolutionary classification of CRISPR–Cas systems. *Nature Reviews Microbiology*, v. 13, n. 11, p. 722–736, 28 set. 2015.
- MALI, P. *et al.* RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science (New York, N.Y.)*, v. 339, n. 6121, p. 823–6, 15 fev. 2013.
- MARCHETTE, N. J.; GARCIA, R.; RUDNICK, A. Isolation of Zika virus from *Aedes aegypti* mosquitoes in Malaysia. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, v. 18, n. 3, p. 411–5, maio 1969.
- MARCOMBE, S. *et al.* Insecticide resistance in the dengue vector *Aedes aegypti* from Martinique: distribution, mechanisms and relations with environmental factors. *PloS one*, v. 7, n. 2, p. e30989, 2012.
- MARTELLI, C. M. T. *et al.* Economic Impact of Dengue: Multicenter Study across Four Brazilian Regions. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 9, n. 9, p. e0004042, 24 set. 2015.
- MARTÍN-ACEBES, M. A.; SAIZ, J.-C. West Nile virus: A re-emerging pathogen revisited.

- World journal of virology*, v. 1, n. 2, p. 51–70, 12 abr. 2012.
- MARTINS, V. E. P. *et al.* Occurrence of Natural Vertical Transmission of Dengue-2 and Dengue-3 Viruses in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Fortaleza, Ceará, Brazil. *PloS one*, v. 7, n. 7, p. e41386, jan. 2012.
- MAVALE, M. *et al.* Venereal transmission of chikungunya virus by *Aedes aegypti* mosquitoes (Diptera: Culicidae). *The American journal of tropical medicine and hygiene*, v. 83, n. 6, p. 1242–4, dez. 2010.
- MAY, R. M.; NOWAK, M. A. Coinfection and the Evolution of Parasite Virulence. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 261, n. 1361, p. 209–215, 22 ago. 1995.
- MCGRAW, E. A; O'NEILL, S. L. Beyond insecticides: new thinking on an ancient problem. *Nature reviews. Microbiology*, v. 11, n. 3, p. 181–93, mar. 2013.
- MCMENIMAN, C.; LANE, R.; CASS, B. Stable introduction of a life-shortening *Wolbachia* infection into the mosquito *Aedes aegypti*. *Science*, v. 323, n. January, p. 141–144, 2009.
- MEDLOCK, J. M. *et al.* A review of the invasive mosquitoes in Europe: ecology, public health risks, and control options. *Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, N.Y.)*, v. 12, n. 6, p. 435–47, jun. 2012.
- MERÇOT, H.; POINSOT, D. Infection by *Wolbachia*: from passengers to residents. *Comptes rendus biologiques*, v. 332, n. 2–3, p. 284–97, 2009.
- MESSINA, J. P. *et al.* Mapping global environmental suitability for Zika virus. *eLife*, v. 5, 19 abr. 2016.
- METTLER, N. E.; CLARKE, D. H.; CASALS, J. Hemagglutination inhibition with arboviruses: relationship between titers and source of erythrocytes. *Applied microbiology*, v. 22, n. 3, p. 377–9, set. 1971.
- 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.
- MONLUN, E. *et al.* Surveillance of the circulation of arbovirus of medical interest in the region of eastern Senegal. *Bulletin de la Société de pathologie exotique (1990)*, v. 86, n. 1, p. 21–8, 1993.
- MOORE, C. G.; WHITACRE, D. M. Competition in Mosquitoes. Production of *Aedes aegypti* Larval Growth Retardant at Various Densities and Nutrition Levels. *Annals of the Entomological Society of America*, v. 65, n. 4, p. 915–918, 17 jul. 1972.
- MOREIRA, L. A *et al.* A *Wolbachia* symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with dengue,

- Chikungunya, and Plasmodium. *Cell*, v. 139, n. 7, p. 1268–78, 24 dez. 2009.
- MORELI, M. L.; DA COSTA, V. G. A systematic review of molecular diagnostic methods for the detection of arboviruses in clinical specimens in Brazil and the importance of a differential diagnosis. *Virology Discovery*, v. 1, n. 1, p. 8, 2013.
- MOTULSKY, H. J.; BROWN, R. E. Detecting outliers when fitting data with nonlinear regression – a new method based on robust nonlinear regression and the false discovery rate. *BMC Bioinformatics*, v. 7, n. 1, p. 123, ago. 2006.
- MOUSSON, L. *et al.* *Wolbachia* modulates Chikungunya replication in *Aedes albopictus*. *Molecular Ecology*, v. 19, n. 9, p. 1953–1964, maio 2010.
- MULAMBA, C. *et al.* Widespread pyrethroid and DDT resistance in the major malaria vector *Anopheles funestus* in East Africa is driven by metabolic resistance mechanisms. *PloS one*, v. 9, n. 10, p. e110058, 15 out. 2014.
- MULLA, M. S. The future of insect growth regulators in vector control. *Journal of the American Mosquito Control Association*, v. 11, n. 2 Pt 2, p. 269–73, jun. 1995.
- MURRAY, K. O. *et al.* Identification of Dengue Fever Cases in Houston, Texas, with Evidence of Autochthonous Transmission Between 2003 and 2005. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, v. 13, n. 12, p. 835–845, dez. 2013.
- MUSSO, D. Zika Virus Transmission from French Polynesia to Brazil. *Emerging infectious diseases*, v. 21, n. 10, p. 1887, out. 2015.
- MUSSO, D.; GUBLER, D. J. Zika Virus. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 29, n. 3, p. 487–524, 30 jul. 2016.
- MUSSO, D.; NILLES, E. J.; CAO-LORMEAU, V.-M. Rapid spread of emerging Zika virus in the Pacific area. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, v. 20, n. 10, p. O595-6, out. 2014.
- MYAT THU, H. *et al.* Lineage extinction and replacement in dengue type 1 virus populations are due to stochastic events rather than to natural selection. *Virology*, v. 336, n. 2, p. 163–172, 2005.
- NEWMAN, C. M. *et al.* *Culex flavivirus* and west nile virus mosquito coinfection and positive ecological association in Chicago, United States. *Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, N.Y.)*, v. 11, n. 8, p. 1099–1105, 2011.
- NGUYET, M. N. *et al.* Host and viral features of human dengue cases shape the population of infected and infectious *Aedes aegypti* mosquitoes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 110, n. 22, p. 9072–7, 28 maio 2013.
- NKYA, T. E. *et al.* Impact of environment on mosquito response to pyrethroid insecticides:

- facts, evidences and prospects. *Insect biochemistry and molecular biology*, v. 43, n. 4, p. 407–16, abr. 2013.
- O'CONNOR, L. *et al.* Open release of male mosquitoes infected with a wolbachia biopesticide: field performance and infection containment. *PLoS neglected tropical diseases*, v. 6, n. 11, p. e1797, jan. 2012.
- OEHLER, E. *et al.* Zika virus infection complicated by Guillain-Barre syndrome--case report, French Polynesia, December 2013. *Euro surveillance : bulletin Européen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*, v. 19, n. 9, p. 7–9, 2014.
- OLIVA, C. F. *et al.* The sterile insect technique for controlling populations of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) on Reunion Island: mating vigour of sterilized males. *PloS one*, v. 7, n. 11, p. e49414, jan. 2012.
- OLIVEIRA MELO, A. S. *et al.* Zika virus intrauterine infection causes fetal brain abnormality and microcephaly: Tip of the iceberg? *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, v. 47, n. 1, p. 6–7, 2016.
- OLSON, J. G. *et al.* Zika virus, a cause of fever in Central Java, Indonesia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 75, n. 3, p. 389–393, jan. 1981.
- OSBORNE, S. E. *et al.* Antiviral protection and the importance of Wolbachia density and tissue tropism in *Drosophila simulans*. *Applied and environmental microbiology*, v. 78, n. 19, p. 6922–9, out. 2012.
- PAN, X. *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 of the United States of America*, v. 109, n. 1, p. E23-31, 3 jan. 2012.
- PAPATHANOS, P. A. *et al.* Sex separation strategies: past experience and new approaches. *Malaria journal*, v. 8 Suppl 2, p. S5, 2009.
- PAULSON, S. L.; GRIMSTAD, P. R.; CRAIG, G. B. Midgut and salivary gland barriers to La Crosse virus dissemination in mosquitoes of the *Aedes triseriatus* group. *Medical and Veterinary Entomology*, v. 3, n. 2, p. 113–123, 1989.
- PAUPY, C. *et al.* *Aedes albopictus*, an arbovirus vector: From the darkness to the light. *Microbes and Infection*, v. 11, n. 14, p. 1177–1185, 2009.
- PEPIN, K. M.; LAMBETH, K.; HANLEY, K. A. Asymmetric competitive suppression between strains of dengue virus. *BMC Microbiology*, v. 8, n. 1, p. 28, 2008.
- PESSANHA, J. E. M. *et al.* Cocirculation of two dengue virus serotypes in individual and pooled samples of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* larvae. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 44, n. 1, p. 103–5, 2011.

- PHUC, H. K. *et al.* Late-acting dominant lethal genetic systems and mosquito control. *BMC biology*, v. 5, p. 11, 2007.
- POINSOT, D.; CHARLAT, S.; MERÇOT, H. On the mechanism of Wolbachia-induced cytoplasmic incompatibility: confronting the models with the facts. *BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, v. 25, n. 3, p. 259–65, mar. 2003.
- POND, W. L. Arthropod-borne virus antibodies in sera from residents of South-East Asia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 57, p. 364–71, set. 1963.
- RADKE, E. G. *et al.* Dengue Outbreak in Key West, Florida, USA, 2009. *Emerging Infectious Diseases*, v. 18, n. 1, p. 135–137, jan. 2012.
- RANCÈS, E. *et al.* The relative importance of innate immune priming in Wolbachia-mediated dengue interference. *PLoS pathogens*, v. 8, n. 2, p. e1002548, fev. 2012.
- RANCÈS, E. *et al.* The toll and Imd pathways are not required for wolbachia-mediated dengue virus interference. *Journal of virology*, v. 87, n. 21, p. 11945–9, 2013.
- READ, A. F.; TAYLOR, L. H. The ecology of genetically diverse infections. *Science (New York, N.Y.)*, v. 292, n. 5519, p. 1099–102, 11 maio 2001.
- REEGAN, A. D. *et al.* Current status of genome editing in vector mosquitoes: A review. *BioScience Trends*, 2016.
- REZZA, G. Dengue and chikungunya: long-distance spread and outbreaks in naïve areas. *Pathogens and global health*, v. 108, n. 8, p. 349–55, dez. 2014.
- REZZA, G. *et al.* Infection with chikungunya virus in Italy: an outbreak in a temperate region. *Lancet (London, England)*, v. 370, n. 9602, p. 1840–6, 1 dez. 2007.
- RITCHIE, S. A. *et al.* Application of wMelPop Wolbachia Strain to Crash Local Populations of *Aedes aegypti*. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 9, n. 7, p. e0003930, 2015.
- ROBIN, Y.; MOUCHET, J. Serological and entomological study on yellow fever in Sierra Leone. *Bulletin de la Société de pathologie exotique et de ses filiales*, v. 68, n. 3, p. 249–58, 1975.
- RODENHUIS-ZYBERT, I. A.; WILSCHUT, J.; SMIT, J. M. Dengue virus life cycle: viral and host factors modulating infectivity. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, v. 67, n. 16, p. 2773–86, ago. 2010.
- SAIZ, J. *et al.* Zika virus: the latest newcomer. v. 7, n. April, p. 1–19, 2016.
- SALAZAR, M. I. *et al.* Dengue virus type 2: replication and tropisms in orally infected *Aedes aegypti* mosquitoes. *BMC microbiology*, v. 7, p. 9, jan. 2007.
- SALUZZO, J. F. *et al.* Serological survey for the prevalence of certain arboviruses in the human population of the south-east area of Central African Republic (author's transl). *Bulletin*

- de la Société de pathologie exotique et de ses filiales*, v. 74, n. 5, p. 490–9, 1981.
- SAVAGE, H. M. *et al.* Epidemic of dengue-4 virus in Yap State, Federated States of Micronesia, and implication of *Aedes hensilli* as an epidemic vector. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, v. 58, n. 4, p. 519–24, abr. 1998.
- SAZAMA, E. J. *et al.* Incidence of *Wolbachia* in aquatic insects. *Ecology and Evolution*, n. December 2016, p. 1–5, jan. 2017.
- SHAW, W. R. *et al.* *Wolbachia* infections in natural *Anopheles* populations affect egg laying and negatively correlate with *Plasmodium* development. *Nature Communications*, v. 7, n. May, p. 11772, 2016.
- SHEPARD, D. S. *et al.* The global economic burden of dengue: A systematic analysis. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 3099, n. 16, p. 1–7, 2016.
- SHUMAN, E. K. Global Climate Change and Infectious Diseases. *New England Journal of Medicine*, v. 362, n. 12, p. 1061–1063, 25 mar. 2010.
- SIM, S. *et al.* Transcriptomic profiling of diverse *Aedes aegypti* strains reveals increased basal-level immune activation in dengue virus-refractory populations and identifies novel virus-vector molecular interactions. *PLoS neglected tropical diseases*, v. 7, n. 7, p. e2295, 4 jul. 2013.
- SIM, S.; JUPATANAKUL, N.; DIMOPOULOS, G. Mosquito Immunity against Arboviruses. *Viruses*, v. 6, n. 11, p. 4479–4504, 2014.
- SIMON, P. Q-Gene: Processing quantitative real-time RT-PCR data. *Bioinformatics*, v. 19, n. 11, p. 1439–1440, 2003.
- SIMPSON, D. I. H. Zika virus infection in man. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 58, n. 4, p. 339–348, 1964.
- ŚMIETANKA, K. *et al.* African Swine Fever Epidemic, Poland, 2014-2015. *Emerging infectious diseases*, v. 22, n. 7, p. 1201–7, jul. 2016.
- SMITHBURN, K. C.; KERR, J. A.; GATNE, P. B. Neutralizing antibodies against certain viruses in the sera of residents of India. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, v. 72, n. 4, p. 248–57, abr. 1954.
- SOUZA-NETO, J. A.; SIM, S.; DIMOPOULOS, G. An evolutionary conserved function of the JAK-STAT pathway in anti-dengue defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 106, n. 42, p. 17841–17846, 20 out. 2009.
- STANAWAY, J. D. *et al.* The global burden of dengue: an analysis from the Global Burden of Disease Study 2013. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 3099, n. 16, p. 1–12, 2016.
- SUAYA, J. A. *et al.* Cost of dengue cases in eight countries in the Americas and Asia: a prospective study. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, v. 80, n. 5, p. 846–

55, maio 2009.

SUNDIN, D. R.; BEATY, B. J. Interference to oral superinfection of *Aedes triseriatus* infected with La Crosse virus. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, v. 38, n. 2, p. 428–32, mar. 1988.

TAKKEN, W.; VERHULST, N. O. Host Preferences of Blood-Feeding Mosquitoes. *Annual Review of Entomology*, v. 58, n. 1, p. 120928130709004, 2011.

TAPPE, D. *et al.* First case of laboratory-confirmed Zika virus infection imported into Europe, November 2013. *Euro surveillance: bulletin Européen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*, v. 19, n. 4, 2014.

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

THANGAMANI, S. *et al.* Vertical Transmission of Zika Virus in *Aedes aegypti* Mosquitoes. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 95, n. 5, p. 16–0448, 2016a.

THANGAMANI, S. *et al.* Vertical Transmission of Zika Virus in *Aedes aegypti* Mosquitoes. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 2016b.

THAVARA, U. *et al.* Double infection of heteroserotypes of dengue viruses in field populations of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) and serological features of dengue viruses found in patients in southern Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, v. 37, n. 3, p. 468–476, 2006.

THIBOUTOT, M. M. *et al.* Chikungunya: A Potentially Emerging Epidemic? *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 4, n. 4, p. e623, 27 abr. 2010.

THOMAS, S. M. *et al.* Low-temperature threshold for egg survival of a post-diapause and non-diapause European aedine strain, *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *Parasites & vectors*, v. 5, p. 100, 2012.

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, 27 jun. 2013.

TULMAN, E. R. *et al.* African swine fever virus. *Current topics in microbiology and immunology*, v. 328, p. 43–87, 2009.

VAN DEN HURK, A. F. *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, jan. 2012.

VASCONCELOS, P. F. C.; MONATH, T. P. Yellow Fever Remains a Potential Threat to Public Health. *Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, N.Y.)*, v. 16, n. 8, p. 566–567,

ago. 2016.

VAZEILLE, M. *et al.* Competitive advantage of a dengue 4 virus when co-infecting the mosquito *Aedes aegypti* with a dengue 1 virus. *BMC Infectious Diseases*, v. 16, n. 1, p. 318, 2016.

VOGHT, S. P. *et al.* Drosophila NPC1b Promotes an Early Step in Sterol Absorption from the Midgut Epithelium. *Cell Metabolism*, v. 5, n. 3, p. 195–205, 2007.

VOLLMER, J. *et al.* Requirement of lipid II biosynthesis for cell division in cell wall-less Wolbachia, endobacteria of arthropods and filarial nematodes. *International Journal of Medical Microbiology*, v. 303, n. 3, p. 140–149, abr. 2013.

VREYSEN, M. J. *et al.* *Glossina austeni* (Diptera: Glossinidae) eradicated on the island of Unguja, Zanzibar, using the sterile insect technique. *Journal of economic entomology*, v. 93, n. 1, p. 123–35, fev. 2000.

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

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

WASINPIYAMONGKOL, L.; MISSÉ, D.; LUPLERTLOP, N. Induction of defensin response to dengue infection in *Aedes aegypti*. *Entomological Science*, v. 18, n. 2, p. 199–206, 2015.

WEAVER, S. C. Host range, amplification and arboviral disease emergence. *Archives of virology. Supplementum*, n. 19, p. 33–44, 2005.

WEAVER, S. C.; REISEN, W. K. Present and future arboviral threats. *Antiviral Research*, v. 85, n. 2, p. 328–345, fev. 2010.

WEGER-LUCARELLI, J. *et al.* Vector Competence of American Mosquitoes for Three Strains of Zika Virus. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 10, n. 10, p. e0005101, 2016.

WERREN, J. H.; BALDO, L.; CLARK, M. E. Wolbachia: master manipulators of invertebrate biology. *Nature reviews. Microbiology*, v. 6, n. 10, p. 741–51, out. 2008.

WIKAN, N.; SMITH, D. R. First published report of Zika virus infection in people: Simpson, not MacNamara. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 17, n. 1, p. 15–17, 2017.

WIKAN, N.; SMITH, D. R. Zika virus: history of a newly emerging arbovirus. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 3099, n. 16, 2016.

WINDBICHLER, N. *et al.* A synthetic homing endonuclease-based gene drive system in the human malaria mosquito. *Nature*, v. 473, n. 7346, p. 212–5, 12 maio 2011.

WINSKILL, P. *et al.* Dispersal of Engineered Male *Aedes aegypti* Mosquitoes. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 9, n. 11, p. 1–18, 2015.

- WISE DE VALDEZ, M. R. *et al.* Genetic elimination of dengue vector mosquitoes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 108, n. 12, p. 4772–5, 22 mar. 2011.
- WOLFE, N. D. *et al.* Sylvatic transmission of arboviruses among Bornean orangutans. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, v. 64, n. 5–6, p. 310–6, 2001.
- WONG, P.-S. J. *et al.* Aedes (Stegomyia) albopictus (Skuse): A Potential Vector of Zika Virus in Singapore. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 7, n. 8, p. e2348, 1 ago. 2013.
- WONG, Z. S. *et al.* Wolbachia-Mediated Antibacterial Protection and Immune Gene Regulation in Drosophila. *PLoS ONE*, v. 6, n. 9, p. e25430, 29 set. 2011.
- WRIGHT, A. V.; NUÑEZ, J. K.; DOUDNA, J. A. Biology and Applications of CRISPR Systems: Harnessing Nature’s Toolbox for Genome Engineering. *Cell*, v. 164, n. 1–2, p. 29–44, 2016.
- XI, Z.; KHOO, C. C. H.; DOBSON, S. L. Wolbachia establishment and invasion in an Aedes aegypti laboratory population. *Science (New York, N.Y.)*, v. 310, n. 5746, p. 326–8, 14 out. 2005.
- XI, Z.; RAMIREZ, J. L.; DIMOPOULOS, G. The Aedes aegypti toll pathway controls dengue virus infection. *PLoS pathogens*, v. 4, n. 7, p. e1000098, jul. 2008.
- YE, Y. H. *et al.* Wolbachia reduces the transmission potential of dengue-infected Aedes aegypti. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 9, n. 6, p. 1–19, 2015.
- YEAP, H. L. *et al.* Assessing quality of life-shortening Wolbachia-infected Aedes aegypti mosquitoes in the field based on capture rates and morphometric assessments. *Parasites & vectors*, v. 7, p. 58, jan. 2014.
- YEAP, H. L. *et al.* Dynamics of the “popcorn” Wolbachia infection in outbred Aedes aegypti informs prospects for mosquito vector control. *Genetics*, v. 187, n. 2, p. 583–95, mar. 2011.
- YEN, J.; BARR, A. Incompatibility in Culex pipiens. *The Use of Genetics in Insect Control*, 1974.
- ZABALOU, S. *et al.* Incompatible insect technique: incompatible males from a Ceratitis capitata genetic sexing strain. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, v. 132, n. 3, p. 232–240, set. 2009.
- ZABALOU, S. *et al.* Wolbachia-induced cytoplasmic incompatibility as a means for insect pest population control. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 101, n. 42, p. 15042–5, 19 out. 2004.
- ZANLUCA, C. *et al.* First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 110, n. 4, p. 569–72, jun. 2015.
- ZHANG, C. *et al.* Clade replacements in dengue virus serotypes 1 and 3 are associated with

changing serotype prevalence. *Journal of virology*, v. 79, n. 24, p. 15123–30, dez. 2005.

ZHANG, D. *et al.* Combining the sterile insect technique with the incompatible insect technique: I-impact of Wolbachia infection on the fitness of triple- and double-infected strains of *Aedes albopictus*. *PLoS ONE*, v. 10, n. 4, p. 1–13, 2015.

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, jan. 2012.

## **ANEXOS**

### **Anexo I - Projeto: desenvolvimento de uma dieta artificial para mosquitos infectados por *Wolbachia***

Paralelamente ao desenvolvimento do meu doutorado, tive aprovado como coordenador, um projeto de pesquisa internacional pela Fundação Bill & Melinda Gates (*Grand Challenges - Explorations*), o qual sou responsável pelo desenvolvimento de uma dieta 100% artificial que possa substituir a necessidade de sangue humano para a manutenção das colônias de mosquitos infectados por *Wolbachia*. O projeto agraciado com a quantia de US\$ 100.000, e complementado com auxílio financeiro universal pela FAPEMIG, no valor de US\$ 50.000. O trabalho encontra-se em fase final de redação do artigo científico.

### **Anexo II - Projeto: Paratransgênese como uma ferramenta no controle de Malária**

Durante o doutorado, fiquei responsável por parte dos experimentos que envolveram a caracterização do perfil de inibição ao desenvolvimento de *Plasmodium vivax* (utilizando sangue de pacientes sintomáticos) em mosquitos *Anopheles aquasalis*, utilizando bactérias *Pantoea agglomerans* transgênicas capazes de secretar moléculas anti-*Plasmodium*.

Este trabalho foi realizado parte no Centro de Pesquisas René Rachou – FIOCRUZ, em Belo Horizonte – MG, e parte no Instituto de Pesquisas Leônidas e Maria Deane, em Manaus – AM, coordenado pelo Dr. Marcelo Jacobs Lorena (Pesquisador Visitante Especial – Ciências sem Fronteiras) e Dr. Luciano Andrade Moreira.

RESEARCH ARTICLE

# From Lab to Field: The Influence of Urban Landscapes on the Invasive Potential of *Wolbachia* in Brazilian *Aedes aegypti* Mosquitoes

Heverton Leandro Carneiro Dutra<sup>1</sup>✉, Lílha Maria Barbosa dos Santos<sup>2</sup>✉, Eric Pearce Caragata<sup>1</sup>, Jéssica Barreto Lopes Silva<sup>1</sup>, Daniel Antunes Maciel Villela<sup>3</sup>, Rafael Maciel-de-Freitas<sup>2</sup>, Luciano Andrade Moreira<sup>1</sup>\*

**1** Mosquitos Vetores: Endossimbiontes e Interação Patógeno Vetor, Centro de Pesquisas René Rachou—Fiocruz, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, **2** Laboratório de Transmissores de Hematozoários, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, **3** Programa de Computação Científica, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

✉ These authors contributed equally to this work.

\* [luciano@cpqrr.fiocruz.br](mailto:luciano@cpqrr.fiocruz.br)



CrossMark  
click for updates

### OPEN ACCESS

**Citation:** Dutra HLC, dos Santos LMB, Caragata EP, Silva JBL, Villela DAM, Maciel-de-Freitas R, et al. (2015) From Lab to Field: The Influence of Urban Landscapes on the Invasive Potential of *Wolbachia* in Brazilian *Aedes aegypti* Mosquitoes. PLoS Negl Trop Dis 9(4): e0003689. doi:10.1371/journal.pntd.0003689

**Editor:** Mark Quentin Benedict, University of Perugia, ITALY

**Received:** November 17, 2014

**Accepted:** March 9, 2015

**Published:** April 23, 2015

**Copyright:** © 2015 Dutra et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

**Funding:** This work was supported by FAPEMIG, CNPq, INCT-EM, the Brazilian Ministry of Health (DECIT/SVS), and a grant to Monash University from the Foundations for the National Institutes of Health through the Vector-Based Transmission of Control: Discovery Research (VCTR) program of the Grand Challenges in Global Health Initiatives of the Bill and Melinda Gates Foundations. LAM is a CNPq fellow. The funders had no role in study design, data

## Abstract

### Background

The symbiotic bacterium *Wolbachia* is currently being trialled as a biocontrol agent in several countries to reduce dengue transmission. *Wolbachia* can invade and spread to infect all individuals within wild mosquito populations, but requires a high rate of maternal transmission, strong cytoplasmic incompatibility and low fitness costs in the host in order to do so. Additionally, extensive differences in climate, field-release protocols, urbanization level and human density amongst the sites where this bacterium has been deployed have limited comparison and analysis of *Wolbachia*'s invasive potential.

### Methodology/Principal Findings

We examined key phenotypic effects of the *wMel* *Wolbachia* strain in laboratory *Aedes aegypti* mosquitoes with a Brazilian genetic background to characterize its invasive potential. We show that the *wMel* strain causes strong cytoplasmic incompatibility, a high rate of maternal transmission and has no evident detrimental effect on host fecundity or fertility. Next, to understand the effects of different urban landscapes on the likelihood of mosquito survival, we performed mark-release-recapture experiments using *Wolbachia*-uninfected Brazilian mosquitoes in two areas of Rio de Janeiro where *Wolbachia* will be deployed in the future. We characterized the mosquito populations in relation to the socio-demographic conditions at these sites, and at three other future release areas. We then constructed mathematical models using both the laboratory and field data, and used these to describe the influence of urban environmental conditions on the likelihood that the *Wolbachia* infection frequency could reach 100% following mosquito release. We predict successful

## Review

Exploiting Intimate Relationships: Controlling Mosquito-Transmitted Disease with *Wolbachia*Eric P. Caragata,<sup>1</sup> Heverton L.C. Dutra,<sup>1</sup> and Luciano A. Moreira<sup>1,\*</sup>

**Mosquito-transmitted diseases impose a growing burden on human health, and current control strategies have proven insufficient to stem the tide. The bacterium *Wolbachia* is a novel and promising form of control for mosquito-transmitted disease. It manipulates host biology, restricts infection with dengue and other pathogens, and alters host reproduction to promote rapid spread in the field. In this review, we examine how the intimate and diverse relationships formed between *Wolbachia* and their mosquito hosts can be exploited for disease control purposes. We consider these relationships in the context of recent developments, including successful field trials with *Wolbachia*-infected mosquitoes to combat dengue, and new *Wolbachia* infections in key malaria vectors, which have enhanced the disease control prospects of this unique bacterium.**

**The Increasing Burden of Mosquito-Transmitted Disease**

Mosquito-borne diseases heavily impact human health around the world, but are largely without adequate systems of control. Dengue fever is the most important viral infection transmitted by arthropods, with an estimated 400 million annual infections, and half the world's population at risk of the disease (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>). Dengue virus (DENV) causes flu-like symptoms, and heavy infection can lead to severe dengue and potentially death. Dengue incidence has risen dramatically over the past 40 years, with endemic infection now occurring in more than 100 countries, and heavy infection in South East Asia and the Americas (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>). The situation has been exacerbated by the global expansion in range of the primary vector *Aedes aegypti*, and the secondary vector *Aedes albopictus*, aided by increased urbanization in developing nations and climate change, which have provided more favorable niches through increased access to breeding sites and human hosts [1,2].

To date, there is no effective, publically available, vaccine or treatment for dengue, although several vaccine candidates are currently in various stages of clinical trials [3]. Existing control programs for mosquito-transmitted diseases are heavily reliant on insecticides, but widespread insecticide resistance among mosquito populations in outbreak areas has limited their effectiveness, facilitating increased disease transmission [4]. Simply put, the increasing dengue burden means that current control strategies are not working effectively and, to that end, there is a fundamental need to develop viable alternatives. To provide the greatest chance of success, these should be mutually compatible and encompass a broad spectrum of approaches, including the development of novel insecticides, transgenic disease-resistant mosquitoes,

## Trends

*Wolbachia*-infected *Aedes aegypti* mosquitoes have been successfully released in the field. The *Wolbachia* infection and desirable host manipulations are stable, and strong inhibition of dengue still occurs after more than 2 years of field exposure.

Researchers have identified several changes to host biology linked to pathogen interference, including increases in immune gene expression and reactive oxygen species levels; however, different combinations of these changes have been associated with pathogen interference in different species, leaving the cause of the phenotype unclear.

Some *Wolbachia* strains can enhance infection with certain pathogens, but there is no evidence of this occurring for dengue or human malaria. Enhancement has not been observed in the stable *Wolbachia*-mosquito associations being considered for disease control purposes.

The application of *Wolbachia* for malaria control is advancing rapidly, with the identification of a native infection in *Anopheles gambiae*, and the creation of the first stable transinfection in *Anopheles stephensi*, which inhibits infection with the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*.

<sup>1</sup>Grupo Mosquitos Vetores: Endossimbiontes e Interação Patógeno Vetor, Centre de Pesquisas

## RESEARCH

## Open Access



# The influence of larval competition on Brazilian *Wolbachia*-infected *Aedes aegypti* mosquitoes

Heverton Leandro Carneiro Dutra<sup>1</sup>, Vanessa Lopes da Silva<sup>2</sup>, Mariana da Rocha Fernandes<sup>3</sup>, Carlos Logullo<sup>3</sup>, Rafael Maciel-de-Freitas<sup>2</sup> and Luciano Andrade Moreira<sup>1\*</sup>

**Abstract**

**Background:** With field releases starting in Brazil, particular interest must be given to understanding how the endosymbiotic bacterium *Wolbachia pipiensis* affects *Aedes aegypti* mosquitoes with a Brazilian genetic background. Currently, there is limited information on how the bacterium affects phenotypic traits such as larval development rate, metabolic reserves and morphometric parameters in *Ae. aegypti*. Here, we analyze for the first time, the effect of *Wolbachia* on these key phenotypes and consider how this might impact the potential of the bacterium as a disease control agent in Brazil.

**Methods:** We examined the influence of the wMel strain of *Wolbachia* in laboratory *Ae. aegypti* with a Brazilian genetic background, reared under different larval densities. Pupae formation was counted daily to assess differences in development rates. Levels of metabolic reserves and morphometric parameters were assessed in adults resulting from each larval condition.

**Results:** wMel infection led to more rapid larval development at higher densities for both males and females, with no effect under less crowded conditions in females. Infection also led to reduced body size at both high and low density, but not at intermediate density, although the scale of this difference was maintained regardless of larval density, in comparison to uninfected individuals. Wing shape also varied significantly between infected and uninfected mosquitoes due to larval density. Glycogen levels in uninfected mosquitoes decreased under higher larval density, but were consistently high with *Wolbachia* infection, regardless of larval density.

**Conclusions:** We demonstrate that the wMel *Wolbachia* strain can positively influence some important host fitness traits, and that this interaction is directly linked to the conditions in which the host is reared. Combined with previously published data, these results suggest that this *Wolbachia* strain could be successfully used as part of the Eliminate Dengue Program in Brazil.

**Keywords:** *Wolbachia*, *Aedes aegypti*, Development time, Larval competition, Morphometrics, Glycogen

**Background**

Mosquitoes of the family Culicidae are considered the most important group of insects involved in disease transmission in humans. The mosquito *Aedes aegypti* is primarily responsible for the transmission of dengue, the most prevalent mosquito-borne viral disease [1], which has seen a 30-fold increase in incidence over the last half

century, dramatically increasing the burden on human health [2]. The transmission cycle of dengue and other vector-borne diseases depends on the existence of a sophisticated tripartite relationship between the pathogen and invertebrate and vertebrate hosts. Vector competence in mosquitoes is dependent on a wide variety of extrinsic and intrinsic factors [3, 4].

Dengue transmission is therefore strongly linked to host fitness and physiology. As such, environmental conditions during larval development can affect many important life history traits during adulthood, including fecundity,

\* Correspondence: luciano@cpqrr.fiocruz.br

<sup>1</sup>Mosquitos Vetores: Endossimbiontes e Interação Patógeno-Vetor, Centro de Pesquisas René Rachou - Fiocruz, Belo Horizonte, MG, Brazil  
Full list of author information is available at the end of the article

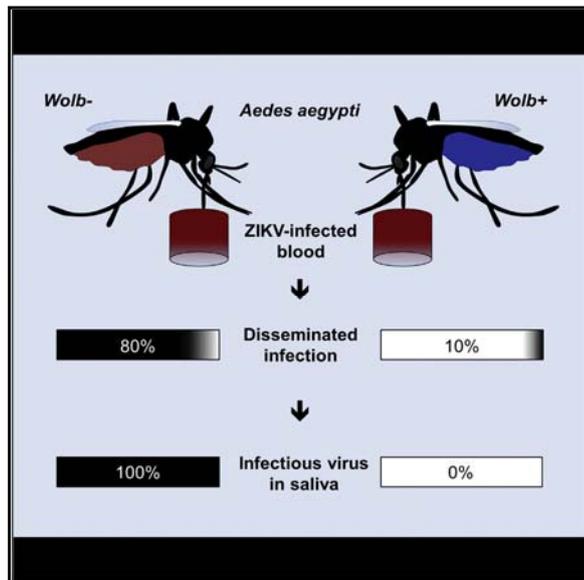


© 2016 Dutra et al. **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

# Cell Host & Microbe

## *Wolbachia* Blocks Currently Circulating Zika Virus Isolates in Brazilian *Aedes aegypti* Mosquitoes

### Graphical Abstract



### Authors

Heverton Leandro Carneiro Dutra,  
 Marcele Neves Rocha,  
 Fernando Braga Stehling Dias,  
 Simone Brutman Mansur,  
 Eric Pearce Caragata,  
 Luciano Andrade Moreira

### Correspondence

luciano@cpqrr.fiocruz.br

### In Brief

Strategies to combat Zika virus (ZIKV) and its mosquito vector are urgently needed. Dutra et al. report that *Wolbachia*-carrying mosquitoes are highly resistant to ZIKV and display reduced virus prevalence and intensity. Saliva from *Wolbachia*-carrying mosquitoes did not contain infectious virus, suggesting the possibility to block ZIKV transmission.

### Highlights

- Mosquitoes harboring *Wolbachia* were resistant to current circulating Zika virus isolates
- Zika virus prevalence, intensity, and disseminated infection were reduced
- Saliva from *Wolbachia*-harboring mosquitoes did not contain infectious Zika virus

Dutra et al., 2016, Cell Host & Microbe 19, 1–4  
 June 8, 2016 © 2016 The Authors. Published by Elsevier Inc.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2016.04.021>

CellPress

EDITORIAL

For reprint orders, please contact: [reprints@futuremedicine.com](mailto:reprints@futuremedicine.com)



## Zika control through the bacterium *Wolbachia pipientis*

“...*Wolbachia* does offer new and powerful approaches for the prevention and management of future outbreaks.”

Eric P Caragata<sup>1</sup>, Heverton LC Dutra<sup>1</sup>, Scott L O'Neill<sup>2</sup> & Luciano A Moreira<sup>\*1</sup>

First draft submitted: 2 September 2016; Accepted for publication: 26 September 2016; Published online: 10 November 2016

Zika has become a disease of great clinical importance, as infections with the arbovirus can result in the debilitating Guillain-Barré syndrome and developmental disorders including microcephaly [1,2]. The severity of the recent Latin American outbreaks has been driven by low levels of herd immunity, the broad distribution of the primary mosquito vector, *Aedes aegypti*, and high rates of global travel [3]. Vaccine candidates are under investigation [4], but it is unlikely that a vaccine alone will be sufficient to completely eliminate disease transmission. Future Zika control programs will also need to rely on vector control approaches, including the use of novel strategies such as the bacterial endosymbiont, *Wolbachia pipientis* [5].

There are two major mosquito control approaches involving *Wolbachia*, which are currently being proposed. One aims to reduce transmission of viruses from mosquitoes to humans and the other uses *Wolbachia* to suppress mosquito populations. Both of these strategies involve the release of *Wolbachia*-infected mosquitoes into the field, and rely on physiological

changes induced in the mosquito host by infection with the bacterium. The most prominent of these is cytoplasmic incompatibility (CI), a type of reproductive incompatibility that reduces the number of viable progeny produced when *Wolbachia*-infected males mate with uninfected females. CI gives *Wolbachia*-infected mosquitoes a reproductive advantage, allowing the bacterium to invade uninfected populations if female and male mosquitoes are released, or to crash uninfected populations if only males are released.

### Transmission blocking

The most prominent *Wolbachia*-based control strategy involves the introduction of *Wolbachia* into wild mosquitoes, without suppressing the target population. *Wolbachia* is known to inhibit viral replication in mosquitoes, and so reduce disease transmission [6,7]. This requires the periodic release of male and female *Wolbachia*-infected mosquitoes to introduce the symbiont into the target population, thereby reducing the incidence of disease transmission. CI acts to establish and maintain the

### KEYWORDS

• *Aedes aegypti* • *Wolbachia* • Zika

<sup>1</sup>Centro de Pesquisas René Rachou – Fiocruz, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

<sup>2</sup>School of Biological Sciences, Monash University, Clayton, Melbourne, Victoria, Australia

\*Author for correspondence: [luciano@cpqrr.fiocruz.br](mailto:luciano@cpqrr.fiocruz.br)

## Inhibition of Zika virus by *Wolbachia* in *Aedes aegypti*

Eric Pearce Caragata, Heverton Leandro Carneiro Dutra and Luciano Andrade Moreira\*

Mosquitos Vetores: Endossimbiontes e Interação Patógeno-Vetor, Centro de Pesquisas René Rachou – Fiocruz, Belo Horizonte, MG, Brazil.

\* Corresponding Author:

Luciano A. Moreira, 1715, Av. Augusto de Lima, Barro Preto, Belo Horizonte, MG Brazil, 30190-002; Tel: +55 31 33497776; Fax: +55 31 32953115, E-mail: luciano@cpqrr.fiocruz.br

Through association with cases of microcephaly in 2015, Zika virus (ZIKV) has transitioned from a relatively unknown mosquito-transmitted pathogen to a global health emergency, emphasizing the need to improve existing mosquito control programs to prevent future disease outbreaks. The response to Zika must involve a paradigm shift from traditional to novel methods of mosquito control, and according to the World Health Organization should incorporate the release of mosquitoes infected with the bacterial endosymbiont *Wolbachia pipientis*. In our recent paper [Dutra, HLC *et al.*, Cell Host & Microbe 2016] we investigated the potential of *Wolbachia* infections in *Aedes aegypti* to restrict infection and transmission of Zika virus recently isolated in Brazil. *Wolbachia* is now well known for its ability to block or reduce infection with a variety of pathogens in different mosquito species including the dengue (DENV), yellow fever, and chikungunya viruses, and malaria-causing *Plasmodium*, and consequently has great potential to control mosquito-transmitted diseases across the globe. Our results demonstrated that the wMel *Wolbachia* strain in Brazilian *Ae. aegypti* is a strong inhibitor of ZIKV infection, and furthermore appears to prevent transmission of infectious viral particles in mosquito saliva, which highlights the bacterium's suitability for more widespread use in Zika control.

### *Wolbachia* can limit vector-borne disease transmission

*Aedes aegypti* mosquitoes infected with the wMel *Wolbachia* strain are already present in the field in several countries as part of a mosquito control strategy designed to reduce the high disease burden of dengue ([www.eliminatedengue.com](http://www.eliminatedengue.com)). wMel is an ideal agent for mosquito control as it can rapidly and stably spread into wild mosquito populations through cytoplasmic incompatibility,

has little impact on host competitiveness, and offers a high degree of inhibition of DENV. In Brazil, these mosquitoes have been released in two suburbs of Rio de Janeiro since late 2014, as part of the initial characterization of the suitability of the bacterium for use in Latin American mosquito populations. Given the recent emergence of Zika in the region, it was important to understand whether wMel caused a similar inhibition of ZIKV infections in Brazilian mosquitoes.

### ZIKV infection in mosquito tissues

We conducted experimental oral infections using two currently circulating ZIKV isolates (BRPE and SPH) that were isolated from patient blood during the late 2015 outbreak. These viruses were maintained in mosquito cells for a short period of time, and fresh, infected supernatant was mixed directly with human blood prior to mosquito feeding. Our use of recently isolated, unfrozen virus meant that our experimental infection process approximated natural virus acquisition for mosquitoes in the field. Likewise, both the *Wolbachia*-infected (wMel\_Br) and -uninfected (Br) mosquito lines that we used had a genetic background that was representative of mosquitoes near the *Wolbachia* release sites in Rio de Janeiro. The Br line was derived from eggs collected in this location in early 2016, and genetic similarity with the wMel\_Br line was maintained by regular introduction of Br males into wMel\_Br cages. Consequently, our experiments provided insight into how *Wolbachia*-infected mosquitoes might respond to ZIKV infection in nature.

We used a Taqman-based RT-qPCR assay to quantify ZIKV levels in mosquito abdomens and heads/thoraces, at 7 and 14 days post-infection, with the latter tissues providing a representation of disseminated infection (Fig. 1). Our data indicated that wMel infection decreased the rate of ZIKV abdominal infection for both isolates, at both time points, and interestingly ZIKV infection rates in wMel\_Br mosquitoes remained low at 14 dpi, highlighting the ability

**MICROREVIEW** on: Dutra HL, Rocha MN, Dias FB, Mansur SB, Caragata EP, Moreira LA (2016) *Wolbachia* Blocks Currently Circulating Zika Virus Isolates in Brazilian *Aedes aegypti* Mosquitoes. Cell Host Microbe 2016 Jun 8;19(6):771-4. doi: 10.1016/j.chom.2016.04.021

doi: 10.15698/mic2016.07.513

Received 13.06.2016, Accepted 20.06.2016, Published 27.06.2016.

Keywords: Zika virus, mosquito-transmitted disease, *Aedes aegypti*, *Wolbachia*.



## The re-emerging arboviral threat: Hidden enemies

The emergence of obscure arboviral diseases, and the potential use of *Wolbachia* in their control

Heverton Leandro Carneiro Dutra, Eric Pearce Caragata and Luciano Andrade Moreira\*

Mayaro, Oropouche, and O'Nyong-Nyong share many traits with more prominent arboviruses, like dengue and yellow fever, chikungunya, and Zika. These include severe clinical symptoms, multiple animal hosts, and widespread vector species living in close proximity to human habitats, all of which constitute significant risk factors for more frequent outbreaks in the future, greatly increasing the potential of these hidden enemies to follow Zika and become the next wave of global arboviral threats. Critically, the current dearth of knowledge on these arboviruses might impede the success of future control efforts, including the potential application of *Wolbachia pipientis*. This bacterium inherently possesses broad anti-pathogen properties and a means of genetic drive that allows it to eliminate or replace target vector populations. We conclude that control of obscure arboviruses with *Wolbachia* might be possible, but successful implementation will be critically dependent on the ability to transfect key vector species.

### Keywords:

chikungunya; dengue; Mayaro; O'Nyong-Nyong; Oropouche; *Wolbachia*; Zika

DOI 10.1002/bies.201600175

Mosquitos Vetores: Endossimbiontes e Interação Patógeno-Vetor, Centro de Pesquisas René Rachou – Fiocruz, Belo Horizonte, MG, Brazil

### \*Corresponding author

Luciano A. Moreira  
E-mail: luciano@cpqrr.fiocruz.br

### Abbreviations:

**CHIKV**, chikungunya virus; **DENV**, dengue virus; **IIT**, the incompatible insect technique; **JEV**, Japanese encephalitis virus; **MAYV**, Mayaro virus; **ONNV**, O'Nyong-Nyong virus; **OROV**, Oropouche virus; **WNV**, West Nile virus; **YFV**, yellow fever virus; **ZIKV**, Zika virus.

### Introduction

The recent emergence of Zika virus (ZIKV) [1], and its associated developmental and neurological effects caught the world by surprise [2]. Yet, there are many notable examples of little known arthropod-transmitted viral pathogens rapidly transitioning into major health threats. This process has been facilitated by changes in environmental conditions, human behavior, viral genetics, and arthropod vector populations, leading to perturbations of the virus transmission cycle, and greater incidence of human outbreaks [3]. A case can be made that ZIKV is only the latest example of a poorly understood and neglected tropical disease that has rapidly spread across the globe with serious consequences.

Historically, the most serious vector-borne disease has been malaria, but more than a decade of concentrated effort, driven by expanded vector control programs, has finally seen case numbers decline (see World Health Organization (WHO) Malaria Report 2015: <http://tinyurl.com/joc38e3> [accessed October 19, 2016]). Simultaneously, there has been resurgence in arboviral infections [4], with viruses such as dengue (DENV), chikungunya (CHIKV), West Nile (WNV), Japanese encephalitis (JEV), and yellow fever (YFV) still representing serious threats to global health. For this reason, the vast majority of arboviral research has focused on these current threats, and not on those that might arise in the future.

In this review, we will examine the historical factors underlying the emergence of major arboviruses including the recent emergence of ZIKV, and consider the similarities with three currently obscure arboviruses; Mayaro (MAYV), Oropouche (OROV), and O'Nyong-Nyong (ONNV) (Table 1), which could potentially emerge as future threats to human health. Finally, we will end the review by exploring the potential use of the endosymbiotic bacterium *Wolbachia pipientis* to combat current and emerging arboviral threats.