FÁBIO DE ALMEIDA

**Alterações reprodutivas causadas pela infecção por
Wolbachia pipientis em *Culex quinquefasciatus***

Tese apresentada ao Departamento de
Parasitologia do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo,
para obtenção de Título de Doutor em
Ciências.

São Paulo
2012

FÁBIO DE ALMEIDA

**Alterações reprodutivas causadas pela infecção por
Wolbachia pipientis em *Culex quinquefasciatus***

Tese apresentada ao Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção de Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro

Orientador: Prof. Dr. Lincoln Suesdek Rocha

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)

São Paulo
2012

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Almeida, Fábio de.

Alterações reprodutivas causadas pela infecção por *Wolbachia pipientis* em *Culex quinquefasciatus* / Fábio de Almeida. -- São Paulo, 2012.

Orientador: Prof. Dr. Lincoln Suesdek Rocha.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Parasitologia. Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro. Linha de pesquisa: Entomologia e Malacologia de Insetos Vetores.

Versão do título para o inglês: Reproductive alterations caused by infection by *Wolbachia pipientis* on *Culex quinquefasciatus*.

1. *Culex* 2. *Wolbachia* 3. Aptidão reprodutiva 4. Vitelogênese
5. Mosquitos 6. Morfometria I. Rocha, Prof. Dr. Lincoln Suesdek
II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas.
Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-
Hospedeiro III. Título.

ICB/SBIB0210/2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Fábio de Almeida.

Título da Tese: Alterações reprodutivas causadas pela infecção por *Wolbachia pipientis* em *Culex quinquefasciatus*.

Orientador(a): Prof. Dr. Lincoln Suesdek Rocha.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº 115 nas fls. 21 do livro 2 para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do(a) Prof.(a) Dr.(a) Alcira Tânia Bijovsky de Katzin, Coordenador(a) da Linha de Pesquisa "*Estudos morfo-funcionais de mosquitos hematófagos*" do qual participou(aram) o(s) aluno(s): **André Franco Cardoso, Fábio de Almeida, Renato Leme Cres**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA) em 29.11.2005.

São Paulo, 30 de novembro de 2005.

Prof. Dr. Wothan Tavares de Lima
Vice-Coordenador em Exercício
CEEA - ICB/USP

Profa. Dra. Patrícia Castelucci
Secretária Suplente da CEEA

Dedico este trabalho à minha família que esteve ao meu lado, a Ludmila que me apoiou muito nestes dois últimos anos e ao meu amigo Jorge que se mostrou um exemplo de superação.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente agradeço ao doutor Lincoln que me aceitou em seu laboratório e me ajudou muito com ideias e discussões. Também pela grande amizade que cultivamos nestes anos.

Agradeço a doutora Tania por ceder um espaço em seu laboratório para realização de experimentos de Bioquímica.

Ao doutor Mauro e sua aluna Sirlei que nos convidaram para realizar colaboração em trabalhos científicos.

Agradeço também aos colegas do Laboratório de Genética de Mosquitos Vetores de Doenças; Paloma que me ajudou nas análises morfométricas, ao Eduardo, Vivian, Camila, Stella, Carol, Flávia pelas ajudas gerais, amizade e pelas descontrações.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Biologia Celular e Ultraestrutura; André que me ajudou em muito com ideias e com experimentos de bioquímica e biologia molecular, Alexandre pelas ajudas gerais, Renato e Felipe pela amizade.

Aos funcionários e colegas do Laboratório de Parasitologia: Cris, Fernanda, Juliane e Carlos pela ajuda com manutenção das colônias e montagem de asas dos mosquitos. A todos os malacólogos pela amizade criada no ambiente laboratorial.

Aos membros da minha banca de qualificação, os quais me ajudaram com muitas ideias.

A minha família pela compreensão e por estar sempre ao meu lado.

A Ludmila pelo amor, companheirismo e dedicação a mim, além da ajuda para confecção deste trabalho.

A todos as amizades feitas no Instituto Butantan e no Instituto de Ciências Biomédicas que, direta ou indiretamente, também contribuíram na minha formação.

Agradeço também ao apoio financeiro do CNPq.

RESUMO

Almeida F. Alterações reprodutivas causadas pela infecção por *Wolbachia pipientis* em *Culex quinquefasciatus*. [tese (Doutorado em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2012.

Wolbachia pertence ao grupo das α -proteobacterias e foi primeiramente relatada no início do século vinte. Desde então, este endossimbionte foi detectado em dezenas de espécies de invertebrados e os efeitos dessa bactéria na reprodução de seus hospedeiros têm sido cada vez mais investigados. Dentre eles estão: partenogênese, morte dos machos, feminização, alterações na aptidão reprodutiva e incompatibilidade citoplasmática. Este trabalho avalia e compara as diferenças fisiológicas e reprodutivas entre *Culex quinquefasciatus* infectados e não-infectados por *Wolbachia*. As larvas de mosquitos infectados e não-infectados não apresentaram diferenças de sobrevivência, porém as não-infectadas se desenvolveram mais rapidamente e atingiram o estágio adulto prematuramente. As fêmeas adultas não-infectadas estão mais aptas a depositar ovos, depositam maior quantidade de ovos e estes são também mais viáveis. Em contrapartida as fêmeas infectadas vivem mais tempo quando alimentadas com sangue, e necessitam de menos tempo, após a alimentação sanguínea, para depositar ovos. Nossos estudos indicam haver uma diferença quantitativa de proteínas existentes nos ovários durante o processo vitelogênico, entre mosquitos das duas colônias, porém este fato não é devido à transcrição diferencial de receptor de vitelogenina e de vitelogenina, a proteína majoritária no processo vitelogênico. Constatamos que o tamanho alar não é significativamente alterado com a desinfecção, porém há uma maior assimetria bilateral alar nos mosquitos infectados.

Palavras-chave: *Culex quinquefasciatus*. *Wolbachia pipientis*. Aptidão reprodutiva. Vitelogênese. Morfometria alar.

ABSTRACT

Almeida F. Reproductive alterations caused by infection by *Wolbachia pipientis* in *Culex quinquefasciatus* [Ph. D. thesis (Biology of Host-Pathogen Relationship)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2012.

Wolbachia belongs to the group of α -proteobacteria and was first reported in the early twentieth century. Since then, this endosymbiont was detected in dozens of invertebrate species and the effects of these bacteria in the reproduction of their hosts have been increasingly studied. Among the effects of infection by *Wolbachia* one may cite: parthenogenesis, male-killing, feminilization, alterations in reproductive fitness and cytoplasmic incompatibility. This study evaluated and compared physiological and reproductive differences between *Culex quinquefasciatus* infected and non-infected with *Wolbachia*. We noted that the mosquito larvae of both groups exhibited the same survival rate, although non-infected ones developed faster to adulthood. Uninfected adult females have higher ability to lay eggs, lay more eggs and those eggs have higher viability. In contrast, infected females live longer when fed with blood, and require less time after blood feeding to lay eggs. Our studies indicate that there are quantitative differences concerning the amounts of proteins in the ovaries of mosquitoes during vitellogenic stage between two colonies. The fact that non-infected mosquitoes have better reproductive fitness may be related to differences in the amount of vitellogenin, the major protein on vitellogenic process, which are produced by fat body and incorporated by oocytes through vitellogenin receptor. But these differences are not related with differential transcription of vitellogenin receptor or vitellogenin genes. We noted that wing size is not significantly altered by the infection, although infected mosquitoes showed higher bilateral wing asymmetry.

Keywords: *Culex quinquefasciatus*. *Wolbachia pipientis*. Reproductive fitness. Vitellogenesis. Wing morphometry.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aa	após alimentação com sangue
BSA	albumina sérica bovina
cDNA	ácido desoxirribonucleico complementar
Ct	ciclo limiar (<i>threshold cycle</i>)
DEPC	dietil-pirocarbonato
DNA	ácido desoxirribonucleico
Dnase	desoxirribonuclease
dNTP	desoxirribonucleotídeo-trifosfato
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilenodiamino tetracético
ELISA	enzyme linked immuno sorbent assay
IC	incompatibilidade citoplasmática
kDa	kiloDalton
mRNA	ácido ribonucleico mensageiro
NA	não alimentado com sangue
pb	pares de base
PBS	tampão fosfato salino
PCR	reação em cadeia da polimerase
PMSF	fluoreto de fenilmetilsulfonila
RNA	ácido ribonucleico
rVg	receptor de vitelogenina
RNase	ribonuclease
SDS	dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS
Tris	tris-hidroximetil-aminometano

U	unidade de enzima
UV	ultravioleta
Vg ⁺	subunidade maior de vitelogenina
Vg ⁻	subunidade menor de vitelogenina
<i>wPip</i> ⁺	colônia infectada
<i>wPip</i> ⁻	colônia não-infectada
WSP	proteína de superfície de membrana
<i>wsp</i>	gene codificador de WSP

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1 - Oligonucleotídeos utilizados para PCR, RT-PCR e PCR em tempo real	37
Figura 1 - Esquema de ocorrência de incompatibilidade citoplasmática	24
Figura 2 - Foto e conformação alar obtida com a ligação dos marcos anatômicos de asa de <i>Culex quinquefasciatus</i>	38
Figura 3 – Eletroforese em gel de agarose 1,5% da PCR, de <i>wPip</i> ⁺ , com iniciadores específicos para o gene <i>wsp</i>	39
Figura 4 – Eletroforese em gel de agarose 1,5% da PCR, de mosquitos tratados, com iniciadores específicos para o gene <i>wsp</i>	40
Figura 5 - Gráfico comparativo do tempo de oviposição após alimentação sanguínea.....	42
Figura 6 - Gráfico comparativo de longevidade de machos	43
Figura 7 - Gráfico comparativo de longevidade de fêmeas não alimentadas com sangue	44
Figura 8 - Gráfico comparativo de longevidade de fêmeas alimentadas com sangue	44
Figura 9 - Organização celular de um folículo ovariano 24h após alimentação sanguínea.....	45
Figura 10 - Imagens de microscopia óptica de folículo ovariano de mosquitos <i>wPip</i> ⁺ e <i>wPip</i> ⁻ 24h aa.....	46
Figura 11 - Imagens de microscopia eletrônica de folículo ovariano de mosquitos <i>wPip</i> ⁺ e <i>wPip</i> ⁻ 48h aa.....	47
Figura 12 - Imagem de microscopia óptica de folículo ovariano de mosquitos <i>wPip</i> ⁺ e <i>wPip</i> ⁻ 72h aa.....	47
Figura 13 - Gráfico comparativo de quantificação proteica de ovários	49
Figura 14 - Eletroforese de extratos de corpos gordurosos.....	50
Figura 15 - Eletroforese de extratos de ovários.....	50
Figura 16 - Immunoblot de corpos gordurosos utilizando anticorpos anti-vg ⁺ e anti-vg ⁻	51
Figura 17 - Immunoblot de ovários utilizando anticorpos anti-vg ⁺ e anti-vg ⁻	51

Figura 18 – Eletroforese em gel de agarose 1% de RT-PCR de amostras de cDNA obtidas a partir de mRNA total de mosquitos, utilizando-se iniciadores de actina, vitelogenina e de receptor de vitelogenina	52
Figura 19 – Diferença inversa dos ciclos limiares de receptor de vitelogenina normalizados com actina e relativos ao ciclo limiar de NA de <i>wPip</i> ⁺	54
Figura 20 – Diferença inversa dos ciclos limiares de vitelogenina normalizados com actina e relativos ao ciclo limiar de NA de <i>wPip</i> ⁺	55
Figura 21 - Gráfico de média e desvio padrão do tamanho do centroide	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dias nos quais as larvas se tornaram adultos	40
Tabela 2 - Aptidão reprodutiva absoluta de mosquitos $wPip^-$ e $wPip^+$	41
Tabela 3 - Aptidão reprodutiva relativa de mosquitos $wPip^-$ e $wPip^+$	41
Tabela 4 - Número de fêmeas que depositaram seus ovos por tempo.....	42
Tabela 5 - Análise comparativa de formação do córion de dez folículos ovarianos 48 h aa.....	48
Tabela 6 - Valores médios dos ciclos limiares entre as trélicas do PCR em tempo real de actina e receptor de vitelogenina.....	53
Tabela 7 - Valores médios dos ciclos limiares entre as trélicas do PCR em tempo real de actina e de vitelogenina.....	53
Tabela 8 - Resultados estatísticos em relação à assimetria bilateral alar.....	56

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Os insetos	16
1.2 O mosquito	16
1.3 Controle populacional	20
1.4 <i>Wolbachia pipientis</i>	21
1.5 Morfometria geométrica das asas	27
2 OBJETIVOS	28
3 MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1 Animais	29
3.2 Tratamento com antibiótico para obtenção de colônia não-infectada (<i>wPip</i> ⁻)	29
3.3 Extração de DNA	30
3.4 Reação em cadeia de polimerase (PCR) para diagnóstico de <i>Wolbachia</i>	30
3.5 Tempo de desenvolvimento larval	31
3.6 Aptidão reprodutiva	31
3.7 Tempo de oviposição após alimentação sanguínea	32
3.8 Longevidade	32
3.9 Microscopia	32
3.10 Análise microscópica do desenvolvimento ovariano	33
3.11 Quantificação de proteínas totais	33
3.12 Análise eletroforética em gel de poliacrilamida SDS (SDS-PAGE)	34
3.13 Imunoblot	34
3.14 Extração e purificação de RNA	35
3.15 Síntese da primeira fita de cDNA	35
3.16 PCR em tempo real	36
3.17 Análise morfométrica alar	37
4 RESULTADOS	39
4.1 <i>wPip</i> ⁺ , obtenção e mantimento de <i>wPip</i> ⁻	39
4.2 Tempo de desenvolvimento larval	40
4.3 Aptidão reprodutiva	41
4.4 Tempo de oviposição após alimentação sanguínea	42

4.5 Longevidade	43
4.6 Análise do desenvolvimento ovariano	45
4.7 Quantificação proteica.....	48
4.8 Análise eletroforética	49
4.9 Imunoblot.....	51
4.10 RT-PCR.....	52
4.11 PCR em tempo real.....	52
4.12 Morfometria geométrica alar	55
5 DISCUSSÃO	57
5.1 Aspectos gerais.....	57
5.2 Desenvolvimento larval	59
5.3 Número de ovos	60
5.4 Longevidade	61
5.5 Tempo de oviposição após alimentação sanguínea	61
5.6 Vitelogênese	62
5.7 Considerações finais	64
6 CONCLUSÕES	66
REFERÊNCIAS.....	67

1 INTRODUÇÃO

1.1 Os insetos

A maior diversidade de espécies do Reino Animal está contida no filo arthropoda e, principalmente, na classe insecta com mais de 750 mil espécies descritas, vivendo em quase todos os habitats terrestres. Antes do surgimento dos seres humanos, os insetos já apresentavam importância ecológica, não só fazendo parte de teias e cadeias alimentares, mas também polinizando plantas (Ruppert, Barnes, 1996).

Muitos insetos trazem benefícios aos seres humanos. Sendo detritívoros, ajudam na reciclagem da matéria orgânica existente no solo, podendo assim ser utilizados na agricultura; produzindo produtos utilizados na culinária como, por exemplo, o mel e, na indústria têxtil, a seda; além de serem utilizados na medicina e na medicina forense (Sukontason et al., 2008). Em contrapartida, os insetos também podem ser apontados como pragas na agricultura, como causador de alergias e como transmissores de microorganismos causadores de doenças, tanto para humanos como para outros animais. Neste contexto estão inseridos alguns patógenos vetoriados por insetos, que podem causar a Doença de Chagas, a Leishmaniose e a Doença do Sono, além de patógenos transmitidos por mosquitos, que podem causar a Filariose Linfática, Dengue, Febre Amarela e Malária.

Na família Culicidae (do lat. *Culex*, “mosquito”) encontramos algumas espécies de gêneros conhecidos como vetores de doenças. Espécies do gênero *Anopheles* são conhecidas por transmitir o *Plasmodium*, o parasita causador da malária; já espécies do gênero *Aedes* são responsáveis pela transmissão do vírus da dengue e da febre amarela; e finalmente espécies do gênero *Culex* no qual se encontram mais de 750 espécies espalhadas por quase todas as regiões do globo, são capazes de transmitir alguns parasitas causadores de doenças (Forattini, 2002).

1.2 O mosquito

Em *Culex quinquefasciatus* alguns microorganismos se adaptaram a viver e se reproduzir em seu interior devido ao hábito hematofágico. Com isso, passaram a

transmitir esses microorganismos que podem causar arboviroses de importância veterinária, Filariose Linfática no Brasil, Encefalite do Oeste do Nilo na Europa e Estados Unidos. Esta última tem causado grande preocupação em relação à sua chegada ao território brasileiro, já que, o vírus é veiculado por mosquitos e tendo as aves como hospedeiros silvestres, pode causar uma severa encefalite nos seres humanos. Recentemente, mamíferos da região do pantanal foram testados em relação à soropositividade ao vírus do Oeste do Nilo e 3% dos animais testados se mostraram positivos (Pauvolid-Corrêa et al., 2011), mostrando que o vírus pode estar circulando em território nacional.

Culex quinquefasciatus é um mosquito de hábito noturno, antropofílico e adaptado às condições urbanas. O ciclo de vida deste, igual ao dos outros mosquitos, é holometábolo e ocorre parte em ambiente aquático e parte em ambiente terrestre. Seus ovos são normalmente depositados juntos em coleções de águas paradas e, principalmente, poluídas e, pelo seu aspecto, cada conjunto de ovos é chamado de jangada. Após 1 ou 2 dias, os ovos eclodem e as larvas encontram um ambiente rico em matéria orgânica para sua alimentação e desenvolvimento. Durante aproximadamente oito dias após eclosão, as larvas passam por 4 estágios larvais e acumulam reservas de lipídeos e glicogênio para serem utilizadas na fase de pupa e no início da fase adulta (Timmermann, Briegel, 1999). As pupas não se alimentam, entre 1 ou 2 dias sofrem metamorfose e se tornam mosquitos adultos machos e fêmeas.

A forma adulta adquire capacidade de voo e passa a se alimentar de açúcares provenientes de tecidos vegetais, sendo esta dieta suficiente para manter a sobrevivência. As fêmeas necessitam de outros nutrientes, como proteínas e lipídeos, para o desenvolvimento da grande quantidade de ovos gerada a cada ciclo gonotrófico e, com isso, se adaptaram à ingestão de sangue que, rico em nutrientes, estimula o início do processo vitelogênico (Clements, 1992). A ingestão de sangue causa estresse mecânico gerado pela grande distensão do epitélio intestinal, pelos cristais de heme produzidos com a digestão da hemoglobina e também, estresse químico, gerado pelas espécies reativas de oxigênio (Ryter, Tyrrel, 2000).

O epitélio intestinal dos mosquitos é constituído por uma monocamada de células epiteliais. Dentre estas estão as células colunares que são responsáveis pela produção de enzimas digestivas e pela absorção dos nutrientes, os quais

atravessam a membrana basal e chegam a hemolinfa, de onde são transportados até o corpo gorduroso (Clements, 1992). O corpo gorduroso é encontrado na região tóraco-abdominal e é o principal órgão do metabolismo intermediário e do armazenamento de energia (Chapman, 1998; Clements, 1992; Snodgrass, 1935). Sua principal célula, o trofócito, é responsável pela produção e estocagem de carboidratos, lipídeos e proteínas, dentre elas a vitelogenina, proteína majoritária no processo de ovogênese (Clements, 1992; Raikhel, 1987).

As vitelogeninas são fosfolipoproteínas glicosiladas oligoméricas, com massa molecular variando entre 200 e 600 kDa, são clivadas proteoliticamente em duas ou mais subunidades (Clements, 1992) e, em *Cx. quinquefasciatus*, estas subunidades têm pesos moleculares de aproximadamente 200 (Vg⁺) e 86 kDa (Vg⁻) (Cardoso et al., 2010). A vitelogenina chega ao ovário pela hemolinfa e é internalizada por intermédio de receptores, encontrados nas membranas celulares dos ovócitos. Elas são armazenadas em grânulos de vitelina até sua utilização pelo embrião (Raikhel, 1987).

Os receptores de vitelogenina de insetos têm peso molecular variando de 180 a 214 kDa e contêm 4 domínios (Sappington et al., 1995). São encontrados somente nos ovários e, em *Aedes aegypti*, seus transcritos são encontrados tanto nos ovócitos quanto nas células auxiliaadoras ou células *nurse* (Cho, Raikhel, 2001; Sappington et al., 1995). A grande quantidade de internalização da vitelogenina não é devida somente aos receptores, sendo que a membrana dos ovócitos no período vitelogênico sofre um desenvolvimento do complexo de endocitose (Snigirevskaya et al., 1997). Este complexo é composto por microvilosidades, por receptores, (localizados principalmente na base dos ovócitos) vesículas recobertas de clatrina, (proteína que ajuda no processo de endocitose) e endossomos (Clements, 1992; Raikhel, Dhadialla, 1992). Após internalização da vitelogenina, o receptor se dissocia da proteína, é reciclado e, por pequenas vesículas, se funde novamente à membrana celular do ovócito (Clements, 1992; Sappington, Raikhel, 1998). Em sua tese, Cardoso (2009), avaliou por PCR em tempo real a quantidade de mRNA de vitelogenina e do receptor de vitelogenina presente em *Cx. quinquefasciatus*, durante o primeiro ciclo gonotrófico. Ele observou que o pico de expressão de vitelogenina ocorre 72h após a alimentação sanguínea (aa) e de receptor de vitelogenina 48 h aa.

Os ovários dos mosquitos são encontrados aos pares, dorso-lateralmente, envoltos por membrana e compostos por unidades funcionais denominadas ovariolos. Estes, por sua vez, são conectados ao cálice, o qual desemboca no oviduto lateral e posteriormente à vagina. A fecundação dos ovos ocorre no oviduto lateral pouco antes da oviposição, pela entrada do esperma pela micrópila (Clements, 1992; Snodgrass, 1935).

Apenas no estágio tardio de pupa, cada ovariolo se diferencia em germário e vitelário compreendendo um, dois ou três folículos ovarianos (Clements, 1992). A porção anterior dos ovariolos é composta pelo germário, que por divisões mitóticas dão origem às células germinativas, enquanto que no vitelário é formado o folículo, composto por: um ovócito, sete células *nurse* ou auxiliaadoras e tudo rodeado por uma monocamada de células foliculares.

As células foliculares se intercomunicam por pontes intercelulares e são responsáveis pela produção do córion (Li, Li, 2006) que futuramente formará a casca do ovo. Este é formado em duas fases distintas, inicialmente, em *Cx. quinquefasciatus*, forma-se o endocóron (entre 12 h a 48 h aa) e somente após a fusão de suas placas formadoras inicia-se a formação do exocóron (entre 48 h a 84 h aa) (Cardoso, 2009) (ver Figura 9).

As células auxiliaadoras são responsáveis por uma grande síntese de ribossomos e de RNA mensageiro, que são transferidos para o ovócito por pontes citoplasmáticas na fase vitelogênica (Clements, 1992; Forattini, 1996; Hagedorn, Fallon, 1973; Snodgrass, 1935). Em *Cx. quinquefasciatus*, o ovócito e as sete células auxiliaadoras não podem ser diferenciados por microscopia antes do repasto sanguíneo (Cardoso et al., 2010).

Logo após a emergência, as fêmeas adultas dos mosquitos estão sob ação do hormônio juvenil, produzido pela *corpora allata* e, com isso, entram na fase pré-vitelogênica a qual pode também ser influenciada por fatores ambientais (Clements, 1992; Gwadz, Spielman, 1973). Nesta fase as células dos folículos ovarianos estão sendo preparadas para absorção e processamento da vitelogenina (Raikhel, Lea, 1983). Gwadz e Spielman (1973) e Hagedorn et al. (1977) observaram que o cérebro também tem um papel, endócrino ou neurológico, fundamental no desenvolvimento folicular pré-vitelogênico.

Após esta fase o hormônio ecdisona, produzido pelas células foliculares do ovário, é transformado, pelo corpo gorduroso, em 20-hidroxiecdisona, que é responsável por inibir o desenvolvimento das células dos folículos ovarianos e mantê-los no estágio de “resting”, estágio no qual o mosquito está fisiologicamente pronto para realizar o repasto sanguíneo (Clements, 1992).

A fase vitelogênica é iniciada com o repasto sanguíneo e é dividida em 3 etapas. A primeira, de iniciação, é marcada pelo início da produção de vitelogenina e o aumento dos folículos ovarianos. Na etapa trófica as células foliculares iniciam a produção das proteínas coriônicas, ocorre grande produção de vitelogenina pelo corpo gorduroso e incorporação desta pelo ovócito, por intermédio de receptores de vitelogenina. Essa incorporação de vitelogenina e também de lipídeos faz com que os folículos aumentem mais de 20 vezes o seu tamanho (Clements, 1992; Roth, Porter, 1964; Sappington, Raikhel, 1998). Na etapa pós-trófica o ovo está maduro com o córion completamente formado e pronto para ser fecundado e oviposto (Clements, 1992).

No ovócito de *Cx. Quinquefasciatus*, 12 h aa, já podem ser observados grânulos de vitelogenina e inclusões lipídicas que aumentam em número e volume até aproximadamente 84h aa, quando o ovo está pronto para ser fecundado e oviposto (Cardoso et al., 2010). Ao final do processo vitelogênico, as células auxiliaadoras e células foliculares são reabsorvidas, restando somente o ovócito protegido pelo córion (Clements, 1992).

1.3 Controle populacional

Devido à problemática em saúde pública causada pelos mosquitos, há a necessidade do desenvolvimento e aplicação de métodos de controle populacional, sendo a melhor maneira utilizando-se de métodos de controle integrados (Raghavendra et al., 2011). Dentre as estratégias de controle podemos citar; o controle ambiental com a eliminação de criadouros; o controle químico com a utilização de inseticidas organofosforados, carbamatos e piretróides (Forattini, 2002), o controle genético (Speranca, Capurro, 2007) e o controle biológico com animais irradiados, com predadores, parasitas e parasitoides (Benedict, Robinson, 2003; Iturbe-Ormaetxe et al., 2011; Laven, 1967a; Marrelli et al., 2007). Nesse âmbito

podemos citar a bactéria *Wolbachia* que, conhecida pela sua capacidade de alterar características reprodutivas de seus hospedeiros, tem sido apontada como um promissor método de controle biológico de mosquitos e pragas agrícolas (Iturbe-Ormaetxe et al., 2011; Werren, 1997).

1.4 *Wolbachia pipientis*

Em homenagem ao seu colega Wolbach e à espécie do hospedeiro (*Culex pipens*) em que foi encontrada, Hertig nomeou a α -proteobactéria observada em tecidos reprodutivos dos mosquitos de *Wolbachia pipientis* (Stouthamer et al., 1999). Essa bactéria pertence à ordem Rickettsiales, na qual, diferentemente da *Wolbachia*, estão inseridas algumas bactérias potencialmente patogênicas aos vertebrados como, por exemplo, a *Rickettsia rickettsi* causadora da febre maculosa que acomete os seres humanos. Desde sua descoberta, os efeitos causados por *Wolbachia* em seus hospedeiros e sua diversidade têm sido amplamente estudados.

Wolbachia, assim como as bactérias do gênero *Rickettsia*, tem características morfológicas típicas: parede celular, cromatina dispersa, grande número de ribossomos e uma membrana celular extra, proveniente da membrana celular do hospedeiro - aspecto comum em endossimbiontes (Voronin et al., 2004). São bactérias Gram-negativas (parede celular composta por camada única de proteoglicanas), aeróbicas, intracelulares obrigatórias e encontradas principalmente em tecidos reprodutivos de seus hospedeiros (insetos, aracnídeos, crustáceos e nematoides). Sendo assim, o principal meio de transmissão desta bactéria é por via materna (transmissão vertical, pelo citoplasma do ovo), apesar de estudos filogenéticos indicarem que já ocorreram transmissões horizontais (O'Neill et al., 1992; Stouthamer et al., 1993; West et al., 1998; Zhou et al., 1998). Porém, este tipo de transmissão nunca foi demonstrado, com exceção da transmissão horizontal por vespas parasitoides (Heath et al., 1999; Huigens et al., 2004).

Estudos recentes mostraram que *Wolbachia* surgiu há aproximadamente 400 milhões de anos, a partir de um grupo polifilético de α -proteobactérias (Bordenstein et al., 2009) e hoje em dia essa bactéria é encontrada em aproximadamente 66% das espécies de insetos (Hilgenboecker et al., 2008) o que faz dela a bactéria intracelular mais abundante do planeta (Werren et al., 2008). Já foram descritos 11

supergrupos (A-K) de *Wolbachia* baseado na sequência gênica de 3 marcadores moleculares (*ftsZ*, *gltA*, *GroEL*) (Ros et al., 2009), sendo que somente as cepas A e B infectam mosquitos (Lo et al., 2002).

O fato de essas bactérias serem encontradas principalmente em tecidos reprodutivos não é um acaso, já que são capazes de alterar aspectos reprodutivos em seus hospedeiros incluindo: partenogênese, feminização, morte dos machos e incompatibilidade citoplasmática - o efeito mais comumente encontrado, mais bem estudado e o único descrito em mosquitos (Voronin et al., 2004). Todos esses efeitos induzem vantagem às fêmeas, já que são elas as responsáveis pela transmissão da bactéria para a prole. Além disso, *Wolbachia* pode causar diferenças na fecundidade e fertilidade de algumas espécies (Almeida et al., 2011; Dobson, Rattanadechakul, 2001; Min, Benzer, 1997) e essas diferenças dependem da cepa de *Wolbachia* e de seu hospedeiro (Duron et al., 2006).

A indução da partenogênese é bem documentada em espécies nas quais os machos se desenvolvem a partir de ovos não fertilizados, tais como ácaros, vespas e tripes (Stouthamer et al., 1990; Weeks e Breeuwer 2001; Arakaki et al., 2001). Dependendo do hospedeiro, a bactéria induz a supressão total da meiose ou o estágio final da primeira mitose, dobrando o número de cromossomos. Assim, em vez de produzirem filhos de ovos não fertilizados, as fêmeas produzem filhas, que ao contrário dos machos, são capazes de transmitir a bactéria a sua prole (Werren et al., 2008).

A feminização foi descrita para isópodos terrestres e lepidópteros. Nos primeiros, as bactérias se proliferam dentro da glândula androgênica, causando a hipertrofia da mesma e inibindo sua função. Consequentemente, machos genéticos adquirem fenótipo de fêmeas (funcionais) e estas possuem duas vezes mais filhas com relação às fêmeas não infectadas (Azzouna et al., 2004). O exato mecanismo responsável pela feminização em insetos ainda não foi esclarecido.

A morte de machos já foi registrada para os insetos (coleópteros, dípteros, lepidópteros) e aracnídeos (pseudoescorpiões) (Dyer, Jaenike 2004; Fialho, Stevens 2000; Jiggins et al., 2001; Zeh et al., 2005). Nesses grupos, a morte dos machos ocorre principalmente durante a embriogênese e aumentaria a aptidão reprodutiva das fêmeas, pois estas poderiam se alimentar dos machos mortos, reduzindo a

competição entre os descendentes, ou ainda diminuindo o risco de cruzamentos entre aparentados (Zeh et al., 2005).

A incompatibilidade citoplasmática (IC) foi primeiramente reportada por Laven (1951) e Ghelelovitch (1952), que observaram, em *Culex*, a ocorrência de cruzamentos incompatíveis, onde pouca ou nenhuma prole nascia. Por desconfiar de se tratar de um fenômeno decorrente de herança citoplasmática, o fenômeno foi denominado como incompatibilidade citoplasmática (Laven, 1959). Posteriormente, Yen e Barr (1971) mostraram que, pela eliminação das bactérias intracelulares com antibióticos, esse fenômeno não ocorria, associando assim o fenômeno à presença de *Wolbachia*.

A IC ocorre em uma situação específica: quando machos infectados cruzam com fêmeas não infectadas, observa-se grande diminuição ou ausência de viabilidade dos ovos. Isto traz uma vantagem às fêmeas infectadas, já que elas poderão cruzar tanto com um macho infectado como com um não-infectado e seus ovos serão sempre viáveis e infectados. Outro tipo de incompatibilidade ocorre quando macho e fêmea estão infectados com cepas diferentes da bactéria (Figura 1). Sabe-se que densidades mais altas da bactéria podem aumentar o nível da incompatibilidade, ou seja, maior será a chance de inviabilidade dos ovos (Breeuwer, Werren, 1993). Além disso, a idade de algumas espécies de *Drosophila* tem influência direta no nível da IC (Reynolds, Hoffmann, 2002; Turelli, Hoffmann, 1995) e também em *Aedes albopictus* (Kittayapong et al., 2002). Porém, Duron et al. (2007) observaram que em *Cx. pipiens* não há esta diferença. Com isso, a IC já foi apontada como possível indutora de microevolução ou até especiação de seus hospedeiros (Dean, Dobson, 2004; Laven, 1967b; Werren, 2008).

Figura 1 – Esquema de ocorrência de incompatibilidade citoplasmática.

Apesar de Serbus et al. (2008) verificarem que na IC a primeira divisão mitótica é alterada após a fertilização, associada a uma imperfeição na condensação da cromatina paterna e na segregação dos cromossomos, não se sabe ao certo o mecanismo pelo qual ocorre a incompatibilidade citoplasmática. Poinset et al. (2003) sugerem três modelos bioquímicos. O primeiro deles é o *lock-key-model* (chave-fechadura), que é o mais aceito até hoje: No citoplasma dos espermátócitos de um macho infectado, as bactérias estão presentes, porém, não são encontradas nos espermatozoides, já que são expulsas nos corpos residuais (Bressac, Rousset, 1993). Apesar disso, as bactérias produziram um fator proteico (fechadura) que se ligaria aos cromossomos dos espermatozoides. No caso do macho infectado cruzar com uma fêmea infectada as bactérias presentes nos ovócitos da fêmea produziram outro fator proteico (chave), o qual removeria o fator proteico masculino (fechadura); isto acarretaria em segregação normal dos cromossomos. Porém, se o macho estiver infectado e a fêmea não, o fator proteico masculino não será removido, fazendo que ocorra uma segregação errônea dos cromossomos. Em um indivíduo diploide, como os mosquitos, o embrião não se desenvolverá. Já em indivíduos

haploides haverá desenvolvimento do embrião, porém, haverá perda dos cromossomos paternos.

Outro modelo, também descrito por Poinot et al. (2003), é o *mistiming-model* no qual fatores proteicos também se ligariam aos cromossomos, porém sua atuação retardaria a segregação dos cromossomos paternos. O terceiro e menos aceito é o *titration-restitution* no qual a bactéria, ao invés de produzir e acoplar um fator proteico aos cromossomos, removeria fatores protéicos pré-existentes nos cromossomos dos machos, também fazendo com que ocorra segregação errônea dos cromossomos. Se o macho infectado cruzasse com uma fêmea infectada as bactérias presentes no ovócito restituíam as proteínas perdidas nos machos, fazendo com que a segregação dos cromossomos ocorresse normalmente.

Recentemente, observando cruzamentos entre indivíduos superinfectados (com *Wolbachia* de 2 ou mais supergrupos), Bossan et al. (2011) propuseram um novo modelo de como ocorreria a incompatibilidade e o nomeou de *goalkeeper-model*. Este modelo leva em conta a existência de dois fatores (x), associados à cepa da bactéria, dois fatores (y) associados ao hospedeiro e, além disso, como no chave-fechadura, existiria um fator “modificador” (fechadura) no espermátócito e um “resgatador” (chave) no ovócito. A quantidade destes fatores teria certa especificidade em cada simbiose (*wolbachia*-hospedeiro), ocorrendo assim vários níveis de incompatibilidade.

Também devido ao fenômeno da incompatibilidade citoplasmática *Wolbachia* é apontada como uma possível ferramenta para controle populacional de mosquitos (Iturbe-Ormaetxe et al., 2011; Laven, 1967a). Esse controle foi primeiramente proposto utilizando-se diretamente a incompatibilidade, ou seja, em um local onde os indivíduos não estariam infectados a soltura de machos infectados faria com que os ovos destes machos com as fêmeas (não-infectadas) não fossem viáveis (Laven, 1967a; Stouthamer et al., 1999).

Min e Benzer (1997) encontraram em *Drosophila melanogaster* uma cepa de *Wolbachia* com alta virulência que causava morte precoce da mosca, cujos tecidos apresentavam degeneração tecidual e foi nomeada de *pop-corn*, hoje em dia mais conhecida como wMelPop. Com intuito de controlar mosquitos e doenças transmitidas por eles, esta cepa, e variações dela, foram transfectadas para diferentes mosquitos induzindo redução de longevidade, o que faria com que os

mosquitos não conseguissem realizar um segundo repasto sanguíneo e consequentemente não transmitiriam doenças (McMeniman et al., 2009; Suh et al., 2009). Além disso, foi visto que a presença da bactéria estimula o sistema imune dos mosquitos os protegendo de outras infecções e, por isso, passam a não transmitir outros parasitos, como o Vírus Dengue, o Vírus Chikungunya, o protozoário causador da malária, o *Plasmodium* (Moreira et al., 2009), além do Vírus do Oeste do Nilo (Glaser, Meola, 2010). Esta estimulação do sistema imune do mosquito pode ser devido ao aumento das espécies reativas de oxigênio produzidas pela *Wolbachia* (Pan et al., 2012), porém o(s) mecanismo(s) exato(s) pelo(s) qual(is) esta diminuição ocorre ainda não foi(foram) determinado(s).

Em duas localidades da Austrália, foram realizados testes de soltura para substituição de população de mosquitos *Aedes aegypti* naturalmente não infectados, por mosquitos artificialmente infectados, mostrando resultados promissores (Hoffmann et al., 2011). Também estão sendo realizadas solturas no Vietnã, na Indonésia e, futuramente, no Brasil com intuito de eliminar a circulação do Vírus Dengue (Maciel-de-Freitas et al., 2012).

A relação simbiótica de *Wolbachia* com seus hospedeiros abrange desde o mutualismo ao parasitismo, sendo que as cepas C e D, presentes em nematódeos filariais, representam o caso mais difundido de mutualismo. Experimentos que utilizaram antibióticos para curar hospedeiros infectados mostraram que a *Wolbachia* é primariamente benéfica para os nematoides (Taylor et al., 2005), sendo que esta proveria metabólitos essenciais para a reprodução, desenvolvimento e sobrevivência dos hospedeiros (McNulty et al., 2010). Em vista disso, doenças como a filariose linfática (causada pelo nematoide *Wuchereria bancrofti* que é transmitido por *Cx. quinquefasciatus* no Brasil) estão também sendo tratadas com antibióticos, estimulando assim a morte das bactérias e consequentemente das filarias (Taylor, 2010). Na relação com crustáceos, aracnídeos e insetos a bactéria é normalmente considerada parasita, já que pode causar os distúrbios reprodutivos já comentados anteriormente.

1.5 Morfometria geométrica das asas

A morfometria corpórea é a formalização matemática entre as formas de objetos e tem sido utilizada para diferenciar espécies e até mesmo populações de mosquitos (Forattini, 2002). A morfometria, que formaliza matematicamente as dissimilaridades entre formas geométricas com alto poder de resolução, permite a comparação de padrões corporais de forma e tamanho independentemente a partir de caracteres multivariados (Monteiro, Reis, 1999; Rohlf, 1993a).

Marcos anatômicos como pontos extremos, ou de justaposição de órgãos e tecidos são geralmente utilizados nas coletas de dados e, no caso das asas, são utilizados pontos de justaposição de nervuras. Além disso, a asa do mosquito é uma estrutura bidimensional que minimiza os erros de deformação e posicionamento, além de apresentar características potencialmente herdáveis e sujeitas à evolução (Dujardin, 2008; Jirakanjanakit et al., 2008). Para a coleta de dados são tomadas coordenadas dos marcos das estruturas e estas são transpostas para um plano cartesiano imaginário, tendo assim valores nos eixos x e y para cada ponto marcado, os quais serão ordenados em tabelas de dados (Monteiro, Reis, 1999). Para comparação de formato alar, é realizada análise estatística pela análise das variáveis canônicas que, por redução da dimensionalidade, passam a ser expressas por variáveis latentes representadas em gráficos uni ou multidimensionais (dependendo do número de populações analisadas).

A forma da asa tem sido utilizada para caracterização e identificação de espécies, porém o tamanho da asa não deve ser utilizado para este fim, já que sofre plasticidade devido a mudanças ambientais (Dujardin, 2008). Porém, o comprimento e o tamanho da asa têm sido utilizados para estimar o tamanho do mosquito (Jirakanjanakit et al., 2007; Lehmann et al., 2006; Morales Vargas et al., 2010). Além disso, estudos mostraram que perturbações ambientais podem induzir alterações fisiológicas no mosquito como a assimetria bilateral de forma e tamanho alar (Mpho et al., 2001, 2002).

2 OBJETIVOS

Comparar as eventuais alterações fisiológicas e reprodutivas em *Culex quinquefasciatus* infectados e não-infectados por *Wolbachia pipientis*. Para isto os objetivos deste estudo foram:

- complementar os estudos anteriormente iniciados (Almeida, 2008) de diferenças de aptidão reprodutiva (*fitness*).
- investigar possíveis diferenças no processo de vitelogênese.
 - por microscopia de ovários;
 - por diferenças proteicas nos ovários e corpos gordurosos;
 - por diferenças na quantidade de mRNA de vitelogenina e receptores de vitelogenina
- medir e comparar o tamanho e assimetria alares.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Nossa colônia de mosquitos *Culex quinquefasciatus* (cepa PIN) foi iniciada em 1995, com cerca de 400 mosquitos capturados às margens do Rio Pinheiros, São Paulo. Em novembro de 2005 foi observada, por microscopia eletrônica de cortes de ovários, a presença de bactérias intracelulares em todos os tipos celulares do folículo ovariano. O diagnóstico de *Wolbachia* foi confirmado, em meu mestrado, por reação em cadeia de polimerase (PCR) e sequenciamento, que revelaram se tratar de *Wolbachia pipientis* da cepa B (Almeida, 2008).

Os animais foram mantidos a 25-28 °C com umidade relativa de 65-75%. As larvas foram alimentadas com comida para peixes (Sera[®]Vipan, Heinsberg, Alemanha) e os adultos com provisão *ad libitum* de solução de sacarose a 10%. Quando necessário, as fêmeas foram alimentadas com sangue em camundongos BALB/c anestesiados com 0,3 mg/kg de cloridrato de xilazina (Calmiun, Agner União, Pouso Alegre, Minas Gerais, Brasil) mais 30 µg/kg de acepromazina (Acepran, Univet S.A., São Paulo, Brasil). Com aprovação dos Comitês de Ética Animal do Instituto Butantan (protocolo: 740-10) e do Instituto de Ciências Biomédicas (protocolo: 115).

3.2 Tratamento com antibiótico para obtenção de colônia não-infectada (*wPip*)

Durante a primeira semana de vida, aproximadamente 300 mosquitos adultos, machos e fêmeas, foram mantidos normalmente com solução de sacarose a 10% (p/v). Na semana seguinte, foi oferecida a mesma solução adicionada de 2 mg/ml (p/v) de cloridrato de tetraciclina em água tamponada (pH 7,0), trocada todos os dias, por uma semana (modificado de Dobson, Rattanadechakul, 2001).

Durante 5 dias após término do tratamento com antibiótico, as fêmeas foram mantidas com 10% (p/v) de solução de sacarose e em seguida alimentadas com sangue. A prole destes mosquitos (geração F1) foi submetida a um novo tratamento, como descrito acima, e as fêmeas também foram alimentadas com sangue. Vinte das fêmeas alimentadas foram separadas para postura individual e, após

oviposição, foram sacrificadas para a obtenção do DNA. Após confirmação do sucesso do tratamento por PCR, a prole destas fêmeas foi agrupada e a partir dela iniciamos a colônia não-infectada (*wPip⁻*) para realizarmos as comparações com a colônia infectada (*wPip⁺*).

3.3 Extração de DNA

Mosquitos adultos foram homogeneizados individualmente, utilizando pistilos apropriados para microtubos. A extração foi realizada utilizando protocolo descrito por Jowett (1986) com modificações. Os indivíduos foram homogeneizados em 150 µl de solução 1 (Tris-HCl 10 mM (pH 7,5), NaCl 60 mM, EDTA 0,5 mM). Foi adicionado 150 µl de solução 2 (SDS 1,25%, Tris-HCl 0,3 M (pH 9,0), EDTA 0,1 M, sacarose 5%) e proteinase K a 100 µg/ml. A mistura foi incubada em banho-maria a 65 °C por 1 h e, após esse tempo foi adicionado acetato de potássio 1 M e incubado por 45 min a 4 °C. O material foi submetido à centrifugação por 10 min a 12000 g a 4 °C. O sobrenadante resultante foi transferido para um novo tubo, adicionado etanol 100% (1:2 v/v) e centrifugado em 12000 g por 5 min à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado, ao precipitado foi adicionado 1 ml de etanol 70% e submetido a uma nova centrifugação nas mesmas condições que a anterior. O precipitado foi ressuspensionado em 30 µl de H₂O milli-Q (Millipore, Barueri, São Paulo, Brasil), adicionado 100 µg/µl de RNase (Ribonuclease A, Sigma, São Paulo, Brasil) e mantido por 1 h a 37 °C. As amostras foram armazenadas em freezer a -20 °C. Para confirmação da qualidade do DNA extraído, os produtos das extrações foram aplicados em gel de agarose 1% e as eletroforeses foram realizadas com voltagem constante de 100 V por 20 min. Os géis foram corados com SYBR® safe DNA gel stain (Invitrogen, São Paulo, Brasil) e observado sob luz UV.

3.4 Reação em cadeia de polimerase (PCR) para diagnóstico de *Wolbachia*

Foram utilizados iniciadores específicos para o gene *wsp*, codificador da proteína de membrana de *Wolbachia* (Zhou et al., 1998) (Quadro 1).

O produto de extração de DNA (1 µl), foi amplificado em solução de Tris HCl 75 mM pH 8,0, MgCl₂ 2 mM, KCl 50 mM, (NH₄)₂SO₄ 20 mM contendo 0,25 mM de cada

iniciador, 1 mM de desoxirribonucleotídeo-trifosfato (dNTP's; Invitrogen) e 1 U de Taq polimerase (Invitrogen). As amostras foram desnaturadas a 94°C por 2 min e submetidas a 40 ciclos de replicação de 1 min a 94 °C com 1 min a 55 °C para a reassociação dos iniciadores e 1 min a 72 °C para a extensão da fita de DNA. Para isso foi utilizado um aparelho automático para PCR Mastercycler Personal (Eppendorf, São Paulo, Brasil). Os produtos das PCR foram aplicados em géis de agarose 1,5% e as eletroforeses realizadas com voltagem constante de 100 V por 20 min. Os géis foram corados com SYBR® safe DNA gel stain (Invitrogen) e observados sob luz UV.

PCRs do DNA de 10 indivíduos fêmeas de ambas as colônias foram realizadas a cada 2 meses para verificação do diagnóstico dos mosquitos *wPip*⁺ e *wPip*⁻.

3.5 Tempo de desenvolvimento larval

Foram separadas (logo após eclosão dos ovos) aproximadamente 100 larvas L1 em cada uma das 3 caixas (20 x 30 cm) de cada colônia. Após a separação foram adicionados 50 mg de comida para peixes (Sera®Vipan, Heinsberg, Alemanha) e, após dois dias e a cada dia subsequente, foram adicionados mais 50 mg até o 8º dia após eclosão. O tempo de desenvolvimento da larva L1 até a emergência de cada adulto foi medido. Esse experimento foi realizado em triplicata (total de 900 larvas). Os dados obtidos foram analisados estatisticamente com o programa Statistica 7.0 e, como teste estatístico, foi utilizado o Qui-quadrado (*Observed x Expected*).

3.6 Aptidão reprodutiva

Sessenta fêmeas e sessenta machos de cada colônia foram separados no estágio de pupa e por 5 dias viveram na mesma gaiola para realizarem a cópula. No 5º dia de vida adulta, foi oferecido um camundongo por 1 h para o repasto sanguíneo. Foram avaliados: o número de fêmeas que se alimentaram; quantas delas ovipuseram; o número de ovos contidos em cada jangada; assim como o número de larvas L1 provenientes desses ovos. Após 5 dias da oviposição foi novamente oferecido camundongo para o repasto e os mesmos parâmetros foram

analisados dessa maneira por 4 ciclos gonotróficos. A partir dos dados obtidos foram calculadas: a fecundidade (relação entre o número de fêmeas totais e o número de fêmeas que ovipuseram); a fertilidade (número de ovos por fêmea) e; viabilidade dos ovos (número de larvas L1 em relação ao número de ovos). Foram realizadas análises estatísticas com o programa Statistica 7.0 e como teste estatístico foi utilizado o Qui-quadrado (*Observed x Expected*).

3.7 Tempo de oviposição após alimentação sanguínea

Vinte fêmeas, de cada colônia, alimentadas por 1 h com sangue, foram separadas para postura individual. O tempo de oviposição após alimentação sanguínea foi medido para cada fêmea em intervalos de 3 em 3 horas a partir das 72 h aa, estendendo-se até a oviposição do último indivíduo. Os dados obtidos foram analisados estatisticamente com o programa Statistica 7.0 e como teste estatístico foi utilizado o Qui-quadrado (*Observed x Expected*).

3.8 Longevidade

Aproximadamente 50 machos e 50 fêmeas de cada colônia foram separados no estagio de pupa e, quando adultos, mantidos com provisão de açúcar *ad libitum*. Três vezes por semana foi contado o número de adultos mortos até o ultimo indivíduo vivo. Concomitantemente o mesmo foi feito com 100 machos e 100 fêmeas, porém a estas foi oferecido camundongo para realização do repasto sanguíneo, por 1 h, e término do ciclo gonotrófico. Os dados obtidos foram analisados estatisticamente com o programa Statistica 7.0 e como teste estatístico foi utilizado o Teste de Cox.

3.9 Microscopia

Ovários de fêmeas adultas não alimentadas com sangue (NA), 24, 48, 72 e 96 h aa foram dissecados sob lupa e fixados com glutaraldeído 0,5% (v/v) e paraformaldeído 4% (p/v) em tampão cacodilato de sódio 0,1 M pH 7,2, por 90 min a temperatura ambiente. Os materiais foram pós-fixados com tetróxido de ósmio 1%

(p/v) em tampão cacodilato de sódio 0,1 M pH 7,2. Posteriormente, foram desidratados em uma série de concentrações crescentes de acetona até 100% e incluídos em resina acrílica Spurr.

Os cortes semifinos (em torno de 300 nm de espessura) foram corados com azul de toluidina e estudados em microscópio de luz.

3.10 Análise microscópica do desenvolvimento ovariano

Cortes semifinos de ovários de 10 mosquitos por tempo (NA, 24, 48, 72, e 96 h aa) de cada colônia, foram analisados por microscopia de luz em aumento de 1000X. Cortes meridionais de 2 folículos de cada ovário (a orientação foi estabelecida pela presença de células nurse em situação polar) foram utilizados para avaliar o estado de desenvolvimento do córion. A análise estatística do estado de desenvolvimento do córion foi realizada utilizando o programa Statistica 7.0 e Qui-quadrado (*Observed x Expected*) como teste estatístico.

3.11 Quantificação de proteínas totais

Amostras de extratos de ovários e corpos gordurosos de fêmeas NA, 24, 48, 72, 96 h aa, foram solubilizadas em PBS adicionado de coquetel de inibidores de proteases (leupeptina 50 µg/ml, pepstatina 5 µg/ml, quimostatina 5 µg/ml, antipaína 5 µg/ml e PMSF 5 µg/ml) e E-64 5 µM. A quantificação das amostras foi realizada utilizando-se o Kit Commassie Bio Rad para microensaios seguindo as recomendações do fabricante e utilizando uma curva padrão de albumina sérica bovina (BSA). As amostras foram lidas em aparelho de ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) Multiskan EX (Labsystems, Israel).

A quantidade de proteínas totais por ovário de todos os tempos analisados foram medidas a partir de no mínimo 10 ovários por grupo (*wPip⁻* e *wPip⁺*) por tempo, em triplicata e comparadas em relação à quantidade de proteína por ovário ou utilizadas para eletroforese (SDS-PAGE).

3.12 Análise eletroforética em gel de poliacrilamida SDS (SDS-PAGE)

Amostras de extratos de ovários e corpos gordurosos de fêmeas NA, 24, 48, 72, 96 h aa foram utilizadas para eletroforese. Duas µg das amostras de ovário e 8 µg das amostras de corpos gordurosos foram solubilizadas em tampão de amostra (Tris 62 mM; DTT 50 mM; SDS 0,2%; glicerol 10%; azul de bromofenol 0,01%) e separados por gel descontínuo de poliacrilamida a 10% contendo 0,1% de SDS (Laemmli, 1970) com voltagem constante de 100 V. Os géis foram corados com Comassie brilliant blue R-250 a 0,2% (p/v) dissolvido em etanol, ácido acético, água (45:10:45, v/v/v) durante 2 h, depois descorados com etanol, ácido acético e água (23:7:70, v/v/v). As massas moleculares foram determinadas utilizando marcadores padrões: miosina (202 kDa); β-galactosidase (117 kDa); albumina de soro bovino (98 kDa) e ovalbumina (47 kDa) (Bio-Rad Laboratories, Berkeley, California, U.S.A).

3.13 Imunoblot

Após eletroforese de amostras de extratos de ovários (2,5 µg) e corpos gordurosos (12 µg) as proteínas foram transferidas para membranas nitrocelulose (Towbin et al., 1979) com amperagem constante de 80 mA por 2 h. As membranas foram bloqueadas em TBS (Tris-HCl 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4) contendo 5% de leite desnatado e, posteriormente incubados com anticorpo primário policlonal de coelho contra subunidade maior da vitelogenina de *Cx. quiquefasciatus* (anti-Vg⁺; cedido pelo Laboratório de Biologia Celular e Ultraestrutura do ICB/USP) diluído 1:12000 em TBS contendo 1% de leite desnatado, juntamente com anticorpo primário policlonal de camundongo contra subunidade menor da vitelogenina (anti-Vg⁻; cedido pelo Laboratório de Biologia Celular e Ultraestrutura do ICB/USP) diluído 1:600 em TBS, contendo 1% de leite desnatado, durante 2 h a 25 °C e *overnight* a 4 °C. Posteriormente as membranas foram lavadas 4x de 10 min com TBS e incubadas com anticorpo secundário conjugado a peroxidase (anti-IgG de coelho e de camundongo, Pierce), diluído 1:1500 em TBS contendo 1% de leite desnatado e mantido em agitação, por 2 h, à temperatura ambiente. Após 4 lavagens com TBS, a peroxidase foi revelada com H₂O₂ e 4-cloro-1-naftol (Bio-Rad Laboratories).

3.14 Extração e purificação de RNA

Três réplicas de oito mosquitos fêmeas inteiros de cada tempo (NA, 24, 48, 72, 96 h aa) de cada colônia foram homogeneizadas em tubos de microcentrífuga com 500 µl de Trizol® (Invitrogen) e incubados por 5 min à temperatura ambiente. Posteriormente foram adicionados 100 µl de clorofórmio. O material foi agitado vigorosamente por 2 min e centrifugado por 15 min a 12.000 g. A fase translúcida contendo o RNA foi transferida para outro tubo, no qual foram adicionados 250 µl de isopropanol, agitado e incubado por 10 min à temperatura ambiente. Após centrifugação por 10 min a 12.000 g o sobrenadante foi retirado, ao *pellet* foi adicionado 1 ml de álcool 75% e centrifugado novamente por 5 min a 4.700 g. O *pellet* resultante foi seco e dissolvido em 30 µl de H₂O tratada com 0,1% de dietilpirocarbonato (H₂O-DEPC) e armazenado a -20 °C.

O RNA foi quantificado em espectômetro (Ultrospec 3000; Pharmacia Biotech, São Paulo, Brasil) em um comprimento de onda de 260 nm. Para eliminar o DNA existente na amostra, 2,2 µg de RNA total foi adicionado 1 µl de Reaction Buffer DNase I 10x (Invitrogen), 2,2 U de desoxirribonuclease I (DNase I Amp grade; Invitrogen) e H₂O-DEPC qsp 10 µl. Após leve agitação, as amostras foram incubadas por 15 min à temperatura ambiente e colocadas em gelo. Foi adicionado 1 µl de EDTA 25 mM pH 8,0 e incubado por 10 min a 65 °C para a inativação da enzima. O RNA purificado foi armazenado em freezer -20 °C.

Para verificar a eficiência do tratamento de purificação das amostras 0,2 µg de RNA total tratado foi utilizado como molde para PCR, utilizando oligonucleotídeos iniciadores para o gene de actina (Quadro 1). Os materiais resultantes da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% e corado com brometo de etídeo. O material que não apresentou produto da PCR observado em gel de agarose 1%, foi utilizado para a síntese de DNA complementar (cDNA).

3.15 Síntese da primeira fita de cDNA

Foram utilizados 2 µg de RNA, 0,5 µg de Oligo (dT) (Invitrogen) e dNTPs 0,1 mM. Para a síntese da primeira fita de cDNA foi utilizado o kit *SuperScript II* (Invitrogen). Os materiais foram incubados por 5 min a 65 °C, foram adicionados 4 µl

de tampão 5x (Tris-HCl 250 mM pH 8,3; KCl 375 mM; MgCl₂ 15 mM) (Invitrogen) a cada material e 2 µl de Ditioneitol (DTT) 0,1 M (Invitrogen). Após incubação por 2 min a 42 °C, foi adicionado 1 µl de enzima *SuperScript II RNase H-reverse Transcriptase* (Invitrogen), seguido de nova incubação a 42 °C por 50 minutos. A inativação da enzima foi efetuada a 70 °C por 15 min.

Para verificar se a síntese do cDNA ocorreu, foi realizada PCR em equipamento automático (Biometra, Goettingen, Alemanha). As misturas de reação continham 2 µl de *Reaction Buffer* 10x com 2 mM de MgCl₂ (Biotools, São Paulo, Brasil), 1 µl de cada um dos oligos nucleotídeos (cedido pelo Laboratório de Biologia Celular e Ultraestrutura do ICB/USP), 1 µl de cDNA ou DNA e 1 U de *Taq Polimerase* (Biotools). As amostras foram desnaturadas a 94 °C por 2 min e submetidas a 30 ciclos de replicação de 20 s a 94 °C, 20 s a 55 °C para reassociação dos oligonucleotídeos e 40 s a 72 °C.

3.16 PCR em tempo real

Estas reações foram realizadas pelo termociclador MasterCycler® ep realplex 2 (Eppendorf) com SYBR® green. Foram utilizados 400 nM de cada iniciador (cedido pelo Laboratório de Biologia Celular e Ultraestrutura do ICB/USP; Quadro 1), 1 µl de cDNA para o volume final de 20 µl. As amostras foram desnaturadas a 95 °C por 15 min e submetidas a 40 ciclos de replicação de 30 s a 94 °C, 30 s a 55 °C para reassociação dos oligonucleotídeos e 30 s a 72 °C para amplificação dos fragmentos. A especificidade das amplificações foi confirmada pelas curvas de dissociação geradas após os ciclos de replicação, de acordo com o manual do fabricante e as análises dos dados foram realizadas no programa Realplex. Dentre os genes candidatos a normalizadores, proteína ribossomal e actina, (oligonucleotídeos em quadro 1) foi utilizado o de actina, pois se mostrou menos variável durante o período vitelogenico (dado não mostrado). Os valores do ciclo limiar (*threshold cycle*, Ct) foram utilizados para quantificar a expressão do gene de interesse em relação ao gene de actina, usando o método de comparação *threshold cycle*.

Quadro 1 - Oligonucleotídeos utilizados para PCR, RT-PCR e PCR em tempo real.

Gene ou transcritos*	Referência ou (nº de acesso – Vector Base)	Oligonucleotídeo
<i>wsp</i> (supergrupo B)	Zhou et al. (1998)	183F- 5'AAGGAACCGAAGTTCATG 3' 691R- 5'AAAAATTAAACGCTACTCCA 3'
Actina (<i>Culex</i>)	CPIJ16462	F- 5' ACAGGTCATCACCATCGGTA 3' R- 5' TCCTTCTGCATACGATCAGC 3'
Proteína ribossomal 60S L32 (<i>Culex</i>)	CPIJ0011220	F- 5' AGGTATCGACAACCGAGTGC 3' R- 5' ACAATCAGCTTGCGCTTCTT 3'
Receptor de vitelogenina (<i>Culex</i>)	CPIJ020278	F- 5' GACGTGGAGAACAAGTGCAA 3' R- 5' GATCTCCGCAGTCATCCTTC 3'
Vitelogenina A1 (<i>Culex</i>)	CPIJ010190	F- 5' CGTTATGCCCGTAACTGGACT 3' R- 5' ACTGGCAGAAGCGTTCAGAT 3'

*os oligonucleotídeos dos transcritos foram desenhados por Cardoso (2009, 2012).

3.17 Análise morfométrica alar

Para as análises de morfometria geométrica alar foram utilizados os métodos descritos por Vidal e Suesdek (2012). As asas direitas e esquerdas de aproximadamente 30 fêmeas de cada colônia foram montadas entre lâmina e lamínula com bálsamo do Canadá. As imagens das asas foram capturadas pela câmera fotográfica digital Leica 320 acoplada a um microscópio estereoscópico Leica S6. Com o auxílio do *software* TpsDig v.2 (Rohlf, 2005) foram tomadas as coordenadas posicionais de cada um dos 18 pontos anatômicos sobre um plano cartesiano (Figura 2). Sobre esses dados foram calculados os tamanhos de centroide (para relacionar se a possível diferença de *fitness* entre fêmeas *wPip*⁺ e *wPip*⁻ é devida ao tamanho do indivíduo) e assimetria bilateral (para analisar se a bactéria causa distúrbio fisiológico nas fêmeas) com asas direitas e esquerdas, utilizando os programas TpsUtil 1.26 (Rohlf, 2004), TpsRelw 1.36 (Rohlf, 2003b), TpsRegr 1.28 (Rohlf, 2003c). A assimetria bilateral foi medida em relação à forma e ao tamanho e as análises estatísticas foram realizadas pelo programa MorphoJ 1.02

utilizando o teste estatístico ANOVA para o tamanho e o teste de permutação para a forma.

Figura 2 – Foto e conformação alar obtida com a ligação dos marcos anatômicos de asa de *Culex quinquefasciatus*.

A – Imagem de asa de *Culex quinquefasciatus*; **B** – Conformação alar da ligação dos 18 marcos anatômicos das asas.

4 RESULTADOS

4.1 *wPip*⁺, obtenção e manutenção de *wPip*⁻

Durante meu mestrado havíamos realizado tratamento com antibiótico tetraciclina (1 mg/ml) dos indivíduos infectados com sucesso, porém antes de iniciar os experimentos no doutorado detectamos que indivíduos da colônia não-infectada estavam infectados, provavelmente pela entrada de indivíduos infectados na colônia não-infectada. Com isso os indivíduos infectados (Figura 3) foram submetidos a um novo tratamento com 2 mg/ml de tetraciclina e obtivemos sucesso na desinfecção, após 2 gerações, confirmada pela PCR. Dentre as 20 fêmeas analisadas da segunda geração (F2) de mosquitos tratados, nenhuma apresentou em gel de agarose, bandas correspondentes ao gene *wsp* após eletroforese (Figura 4) e, a partir da prole destes 20 indivíduos não-infectados, iniciamos a colônia *wPip*⁻. Os experimentos com *wPip*⁻ só foram iniciados após confirmação de que até a 6^o geração após o tratamento não foram encontrados indivíduos infectados. A *wPip*⁻ manteve-se não-infectada até o fim dos experimentos, como confirmado pelas PCRs realizadas a cada 2 meses.

Figura 3 – Eletroforese em gel de agarose 1,5% da PCR, de *wPip*⁺, com iniciadores específicos para o gene *wsp*.

1 a 19: Fragmentos de 500 pares de base (pb) do gene *wsp* de um indivíduo fêmea, por poço, da *wPip*⁺; +: controle positivo, *Culex quinquefasciatus* infectados com a cepa B da bactéria; -: controle negativo, sem DNA; pad: padrão de peso molecular.

Figura 4 – Eletroforese em gel de agarose 1,5% da PCR, de mosquitos tratados, com iniciadores específicos para o gene *wsp*.

1 a 20: Ausência de fragmentos de 500 pares de base (pb) do gene *wsp* de um indivíduo fêmea, por poço, da geração F2 de indivíduos tratados; +: controle positivo, *Culex quinquefasciatus* infectados com a cepa B da bactéria; -: controle negativo, sem DNA; pad: padrão de peso molecular.

4.2 Tempo de desenvolvimento larval

Todas as larvas que sobreviveram se tornaram adultos entre 7 e 10 dias. A tabela 1 sumariza o resultado observado.

Tabela 1 – Dias nos quais as pupas se tornaram adultas.

Dia após eclosão	<i>wPip⁻</i>	<i>wPip⁺</i>
	(número de adultos emergidos)	(número de adultos emergidos)
7 ^o	0,4% (3)	0,4% (3)
8 ^o	34,5% (294)	26% (214)
9 ^o	52,4% (446)	52,1% (429)
10 ^o	12,7% (108)	21,5% (177)
Total	100% (851)	100% (823)

Para comparar o tempo de desenvolvimento larval, estes dados foram submetidos a análise estatística pelo teste de Qui-quadrado (*observed x expected*), que mostrou que os indivíduos da *wPip⁻* possuem esse tempo mais curto ($p < 0,001$).

4.3 Aptidão reprodutiva

A tabela 2 mostra os valores absolutos obtidos em relação ao número de fêmeas que se alimentaram, número de jangadas de ovos, número de ovos presentes nas jangadas e o número de larvas provenientes dos ovos de 60 indivíduos de cada colônia por 4 ciclos gonotróficos.

Tabela 2 – Aptidão reprodutiva absoluta de mosquitos *wPip⁻* e *wPip⁺*.

Ciclo gonotrófico	Fêmeas alimentadas		Jangadas		Ovos		Larvas (L1)	
	<i>wPip⁻</i>	<i>wPip⁺</i>	<i>wPip⁻</i>	<i>wPip⁺</i>	<i>wPip⁻</i>	<i>wPip⁺</i>	<i>wPip⁻</i>	<i>wPip⁺</i>
1º	44	44	34	24	7018	4651	6098	3719
2º	33	22	23	15	4414	2213	1923	682
3º	19	18	12	10	1898	1293	689	334
4º	10	3	8	3	764	239	188	41
Total	60*	60*	77	52	14094	8396	8898	4776

* indivíduos disponíveis apenas para o 1º ciclo gonotrófico, porém somente 44 de cada colônia se alimentaram no 1º ciclo.

Com os dados da tabela acima foram calculados os valores relativos (Tabela 3).

Tabela 3 – Aptidão reprodutiva relativa de mosquitos *wPip⁻* e *wPip⁺*.

	Fecundidade (%)		Fertilidade (media)		Viabilidade (%)	
	<i>wPip⁻</i>	<i>wPip⁺</i>	<i>wPip⁻</i>	<i>wPip⁺</i>	<i>wPip⁻</i>	<i>wPip⁺</i>
1º	77	55	206	193	87	80
2º	70	68	191	148	43	31
3º	63	56	158	129	36	26
4º	80	100	95	80	25	17
Media	70*	60*	163	138	48	39

* 4º ciclo gonotrófico não incluso

Pudemos observar que quanto à fecundidade (Qui-quadrado = 23,76; $p < 0,001$) e fertilidade (Qui-quadrado = 34,39; $p < 0,001$) das fêmeas, assim como na viabilidade dos ovos (Qui-quadrado = 380,19; $p < 0,001$) os mosquitos *wPip⁻* possuem uma melhor aptidão reprodutiva.

4.4 Tempo de oviposição após alimentação sanguínea

Nenhuma fêmea morreu antes da oviposição e depositaram seus ovos entre 72h aa e 84 h aa. A tabela 4 sumariza as observações.

Tabela 4 – Número de fêmeas que depositaram seus ovos por tempo.

	<i>wPip</i> ⁻ (número de fêmeas que ovipuseram)	<i>wPip</i> ⁺ (número de fêmeas que ovipuseram)
72 h	50% (15)	93,3% (28)
75 h	16,7% (5)	0% (0)
78 h	16,7% (5)	3,3% (1)
81 h	10% (3)	0% (0)
84 h	6,6% (2)	3,4% (1)
Total	100% (30)	100% (30)

A partir dos dados apresentados na tabela 4 foi elaborado um gráfico (Figura 5).

Figura 5 – Gráfico comparativo do tempo de oviposição após alimentação sanguínea.

Podemos observar que as 72 h aa quase todas as fêmeas $wPip^+$ já haviam depositado seus ovos, diferentemente das fêmeas $wPip^-$, pois apenas metade delas havia depositado seus ovos neste tempo. A análise estatística do tempo de oviposição mostrou que os indivíduos $wPip^+$ necessitam de menos tempo aa para depositarem seus ovos (Qui-quadrado = 18,88; $p < 0,01$).

4.5 Longevidade

Dentre os indivíduos alimentados e não alimentados com sangue, o número de indivíduos mortos foi contado até o 60º dia de vida adulta, quando não restaram mais indivíduos vivos. A partir da sobrevivência dos indivíduos, foram montados gráficos comparativos de sobrevivência de machos (Figura 6), fêmeas não alimentadas com sangue (Figura 7) e fêmeas alimentadas com sangue (Figura 8).

Figura 6 – Gráfico comparativo de longevidade de machos mantidos com solução de sacarose.

Figura 7 – Gráfico comparativo de longevidade de fêmeas mantidas com solução de sacarose e não alimentadas com sangue.

Figura 8 – Gráfico comparativo de longevidade de fêmeas mantidas com solução de sacarose e alimentadas com sangue.

Os dados de sobrevivência de machos, fêmeas não alimentadas e fêmeas alimentadas com sangue foram analisados estatisticamente (Teste de Cox) e foi observado que, somente no caso de fêmeas alimentadas com sangue, a diferença de sobrevivência foi significativa, ou seja, dentre as fêmeas que se alimentam de sangue, as que são infectadas pela *Wolbachia* vivem mais tempo (machos – $p > 0,05$; fêmeas não alimentadas – $p > 0,05$ e fêmeas alimentadas – $p < 0,001$).

Utilizando-se dos dados de fertilidade (número de ovos) viabilidade dos ovos e longevidade dos adultos foi calculado o Ro , que indica a contribuição média em descendentes para a população por fêmea (Ro de $wPip^-$ = 258 e Ro de $wPip^+$ = 208). Isso mostra que o fato de os mosquitos $wPip^-$ depositarem mais ovos é mais relevante, em termos populacionais, do que os indivíduos $wPip^+$ viverem mais tempo.

4.6 Análise do desenvolvimento ovariano

A figura 9 mostra a organização celular de um folículo ovariano 24 h aa.

Figura 9 – Organização celular de um folículo ovariano de mosquito $wPip^+$ 24 h após alimentação sanguínea.

Fotomicrografias de folículos ovarianos, 24 h aa. **A-** O epitélio folicular (setas) rodeia o conjunto formado pelo ovócito (OV) e as células nurse (CN) N: núcleos. Asterisco: grânulos de vitelina. 400X. **B-** Maior aumento destacando, no espaço folicular, as vesículas formadoras do endocóion (setas). CF: células foliculares. CN: célula nurse. OV: ovócito. N: núcleos. V: grânulos de vitelina. 1000X. Fonte: Cardoso (2008)

Às 24 h aa não observamos diferenças significativas entre folículos ovarianos de fêmeas *wPip*⁺ e *wPip*⁻ (Figura 10). Porém, em meu mestrado (Almeida, 2008) observamos que às 48 h aa (único tempo analisado) havia um atraso no desenvolvimento de folículos ovarianos de mosquitos não-infectados (Figura 11). Em todos os outros tempos analisados neste trabalho (NA, 24, 72 e 96 h aa) não foram observadas diferenças no desenvolvimento de folículos ovarianos entre mosquitos *wPip*⁻ e *wPip*⁺. No tempo de 48 h aa pudemos observar algumas vesículas na porção apical das células foliculares de mosquitos *wPip*⁺, indicando o início da formação do exocóron. Além disso, na maioria dos folículos de 48 h aa analisados, observamos que as placas formadoras do endocóron já haviam se fundido formando uma estrutura única, diferentemente da maioria dos folículos ovarianos de mosquitos *wPip*⁻ que, neste mesmo tempo, além de não apresentarem vesículas formadoras do exocóron, não apresentaram as placas formadoras do endocóron fundidas (Figura 11, Almeida, 2008). Além disso, não observamos qualquer diferença às 72 h aa (Figura 12) indicando que o atraso nos ovócitos de mosquitos *wPip*⁻ foi recuperado.

Figura 10 – Imagens de microscopia óptica de folículo ovariano de mosquitos *wPip*⁺ e *wPip*⁻ 24 h aa.

Parte de folículos de um mosquito de cada uma das colônias (*wPip*⁺ e *wPip*⁻), 24 h aa. **A:** *wPip*⁺ - as setas apontam o endocóron; Asterisco: grânulos de vitelina. 1000X. **B:** *wPip*⁻ - as setas apontam o início da formação do endocóron. Asterisco: grânulos de vitelina. 1000X.

Figura 11 – Imagens de microscopia eletrônica de folículo ovariano de mosquitos *wPip*⁺ e *wPip*⁻ 48 h aa.

Parte de folículos de um mosquito de cada uma das colônias (*wPip*⁺ e *wPip*⁻), 48 h aa. **A:** *wPip*⁺ - as setas apontam o endocóron, as cabeças de seta, o exocóron. Asterisco: grânulos de vitelina. 1500X. **B:** *wPip*⁻ - as setas apontam o endocóron. Asterisco: grânulos de vitelina. 1500X.
Fonte: Almeida (2008)

Figura 12 – Imagem de microscopia óptica de folículo ovariano de mosquitos *wPip*⁺ e *wPip*⁻ 72 h aa.

Parte de folículos de um mosquito de cada uma das colônias (*wPip*⁺ e *wPip*⁻), 72 h aa. **A:** *wPip*⁺ - as setas apontam o endocóron, as cabeças de seta, o exocóron. Asterisco: grânulos de vitelina. 1000X. **B:** *wPip*⁻ - as setas apontam o endocóron, as cabeças de seta, o exocóron. Asterisco: grânulos de vitelina. 1000X.

Em relação ao término da formação do endocóron e início da formação do exocóron às 48 h aa, foi realizada uma análise estatística dos folículos ovarianos de 10 mosquitos de cada colônia (só foi utilizado 1 folículo de cada fêmea na análise, já que observamos que os folículos de uma fêmea se desenvolvem sincronicamente), tendo como parâmetro de diferença, o término (placas fundidas) ou não (placas não-fundidas) da formação do endocóron e o início da formação do exocóron (presença de vesículas). Estes parâmetros foram utilizados como critérios de classificação

(Tabela 5), o que mostrou que em média às 48 h aa, os folículos ovarianos de mosquitos não-infectados apresentam um atraso em seu desenvolvimento (Qui-quadrado, $p < 0,01$).

Tabela 5 – Análise comparativa de formação do córion de dez folículos ovarianos 48 h aa.

	<i>wPip</i> ⁻	<i>wPip</i> ⁺
Placas do endocórion não fundidas (atrasados)	50% (5)	30% (3)
Placas do endocórion fundidas	40% (4)	30% (3)
Vesículas formadoras do exocórion aparentes (adiantados)	10% (1)	40% (4)
Total	100% (10)	100% (10)

4.7 Quantificação proteica

O gráfico (Figura 13) indica que há diferenças nas quantidades de proteínas totais de ovários entre os indivíduos *wPip*⁻ (curva em azul) e *wPip*⁺ (curva em vermelho). A principal diferença entre as quantidades de proteínas totais de ovários de mosquitos *wPip*⁺ e *wPip*⁻ foi observada no tempo de 48 h aa, na qual observamos uma maior quantidade de proteína nos ovários de indivíduos *wPip*⁺.

Figura 13 – Gráfico comparativo de quantificação proteica de ovários.

4.8 Análise eletroforética

A análise eletroforética de extratos de corpos gordurosos (Figura 14) e de ovários (Figura 15) não mostrou diferenças no padrão de bandas, porém mostrou diferenças aparentes de intensidade das bandas correspondentes às duas subunidades da vitelogenina (200 e 86 kDa).

Figura 14 - Eletroforese de extratos de corpos gordurosos.

Eletroforese de extratos de corpos gordurosos de mosquitos NA, 24, 48, 72 e 96 h aa. Foram utilizados 8 µg de proteína total em cada canaleta. 200 kDa e 86 kDa massas correspondentes às duas subunidades de vitelogenina.

Figura 15 - Eletroforese de extratos de ovários.

Eletroforese de extratos de ovários de mosquitos NA, 24, 48, 72 e 96 h aa. Foram utilizados 2 µg de proteína total em cada canaleta. 200 kDa e 86 kDa massas correspondentes às duas subunidades de vitelogenina.

Na figura 14 (corpos gordurosos) pudemos observar uma menor intensidade das bandas correspondentes à vitelogenina às 24 h aa nos indivíduos *wPip*⁻ e nos tempos subsequentes a intensidade dessas bandas desse grupo passa a ser pouco maior. Já na figura 15 (ovários) observamos maior intensidade da banda correspondente à subunidade maior da vitelogenina (200 kDa) nos mosquitos *wPip*⁺ nos tempos de 72 h e, principalmente, 48 h aa.

4.9 Imunoblot

Utilizando-se anticorpos anti Vg^+ e anti Vg^- , foi realizado *Western-blot* de eletroforeses de corpos gordurosos e ovários. As figuras 16 e 17 mostram os respectivos resultados.

Figura 16 – Imunoblot de corpos gordurosos utilizando anticorpos anti- vg^+ e anti- vg^- .

Imunoblot de extratos de corpos gordurosos de mosquitos NA, 24, 48, 72 e 96 h aa. Foram utilizados 12 μ g de proteína total por canaleta. Os anticorpos utilizados foram anti subunidade maior e subunidade menor da vitelogenina (200 e 86 kDa).

Assim como na eletroforese de corpos gordurosos (Figura 14) o imunoblot (Figura 16) mostrou uma menor intensidade das bandas correspondentes às subunidades da vitelogenina às 24 h aa de indivíduos $wPip^-$.

O imunoblot realizado a partir da eletroforese de ovários (Figura 17) não mostrou diferenças aparentes na intensidade das bandas de Vg^+ e Vg^- .

Figura 17 – Imunoblot de ovários utilizando anticorpos anti- vg^+ e anti- vg^- .

Imunoblot de extratos de ovários de mosquitos NA, 24, 48, 72 e 96 h aa. Foram utilizados 2,5 μ g de proteína total por canaleta. Os anticorpos utilizados foram anti-subunidade maior e anti-subunidade menor da vitelogenina (200 e 86 kDa).

4.10 RT-PCR

A partir dos cDNAs foi realizado RT-PCR para observar a eficiência dos iniciadores. As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% (Figura 18).

Figura 18 – Eletroforese em gel de agarose 1% de RT-PCR de amostras de cDNA obtidas a partir de RNA total de mosquitos, utilizando-se iniciadores para os cDNAs de actina, vitelogenina e de receptor de vitelogenina.

NA: não alimentado com sangue; 24, 48, 72 e 96 horas após alimentação sanguínea (fragmentos esperados de 200 pares de base); +: controle positivo, DNA de *Culex quinquefasciatus*; -: sem DNA e sem cDNA; pad: padrão de peso molecular.

Pudemos observar a presença das amplificações dos genes em todas as amostras com exceção dos controles negativos, indicando o perfil transcricional dos genes analisados. A amplificação de actina se mostrou um bom gene constitutivo, pois a intensidade das bandas correspondentes a todos os tempos analisados foi aparentemente semelhante.

4.11 PCR em tempo real

As mesmas amostras de cDNAs utilizadas para a RT-PCR foram submetidas a PCR em tempo real. A tabela 6 mostra a média, entre as réplicas, dos valores dos ciclos limiares (*threshold cycle*, Ct) de cDNAs de actina (normalizador), vitelogenina e receptor de vitelogenina nos tempos analisados.

Tabela 6 – Valores médios dos ciclos limiares entre as réplicas do PCR em tempo real de actina e receptor de vitelogenina.

	<i>wPip</i> ⁻	<i>wPip</i> ⁺	<i>wPip</i> ⁻	<i>wPip</i> ⁺
	Actina		Receptor de vitelogenina	
NA	22,13	22,03	26,03	26,05
24h	22,00	21,98	23,92	24,97
48h	22,76	22,77	23,36	24,10
72h	23,14	23,00	25,09	23,74
96h	22,48	22,82	24,65	24,14

Tabela 7 – Valores médios dos ciclos limiares entre as réplicas do PCR em tempo real de actina e de vitelogenina.

	<i>wPip</i> ⁻	<i>wPip</i> ⁺	<i>wPip</i> ⁻	<i>wPip</i> ⁺
	Actina		Vitelogenina	
NA	22,35	21,14	29,29	28,58
24h	22,01	21,51	16,33	16,47
48h	23,62	22,79	19,66	18,58
72h	23,28	24,15	25,75	27,49
96h	23,91	23,27	28,00	28,24

Os valores de ciclo limiar dos genes de interesse (Vg e rVg) foram subtraídos dos valores do gene normalizador (actina). O maior valor de ciclo limiar (NA *wPip*⁺ em receptor de vitelogenina e em vitelogenina) foi normalizado a zero (o valor mínimo do eixo y foi reduzido a zero). Para a construção dos gráficos (Figuras 19 e 20) a diferença entre os ciclos limiares relativos ao tempo de NA de *wPip*⁺ foram tornados positivos para melhor visualização.

Figura 19 – Diferença inversa dos ciclos limiares de receptor de vitelogenina normalizados com actina e relativos ao ciclo limiar de NA de *wPip*⁺.

Barra de erros: Erro padrão entre as 3 réplicas

Podemos observar que aparentemente há diferenças nos ciclos limiares do gene de receptor de vitelogenina em todos os tempos após alimentação, sendo que a transcrição se mostrou maior nos tempos iniciais da vitelogênese (24 e 48 h aa) em mosquitos *wPip*⁻ e nos tempos finais (72 e 96 h aa) passou a ser menor. Porém, o teste-T mostrou que estas diferenças não são significativas ($p > 0,05$) ou seja, a transcrição de receptor de vitelogenina entre *wPip*⁻ e *wPip*⁺ relativa a cada tempo é semelhante.

Quanto aos ciclos limiares referentes à vitelogenina entre *wPip*⁻ e *wPip*⁺ notamos pouca diferença (Figura 19). O teste-T mostrou que estas diferenças, também, não são significativas ($p > 0,05$) ou seja, a transcrição deste gene é semelhante entre infectados e não-infectados nos tempos analisados.

Figura 20 – Diferença inversa dos ciclos limiares de vitelogenina normalizados com actina e relativos ao ciclo limiar de NA de *wPip*⁺.

Barra de erros: Erro padrão entre as 3 réplicas

4.12 Morfometria geométrica alar

A análise de tamanho de centroide mostrou que fêmeas *wPip*⁺ e *wPip*⁻ possuem um tamanho de asa semelhante e presumivelmente tamanho corpóreo também semelhante (Figura 21). Já a análise de assimetria bilateral em relação à forma mostrou que tanto os mosquitos *wPip*⁺ quanto *wPip*⁻ são assimétricos, porém em grau acentuado nos infectados. Quanto à assimetria bilateral relacionada ao tamanho mostrou que somente os mosquitos *wPip*⁺ são assimétricos (Tabela 8).

Figura 21 – Gráfico de média e desvio padrão do tamanho do centroide. **Tabela 8** – Resultados estatísticos em relação à assimetria bilateral alar.

	Forma		Tamanho de centróide	
	$wPip^+$	$wPip^-$	$wPip^+$	$wPip^-$
Valor de p	< 0,0001	0,02	0,02	> 0,5

Forma - Teste de Permutação; Tamanho - Teste ANOVA

5 DISCUSSÃO

Em meu mestrado (Almeida, 2008) a presença de *Wolbachia* foi detectada por microscopia de ovários de *Cx. quinquefasciatus* de nossa colônia e posteriormente por PCR. Foi realizada a desinfecção de parte da colônia infectada, iniciada uma colônia não-infectada e alguns estudos foram realizados comparando as duas colônias. Naqueles estudos observamos que os mosquitos não-infectados: produziam maior quantidade de ovos; que, por microscopia, às 48 h aa o desenvolvimento dos ovos estava atrasado; que a razão sexual (*sex-ratio*) não era modificada pela desinfecção e; que o cruzamento entre machos infectados e fêmeas não-infectadas não gerava prole, concluindo que o fenômeno da IC ocorria em proporções próximas a 100% neste mosquito.

O tratamento dos mosquitos infectados foi realizado novamente no início de meu doutorado por encontrarmos indivíduos infectados na colônia não-infectada. Neste novo tratamento foi utilizado o mesmo antibiótico (cloridrato de tetraciclina), porém em concentração de 2 mg/ml (o dobro da anterior, Almeida, 2008) e, apesar de observarmos que mais mosquitos morreram, foi mais eficiente, pois todos os indivíduos analisados da 2ª geração de tratamento não estavam infectados (Figura 3).

A cepa de *Wolbachia* presente em *Culex* é normalmente denominada *wPip*, por esse fato decidimos chamar a nossa colônia de mosquitos infectados como *wPip*⁺ e a colônia a qual as bactérias foram removidas (não-infectados) a nomeamos de *wPip*⁻.

5.1 Aspectos gerais

Como *Wolbachia* tem sido apontada como possível instrumento de controle populacional de insetos (Iturbe-Ormaetxe et al., 2011; Laven, 1967a) e controle de transmissão de patógenos vetoriadas por mosquitos, (Blagrove et al., 2012; Iturbe-Ormaetxe et al., 2011; Maciel-de-Freitas et al., 2012; van den Hurk et al., 2012; Werren, 1997) o estudo de aptidão reprodutiva (*fitness*) causada pela bactéria é de suma importância, já que essa cepa de *Wolbachia* (*wPip*) e *Cx. quinquefasciatus* poderiam ser utilizados neste contexto.

Neste trabalho observamos que as fêmeas não-infectadas têm o período de desenvolvimento larval mais curto (Tabela 1), têm melhor capacidade de depositar ovos e depositam maior quantidade de ovos, os quais também apresentam maior viabilidade (Tabelas 2 e 3). Em contrapartida depositam seus ovos tardiamente (Tabela 4; Figura 5) e vivem menos tempo quando alimentadas com sangue (Figura 8). O cálculo do R_o (taxa líquida de reprodução, em outras palavras, o número de descendentes gerados em média por fêmea) mostrou que é vantajoso para as fêmeas em termos de *fitness* ser não-infectada.

Sendo assim, porque a população de *Cx. quinquefasciatus* de São Paulo (Almeida, 2008) e de diferentes regiões do Brasil (Morais et al., 2012) estão com alta prevalência de infecção por *Wolbachia*? Estudos realizados por Crain et al. (2011) sobre os principais aspectos que atuam em uma substituição de população não-infectada por outra infectada respondem a nossa pergunta. Eles mostraram que dentre os aspectos mais importantes nesta substituição estão, em ordem decrescente: a viabilidade das larvas, o sucesso da transmissão materna, o número de ovos depositados e, apesar de serem essenciais, em segundo plano estariam a frequência de infecção e a incompatibilidade citoplasmática.

Seguindo esse raciocínio, quanto aos resultados aqui presentes, acreditamos que a população de *Culex quinquefasciatus* aqui do Brasil está com alta prevalência de infecção pelo fato de observarmos (entre esses aspectos) apenas uma redução no número de ovos, já que a viabilidade das larvas é aparentemente semelhante entre $wPip^+$ e $wPip^-$. Além disso, o sucesso da transmissão materna é próximo a 100% (já que pelas PCRs dos indivíduos $wPip^+$ sempre encontramos infecção) assim como em mosquitos silvestres no Brasil (Morais et al., 2012) e a existência da, também próxima a 100%, incompatibilidade citoplasmática (Almeida, 2008). Com isso, apesar de a *Wolbachia* reduzir o *fitness* deste mosquito, acreditamos que esta cepa pode ser artificialmente transfectada para outra população de insetos, utilizando como controle populacional de pragas agrícolas, mosquitos ou patógenos veiculados por mosquitos.

As alterações de *fitness* foram descritas em diversos hospedeiros (Iturbe-Ormaetxe, O'Neill, 2007) trazendo vantagens (Dong et al., 2007; Fry et al., 2004) ou desvantagens (Fleury et al., 2000; Fry et al., 2004) para os indivíduos infectados e é

sabido que estas alterações dependem da cepa da bactéria e de seu hospedeiro (Dobson et al., 2004; Duron et al., 2006).

Em mosquitos, o efeito reprodutivo mais comum, causado por *Wolbachia*, é a incompatibilidade citoplasmática (Voronin et al., 2004), porém também já foram vistos casos de alterações de aptidão reprodutiva. Rasgon (2012) observou em *Cx. pipens*, sobrevivência reduzida de adultos machos infectados. Estudo realizado em populações de *Cx. pipens*, silvestres e de colônia, da Califórnia mostrou não haver diferença na fecundidade (número de ovos) entre indivíduos infectados e não-infectados (Rasgon, Scott, 2003).

Entretanto, a maioria dos exemplos de alterações de *fitness* em mosquitos foi descritas em *Aedes albopictus*: Dobson et al. (2004) observaram aumento de fecundidade e fertilidade das fêmeas infectadas; dois anos depois, Islam e Dobson (2006) descreveram maior sobrevivência nos estágios juvenis da colônia infectada, mas uma queda de longevidade das fêmeas adultas; neste mesmo modelo, foi observado que o desenvolvimento larval de machos infectados é mais lento que em não-infectados e as fêmeas, em pequena densidade larval tem esse desenvolvimento semelhante, porém em altas densidades, os infectados também se desenvolvem mais lentamente (Gavotte et al., 2009).

5.2 Desenvolvimento larval

A nossa comparação do tempo de desenvolvimento larval (mais rápido em mosquitos *wPip*⁻; Tabela 1) é um fator que pode alterar a dinâmica populacional (Gavotte et al., 2009; Islam, Dobson, 2006). Acreditamos ser vantajoso para os mosquitos ter um desenvolvimento larval mais curto, pois estariam menos expostos aos riscos de serem predados, de o criadouro secar ou ser mecanicamente removido antes que os indivíduos atinjam a fase adulta, na qual, sendo atingida anteriormente, poderá se reproduzir antecipadamente, aumentando assim a população. Por outro lado, tendo desenvolvimento larval mais curto, o indivíduo talvez atinja o estágio adulto com deficiências nutritivas.

Dentre os fatores que podem influenciar no tempo de desenvolvimento estão, os fatores ambientais, a quantidade de alimento disponível (que neste caso foram os mesmos para *wPip*⁺ e *wPip*⁻) ou influência na fisiologia do mosquito, como por

exemplo mudança na expressão gênica ou mudanças de produção de hormônios, como hormônio juvenil ou 20-hidroxiecdisona, que atuam diretamente nesta fase da vida (Clements, 1992).

5.3 Número de ovos

O fato de os mosquitos *wPip*⁺ e *wPip*⁻ terem tamanho semelhante (medido pelo tamanho das asas, Figura 21), exclui a possibilidade de os mosquitos não-infectados depositarem maior número de ovos (Tabela 2) ser influenciada pelo tamanho, como observado por outros autores (Jirakanjanakit et al., 2007; Lehmann et al., 2006; Morales Vargas et al., 2010). Outros autores relacionam uma menor quantidade de ovos produzidos pelos mosquitos ao consumo de nutrientes ingeridos por seus parasitas, como foi descrito em mosquitos infectados com diferentes patógenos. Lima et al. (2003) mostraram que mosquitos *Cx. quinquefasciatus* infectados por *Wuchereria bancrofti* apresentam redução no número médio de ovos depositados. O mesmo foi relatado por Styer et al. (2007) em mosquitos *Culex tarsalis* infectados com Vírus do Oeste do Nilo e os autores relacionam o fato ao consumo de nutrientes pelo agente infeccioso ou pela resposta imune causada por ele em seus hospedeiros. Porém, em nosso caso, acreditamos que a infecção também possa mudar fisiologicamente o mosquito, atuando em nível transcricional e/ou traducional de genes assim como visto em outros mosquitos (elucidado adiante). Além disso, assim como na larva, a fase vitelogênica do mosquito também é muito influenciada pelos hormônios juvenil e 20-hidroxiecdisona os quais também podem estar relacionados com esta diferença (Clements, 1992; Araujo et al., 2011).

Seguindo esse raciocínio Bell e Bohm (1975) e Clifton e Noriega (2011) mostraram que alterações na quantidade de hormônio juvenil podem induzir atresia folicular, um processo semelhante a apoptose, que ocorre para que folículos danificados ou mutados morram antes da maturidade (Buszcak, Cooley, 2000; Nezis et al., 2000) e, em mosquitos, sabe-se que os folículos ovarianos podem sofrer atresia do estágio pre-vitelogênico até a fase pós-trófica da vitelogênese (Clements, 1992).

Além disso, por *Wolbachia* estar presente nos ovários, produzir espécies reativas de oxigênio (Pan et al., 2012), as quais podem também induzir apoptose

(Sarafian, Bredezen, 1994), e também pelo fato de a infecção por outro patógeno como o *Plasmodium* induzir atresia folicular em seu hospedeiro (Hopwood et al., 2001), vemos a atresia folicular como um possível candidato à redução do número de ovos nos mosquitos *wPip*⁺.

5.4 Longevidade

Outro aspecto medido nas comparações foi a longevidade dos mosquitos e pudemos verificar que, somente quando alimentadas com sangue, as fêmeas *wPip*⁺ têm maior longevidade (Figura 8). Esta diferença pode estar relacionada ao custo reprodutivo ou seja, a energia gasta para reprodução diminuiria o tempo de vida (já que fêmeas *wPip*⁺ depositam menos ovos), assim como evidenciado por outros autores em *Anopheles* infectados por *Plasmodium* (Ferguson, Read, 2002; Martins et al., 2012; Vézilier et al., 2012) ou não-infectados (Dao et al., 2010).

É interessante de ressaltar que reprodutivamente os mosquitos não-infectados apresentam vantagem (medida pelo cálculo do *Ro*, comentado anteriormente), porém o fato de os mosquitos infectados apresentarem maior sobrevida entre os dias 35 e 55 os ajudaria a realizar mais repastos sanguíneos, o que poderia acarretar em maior transmissão de patógenos.

5.5 Tempo de oviposição após alimentação sanguínea

Quanto ao tempo de oviposição após alimentação sanguínea observamos que os mosquitos *wPip*⁺ depositam, em média, seus ovos antecipadamente em relação aos mosquitos *wPip*⁻ (Tabela 4; Figura 5) e os estudos de microscopia evidenciaram um adiantamento no processo de ovogênese dos mosquitos *wPip*⁺ (Figura 10). Como a *Wolbachia* é capaz de alterar drasticamente a reprodução de seus hospedeiros em seu benefício (Werren et al., 1995) a fisiologia do mosquito em relação a ovogênese/vitelogênese também poderia estar sendo alterada por essa bactéria.

5.6 Vitelogênese

No intuito de investigar de qual maneira a bactéria causa as alterações reprodutivas e, principalmente, em relação ao processo vitelogênico, decidimos estudar os ovários de infectados e não-infectados por microscopia em diferentes tempos após a alimentação sanguínea, o que nos mostrou que às 48 h aa os mosquitos *wPip*⁺ apresentavam em média o desenvolvimento do ovário adiantado (Figura 11; Tabela 5). Além de, em trabalho realizado por nós (Almeida et al., 2011) observarmos nos folículos ovarianos, grânulos de vitelina (vitelogenina) maiores neste mesmo tempo de 48 h aa de mosquitos *wPip*⁺.

Posteriormente estudamos bioquimicamente e molecularmente a influência de *Wolbachia* na produção e captação da vitelogenina. Outro fato que nos levou a este caminho foi a observação feita por Ahmed et al. (2001) que, por ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay), detectaram uma menor quantidade de vitelina nos ovários de *Anopheles gambiae* infectados por *Plasmodium yoelli nigeriensis*, o que reduziu o número de ovos e sua viabilidade. Eles relacionam este fato com a queda, nos mosquitos infectados, da quantidade de mRNA responsável pela transcrição da vitelogenina.

Iniciamos esta investigação partindo de quantificações proteicas de ovários (Figura 13), o que mostrou que às 48 h aa há maior quantidade de proteínas nos ovários de mosquitos *wPip*⁺ e nos tempos posteriores passa a ser menor. Estes fatos corroboram os dados de *fitness* juntamente com a microscopia pois, às 48 h aa os ovários de infectados estão mais desenvolvidos, porém ao final do processo, depositam uma menor quantidade de ovos, os quais são também menos viáveis.

Em eletroforese de corpos gordurosos (local de produção de vitelogenina) observamos que às 24 h aa houve uma pequena diferença na intensidade das bandas correspondentes à vitelogenina, sendo as de corpos gordurosos de *wPip*⁺ com maior intensidade, porém nos tempos posteriores as bandas correspondentes às subunidades da vitelogenina passam a ser semelhantes (Figura 14). Em eletroforese de ovários observamos também uma maior intensidade das bandas correspondentes à vitelogenina às 48 h aa em *wPip*⁺ (Figura 15). Aparentemente estas eletroforeses indicaram que em *wPip*⁺ às 24 h aa há uma maior quantidade de

vitelogenina no corpo gorduroso (maior produção) e o efeito desta maior quantidade é refletido na maior quantidade de vitelogenina nos ovários de *wPip*⁺ 48 h aa.

No intuito de evidenciar melhor estas diferenças realizamos imunoblot de eletroforeses de corpos gordurosos e ovários utilizando anticorpos contra as duas subunidades de vitelogenina. No tempo de 24 h aa, o imunoblot de eletroforese de corpo gorduroso (Figura 16) mostrou diferença, entre a intensidade das bandas correspondentes às subunidades de vitelogenina que, em mosquitos *wPip*⁺, se mostraram mais evidentes comparativamente às de *wPip*⁻. Já o imunoblot de ovários não mostrou diferenças de intensidade entre as bandas correspondentes às subunidades de vitelogenina em todos os tempos, possivelmente por saturação de vitelogenina transferida para a membrana de nitrocelulose (Figura 17).

Com os resultados discutidos até o momento, aparentemente os indivíduos *wPip*⁺ têm a fase inicial da ovogênese (de 0 h até 48 h aa) acelerada em relação aos indivíduos *wPip*⁻, porém, após esta fase parece haver uma desaceleração do processo ovogênico nesses mosquitos, diferentemente da ovogênese de mosquitos *wPip*⁻, nos quais até às 72 h aa, não ocorre essa desaceleração.

Devido as pequenas diferenças de resultados mostrados pelas eletroforeses e imunoblots, e também no intuito de obter uma resposta mais precisa sobre as diferenças nas quantidades de vitelogenina produzida pelo corpo gorduroso e armazenada nos ovários, optamos por medir a quantidade relativa de mRNA de vitelogenina e de receptor de vitelogenina entre os mosquitos das colônias. É interessante ressaltar que alguns estudos mostraram diferenças transcricionais de genes em indivíduos infectados por *Wolbachia* como, por exemplo, em relação à ferritina (Kremer et al., 2009), genes relacionados à produção de dopamina (Moreira et al., 2011), e também em diversos genes relacionados à imunidade (Kambris et al., 2010) e a longevidade (Caragata et al., 2011).

Quanto à transcrição do receptor de vitelogenina observamos, assim como Sappington et al. (1995) para *Ae. aegypti*, que o aumento do transcrito ocorre nas primeiras horas após alimentação sanguínea (Tabela 6; Figura 19). Porém, em *Aedes* o pico de expressão ocorre às 24 h aa e não às 48-72 h aa, como observamos em *Culex*. Provavelmente este fato está relacionado ao processo mais lento de digestão do sangue (Okuda et al., 2002) e conseqüentemente com o tempo de oviposição após alimentação sanguínea tardio em *Culex quinquefasciatus*

comparados com *Aedes* (Cardoso et al., 2010). Com isso, o fato de a transcrição deste gene, nos tempos analisados, ser semelhante entre $wPip^+$ e $wPip^-$, indica que a diferença na quantidade de receptor de vitelogenina não é responsável pelas alterações de aptidão reprodutiva, as análises microscópicas e de quantidade de proteínas e vitelogenina existentes em ovários de infectados e não-infectados.

Assim como a transcrição do gene de receptor de vitelogenina, a transcrição da vitelogenina (Tabela 7; Figura 20) não se mostrou alterada pela infecção, ou seja, este fato também não pode ser relacionado à menor quantidade de vitelogenina observada nos corpos gordurosos de mosquitos 24 h aa e ovários de $wPip^-$ 48 h aa. Outro fato observado é que, também como mostrado em outros modelos (Chen et al., 2004; Kokoza et al., 2001; Nirmala et al., 2005), o pico de expressão deste gene ocorre logo após o repasto sanguíneo (24h aa), porém em *Cx. quinquefasciatus* o pico se estende até 48 h aa só voltando ao nível de não-alimentado às 96 h aa, como o esperado devido às diferenças já comentadas em relação à *Aedes*.

Raikhel e Lea (1991) observaram em *Ae. aegypti* que após a formação do exocório a entrada de vitelogenina nos ovários não ocorre. Nossos resultados de microscopia mostraram que a formação do cório em indivíduos $wPip^+$ ocorre antecipadamente, fato que poderia culminar em menor quantidade de proteínas e, talvez, vitelogenina presente nos ovários de $wPip^+$ às 72 e 96 h aa, o que também poderia culminar em menor quantidade e viabilidade dos ovos produzidos.

Um fator que não devemos ignorar é que a *Wolbachia* pode também estar alterando, por mecanismos desconhecidos, fisiologicamente a produção ou atuação de hormônios importantes durante o período vitelogênico como hormônio juvenil, 20-hidroxiecdisona ou moléculas que podem interferir neste período, como mostrado em outros modelos infectados por *Wolbachia* (Caragata et al., 2011; Kambris et al., 2010; Kremer et al., 2009; Moreira et al., 2011).

5.7 Considerações finais

Outro fato importante de elucidar é que, aparentemente, *Wolbachia* está causando distúrbios não somente reprodutivos, já que o elevado grau de assimetria alar encontrado nos indivíduos infectados (Tabela 8), provavelmente está relacionado a perturbações fisiológicas (Mpho et al., 2001, 2002).

Na tentativa de responder perguntas referentes à infecção, este trabalho gerou informações novas e também dúvidas em relação ao modo como esta bactéria atua na alteração da reprodução deste mosquito. Além disso, estas respostas devem ser complexas, pois os fenômenos abordados nos parecem ser multifatoriais ou multicausais, por isso mais estudos referentes ao *Culex quinquefasciatus* e também a atuação de *Wolbachia* devem ser realizados.

6 CONCLUSÕES

- O tratamento com tetraciclina de 2 mg/ml é mais eficiente em relação ao de 1 mg/ml.
- as larvas infectadas necessitam de maior tempo de desenvolvimento para se tornarem adultas;
- as fêmeas adultas infectadas têm menor fecundidade, fertilidade, seus ovos possuem menor viabilidade e em contrapartida são capazes de depositar seus ovos em menor tempo após alimentação sanguínea;
- a sobrevivência de indivíduos infectados e não-infectados machos e fêmeas não alimentadas com sangue são semelhantes, porém quando alimentadas com sangue as fêmeas infectadas vivem mais;
- o cálculo da contribuição média em número de descendentes por fêmea (R_0) mostrou que as não-infectadas têm aptidão reprodutiva aumentada;
- a análise microscópica mostrou um amadurecimento acelerado dos ovos de mosquitos infectados, culminando em formação antecipada do córion;
- as quantificações proteicas, o SDS-Page e o imunoblot indicaram que às 48h após alimentação sanguínea há maior quantidade de proteínas nos ovários e corpos gordurosos de mosquitos infectados, indicando uma maior quantidade de vitelogenina. Porém, ao final do processo vitelogênico essas quantidades se equiparam;
- não houve diferenças significativas na transcrição de receptor de vitelogenina e de vitelogenina entre infectados e não-infectados, indicando que a produção e captação da vitelogenina não são responsáveis pelas diferenças de aptidão reprodutiva.

REFERÊNCIAS*

- Ahmed AM, Maingon R, Romans P, Hurd H. Effects of malaria infection on vitellogenesis in *Anopheles gambiae* during two gonotrophic cycles. *Insect Mol Biol*. 2001;10:347-56.
- Almeida F. Análise comparativa de *Culex quinquefasciatus* infectados e não infectados por *Wolbachia pipientis*. [dissertação (Mestrado em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2008. 45 f.
- Almeida Fd, Moura AS, Cardoso AF, Winter CE, Bijovsky AT, Suesdek L. Effects of *Wolbachia* on fitness of *Culex quinquefasciatus* (Diptera; Culicidae). *Infect Genet Evol*. 2011;11:2138-43.
- Arakaki N, Miyoshi T, Noda H. *Wolbachia*-mediated parthenogenesis in the predatory thrips *Frankliniopsis vespiformis* (Thysanoptera: Insecta). *Proc Biol Sci*. 2001;268:1011-6.
- Araujo RV, Maciel C, Hartfelder K, Capurro ML. Effects of *Plasmodium gallinaceum* on hemolymph physiology of *Aedes aegypti* during parasite development. *J Insect Physiol*. 2011;57:265-73.
- Azzouna A, Greve P, Martin G. Sexual differentiation traits in functional males with female genital apertures (male symbol fga) in the woodlice *Armadillidium vulgare* Latr. (Isopoda, Crustacea). *Gen Comp Endocrinol*. 2004;138:42-9.
- Bell WJ, Bohm MK. Oosorption in insects. *Biol Rev Camp Philos Soc*. 1975;50:373-96.
- Benedict MQ, Robinson AS. The first releases of transgenic mosquitoes: an argument for the sterile insect technique. *Trends Parasitol*. 2003;19:349-55.
- Blagrove MS, Arias-Goeta C, Failloux AB, Sinkins SP. *Wolbachia* strain wMel induces cytoplasmic incompatibility and blocks dengue transmission in *Aedes albopictus*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109:255-60.
- Bordenstein SR, Paraskevopoulos C, Dunning Hotopp JC, Sapountzis P, Lo N, Bandi C, Tettelin H, Werren JH, Bourtzis K. Parasitism and mutualism in *Wolbachia*: what the phylogenomic trees can and cannot say. *Mol Biol Evol*. 2009;26:231-41.
- Bossan B, Koehncke A, Hammerstein P. A new model and method for understanding *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility. *PLoS One*. 2011;6:e19757.

*De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 Jul 15]. Available from: <http://www.icmje.org>.

Breeuwer JA, Werren JH. Cytoplasmic incompatibility and bacterial density in *Nasonia vitripennis*. *Genetics*. 1993;135:565-74.

Bressac C, Rousset F. The reproductive incompatibility system in *Drosophila simulans*: DAPI-staining analysis of the *Wolbachia* symbionts in sperm cysts. *J Invertebr Pathol*. 1993;61:226-30.

Buszckak M, Cooley L. Eggs to die: cell death during *Drosophila* oogenesis. *Cell Death Differ*. 2000;7:1071-4.

Caragata EP, Poinsignon A, Moreira LA, Johnson PH, Leong YS, Ritchie SA, O'Neill SL, McGraw EA. Improved accuracy of the transcriptional profiling method of age grading in *Aedes aegypti* mosquitoes under laboratory and semi-field cage conditions and in presence of *Wolbachia* infection. *Insect Mol Biol*. 2011;20:215-24.

Cardoso AF. Vitelogênese do mosquito *Culex quinquefasciatus*. [tese (Doutorado em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2009. 98 f.

Cardoso AF, Cres RL, Moura AS, de Almeida F, Bijovsky AT. *Culex quinquefasciatus* vitellogenesis: morphological and biochemical aspects. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2010;105:254-62.

Chapman RF. The insects: structure and function. 4th ed. United Kingdom: Cambridge University Press; 1998.

Chen L, Zhu J, Sun G, Raikhel AS. The early gene Broad is involved in the ecdysteroid hierarchy governing vitellogenesis of the mosquito *Aedes aegypti*. *J Mol Endocrinol*. 2004;33:743-61.

Cho WL, Raikhel AS. Organization and developmental expression of the mosquito vitellogenin receptor gene. *Insect Mol Biol*. 2001;10:465-74.

Clements AN. The biology of mosquitoes: development, nutrition, and reproduction. New York: Chapman and Hall; 1992. v.1.

Clifton ME, Noriega FG. Nutrient limitation results in juvenile hormone-mediated resorption of previtellogenic ovarian follicles in mosquitoes. *J Insect Physiol*. 2011;57:1274-81.

Crain PR, Mains JW, Suh E, Huang Y, Crowley PH, Dobson SL. *Wolbachia* infections that reduce immature insect survival: predicted impacts on population replacement. *BMC Evol Biol*. 2011;11:290.

Dao A, Kassogue Y, Adamou A, Diallo M, Yaro AS, Traore S, Lehmann T. Reproduction-Longevity Trade-Off in *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol*. 2010;47:769-77.

- Dean JL, Dobson SL. Characterization of *Wolbachia* infections and interspecific crosses of *Aedes* (Stegomyia) *polynesiensis* and *Ae.* (Stegomyia) *riversi* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol.* 2004;41:894-900.
- Dobson SL, Rattanadechakul W. A novel technique for removing *Wolbachia* infections from *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol.* 2001;38:844-9.
- Dobson SL, Rattanadechakul W, Marsland EJ. Fitness advantage and cytoplasmic incompatibility in *Wolbachia* single- and superinfected *Aedes albopictus*. *Heredity.* 2004;93:135-42.
- Dong P, Wang JJ, Hu F, Jia FX. Influence of *Wolbachia* infection on the fitness of the stored-product pest *Liposcelis tricolor* (Psocoptera: Liposcelididae). *J Econ Entomol.* 2007;100:1476-81.
- Dujardin JP. Morphometrics applied to medical entomology. *Infect Genet Evol.* 2008;8:875-90.
- Duron O, Bernard C, Unal S, Berthomieu A, Berticat C, Weill M. Tracking factors modulating cytoplasmic incompatibilities in the mosquito *Culex pipiens*. *Mol Ecol.* 2006;15:3061-71.
- Duron O, Fort P, Weill M. Influence of aging on cytoplasmic incompatibility, sperm modification and *Wolbachia* density in *Culex pipiens* mosquitoes. *Heredity.* 2007;98:368-74.
- Dyer KA, Jaenike J. Evolutionarily stable infection by a male-killing endosymbiont in *Drosophila innubila*: molecular evidence from the host and parasite genomes. *Genetics.* 2004;168:1443-55.
- Ferguson HM, Read AF. Why is the effect of malaria parasites on mosquito survival still unresolved? *Trends Parasitol.* 2002;18:256-61.
- Fialho RF, Stevens L. Male-killing *Wolbachia* in a flour beetle. *Proc Biol Sci.* 2000;267:1469-73.
- Fleury F, Vavre F, Ris N, Fouillet P, Boulétreau M. Physiological cost induced by the maternally-transmitted endosymbiont *Wolbachia* in the *Drosophila* parasitoid *Leptopilina heterotoma*. *Parasitology.* 2000;5:493-500.
- Forattini OP. *Culicidologia médica.* São Paulo: Edusp; 1996. v.1.
- Forattini OP. *Culicidologia médica.* São Paulo: Edusp; 2002. v.2.
- Fry AJ, Palmer MR, Rand DM. Variable fitness effects of *Wolbachia* infection in *Drosophila melanogaster*. *Heredity.* 2004;93:379-89.

Gavotte L, Mercer DR, Vandyke R, Mains JW, Dobson SL. *Wolbachia* infection and resource competition effects on immature *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). J Med Entomol. 2009;46:451–9.

Ghelelovitch S. Genetic determinism of sterility in the cross-breeding of various strains of *Culex autogenicus* Roubaud. C R Hebd Seances Acad Sci. 1952;234:2386-8.

Glaser RL, Meola MA. The native *Wolbachia* endosymbionts of *Drosophila melanogaster* and *Culex quinquefasciatus* increase host resistance to West Nile virus infection. PLoS One. 2010;5:e11977.

Gwadz RW, Spielman A. Corpus allatum control of ovarian development in *Aedes aegypti*. J Insect Physiol. 1973;19:1441-8.

Hagedorn HH, Fallon AM. Ovarian control of vitellogenin synthesis by the fat body in *Aedes aegypti*. Nature. 1973;244:103-5.

Hagedorn HH, Turner S, Hagedorn EA, Pontecorvo D, Greenbaum P, Pfeiffer D, Wheelock G, Flanagan TR. Postemergence growth of the ovarian follicles of *Aedes aegypti*. J Insect Physiol. 1977;23:203-6.

Heath BD, Butcher RD, Whitfield WG, Hubbard SF. Horizontal transfer of *Wolbachia* between phylogenetically distant insect species by a naturally occurring mechanism. Curr Biol. 1999;9:313-6.

Hilgenboecker K, Hammerstein P, Schlattmann P, Telschow A, Werren JH. How many species are infected with *Wolbachia*?--A statistical analysis of current data. FEMS Microbiol Lett. 2008;281:215-20.

Hopwood JA, Ahmed AM, Polwart A, Williams GT, Hurd H. Malaria-induced apoptosis in mosquito ovaries: a mechanism to control vector egg production. J Exp Biol. 2001;204:2773-80.

Hoffmann AA, Montgomery BL, Popovici J, Iturbe-Ormaetxe I, Johnson PH, Muzzi F, Greenfield M, Durkan M, Leong YS, Dong Y, Cook H, Axford J, Callahan AG, Kenny N, Omodei C, McGraw EA, Ryan PA, Ritchie SA, Turelli M, O'Neill SL. Successful establishment of *Wolbachia* in *Aedes* populations to suppress dengue transmission. Nature. 2011;476:454-7.

Huigens ME, de Almeida RP, Boons PA, Luck RF, Stouthamer R. Natural interspecific and intraspecific horizontal transfer of parthenogenesis-inducing *Wolbachia* in Trichogramma wasps. Proc Biol Sci. 2004;271:509-15.

Islam MS, Dobson SL. *Wolbachia* effects on *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) immature survivorship and development. J Med Entomol. 2006;43:689-95.

Iturbe-Ormaetxe I, O'Neill SL. *Wolbachia*-host interactions: connecting phenotype to genotype. Curr Opin Microbiol. 2007;10:221-4.

Iturbe-Ormaetxe I, Walker T, O' Neill SL. *Wolbachia* and the biological control of mosquito-borne disease. EMBO Rep. 2011;12:508-18.

Jiggins FM, Hurst GD, Schulenburg JH, Majerus ME. Two male-killing *Wolbachia* strains coexist within a population of the butterfly *Acraea encedon*. Heredity (Edinb). 2001;86:161-6.

Jirakanjanakit N, Leemingsawat S, Dujardin JP. The geometry of the wing of *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* in isofemale lines through successive generations. Infect Genet Evol. 2008;8:414-21.

Jirakanjanakit N, Leemingsawat S, Thongrungrat S, Apiwathnasorn C, Singhaniyom S, Bellec C, Dujardin JP. Influence of larval density or food variation on the geometry of the wing of *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti*. Trop Med Int Health. 2007;12:1354-60.

Jowett T. Preparation of nucleic acids. *Drosophila*, a practical approach. Oxford: Roberts DB; 1986.

Kambris Z, Blagborough AM, Pinto SB, Blagrove MS, Godfray HC, Sinden RE, Sinkins SP. *Wolbachia* stimulates immune gene expression and inhibits plasmodium development in *Anopheles gambiae*. PLoS Pathog. 2010;6:e1001143.

Kittayapong P, Mongkalagoon P, Baimai V, O'Neill SL. Host age effect and expression of cytoplasmic incompatibility in field populations of *Wolbachia*-superinfected *Aedes albopictus*. Heredity. 2002;88:270-4.

Kokoza VA, Martin D, Mienaltowski MJ, Ahmed A, Morton CM, Raikhel AS. Transcriptional regulation of the mosquito vitellogenin gene via a blood meal-triggered cascade. Gene. 2001;274:47-65.

Kremer N, Voronin D, Charif D, Mavingui P, Mollereau B, Vavre F. *Wolbachia* interferes with ferritin expression and iron metabolism in insects. PLoS Pathog. 2009;5:e1000630.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970;227:680-5.

Laven H. Crossing experiments with *Culex* strains. Evolution. 1951;5:370–5

Laven H. Speciation by cytoplasmic isolation in the *Culex pipiens* complex. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 1959;24:166–73

Laven H. Eradication of *Culex pipiens fatigans* through cytoplasmic incompatibility. Nature. 1967a;216:383-4.

Laven H. A possible model for speciation by cytoplasmic isolation in the *Culex pipiens* complex. Bull World Health Organ. 1967b;37:263-6.

Lehmann T, Dalton R, Kim EH, Dahl E, Diabate A, Dabire R, Dujardin JP. Genetic contribution to variation in larval development time, adult size, and longevity of starved adults of *Anopheles gambiae*. *Infect Genet Evol*. 2006;6:410-6.

Li JS, Li J. Major proteins and their crosslinking during chorion hardening in *Aedes aegypti* mosquitoes. *Insect Biochem Mol Biol*. 2006;36:954-64.

Lima CA, Almeida WR, Hurd H, Albuquerque CM. Reproductive aspects of the mosquito *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) infected with *Wuchereria bancrofti* (Spirurida: Onchocercidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2003;98:217-22.

Lo N, Casiraghi M, Salati E, Bazzocchi C, Bandi C. How many *Wolbachia* supergroups exist? *Mol Biol Evol*. 2002;19:341-6.

Maciel-de-Freitas R, Aguiar R, Bruno RV, Guimarães MC, Lourenço-de-Oliveira R, Sorgine MH, Struchiner CJ, Valle D, O'Neill SL, Moreira LA. Why do we need alternative tools to control mosquito-borne diseases in Latin America? *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2012;107:828-9.

Marrelli MT, Rasgon J, Jacobs-Lorena M. Transgenic malaria-resistant mosquitoes have a fitness advantage when feeding on *Plasmodium*-infected blood. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007;104:5580-3.

Martins AJ, Ribeiro CD, Bellinato DF, Peixoto AA, Valle D, Lima JB. Effect of insecticide resistance on development, longevity and reproduction of field or laboratory selected *Aedes aegypti* populations. *PLoS One*. 2012;7:e31889.

McMeniman CJ, Lane RV, Cass BN, Fong AW, Sidhu M, Wang YF, O'Neill SL. Stable introduction of a life-shortening *Wolbachia* infection into the mosquito *Aedes aegypti*. *Science*. 2009;323:141-4.

McNulty SN, Foster JM, Mitreva M, Dunning Hotopp JC, Martin J, Fischer K, Wu B, Davis PJ, Kumar S, Brattig NW, Slatko BE, Weil GJ, Fischer PU. Endosymbiont DNA in endobacteria-free filarial nematodes indicates ancient horizontal genetic transfer. *PLoS One*. 2010;5:e11029.

Min KT, Benzer S. *Wolbachia*, normally a symbiont of *Drosophila*, can be virulent, causing degeneration and early death. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94:10792-6.

Monteiro LR, Reis SF. Princípios de morfometria geométrica. Ribeirão Preto: Holos; 1999. 189 p.

Morais SA, Almeida F, Suesdek L, Marrelli MT. Low genetic diversity in *Wolbachia*-infected *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) from Brazil and Argentina. *Rev Inst Med Trop*. 2012;54:325-9.

Morales Vargas RE, Ya-Umphun P, Phumala-Morales N, Komalamisra N, Dujardin JP. Climate associated size and shape changes in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations from Thailand. *Infect Genet Evol*. 2010;10:580-5.

Moreira LA, Iturbe-Ormaetxe I, Jeffery JA, Lu G, Pyke AT, Hedges LM, Rocha BC, Hall-Mendelin S, Day A, Riegler M, Hugo LE, Johnson KN, Kay BH, McGraw EA, van den Hurk AF, Ryan PA, O'Neill SL. A *Wolbachia* symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with dengue, Chikungunya, and *Plasmodium*. *Cell*. 2009;139:1268-78.

Moreira LA, Ye YH, Turner K, Eyles DW, McGraw EA, O'Neill SL. The wMelPop strain of *Wolbachia* interferes with dopamine levels in *Aedes aegypti*. *Parasit Vectors*. 2011;4:28.

Mpho M, Holloway GJ, Callaghan A. A comparison of the effects of organophosphate insecticide exposure and temperature stress on fluctuating asymmetry and life history traits in *Culex quinquefasciatus*. *Chemosphere*. 2001;45:713-20.

Mpho M, Callaghan A, Holloway GJ. Temperature and genotypic effects on life history and fluctuating asymmetry in a field strain of *Culex pipiens*. *Heredity*. 2002;88:307-12.

Nezis IP, Stravopodis DJ, Papassideri I, Robert-Nicoud M, Margaritis LH. Stage-specific apoptotic patterns during *Drosophila* oogenesis. *Eur J Cell Biol*. 2000;79:610-20.

Nirmala X, Marinotti O, James AA. The accumulation of specific mRNAs following multiple blood meals in *Anopheles gambiae*. *Insect Mol Biol*. 2005;14:95-103.

Okuda K, de Souza Caroci A, Ribolla PE, de Bianchi AG, Bijovsky AT. Functional morphology of adult female *Culex quinquefasciatus* midgut during blood digestion. *Tissue Cell*. 2002;34:210-9.

O'Neill SL, Giordano R, Colbert AM, Karr TL, Robertson HM. 16S rRNA phylogenetic analysis of the bacterial endosymbionts associated with cytoplasmic incompatibility in insects. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89:2699-702.

Pan X, Zhou G, Wu J, Bian G, Lu P, Raikhel AS, Xi Z. *Wolbachia* induces reactive oxygen species (ROS)-dependent activation of the Toll pathway to control dengue virus in the mosquito *Aedes aegypti*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109:E23-31.

Pauvolid-Corrêa A, Morales MA, Levis S, Figueiredo LT, Couto-Lima D, Campos Z, Nogueira MF, da Silva EE, Nogueira RM, Schtzmayer HG. Neutralising antibodies for West Nile virus in horses from Brazilian Pantanal. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2011;106:467-74.

Poinsot D, Charlat S, Mercot H. On the mechanism of *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility: confronting the models with the facts. *Bioessays*. 2003;25:259-65.

Raghavendra K, Barik TK, Reddy BP, Sharma P, Dash AP. Malaria vector control: from past to future. *Parasitol Res*. 2011;108:757-79.

Raikhel AS. Monoclonal antibodies as probes for processing of the mosquito yolk protein; a high-resolution immunolocalization of secretory and accumulative pathways. *Tissue Cell*. 1987;19:515-29.

Raikhel AS, Dhadialla TS. Accumulation of yolk proteins in insect oocytes. *Annu Rev Entomol*. 1992;37:217-51.

Raikhel AS, Lea AO. Previtellogenic development and vitellogenin synthesis in the fat body of a mosquito: an ultrastructural and immunocytochemical study. *Tissue Cell*. 1983;15:281-99.

Raikhel AS, Lea AO. Control of follicular epithelium development and vitelline envelope formation in the mosquito; role of juvenile hormone and 20-hydroxyecdysone. *Tissue Cell*. 1991;23:577-91.

Rasgon JL. *Wolbachia* induces male-specific mortality in the mosquito *Culex pipiens* (LIN strain). *PLoS One*. 2012;7:e30381.

Rasgon JL, Scott TW. *Wolbachia* and cytoplasmic incompatibility in the California *Culex pipiens* mosquito species complex: parameter estimates and infection dynamics in natural populations. *Genetics*. 2003;165:2029-38.

Reynolds KT, Hoffmann AA. Male age, host effects and the weak expression or non-expression of cytoplasmic incompatibility in *Drosophila* strains infected by maternally transmitted *Wolbachia*. *Genet Res*. 2002;80:79-87.

Rohlf FJ. Bias and error in estimates of mean shape in geometric morphometrics. *J Hum Evol*. 2003a;44:665-83.

Rohlf FJ. TpsRelw, relative warps analysis [Computer program]. Version 1.36. Department of Ecology and Evolution, State University of New York. Stony Brook; 2003b.

Rohlf FJ. TpsRegr, shape regression [Computer program]. Version 1.28. Department of Ecology and Evolution, State University of New York. Stony Brook; 2003c.

Rohlf FJ. TpsUtil, file utility program [Computer program]. Version 1.26. Department of Ecology and Evolution, State University of New York. Stony Brook; 2004.

Rohlf FJ. TpsDig, digitize landmarks and outlines [Computer program]. Version 2.05. Department of Ecology and Evolution, State University of New York. Stony Brook; 2005.

Ros VI, Fleming VM, Feil EJ, Breeuwer JA. How diverse is the genus *Wolbachia*? Multiple-gene sequencing reveals a putatively new *Wolbachia* supergroup recovered from spider mites (Acari: Tetranychidae). *Appl Environ Microbiol*. 2009;75:1036-43.

Roth TF, Porter KR. Yolk Protein Uptake in the Oocyte of Mosquito *Aedes aegypti*. *L. J Cell Biol*. 1964;20:313-32.

- Ruppert E, Barnes RD. Zoologia dos invertebrados. 6th ed. São Paulo: Rocca; 1996.
- Ryter SW, Tyrrell RM. The heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensitivity. Heme oxygenase has both pro-and antioxidant properties. *Free Radic Biol Med.* 2000;28:289-309.
- Sappington TW, Hays AR, Raikhel AS. Mosquito vitellogenin receptor: purification, developmental and biochemical characterization. *Insect Biochem Mol Biol.* 1995;25:807-17.
- Sappington TW, Raikhel AS. Molecular characteristics of insect vitellogenins and vitellogenin receptors. *Insect Biochem Mol Biol.* 1998;28:277-30.
- Sarafian, TA, Bredesen DE. Is apoptosis mediated by reactive oxygen species? *Free Radic Res.* 1994;21:1-8.
- Serbus LR, Casper-Lindley C, Landmann F, Sullivan W. The genetics and cell biology of *Wolbachia*-host interactions. *Annu Rev Genet.* 2008;42:683-707.
- Snigirevskaya ES, Sappington TW, Raikhel AS. Internalization and recycling of vitellogenin receptor in the mosquito oocyte. *Cell Tissue Res.* 1997;290:175-83.
- Snodgrass RE. The internal organs of reproduction. In:_____. Principles of insect morphology. New York: Mc Graw-Hill Book Company; 1935.
- Speranca MA, Capurro ML. Perspectives in the control of infectious diseases by transgenic mosquitoes in the post-genomic era: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2007;102:425-33.
- Stouthamer R, Breeuwer JA, Hurst GD. *Wolbachia pipiensis*: microbial manipulator of arthropod reproduction. *Annu Rev Entomol.* 1999;53:71-102.
- Stouthamer R, Breeuwer JA, Luck RF, Werren JH. Molecular identification of microorganisms associated with parthenogenesis. *Nature.* 1993;361:66-8.
- Stouthamer R, Luck RF, Hamilton WD. Antibiotics cause parthenogenetic *Trichogramma* (Hymenoptera/Trichogrammatidae) to revert to sex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87:2424-7.
- Styer LM, Meola MA, Kramer LD. West Nile virus infection decreases fecundity of *Culex tarsalis* females. *J Med Entomol.* 2007;44:1074-85.
- Suh E, Mercer DR, Fu Y, Dobson SL. Pathogenicity of life-shortening *Wolbachia* in *Aedes albopictus* after transfer from *Drosophila melanogaster*. *Appl Environ Microbiol.* 2009;75:7783-8.
- Sukontason KL, Sribanditmongkol P, Chaiwong T, Vogtsberger RC, Piangjai S, Sukontason K. Morphology of immature stages of *Hemipyrellia ligurriens*

(Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae) for use in forensic entomology applications. *Parasitol Res.* 2008;103:877-87.

Taylor MJ, Bandi C, Hoerauf A. *Wolbachia* bacterial endosymbionts of filarial nematodes. *Adv Parasitol.* 2005;60:245-84.

Taylor MJ, Hoerauf A, Bockarie M. Lymphatic filariasis and onchocerciasis. *Lancet.* 2010;376:1175-85.

Timmermann SE, Briegel H. Larval growth and biosynthesis of reserves in mosquitoes. *J Insect Physiol.* 1999;45:461-70.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1979;76:4350-4 .

Turelli M, Hoffmann AA. Cytoplasmic incompatibility in *Drosophila simulans*: dynamics and parameter estimates from natural populations. *Genetics.* 1995;140:1319-38.

van den Hurk AF, Hall-Mendelin S, Pyke AT, Frentiu FD, McElroy K, Day A, Higgs S, O'Neill SL. Impact of *Wolbachia* on Infection with Chikungunya and Yellow Fever Viruses in the Mosquito Vector *Aedes aegypti*. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012;6:e1892.

Vézilier J, Nicot A, Gandon S, Rivero A. *Plasmodium* infection decreases fecundity and increases survival of mosquitoes. *Proc Biol Sci.* 2012;279:4033-41.

Vidal PO, Suesdek L. Comparison of wing geometry data and genetic data for assessing the population structure of *Aedes aegypti*. *Infect Genet Evol.* 2012;12:591-6.

Voronin DA, Dudkina NV, Kiseleva EV. A new form of symbiotic bacteria *Wolbachia* found in the endoplasmic reticulum of early embryos of *Drosophila melanogaster*. *Dokl Biol Sci.* 2004;396:227-9.

Weeks AR, Breeuwer JA. *Wolbachia*-induced parthenogenesis in a genus of phytophagous mites. *Proc Biol Sci.* 2001;268:2245-51.

Werren JH, Zhang W, Gou LR. Evolution and Phylogeny of *Wolbachia*: Reproductive Parasites of Arthropods. *Proc Biol Sci.* 1995;261:55-63.

Werren JH. Biology of *Wolbachia*. *Annu Rev Entomol.* 1997;42:587-609.

Werren JH, Baldo L, Clark ME. *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology. *Nat Rev Microbiol.* 2008;6:741-51.

West SA, Cook JM, Werren JH, Godfray HC. *Wolbachia* in two insect host-parasitoid communities. *Mol Ecol.* 1998;7:1457-65.

Yen JH, Barr AR. New hypothesis of the cause of cytoplasmic incompatibility in *Culex pipiens* L. Nature. 1971;232:657-8.

Zeh DW, Zeh JA, Bonilla MM. *Wolbachia*, sex ratio bias and apparent male killing in the harlequin beetle riding pseudoscorpion. Heredity (Edinb). 2005;95:41-9.

Zhou WG, Rousset F, O'Neill S. Phylogeny and PCR-based classification of *Wolbachia* strains using wsp gene sequences. Proc R Soc Lond, B, Biol Sci. 1998;265:509-15.