Universidade de São Paulo
Faculdade de Saúde Pública

**Análise da atividade locomotora de *Aedes aegypti* e
Aedes albopictus (Diptera: Culicidae) do Parque
Municipal do Piqueri São Paulo, SP**

Filipe Gabriel Menezes Pancetti

**Dissertação apresentada à Comissão de Pós-graduação
da Faculdade de Saúde Pública para obtenção do título
de Mestre em Ciências**

Área de concentração: Epidemiologia

**Orientador(a): Profa. Dra. Tamara Nunes de Lima
Camara**

São Paulo

2017

**Análise da atividade locomotora de *Aedes aegypti* e
Aedes albopictus (Diptera: Culicidae) do Parque
Municipal do Piqueri São Paulo, SP**

Filipe Gabriel Menezes Pancetti

**Dissertação apresentada à Comissão de Pós-graduação
da Faculdade de Saúde Pública para obtenção do título
de Mestre em Ciências**

Área de concentração: Epidemiologia

**Orientador(a): Profa. Dra. Tamara Nunes de Lima
Camara**

São Paulo

2017

AGRADECIMENTOS

À Prof.^a Dra. Tamara Nunes de Lima-Camara, por me aceitar como seu aluno, por toda a orientação, apoio, paciência e auxílio desde o aprimoramento profissional até o término do mestrado.

Aos membros da banca examinadora, Prof. Dr. Delsio Natal, Dra. Marcia Bicudo de Paula e Dra. Gisela Rita Alvarenga Monteiro Marques por aceitarem avaliar minha dissertação e pelas correções e sugestões, que certamente contribuíram tanto para o meu aprendizado quanto para melhorar meu trabalho.

Ao Dr. Paulo Roberto Urbinatti, pela amizade, conhecimento transmitido, por toda a ajuda no campo e laboratório e pela disposição em sempre ajudar no que fosse preciso durante todo o decorrer do programa de aprimoramento profissional e mestrado.

À Rosa Maria Marques de Sá Almeida por toda a ajuda oferecida durante o decorrer do meu trabalho, desde as coletas em campo até a preparação dos mosquitos na incubadora.

Aos meus amigos do Laboratório de Entomologia: Marta Ribeiro, minha primeira parceira de mestrado, aos bons amigos Ronan Rocha e Bruno Nakazato, Pamela Andrade, Sabrina Ribeiro, Morgana Diniz, Thais Azevedo e Victor Lima pela ajuda durante o trabalho em campo e no laboratório, parceria, dicas, conselhos e por todos os bons momentos que partilhamos no laboratório, na copa ou mesmo fora da FSP.

À Dra. Sandra Nagaki, pela especial amizade, conversas e ajuda oferecida, aos amigos Cecilia Lavistchka, Ivy de Sá, Leonardo Suveges, Bruna Demari e Leticia Marteis por todas as boas conversas que tivemos, dicas e troca de conhecimentos. Aos amigos Rubens Silveira e Mariana Dantas, que ajudaram no projeto durante o todo o período em que estiveram no nosso laboratório e também pelas boas

conversas. Ao Antônio Ralph especialmente pela ajuda e paciência com a parte estatística do meu trabalho, ao Aristides Fernandes por todo o vasto conhecimento transmitido e conversas partilhados, ao amigo Fernando Luis Macedo pelo incentivo em fazer o programa de aprimoramento, e a todos os demais amigos do anexo e de outros laboratórios. Muito obrigado a todos pela ajuda e pelos momentos memoráveis que partilhamos juntos, que com certeza contribuíram imensamente para tornar essa experiência do mestrado ainda mais gratificante.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo financiamento do projeto: Análise da atividade locomotora de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) do Parque Municipal do Piqueri São Paulo, SP.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela minha bolsa de estudos durante o mestrado.

Aos administradores do Parque Municipal do Piqueri: Sra. Elizete (2014) e Sr. João Paulo (2015 e 2016) pela autorização e colaboração na realização deste trabalho.

Aos meus pais Francisco e Maria de Fatima, por sempre estarem ao meu lado, me orientando, apoiando e incentivando em todas as etapas de minha vida.

*“Em um lugar escuro nos encontramos, e um
pouco mais de conhecimento ilumina nosso
caminho”*

- Yoda em Star Wars: Episódio III, A Vingança
dos Sith, escrito e dirigido por George Lucas
(2005)

RESUMO

PANCETTI, F.G.M. Análise da atividade locomotora de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) do Parque Municipal do Piqueri São Paulo, SP. [Dissertação (Mestrado em Saúde Pública)]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo; 2017.

O estudo de mosquitos é extremamente importante, pois muitos são considerados vetores de diversos patógenos transmissíveis ao homem. *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* são responsáveis por transmitir arbovírus, como os da dengue, chikungunya, zika e febre amarela urbana, no mundo. Neste trabalho foram empregados *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* para: analisar a atividade locomotora de machos, fêmeas virgens e fêmeas inseminadas naturalmente; comparar a atividade locomotora de fêmeas injetadas intratoracicamente com extrato de glândulas acessórias (AG) de machos co e heteroespecíficos; e verificar a taxa de inseminação de fêmeas injetadas com glândulas acessórias de machos co e heteroespecíficos, quando são posteriormente expostas a seus machos coespecíficos. Os mosquitos foram coletados em ovitrampas instaladas no Parque Municipal do Piqueri, Zona Leste da cidade de São Paulo, durante o outono e a primavera de 2015 e outono de 2016. Após a emergência dos adultos, estes foram transferidos para quatro gaiolas matrizes separadas por espécie e sexo, dos quais obtivemos machos e fêmeas virgens de cada espécie. Em outras duas gaiolas foram agrupadas por espécie, 40 fêmeas e 40 machos para cópula por 24 horas para obtermos fêmeas inseminadas naturalmente. Posteriormente, todos os mosquitos foram transferidos para uma incubadora por quatro dias para análise da atividade locomotora. Na comparação de fêmeas injetadas com glândulas acessórias, foram extraídas as glândulas de machos de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* e estas injetadas intratoracicamente em fêmeas co e heteroespecíficas. Todas as fêmeas injetadas foram transferidas para uma incubadora por três dias. Para a análise dos dados foram utilizados os testes estatísticos F e T e ANOVA. Após a atividade locomotora, as fêmeas injetadas foram expostas a seus machos coespecíficos e posteriormente tiveram suas espermatecas dissecadas para verificar a presença de espermatozoides a fim de analisar a taxa de inseminação. Nos machos, fêmeas virgens e fêmeas inseminadas naturalmente de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*, o

padrão da atividade locomotora foi diurno e bimodal no outono e na primavera. Em *Ae. aegypti* machos a atividade foi mais evidente no outono e em *Ae. albopictus* na primavera. Nas fêmeas de *Ae. aegypti* virgens a atividade foi mais evidente que nas inseminadas naturalmente em ambas as estações. Nas fêmeas de *Ae. albopictus* não houve diferença na atividade das virgens e inseminadas. Nas fêmeas de *Ae. aegypti* injetadas com AG a atividade locomotora foi diurna, com padrão unimodal e menos marcada. Nas fêmeas de *Ae. albopictus* injetadas com AG não houve diferença. Na taxa de inseminação, somente *Ae. albopictus* fêmeas injetadas com AG heteroespecíficas apresentaram espermatozoides após cópula coespecífica. Este estudo contribui para compreensão do comportamento de mosquitos vetores como *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*.

Palavras-chave: Vetores. *Aedes aegypti*. *Aedes albopictus*. Atividade locomotora. Inseminação.

ABSTRACT

PANCETTI, F.G.M. Analysis of the locomotor activity of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) of the Piqueri Municipal Park São Paulo, SP. [Dissertation (Public Health)]. São Paulo: Faculty of Public Health, University of São Paulo; 2017.

The study of mosquitoes is extremely important, since many are considered vectors of several pathogens transmissible to man. *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* are responsible for transmitting arboviruses, such as dengue, chikungunya, zika and urban yellow fever, in the world. This study employed *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus* to: analyze the locomotor activity of males, virgin females and females naturally inseminated; compare the locomotor activity of females injected intratoracically with extract of accessory glands (AG) of co and heterospecific males; and verify the rate of insemination of females injected with accessory glands of co and heterospecific males when later exposed to their co-specific males. The mosquitoes were collected in ovitraps installed in Piqueri Municipal Park, East of São Paulo city, during the autumn and spring of 2015 and autumn of 2016. After the emergence of adults, they were transferred to four cages, separated by species and sex from which we obtained virgin males and females of each species. In the other two cages, they were grouped by species, 40 females and 40 males for mating during 24 hours to obtain naturally inseminated females. Thereafter, all the mosquitoes were transferred to an incubator for four days to the locomotor activity analysis. In the comparison of females injected with accessory glands, the male glands of *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus* were extracted and injected intratoracically into co and heterospecific females. All injected females were transferred to an incubator for three days. For the analysis, the statistical tests F and T and ANOVA were used. After the locomotor activity, the injected females were exposed to their co-specific males and later had their spermathecas dissected to verify the presence of spermatozoa in order to analyze the insemination rate. In males, virgin and naturally inseminated females of *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus*, the pattern of locomotor activity was diurnal and bimodal in autumn and spring. *Aedes aegypti* males activity was more evident in autumn and in *Ae. albopictus* in

spring. In virgin females of *Ae. aegypti* the activity was more evident than in the naturally inseminated in both seasons. In females of *Ae. albopictus*, there was no difference in the activity of virgin and inseminated. In females of *Ae. aegypti* injected with AG the locomotor activity was diurnal, with a unimodal and less marked pattern. In the females of *Ae. albopictus* injected with AG there was no difference. In the insemination rate, only *Ae. albopictus* females injected with heterospecific AGs presented spermatozoa after coespecific mating. This study contributes to the understanding of mosquito vectors behavior such as *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus*.

Keywords: Vectors. *Aedes aegypti*. *Aedes albopictus*. Locomotor activity. Insemination.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Imagem do Parque do Piqueri, no bairro de Tatuapé, zona leste da cidade de São Paulo, evidenciando a disposição das áreas A (interna), B (intermediária) e C (região periférica). Os pontos numerados representam a localização das ovitrampas instaladas no parque (1 a 36)	29
Figura 2	Ovitrampa instalada no parque do Piqueri, com palheta de Eucatex fixada contendo 500 ml de infusão de feno como atrativo para as fêmeas de <i>Aedes</i>	30
Figura 3	Palhetas positivas separadas individualmente em bacias com água e ração de peixe para eclosão dos ovos	31
Figura 4	(A) - Espermatecas de fêmea de <i>Ae. albopictus</i> inseminada, com a presença de espermatozóides destacada no círculo vermelho. (B) - Espermatecas de fêmea de <i>Ae. aegypti</i> não inseminada	33
Figura 5	(A) - Glândulas acessórias de macho de <i>Ae. albopictus</i> . (B) - Esquema do aparelho reprodutor masculino de <i>Aedes</i> , destacando (no retângulo vermelho) as glândulas acessórias	34
Figura 6	Tubo de atividade com algodão embebido em solução açucarada e vedado em ambos os lados com parafilme, contendo uma fêmea de <i>Ae. aegypti</i> confinada	37
Figura 7	Placa de monitoramento de atividade locomotora contendo 32 tubos, com um mosquito em cada	37
Figura 8	(A) Incubadora onde foram mantidos os monitores de atividade locomotora e (B) visão interna da incubadora, com os monitores conectados	38
Figura 9	Atividade locomotora de machos de <i>Ae. aegypti</i> de ovos coletados no outono (azul) e de ovos coletados na primavera (vermelho). Linhas tracejadas correspondem ao erro padrão	41
Figura 10	Atividade locomotora de machos de <i>Ae. albopictus</i> de ovos coletados no outono (azul) e de ovos coletados na primavera (vermelho). Linhas tracejadas correspondem ao erro padrão	41
Figura 11	Atividade locomotora de fêmeas de <i>Ae. aegypti</i> virgens (azul) e inseminadas (vermelho) de ovos coletados durante o outono. Linhas tracejadas correspondem ao erro padrão	43
Figura 12	Atividade locomotora de fêmeas de <i>Ae. aegypti</i> virgens (azul) e inseminadas (vermelho) de ovos coletados durante a primavera. Linhas tracejadas correspondem ao erro padrão	44

Figura 13	Atividade locomotora de fêmeas de <i>Ae. albopictus</i> virgens (azul) e inseminadas (vermelho) de ovos coletados durante o outono. Linhas tracejadas correspondem ao erro padrão	45
Figura 14	Atividade locomotora de fêmeas de <i>Ae. albopictus</i> virgens (azul) e inseminadas (vermelho) de ovos coletados durante a primavera. Linhas tracejadas correspondem ao erro padrão	46
Figura 15	Atividade locomotora de fêmeas de <i>Ae. aegypti</i> injetadas com salina (laranja), com AG de machos coespecíficos (vermelho) e heteroespecíficos (azul). Linhas tracejadas representam ao erro padrão	48
Figura 16	Atividade locomotora de fêmeas de <i>Ae. albopictus</i> injetadas com salina (laranja), com AG de machos coespecíficos (azul) e heteroespecíficos (vermelho) Linhas tracejadas representam ao erro padrão.....	48

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	15
1.1	RITMOS CIRCADIANOS E SUAS PROPRIEDADES	16
1.2	<i>Aedes aegypti</i>	17
1.3	<i>Aedes albopictus</i>	18
1.4	DENGUE	19
1.5	CHIKUNGUNYA	20
1.6	ZIKA	21
1.7	FEBRE AMARELA	23
1.8	ATIVIDADE E INTERAÇÕES ENTRE <i>Ae. aegypti</i> E <i>Ae. albopictus</i>	24
2.	OBJETIVOS	27
2.1	Objetivo geral	27
2.2	Objetivos específicos	27
3.	MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1	ÁREA DE ESTUDO	28
3.2	COLETA DE OVOS DE <i>Ae. aegypti</i> E <i>Ae. albopictus</i> E MANUTENÇÃO DO DESENVOLVIMENTO	29
3.3	INSEMINAÇÃO NATURAL DE FÊMEAS DE <i>Ae. aegypti</i> E <i>Ae.</i> <i>albopictus</i>	32
3.4	OBTENÇÃO DE EXTRATO DE GLÂNDULAS ACESSÓRIAS DE MACHOS DE <i>Ae. aegypti</i> E <i>Ae. albopictus</i>	33
3.5	INSEMINAÇÃO COM INJEÇÃO INTRATORÁCICA EM FÊMEAS DE <i>Ae. aegypti</i> E <i>Ae. albopictus</i>	34
3.6	ANÁLISE DA ATIVIDADE LOCOMOTORA	35
4.	RESULTADOS	39

4.1	ATIVIDADE LOCOMOTORA DE MACHOS DE <i>Aedes aegypti</i> E <i>Aedes albopictus</i> PROVENIENTES DE OVOS COLETADOS DURANTE A PRIMAVERA E OUTONO	40
4.2	ATIVIDADE LOCOMOTORA DE FÊMEAS DE <i>Aedes aegypti</i> E <i>Aedes albopictus</i> VIRGENS E INSEMINADAS NATURALMENTE PROVENIENTES DE OVOS COLETADOS DURANTE A PRIMAVERA E OUTONO	42
4.3	ATIVIDADE LOCOMOTORA DE FÊMEAS DE <i>Aedes albopictus</i> E <i>Aedes aegypti</i> INJETADAS COM SALINA E AG DE MACHOS COESPECÍFICOS E HETEROESPECÍFICOS	46
4.4	TAXA DE INSEMINAÇÃO DE FÊMEAS VIRGENS DE <i>Aedes aegypti</i> E <i>Aedes albopictus</i> INJETADAS E POSTERIORMENTE EXPOSTAS A SEUS MACHOS COESPECÍFICOS	49
5.	DISCUSSÃO	50
6.	CONCLUSÕES	56
7.	REFERÊNCIAS	58

1. INTRODUÇÃO

Entre todos os grupos do Reino Animal conhecidos, o mais amplo é o Filo Arthropoda (grego *arthro* = articulado e *poda* = pés) onde a Classe Insecta conta com o maior número de espécies (FORATTINI, 1996). Por serem considerados os organismos mais diversificados no planeta e por estarem presentes em abundância tanto em ambientes naturais quanto antrópicos, os insetos possuem importância socioeconômica e médica. Os insetos fitófagos causam prejuízos no setor agrícola e os hematófagos podem ser transmissores de agentes patogênicos de doenças, como arboviroses, malária, leishmanioses, oncocercose e Chagas (RAFAEL e col., 2012). A partir de suas características morfológicas, os insetos foram organizados em grandes grupos denominados Ordens (CERRI, 2010).

A Ordem Diptera engloba diversas espécies que atuam como vetores biológicos e mecânicos de patógenos que podem causar doenças em animais e no homem (RAFAEL e col., 2012). Dividida em duas subordens: Brachycera, de insetos com antenas compostas por 3 a 6 segmentos, e Nematocera, de insetos com antenas compostas por mais de 10 segmentos livres e articulados. Enquanto a subordem Brachycera inclui as moscas, responsáveis por algumas miíases e berne, por exemplo, a subordem Nematocera engloba os flebotomíneos, os simulídeos e os mosquitos (CERRI, 2010).

Os mosquitos apresentam ciclo de vida holometabólico, com uma fase aquática (estágios de ovo, larva e pupa) e uma fase terrestre (estágio adulto) e são conhecidos como muriçocas, carapanãs e pernilongos que representam a família Culicidae, dividida em duas subfamílias: Anophelinae, com três gêneros, sendo *Anopheles*, de interesse médico, com algumas espécies transmissoras dos agentes da malária e Culicinae com 38 gêneros distribuídos em 11 tribos, onde Culicini e Aedini são as que apresentam maior interesse em saúde pública (FORATTINI, 1996, 2002; CERRI, 2010; WRBU, 2017). No gênero *Aedes*, os subgêneros *Ochlerotatus* e *Stegomyia* evidenciam potenciais vetores de patógenos ao homem (CONSOLI e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; FORATTINI, 2002). O subgênero *Stegomyia*, originalmente distribuído no Velho Mundo, se expandiu para outros continentes, inclusive as Américas, e duas espécies receberam especial atenção após sua introdução na região

neotropical: *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) e *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse, 1894) (FORATTINI, 2002).

1.1 RITMOS CIRCADIANOS E SUAS PROPRIEDADES

Uma variedade de organismos, desde os mais simples, como bactérias, até os mais complexos, como plantas e animais, evoluíram sob a presença de um ciclo terrestre de dia e noite, possuindo, assim, um padrão rítmico diário, relacionado, principalmente, com as fases de claro e escuro. Tais ritmos diários são controlados por osciladores internos, denominados Relógio Circadiano (ALBERTS e col., 2009).

Processos rítmicos sempre foram interpretados como respostas passivas que os seres vivos davam frente às oscilações ambientais aos quais estavam expostos, como os ciclos diários de claro e escuro e de temperatura. Entretanto, em 1729, o astrônomo francês Jean Jacques d’Ortous de Mairan realizou um experimento com a planta *Mimosa pudica* e observou que, em condições naturais, esta abria seus folíolos durante o dia e os fechava durante a noite. Ao colocar esta mesma planta em uma câmara totalmente isolada de qualquer luminosidade, de Mairan observou que ela ainda abria seus folíolos durante o período que corresponderia à fase clara, e os retraía durante o período que corresponderia à fase escura. Com este experimento, ficou demonstrada a persistência dos ritmos biológicos circadianos (do grego *circa*=cerca; *dian*=dia; “cerca de um dia”) mesmo em condições de isolamento total dos ciclos ambientais externos (Revisado em MOORE-EDE e col., 1982; ROTENBERG e col., 1997).

Outro cientista chamado Duhamel Du Monceau fez um experimento semelhante em 1759, quando utilizou a mesma planta sob as mesmas circunstâncias que de Mairan, porém com temperatura controlada também, percebendo que os movimentos da planta se mantinham e que possivelmente os ritmos circadianos teriam um caráter endógeno, independente dos fatores externos. Posteriormente, em 1832, Augustin de Candolle observou o ritmo em livre curso dos relógios circadianos, refazendo a experiência e percebendo a movimentação dos folíolos se anteciparem a cada dia de experimento (Revisado em MOORE-EDE e col., 1982).

Já no ano de 1955, outro experimento feito por Renner também contribuiu para evidenciar o caráter endógeno dos ritmos circadianos, utilizando abelhas treinadas em um laboratório na França para se alimentarem entre 20h15min e 22h15min dentro de

um recinto fechado. De um dia para o outro, transferiu as abelhas para outro recinto semelhante, em laboratório na cidade de Nova Iorque. Renner observou que as abelhas se alimentavam ainda no horário correspondente à França, levando alguns dias para se adaptarem ao horário do novo local (Revisado em MOORE-EDE e col., 1982).

Outros nomes importantes no estudo de ritmos circadianos no século XX podem ser citados, como o do cronobiologista inglês Colin Pittendrigh e também Ronald J. Konopka e Seymour Benzer que, em 1971, realizaram estudos sobre ritmos circadianos em moscas *Drosophila melanogaster* mutantes, começando a desvendar as bases genéticas dos ritmos biológicos em insetos (KNOPKA e BENZER, 1971). A partir daí, *D. melanogaster* passou a ser um excelente modelo para o estudo da expressão de genes envolvidos no funcionamento do relógio circadiano de insetos (Revisado em HARDIN, 2005). Atualmente, sabe-se que o marcapasso molecular do relógio circadiano é basicamente composto por três alças regulatórias, nas quais a transcrição rítmica dos genes é controlada por mecanismos de autorregulação negativa (HARDIN, 2005; AMORETTY e col., 2013).

Dessa forma, concluiu-se que o relógio circadiano, estando presente nos mais diversos organismos, apresenta três propriedades básicas, sendo a primeira delas a capacidade de sincronização com o ambiente externo. A segunda é a capacidade de manutenção de seu funcionamento, mesmo quando o organismo é isolado do meio externo, passando a expressar seu período endógeno, menor ou maior do que 24 horas, e a terceira é a capacidade de termo compensação, não alterando significativamente seu período endógeno mesmo em ambientes com temperaturas oscilantes (Revisado em MARQUES e col., 1997).

O estudo de ritmos biológicos em insetos como mosquitos é viável, pois são animais de fácil manutenção e manipulação em condições de laboratório, além de ser extremamente importante, pois muitos são considerados vetores de diversos patógenos transmissíveis ao homem, como é o caso do *Aedes aegypti* e do *Aedes albopictus*.

1.2 *Aedes aegypti*

Mosquito de origem africana, descrito pela primeira vez no Egito, mas que atualmente se encontra bem distribuído em diversas outras regiões tropicais e subtropicais do mundo. Acredita-se que tenha chegado ao Brasil durante o período

colonial, e por ter sido comprovada sua relação com a transmissão da febre amarela, foi combatido através de intenso plano de erradicação, sendo considerado oficialmente erradicado de todo o território brasileiro em 1955, no entanto ao fim da década de 1960 o mosquito foi reintroduzido no Brasil, devido ao fato de outros países da América do Sul, América Central e os Estados Unidos não terem aderido ao plano. Atualmente, o *Ae. aegypti* ocorre em todo o território brasileiro (CONSOLI e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; BRAGA e VALLE, 2007).

A grande frequência de encontro de *Ae. aegypti* em ambientes urbanos e suburbanos, onde há elevada concentração de casas e pessoas, reflete suas características marcantes de endofilia e antropofilia, utilizando o interior de residências como abrigo e o homem como principal fonte para o repasto sanguíneo (CONSOLI e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; LIMA-CAMARA e col., 2006). Os tipos de criadouros empregados por essa espécie condizem com as áreas que habita, uma vez que são representados, fundamentalmente, por recipientes artificiais que armazenam água, como latas, pneus, vasos, pratos, caixas d'água, entre outros (HONÓRIO e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 2001; NATAL, 2002). Entretanto, *Ae. aegypti* também pode utilizar criadouros naturais para colocar seus ovos, já tendo sido encontrado em bromélias e ocos de árvores, como as pertencentes a Família Moraceae (FORATTINI e MARQUES, 2000; VAREJÃO e col., 2005; LIMA-CAMARA e col., 2016).

Através da alimentação sanguínea, a fêmea infectada do *Ae. aegypti* pode transmitir alguns arbovirus ao homem e, atualmente, no Brasil, esse mosquito é considerado o principal vetor dos agentes etiológicos da febre amarela urbana, dengue, chikungunya e Zika (HAYES, 2009; VEGA-RÚA e col., 2014; FERREIRA DE BRITO e col., 2016).

1.3 *Aedes albopictus*

Assim como o *Ae. aegypti*, o *Ae. albopictus*, é considerado um mosquito exótico no Brasil, tendo sido descrito pela primeira vez na Índia. Sua distribuição original engloba países do sudeste asiático e, por isso, esse mosquito é conhecido popularmente como “tigre asiático” (FORATTINI, 2002). É um mosquito geralmente

encontrado em regiões tropicais, subtropicais e temperadas, em ambientes urbanos, suburbanos, rurais e silvestres (HAWLEY, 1988).

Em 1986 ocorreu o primeiro registro do *Ae. albopictus* no Brasil, sendo identificado primeiramente no Rio de Janeiro (FORATTINI, 1986) e, posteriormente, em São Paulo (BRITO e col., 1986). Com o passar dos anos, foi sendo encontrado em muitos outros Estados brasileiros e, atualmente, os únicos Estados onde não há registro são o Amapá e o Acre (SANTOS e col., 2003; SANTANA e col., 2014; PANCETTI e col., 2015). A espécie frequentemente utiliza criadouros naturais, como buracos de árvores, bromélias e internódios de bambu, eventualmente utilizando recipientes artificiais deixados pelo homem (HAWLEY, 1988; CONSOLI e LOURENÇO –DE-OLIVEIRA, 1994). Assim como *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus* tem sua presença relacionada ao homem, porém é mais abundante em áreas rurais e silvestres, sendo mais presente no peridomicílio (HAWLEY, 1988; LIMA-CAMARA e col., 2006). A alimentação sanguínea pode ser realizada em uma grande variedade de hospedeiros vertebrados, como aves, animais domésticos e silvestres, e o próprio homem (HUANG, 1972; HAWLEY, 1988).

Até o presente, no Brasil, o mosquito *Ae. albopictus* não foi incriminado como vetor de arbovirose, porém, em laboratório, essa espécie demonstra competência para se infectar e transmitir com sucesso os vírus amarelo, dengue, chikungunya e Zika (MILLER e BALINGER, 1988; CASTRO e col., 2004; VEGA-RÚA e col., 2014; CHOUIN-CARNEIRO e col., 2016).

1.4 DENGUE

A dengue é provocada por um vírus da família Flaviviridae, gênero *Flavivirus*, classificado em quatro sorotipos: DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 (TAUIL, 2002; BARRETO e TEIXEIRA, 2008). Considerada a arbovirose transmissível ao homem de maior importância no mundo, a dengue representa um grave problema em saúde pública nas regiões tropicais e subtropicais (Ministério da Saúde, 2002; Kyle & Harris, 2008). Anualmente, estima-se que ocorram cerca de 50 milhões de infecções pelo vírus dengue, sendo que a incidência da doença aumentou 30 vezes nos últimos 50 anos e a OMS (Organização Mundial da Saúde) aponta que 40% da população mundial apresenta risco de contrai-lo (WHO, 2014; MS/PORTAL DE SAÚDE, 2015).

No Brasil, apesar de existirem referências de evidências de epidemias dessa doença desde o século XIX, nos anos de 1981-1982 é que ocorreu a primeira epidemia clínica e laboratorialmente documentada, em Boa Vista, Roraima, tendo sido identificados os sorotipos 1 e 4 (OSANAI, 1984). Em 1986 o sorotipo 1 foi identificado no Rio de Janeiro, e posteriormente o sorotipo 2, como o primeiro caso hemorrágico. Em 2001 o sorotipo 3 foi identificado em Nova Iguaçu e em 2010 o sorotipo 4 foi isolado em Roraima e no Amazonas (IOC/FIOCRUZ, 2010). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), as infecções pelo vírus podem variar de formas clinicamente inaparentes ou brandas até formas graves, como a dengue hemorrágica, podendo ser fatal (WHO, 1997). Os sintomas são febre súbita e alta, dores no corpo, em especial atrás dos olhos, eventuais manchas na pele, náuseas, vômito, diarreia, tontura, acúmulo de líquidos, podendo em alguns casos ocorrer complicações, como o comprometimento de órgãos (BRASIL, 2016). A imunização ocorre somente para o sorotipo contraído, não havendo, portanto, imunização cruzada (TAUIL, 2001).

Em 2015, a Anvisa (Agência nacional de Vigilância Sanitária) publicou o primeiro registro de uma vacina contra dengue (Denguevaxia – vacina dengue 1, 2, 3 e 4 – recombinante, atenuada) e aprovou o início dos estudos referentes à fase 3 da vacina contra a dengue realizados no Instituto Butantan (MS/PORTAL DE SAÚDE, 2015). Essa fase, com testes em humanos, teve início em outubro de 2016, e foi coordenado pela Fiocruz de Pernambuco (FIOCRUZ, 2016).

Em 2015, até a semana epidemiológica 52 (04/01/2015 a 02/01/2016) haviam sido registrados 1.649.008 prováveis casos de dengue no Brasil, sendo que 21.898 foram confirmados, com 863 óbitos. Em 2016, até a semana epidemiológica 52 (03/01/2016 a 31/12/2016) havia 1.500.535 casos prováveis no Brasil, sendo 9.263 confirmados e 642 óbitos. Já em 2017, até a semana epidemiológica 19 (01/01/2017 a 13/05/2017) houve 144.326 casos prováveis, desses, 1.123 confirmados e 23 óbitos (MS/PORTAL DE SAÚDE, 2017).

1.5 CHIKUNGUNYA

Chikungunya (CHIKV) é um vírus RNA, descrito em 1950 na Tanzânia. Pertence ao gênero *Alphavirus* e a família *Togaviridae*. Sua identificação ocorreu

durante um surto, que à primeira vista, foi atribuído a dengue (WEAVER, 2014). O nome Chikungunya vem do idioma Makonde, e significa “aquele que se curva”, fazendo referência a posição característica apresentada pelos que contraíam a doença. O vírus é transmitido ao homem pelos vetores *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* (POWERS e LOGUE 2007; NUNES e col., 2015).

Em 2004, o vírus emergiu em ilhas do Oceano Índico, alcançando regiões tropicais e subtropicais da África e Ásia, além de zonas temperadas da Europa. O vírus foi identificado no Caribe em 2013 e, em 2014, mais de 130 mil casos autóctones foram registrados nas Américas (VEGA-RÚA e col., 2014; PAHO/WHO 2014; MS/SVS 2014; NUNES e col., 2015). Em 2014, foi registrado o primeiro caso autóctone de chikungunya no Brasil, em Oiapoque, Amapá, e pouco tempo depois, novos casos foram identificados em Feira de Santana, na Bahia. Até outubro do mesmo ano, já haviam sido confirmados 682 casos autóctones no Brasil pelo Ministério da Saúde (NUNES e col., 2015).

Os sintomas da infecção por CHIKV se caracterizam por febre, cefaleia, mialgia, erupção cutânea e dor articular intensa, que geralmente apresenta melhora em torno de 10 dias, porém podem persistir durante meses após o quadro febril. Ao contrário da dengue, a ocorrência de sintomas severos como choques ou hemorragias é incomum (POWERS e LOGUE, 2007).

No Brasil, até a semana epidemiológica 52 de 2015, haviam sido registrados 20.661 casos suspeitos de chikungunya, sendo 7.823 confirmados, e 3 óbitos. Em 2016, até a semana 52 foram registrados 271.824 casos prováveis, sendo 151.318 confirmados e 196 óbitos. Para 2017, até a semana epidemiológica 19 foram 80.949 casos prováveis registrados, sendo que desses, 28.225 confirmados, com 13 óbitos (MS/PORTAL DE SAÚDE, 2017).

1.6 ZIKA

O vírus Zika (ZIKAV) pertence à família Flaviviridae e gênero *Flavivirus*, assim como o vírus dengue, vírus amarelo, vírus do Nilo Ocidental e Rocio. Com recente destaque pela sua importância para a saúde pública, é transmitido por mosquitos do gênero *Aedes* (HAYES, 2009; FAYE e col., 2014; CIEVS/SP, 2015; OLIVEIRA, 2015). O primeiro isolamento do vírus ocorreu na floresta Zika, em

Uganda, no ano de 1947, em primatas não humanos. No período entre 1951 a 2013, houve notificações de evidências em humanos em países da África, Ásia e Oceania (PORTAL DE SAÚDE, 2015). O primeiro surto fora da área endêmica ocorreu em 2007, na ilha Yap, na Micronésia e, em 2013, houve surto na Polinésia Francesa (HAYES, 2009; CIEVS/MG, 2015; CIEVS/SP, 2015).

O primeiro caso autóctone de Zika no Brasil ocorreu em março 2015, em Camaçari, Bahia e a principal hipótese era a de que o ZIKAV tinha chegado ao Brasil no período da Copa do Mundo, em 2014 (CAMPOS e col., 2015; ZANLUCA e col., 2015). No entanto, o sequenciamento genético do vírus circulante no Brasil demonstrou que ele pertencia à uma linhagem asiática, circulante em regiões como a polinésia Francesa, Ilhas Cook, Ilha de Páscoa e Nova Caledônia. Não tendo havido a participação de nenhum atleta vindo dessas regiões na Copa do Mundo, uma segunda teoria surgiu, relacionando a chegada do vírus ao Brasil com uma competição de canoagem sediada no Rio de Janeiro em 2013, onde participaram competidores provenientes dos países citados (MUSSO, 2015).

Os principais sintomas da doença envolvem febre, dor de cabeça, conjuntivite não purulenta, artralgia, mialgia, astenia, erupções cutâneas, dor ao redor dos olhos, anorexia, vômitos, diarreia e dor abdominal (MS/PORTAL DE SAÚDE, 2014). No Brasil, estado do Ceará, em novembro de 2015, foi confirmada pelo Ministério da Saúde a relação entre o ZIKAV e surto de microcefalia em amostras de sangue e tecido de um bebê com microcefalia, que veio a óbito (MS/PORTAL DE SAÚDE, 2015). Em outros dois casos de óbitos (um homem residente em São Luís, Maranhão, e uma menina residente em Benevides, Pará) os pacientes apresentaram suspeita de dengue, no entanto exames revelaram a presença do ZIKAV. Foram os primeiros casos de óbito pelo vírus Zika registrados no mundo (MS/PORTAL DE SAÚDE, 2015). Recentemente um estudo feito por Rodrigues (2016) em recém-nascidos no Brasil verificou também uma possível relação de casos de Zika com microcefalia. CUGOLA e col. (2016) demonstraram em laboratório que pacientes gestantes possivelmente infectadas com ZIKAV pode prejudicar o desenvolvimento neurológico em fetos, causando microcefalia.

Estudos também mostraram a relação entre a infecção pelo ZIKAV e casos de Síndrome de Guillain-Barré, uma doença autoimune caracterizada por afetar o sistema nervoso periférico, podendo em alguns casos levar a morte (NIAMS, 2016). Na

Polinésia Francesa, foi observado, durante um surto de Zika, o aumento de casos de Síndrome de Guillain-Barré em até 20 vezes o habitual, o que levou a hipótese de haver relação entre a infecção pelo vírus e o desenvolvimento da síndrome (OEHLER e col., 2014).

No Brasil, até a semana epidemiológica 52 de 2016, haviam sido registrados 215.319 casos prováveis, sendo que 130.701 confirmados e 8 óbitos. Já em 2017, até a semana 19 foram 9.351 casos suspeitos registrados e 3.356 confirmados, sem óbitos até o momento (MS/PORTAL DE SAÚDE, 2017).

1.7 FEBRE AMARELA

A febre amarela é uma doença hemorrágica viral, cujo agente etiológico é um vírus RNA, da família Flaviviridae, gênero *Flavivirus*, transmitido por fêmeas infectadas de mosquitos dos gêneros *Aedes*, *Haemagogus* e *Sabethes*. O vírus amarílico é endêmico em regiões tropicais das Américas Central e do Sul, e também do continente africano. Os principais sintomas apresentados por quem contrai a doença são dores de cabeça e muscular, febre, vômitos, náuseas, fadiga e icterícia (característica que dá nome à doença) (BARRET e HIGGS, 2007; WHO, 2016).

A febre amarela apresenta dois ciclos distintos: o silvestre e o urbano. Apesar de tratar-se da mesma arbovirose, o ciclo urbano envolve o *Ae. aegypti* como vetor e o homem como hospedeiro, enquanto o ciclo silvestre tem como principais vetores mosquitos do gênero *Haemagogus* e *Sabethes* e como hospedeiros vertebrados de maior destaque primatas não humanos dos gêneros *Alouatta*, *Cebus*, *Atelles* e *Callithrix* (TAUIL, 2010).

A doença chegou ao Brasil, possivelmente vinda das Antilhas, em meados do século XVII, e representou, durante o fim do século XIX e começo do século XX, um grande problema de saúde pública, não somente por ter levado milhares de pessoas à morte, como também por interferir na importação de mão de obra e prejudicar relações de comércio com outros países (TEIXEIRA, 2001). No estado de São Paulo, os primeiros casos de febre amarela foram registrados a partir de 1850, no município de Santos, cidade portuária e porta de entrada para trabalhadores imigrantes (TEIXEIRA, 2001). O mosquito vetor foi intensamente combatido através de campanhas ministradas por Oswaldo Cruz, e em 1937 foi desenvolvida a vacina profilática para a

doença, fatores que contribuíram para que o último caso do ciclo urbano de febre amarela tenha sido registrado no Brasil em 1942. Atualmente, somente o ciclo silvestre encontra-se em circulação no Brasil (TAUIL, 2010).

Até março de 2017, o Brasil registrou cerca de 1.456 casos suspeitos de febre amarela silvestre, na maioria na região Sudeste, sendo que desses, 378 foram confirmados e 144 descartados (MS/PORTAL DE SAÚDE, 2017).

1.8 ATIVIDADE E INTERAÇÕES ENTRE *Aedes aegypti* E *Aedes albopictus*

Nos mosquitos a atividade hematofágica tem importância na dinâmica de transmissão de doenças, pois é dessa forma que os insetos vetores transmitem os patógenos que albergam no homem. As atividades diárias de hematofagia, locomoção, alimentação, cópula, oviposição, eclosão, entre outras, são controladas pelo relógio circadiano interno (SAUNDERS, 2002; AMORETTY e col., 2013). Os insetos geralmente realizam essas atividades em determinados momentos do dia, o que caracteriza seu comportamento como diurno, crepuscular ou noturno. Compreender esse padrão de atividades é de fundamental importância para caracterizar a biologia das espécies, bem como a dinâmica de transmissão de patógenos por insetos vetores (SAUNDERS, 2002).

Geralmente, tanto *Ae. aegypti* quanto *Ae. albopictus* apresentam um padrão de atividade diurno e bimodal nos períodos crepusculares matutino e vespertino (ATMOSOEDJONO e col., 1972, HAWLEY, 1988). No entanto, variações fisiológicas podem afetar a atividade de *Ae. aegypti* e de *Ae. albopictus*, como já observado, em condições de laboratório, com fêmeas de *Ae. aegypti* que, após a cópula com machos co-específicos, apresentaram redução na atividade total de voo (JONES 1981). A atividade locomotora de fêmeas *Ae. aegypti* de laboratório também foi alterada quando estas foram inseminadas ou após alimentação sanguínea (LIMA-CAMARA e col., 2014). Com efeito, a glândula acessória (AG) dos machos de *Ae. aegypti* produz substâncias que são transferidas para as fêmeas durante a cópula e podem influenciar sua atividade, bem como a fisiologia e o comportamento destas (KLOWDEN, 1999, JONES, 1981).

LIMA-CAMARA e col., (2011), utilizando mosquitos de colônia, demonstraram que fêmeas de *Ae. aegypti* infectadas intratoracicamente com o vírus

dengue (DENV-2) apresentaram uma maior atividade locomotora, fato que pode ter influência na transmissão desse patógeno ao homem, sinalizando que a infecção por vírus pode alterar a atividade de mosquitos vetores.

Em áreas onde ocorre simpatria, *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* podem se desenvolver em criadouros similares, principalmente em recipientes artificiais, distribuídos em áreas urbanas e suburbanas (BRAKS e col., 2003; 2004, HONÓRIO e col., 2009). Além da competição entre as formas imaturas, a possibilidade da inseminação cruzada entre machos e fêmeas de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*, provocando esterilização das fêmeas (satirização), tem sido alvo de alguns estudos em campo e em laboratório (NASCI e col., 1989, NAZNI e col., 2009). NAZNI e col. (2009) relatam, em condições de laboratório, a existência do cruzamento entre machos de *Ae. albopictus* e *Ae. aegypti* com fêmeas de *Ae. aegypti* e de *Ae. albopictus*, respectivamente, mas todos gerando ovos inférteis. Paralelamente, em laboratório, NASCI e col. (1989) sugerem que fêmeas de *Ae. aegypti* são mais receptivas à inseminação por um macho de *Ae. albopictus* do que uma fêmea de *Ae. albopictus* é pela inseminação por um macho de *Ae. aegypti*.

Utilizando mosquitos de colônias de laboratório, LIMA-CAMARA e col. (2013) injetaram intratoracicamente extrato de glândulas acessórias de machos de *Ae. aegypti* e de *Ae. albopictus* em fêmeas de *Ae. aegypti* e observaram redução na atividade locomotora em relação às fêmeas injetadas com salina (controle). Além disso, as fêmeas de *Ae. aegypti* se tornaram refratárias à cópula com machos coespecíficos após terem sido injetadas com glândulas acessórias de machos de *Ae. albopictus*.

Normalmente estudos de atividade locomotora ou outros realizados com *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* são feitos em campo, com variáveis ambientais atuando, ou em laboratório, com colônias de mosquitos e condições controladas. Nesse estudo, foi analisada a atividade locomotora de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* oriundos de ovos coletados no campo (F1) em duas estações (outono e primavera), em condições controladas de laboratório.

Até o momento, só existem estudos de atividade locomotora de fêmeas de *Ae. aegypti* injetadas com AG de machos co e heteroespecíficos, mas não há nada sobre essa atividade em fêmeas de *Ae. albopictus*. Paralelamente, é interessante ressaltar que é a primeira vez que se realiza um experimento de injeção intratorácica de glândulas

acessórias de machos co e heteroespecíficos em fêmeas de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* oriundas de ovos provenientes de campo.

Sendo *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* vetores de importantes arbovírus tanto no Brasil quanto em outras partes do mundo, torna-se de extrema importância todo o tipo de informação que se possa produzir sobre essas espécies, sendo assim, esse trabalho tem como objetivo contribuir com esse conhecimento, analisando a atividade locomotora e fornecendo dados acerca do comportamento desses vetores, assim como a interação entre ambos em locais onde existam em simpatria.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Estudar o padrão de atividade locomotora de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* provenientes do Parque Municipal de Piqueri, São Paulo – SP, sob regime de 12 horas de claro e 12 horas de escuro (CE 12:12), a 25°C.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o padrão de atividade locomotora de **machos, fêmeas virgens e fêmeas inseminadas naturalmente** de *Ae. aegypti* e de *Ae. albopictus* no outono e na primavera de 2015 e no outono de 2016;

- Comparar o efeito da **injeção intratorácica de glândulas acessórias de machos** de *Ae. aegypti* e de *Ae. albopictus* na atividade locomotora de fêmeas virgens de ambas as espécies;

- Verificar a **taxa de inseminação** de fêmeas de *Ae. aegypti* e de *Ae. albopictus* injetadas com glândulas acessórias de machos coespecíficos e heteroespecíficos, quando são posteriormente expostas a seus machos coespecíficos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. ÁREA DE ESTUDO

A cidade de São Paulo é considerada uma das maiores metrópoles do mundo, com uma área de 1.521,110 km² e possuindo mais de 12 milhões de habitantes (IBGE, 2016). É uma cidade de clima subtropical úmido, com invernos secos e verões chuvosos e de bioma predominantemente composto por Mata Atlântica (EM-IAG/USP, 2014 IBGE, 2016).

A pesquisa foi realizada no parque do Piqueri, localizado no bairro do Tatuapé, zona leste do município de São Paulo. O parque apresenta área de 97.272 metros quadrados (23° 31' 39.98"S e 46° 34' 24.88"W) onde existem cerca de 150 tipos de plantas, dentre elas eucalipto, alameda de sibipirunas, bambuzal e bosques heterogêneos, bem como cerca de 90 espécies de animais, como peixes, sapo-cururu, tigrésd'água e cobra-de-duas-cabeças, pica-paus, sabiás, papagaios e maracanãs. O mamífero representante do parque é o ouriço cacheiro. Sua estrutura também conta com pista de caminhada, quadras poliesportivas, aparelhos de ginástica, playground e lago, que são um atrativo para um grande número de pessoas (Prefeitura de São Paulo, 2015; SVMA, 2015).

O parque foi dividido em três áreas: **A**, **B** e **C**. Enquanto a área **A** representa a região mais interna do parque, estando mais distante das habitações, a área **B** é intermediária e a área **C** compreende a região periférica do parque, estando mais próxima das áreas habitadas (**Figura 1**).

Figura 1- Imagem do Parque do Piqueri, no bairro de Tatuapé, zona leste da cidade de São Paulo, evidenciando a disposição das áreas **A** (interna), **B** (intermediária) e **C** (região periférica). Os pontos numerados representam a localização das ovitrampas instaladas no parque (1 a 36). Fonte: Silva, MHR (2017).

3.2. COLETA DOS OVOS DE *Ae. aegypti* E *Ae. albopictus* E MANUTENÇÃO DO DESENVOLVIMENTO

A coleta de ovos de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* foi realizada através de armadilhas de oviposição (ovitrampas) (**Figura 2**). As ovitrampas que utilizamos consistem de um recipiente de plástico de cor escura e boca larga, no qual é fixada em seu interior, com um clipe, uma palheta de madeira compensado, com uma superfície rugosa voltada para o interior da armadilha, servindo como local para a postura dos ovos pelas fêmeas de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*. FAY e PERRY (1965) foram os primeiros a utilizar ovitrampas para vigilância de populações de *Ae. aegypti* e FAY e ELIASON (1966) demonstraram a alta eficácia da ovitrampa quando utilizada em

pesquisas voltadas a coleta de larvas. REITER e col. (1991) concluíram que a infusão de feno propicia o desenvolvimento de uma fauna microbiana rica na água, o que proporciona maior oferta de nutrientes para as formas imaturas do mosquito, sendo assim, a oviposição das fêmeas aumenta quando a infusão é adicionada à água da armadilha. MARQUES e col. (1993) verificaram que as ovitrampas foram mais eficientes quando comparadas com criadouros naturais (oco de bambú) também, fato que torna as armadilhas uma boa ferramenta especialmente para a coleta de imaturos de *Ae. albopictus*.

Cada ovitrampa tem capacidade para 1,5 L sendo que, nesse estudo, foram utilizados 450 ml de água e 50 ml de solução de feno (10%). Foram utilizadas 12 armadilhas por área (+/- 1,5 m de altura do solo) totalizando 36 armadilhas no parque (Figura 1).

Figura 2 - Ovitrampa instalada no parque do Piqueri, com palheta de Eucatex fixada contendo 500 ml de infusão de feno como atrativo para as fêmeas de *Aedes*. Foto: Urbinatti, PR (2014).

Durante a primavera (outubro a novembro) de 2015 e outonos (abril a junho) de 2015 e 2016, no período de seis semanas consecutivas, as palhetas das 36 armadilhas foram semanalmente recolhidas e substituídas por novas, assim como a água e solução de feno. As 216 palhetas recolhidas foram encaminhadas ao

Laboratório de Entomologia da Faculdade de Saúde Pública da USP, onde, após estarem secas, foram avaliadas quanto à positividade (presença de ovos) em microscópio estereoscópico. As palhetas positivas tiveram os ovos contados e foram colocadas individualmente em bacias contendo água e ração triturada de peixe (Tetramin®) até a eclosão das larvas (**Figura 3**) cujo desenvolvimento foi observado até o estágio L4, e identificadas por espécie, segundo CONSOLI e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA (1994).

Figura 3 - Palhetas positivas separadas individualmente em bacias com água e ração de peixe para eclosão dos ovos. Foto: Urbinatti, PR (2014).

Após identificadas, as larvas L4 foram separadas por espécie, em dois recipientes: um para *Ae. aegypti* e outro para *Ae. albopictus*. As pupas formadas foram individualizadas em borreiros contendo água, a fim de garantir a emergência de adultos virgens. Após a emergência dos adultos, de todas as coletas, estes foram transferidos para gaiolas de 30x30 cm, separadas por sexo e espécie, totalizando quatro gaiolas matrizes (1=*Ae. aegypti* machos, 1=*Ae. aegypti* fêmeas, 1=*Ae. albopictus* machos, 1=*Ae. albopictus* fêmeas). Os machos e fêmeas virgens de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* utilizados no experimento de atividade locomotora foram provenientes dessas gaiolas matrizes.

3.3. INSEMINAÇÃO NATURAL DE FÊMEAS DE *Ae. aegypti* E *Ae. albopictus*

Após sete dias mantidos nas gaiolas matrizes, cerca de 40 fêmeas virgens de *Ae. aegypti* e 40 fêmeas virgens de *Ae. albopictus* foram transferidas para outras duas gaiolas contendo cerca de 40 machos coespecíficos cada, mantendo a proporção de um macho: uma fêmea, onde permaneceram por um período de 24 horas, a fim de realizarem cópula. O experimento de atividade locomotora teve início após as 24 horas de cópula. Após o experimento, as espermatecas de todas as fêmeas de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* foram dissecadas para garantirmos que houve inseminação. Fêmeas não inseminadas foram excluídas da análise.

Para a dissecação das espermatecas, as fêmeas foram colocadas adormecidas sobre uma lâmina, junto com uma gota de salina 0,9%. Com auxílio de dois estiletes, a porção final do abdômen da fêmea, onde se encontram as espermatecas, foi puxada para a gota de salina. Após esse procedimento, uma lamínula foi colocada sobre a lâmina e esta foi levada para o microscópio óptico, para detecção da presença (**Figura 4A**) ou ausência (**Figura 4B**) de espermatozoides nas espermatecas.

Figura 4. (A) - Espermatecas de fêmea de *Ae. albopictus* inseminada, com a presença de espermatozoides destacada no círculo vermelho. (B) - Espermatecas de fêmea de *Ae. aegypti* não inseminada. Foto: Pancetti FGM (2016).

3.4. OBTENÇÃO DE EXTRATO DE GLÂNDULAS ACESSÓRIAS DE MACHOS DE *Ae. aegypti* E *Ae. albopictus*

Foram dissecadas as glândulas acessórias (AG) (**Figura 5 A e B**) de 25 machos de *Ae. aegypti* e de 25 machos de *Ae. albopictus*, segundo CONSOLI e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA (1994). Os machos foram adormecidos em gelo e as dissecções foram feitas em solução salina 0,9%, sobre uma lâmina e com o auxílio de microscópio estereoscópico. A extração do par de AG foi realizada com dois estiletes – um no tórax e outro no final do abdome do macho - e o total de 25 pares de AG foi armazenado em 50µL de salina, em proporção de 1AG/µL. Antes de aplicar as injeções intratorácicas nas fêmeas, as soluções contendo as AG eram sonicadas por 1 minuto e centrifugadas por 1h a 13.000g (CRAIG JR. 1967, LIMA-CAMARA e col., 2013).

Figura 5 (A) - Glândulas acessórias de macho de *Ae. albopictus*. **(B)** - Esquema do aparelho reprodutor masculino de *Aedes*, destacando (no retângulo vermelho) as glândulas acessórias. Foto: Pancetti FGM, 2016. Desenho: Pancetti FGM, 2017. Modificado de: Consoli, R.A.G.B; Lourenço de Oliveira, R (1994).

3.5. INSEMINAÇÃO COM INJEÇÃO INTRATORÁCICA EM FÊMEAS DE *Ae. aegypti* E *Ae. albopictus*

Cerca de 120 fêmeas virgens de *Ae. aegypti* e 120 fêmeas virgens de *Ae. albopictus* foram separadas em três grupos de 40 cada: o primeiro grupo foi injetado intratoracicamente com 0.28 μ L de salina (grupo controle), o segundo com 0.28 μ L de extrato de AG de machos heteroespecíficos e o terceiro com 0.28 μ L de extrato de AG de machos co-específicos. Considerando que na natureza cada par de AG é capaz de inseminar cerca de 64 fêmeas (CRAIG JR, 1967), a dose injetada em nosso experimento é suficiente para indicar a inseminação para as fêmeas de ambas as espécies.

Ao final do experimento de atividade locomotora, as fêmeas de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* dos 3 grupos que permaneceram vivas foram colocadas em gaiolas com machos co-específicos, com objetivo de verificar se a inseminação foi afetada ou não pela injeção de AG. O contato com os machos teve duração de 72 horas e, após esse período, as fêmeas foram adormecidas em gelo para verificação da presença ou ausência de espermatozoides nas espermatecas, conforme descrito no item 3.3.

3.6. ANÁLISE DA ATIVIDADE LOCOMOTORA

Para os experimentos da atividade locomotora, foi utilizado o sistema de análise de atividade *Drosophila* Activity Monitor, da Trikinetics, desenvolvido inicialmente para estudos com *Drosophila*, mas que se mostra eficiente também nos estudos de ritmos circadianos de mosquitos e flebótomos (MEIRELES-FILHO e col., 2006, GENTILE e col., 2006). Os **machos, fêmeas virgens, fêmeas inseminadas naturalmente** e as **fêmeas injetadas com AG**, tanto para *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* utilizados nos experimentos de atividade locomotora foram colocados respectivamente em 32 tubos cilíndricos de vidro com 10 cm de comprimento e 3,5 cm de diâmetro (Figura 6). Cada tubo contendo um mosquito ficou localizado em um canal (unidade de monitoramento individual) presentes em uma placa de monitoramento e sua movimentação pode ser detectada e registrada cada vez que o indivíduo atravessava um feixe de luz infravermelho no meio do tubo. A leitura da atividade dos mosquitos é acumulativa, e registrada a cada 30 minutos. Foram utilizados até seis monitores de atividade, cada um com a capacidade de albergar 32 tubos. Os mosquitos foram mantidos dentro de uma incubadora durante o experimento por sete dias, em regime de doze horas de claro e doze horas de escuro (CE 12:12), a 25° C. A umidade no interior da incubadora permaneceu a 20% durante a realização dos experimentos.

Na preparação do tubo, um pequeno pedaço de algodão embebido com solução açucarada 10% foi colocado em uma das extremidades e serviu de alimento aos mosquitos. Os mosquitos adultos foram sugados diretamente das gaiolas com o auxílio de um Capturador Manual de Castro e mantidos em gelo, para adormecerem. Posteriormente, foram transferidos para uma mesa fria, forrada com papel, onde foram depositados individualmente nos tubos de atividade. A transferência dos mosquitos da mesa para o tubo foi feita com pinça entomológica, a fim de evitar danos aos insetos. Ambas as extremidades do tubo foram vedadas com parafilme, a fim de evitar o ressecamento do algodão e a morte do mosquito por desidratação (**Figura 6**). Após esse procedimento, os tubos foram acondicionados nas placas de monitoramento (**Figura 7**).

As placas de monitoramento de atividade foram colocadas dentro da incubadora (**Figura 8**), com fotoperíodo e temperatura controlados e conectados a um

computador por cabos. Os experimentos tiveram duração média de seis dias. O programa de computador utilizado para o registro dos dados da atividade locomotora dos mosquitos foi o “DAMSystem data collection 308”. Cada movimento dos insetos ficou registrado em um arquivo individual, sendo um arquivo para cada placa de monitoramento. Os dados foram avaliados em planilhas do programa Excel. A média geométrica de Williams foi utilizada para análise dos dados e construção dos gráficos. Foi utilizado o programa Paleontological Statistics (PAST) versão 2.16 para a aplicação dos testes estatísticos. Realizamos respectivamente três experimentos com *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* para o outono (2015) e três experimentos para a primavera (2015), com os **machos**, as **fêmeas virgens** e as **fêmeas inseminadas naturalmente**, e para o outono (2016) dois experimentos com as **fêmeas injetadas com AG co e heteroespecíficas**. Os três experimentos realizados para a primavera (2015) foram comparados entre si através dos testes F e T ou One Way ANOVA, e os que não apresentaram diferença significativa entre si foram unidos. Isso foi feito também com os três experimentos do outono (2015), assim como os dois experimentos realizados no outono (2016), resultando dessa forma em um experimento para o outono (2015) e um experimento para a primavera (2015) onde comparamos a atividade de **machos**, **fêmeas virgens** e **fêmeas inseminadas naturalmente** de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*, e um experimento para o outono (2016), onde comparamos a atividade das **fêmeas injetadas com AG**.

Para as comparações entre os mosquitos (estações e estado fisiológico) também foi utilizado o teste F e T para comparar dois experimentos (machos X machos, fêmeas virgens X fêmeas inseminadas), e para comparar três experimentos (fêmeas com salina X fêmeas com AG coespecífica X fêmeas com AG heteroespecífica) foi utilizado o teste One Way ANOVA. Para a realização das análises, foram comparadas as médias da atividade dos mosquitos em intervalos de 30 minutos, e considerados a média total de movimentação, a média diurna (durante toda a fase clara), média noturna (durante toda a fase escura), médias de light on e light off (ao acender e apagar das luzes) e médias diurna sem light on e noturna sem light off, durante quatro dias para machos, fêmeas virgens e inseminadas de ambas as espécies, e durante três dias para as fêmeas inseminadas com AG de machos co, heteroespecíficos e controle (com salina). A redução dos dias considerados para o experimento com as fêmeas injetadas ocorreu para que pudéssemos ter um N amostral maior.

Figura 6 - Tubo de atividade com algodão embebido em solução açucarada e vedado em ambos os lados com parafilme, contendo uma fêmea de *Ae. aegypti* confinada. Foto: Pancetti, FGM (2016).

Figura 7 - Placa de monitoramento de atividade locomotora contendo 32 tubos, com um mosquito em cada. Foto: Pancetti, FGM (2016).

Figura 8 (A) - Incubadora onde foram mantidos os monitores de atividade locomotora e **(B)** visão interna da incubadora, com os monitores conectados. Foto: Pancetti, FGM (2016).

4. RESULTADOS

A atividade locomotora dos mosquitos adultos avaliados foi apresentada em gráficos, onde as colunas brancas representam as doze horas da fase clara (dia subjetivo), quando a luz da incubadora permaneceu acesa (iniciando as 07 h 00 min AM), e as colunas cinza representam as doze horas da fase escura (noite subjetiva), quando as luzes da incubadora permaneceram apagadas (iniciando as 19 h 00 min PM), desse modo, cada dia de experimento é representado no gráfico por uma coluna clara e uma escura. O primeiro dia do experimento, ou seja, o dia da preparação e acondicionamento dos mosquitos na incubadora foi excluído das análises, para minimizar o registro de uma atividade relacionada ao estresse dos mosquitos. Todos os mosquitos que permaneceram vivos até o quarto dia de experimento (**machos, fêmeas virgens e fêmeas inseminadas naturalmente de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus***) ou até o terceiro dia de experimento (**fêmeas de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* injetadas com AG**) foram consideradas para análise estatística, avaliando:

- (1) a média de atividade total, isto é, a média de todos os dias de experimento;
- (2) a média diurna, isto é, a média das fases claras dos dias de experimento;
- (3) a média noturna, isto é, a média das fases escuras dos dias de experimento;
- (4) a média diurna sem light-on, representando a média das fases claras sem os picos de acender das luzes;
- (5) a média noturna sem light-off, representando a média das fases escuras sem os picos do apagar das luzes;
- (6) a média do acender das luzes;
- (7) a média do apagar das luzes.

4.1. ATIVIDADE LOCOMOTORA DE MACHOS DE *Ae. aegypti* E *Ae. albopictus* PROVENIENTES DE OVOS COLETADOS NO OUTONO E NA PRIMAVERA

Para avaliarmos a atividade locomotora de **machos de *Ae. aegypti*** foram realizados dois experimentos no **outono** com N total de 48 mosquitos e dois experimentos na **primavera** com N total de 13 mosquitos. Observamos nos mosquitos de ambas as estações atividade diurna predominante e um padrão bimodal nos quatro dias do experimento da atividade locomotora, sendo o primeiro pico no início de todas as fases claras e o segundo após a metade de todas as fases claras. No entanto, os machos do outono apresentaram mais atividade diurna, bem como picos de apagar e acender das luzes mais acentuados quando comparados com os machos da primavera, que apresentaram menor atividade e picos com menos amplitude nos quatro dias de experimento. A média de atividade total dos machos do outono e primavera demonstrou diferença significativa ($t=5,1027$ $p=0,0001$), assim como as demais médias testadas, que também foram significativamente diferentes, exceto a média de light-off ($t=1,8661$ $p=0,0707$) (**Figura 9**).

Para avaliarmos a atividade locomotora de **machos de *Ae. albopictus*** foram realizados dois experimentos no **outono** com N total de 30 mosquitos e três experimentos na **primavera** com N total de 45 mosquitos. A atividade de *Ae. albopictus* em ambas as estações foi diurna e bimodal, com o primeiro pico logo após o acender das luzes e o segundo pico pouco antes do apagar das luzes nos quatro dias de experimento. Os machos da primavera apresentaram os picos ao início de todas as fases claras mais marcados que os machos do outono, com a média de light-on apresentando diferença significativa entre eles ($t=-2,5853$ $p=0,0135$) em todos os dias do experimento. Os picos antes do início do apagar das luzes também foram maiores nos machos da primavera do que nos machos do outono, exceto no primeiro dia, porém sem diferença significativa ($t=-1,8995$ $p=0,063$) (**Figura 10**).

Figura 9 - Atividade locomotora de machos de *Ae. aegypti* de ovos coletados no outono (azul) e de ovos coletados na primavera (vermelho). Linhas tracejadas correspondem ao erro padrão.

Figura 10 - Atividade locomotora de machos de *Ae. albopictus* de ovos coletados no outono (azul) e de ovos coletados na primavera (vermelho). Linhas tracejadas correspondem ao erro padrão.

4.2. ATIVIDADE LOCOMOTORA DE FÊMEAS VIRGENS E FÊMEAS INSEMINADAS NATURALMENTE DE *Ae. aegypti* E *Ae. albopictus* COLETADAS NO OUTONO E NA PRIMAVERA

Para compararmos a atividade locomotora de **fêmeas de *Ae. aegypti* virgens** e **fêmeas inseminadas naturalmente** provenientes de ovos coletados no **outono** foram realizados três experimentos com N total de 58 mosquitos para as **fêmeas virgens** e dois experimentos com N total de 52 mosquitos para as **fêmeas inseminadas**. Em ambas as fêmeas a atividade diurna foi predominante, com aumento ocorrendo após a metade da fase clara nos quatro dias de experimento, porém, as **fêmeas virgens** demonstraram padrão bimodal, com o primeiro e segundo picos bem marcados logo após o acender das luzes, e o apagar das luzes. A atividade das **fêmeas inseminadas** no primeiro pico foi pouco pronunciada com aumento após a metade das fases claras, e o segundo pico no apagar das luzes foi bem marcado nos quatro dias de experimento. A média total entre as fêmeas virgens e inseminadas demonstrou diferença significativa ($t=5,422$ $p=0,0001$). A média noturna ($t=0,14359$ $p=0,8911$) e noturna sem light off ($t=0,78613$ $p=0,4507$) de ambas não demonstraram diferença significativa. As demais médias testadas para as fêmeas foram significativamente diferentes (**Figura 11**).

Para avaliarmos a atividade locomotora de **fêmeas de *Ae. aegypti* virgens** e **fêmeas inseminadas naturalmente** provenientes de ovos coletados na **primavera** foram realizados três experimentos com N total de 51 mosquitos para as **fêmeas virgens** e dois experimentos com N total de 35 mosquitos para as **fêmeas inseminadas**. Em ambas as fêmeas a atividade foi predominantemente diurna e com aumento após a metade das fases claras nos quatro dias de experimento. As **fêmeas virgens** apresentaram um padrão de atividade bimodal, com o primeiro e segundo picos bem marcados logo após o acender e o apagar das luzes, similarmente ao observado no outono. Já as **fêmeas inseminadas** demonstraram padrão levemente bimodal exceto no terceiro dia, que no acender das luzes apresentaram picos pouco pronunciados e no apagar das luzes mais marcados. Assim como observado nas fêmeas do outono, a atividade das fêmeas virgens da primavera também foi mais acentuada do que a das fêmeas inseminadas em todos os dias de experimento,

É possível perceber que a atividade das fêmeas virgens foi maior do que a das fêmeas inseminadas, havendo diferença significativa na média total ($t=4,7364$

$p=0,0001$), assim como para todas as demais médias testadas, exceto pela média de light-off em todos os dias de experimento ($t=-0,7859$ $p=0,4361$) (**Figura 12**).

Figura 11 - Atividade locomotora de fêmeas de *Ae. aegypti* virgens (azul) e inseminadas (vermelho) de ovos coletados durante o outono. Linhas tracejadas correspondem ao erro padrão.

Figura 12 - Atividade locomotora de fêmeas de *Ae. aegypti* virgens (azul) e inseminadas (vermelho) de ovos coletados durante a primavera. Linhas tracejadas correspondem ao erro padrão.

Para a comparação da atividade locomotora de **fêmeas virgens** e **fêmeas inseminadas naturalmente de *Ae. albopictus*** no **outono**, foram realizados dois experimentos para as **fêmeas virgens**, com N total de 42 mosquitos, e apenas um experimento para as **fêmeas inseminadas**, com N total de 24 mosquitos. Fêmeas virgens e inseminadas de *Ae. albopictus* apresentaram padrão de atividade bimodal, com o primeiro pico menos marcado no acender das luzes e o segundo pico bem acentuado no apagar das luzes nos quatro dias de experimento. A atividade foi diurna e, apesar das fêmeas virgens terem apresentado mais atividade do que as fêmeas inseminadas, nenhuma média testada apresentou diferença significativa em todos os dias de experimento (**Figura 13**).

Para a comparação da atividade locomotora de **fêmeas virgens** e **fêmeas inseminadas naturalmente de *Ae. albopictus*** na **primavera**, foram realizados três experimentos tanto para as **fêmeas virgens**, com N total de 47 mosquitos, quanto para as **fêmeas inseminadas**, com N total de 59 mosquitos. Ambas as fêmeas apresentaram atividade diurna, com aumento gradual pouco antes do término da fase clara, e

Similarmente ao observado no outono tanto as fêmeas virgens quanto as inseminadas mostraram padrão bimodal de atividade, com o primeiro pico menor no acender das luzes, e um segundo pico maior no apagar das luzes em todos os dias de experimento. Para as análises estatísticas, a única média que apresentou diferença significativa para a atividade de ambos os grupos de fêmeas foi a de light-on ($t=2,1836$ $p=0,0318$). As demais médias testadas não apresentaram diferença significativa na atividade entre fêmeas virgens e inseminadas (**Figura 14**).

Figura 13 - Atividade locomotora de fêmeas de *Ae. albopictus* virgens (azul) e inseminadas (vermelho) de ovos coletados durante o outono. Linhas tracejadas correspondem ao erro padrão.

Figura 14 - Atividade locomotora de fêmeas de *Ae. albopictus* virgens (azul) e inseminadas (vermelho) de ovos coletados durante a primavera. Linhas tracejadas correspondem ao erro padrão.

4.3. ATIVIDADE LOCOMOTORA DE FÊMEAS DE *Ae. aegypti* E *Ae. albopictus* INJETADAS COM SALINA E AG DE MACHOS COESPECÍFICOS E HETEROESPECÍFICOS

Para a atividade locomotora das **fêmeas de *Ae. aegypti* injetadas com salina, AG de machos coespecíficos e AG de machos heteroespecíficos** foram realizados dois experimentos, com um N total de 28 mosquitos para as **fêmeas injetadas com salina**, enquanto que para as **fêmeas injetadas com AG de machos coespecíficos**, o N total foi de 31 e para as **fêmeas injetadas com AG de machos heteroespecíficos**, o N total foi de 17.

Observamos um padrão bimodal para as fêmeas de *Ae. aegypti* injetadas com salina, com o primeiro pico no acender das luzes e o segundo pico bem marcados pouco antes do início da fase escura. Já nas fêmeas injetadas com AG de machos coespecíficos e heteroespecíficos, observamos um padrão unimodal predominante, com pico bem marcado no apagar das luzes, sendo ainda maior nas fêmeas injetadas

com AG de machos heteroespecíficos. A atividade das fêmeas em todos os estágios fisiológicos foi marcadamente diurna, no entanto a atividade diurna das fêmeas com salina foi mais acentuada do que nas fêmeas com AG. A média de atividade total dos três grupos de fêmeas não apresentou diferença significativa ($F=1,398$ $p=0,2536$), no entanto houve diferença significativa nas médias diurna ($F=5,28$ $p=0,007217$), média de light off ($F=8,326$ $p=0,000553$) e na média diurna sem light on ($F=5,193$ $p=0,007784$) (**Figura 15**).

Para a atividade locomotora das **fêmeas de *Ae. albopictus* injetadas com salina, AG de machos coespecíficos e AG de machos heteroespecíficos** foram realizados dois experimentos, com N total de 26 mosquitos para **fêmeas injetadas com salina** e N total de 27 mosquitos tanto para as **fêmeas injetadas com AG de machos coespecíficos e heteroespecíficas**.

Observamos que a movimentação das fêmeas de *A. albopictus* com salina e com AG de machos co e heteroespecíficos apresentaram padrão bimodal, com o primeiro pico pouco marcado ao acender das luzes e o segundo pico bem marcado no apagar das luzes. Não foram observadas diferenças significativas para a média noturna ($F=2,473$ $p=0,09098$), bem como para nenhuma das demais médias testadas nas fêmeas dos três estados fisiológicos. Também não foi observada uma diferença significativa entre a atividade das fêmeas injetadas com AG co e heteroespecíficas ($t=-2,0066$, $p=0,0526$) (**Figura 16**).

Figura 15 - Atividade locomotora de fêmeas de *Ae. aegypti* injetadas com salina (laranja), com AG de machos coespecíficos (vermelho) e heteroespecíficos (azul). Linhas tracejadas representam ao erro padrão.

Figura 16 - Atividade locomotora de fêmeas de *Ae. albopictus* injetadas com salina (laranja), com AG de machos coespecíficos (azul) e heteroespecíficos (vermelho). Linhas tracejadas representam ao erro padrão.

4.4. TAXA DE INSEMINAÇÃO DE FÊMEAS VIRGENS DE *Ae. aegypti* E DE *Ae. albopictus* INJETADAS COM AG E POSTERIORMENTE EXPOSTAS A SEUS MACHOS COESPECÍFICOS.

A **Tabela** mostra a taxa de inseminação das fêmeas de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* injetadas intratoracicamente com salina, AG de machos coespecíficos e heteroespecíficos que sobreviveram até o fim dos três dias de experimento de atividade locomotora e então foram expostas a seus machos coespecíficos. Após o período de cópula (72 h) todas as fêmeas foram dissecadas e as espermatecas analisadas, para verificarmos se houve inseminação, pela presença de espermatozoides. Os dados apresentados são referentes aos dois experimentos de injeção realizados citados no item 4.3.

Em *Ae. albopictus*, das onze fêmeas injetadas com salina, cinco (45,5%) foram inseminadas. Já para as fêmeas injetadas com AG de machos coespecíficos, das 18 fêmeas expostas, nenhuma foi inseminada (0%), enquanto para as fêmeas injetadas com AG de machos heteroespecíficos, de 14 fêmeas expostas, oito (57%) foram inseminadas. Para *Ae. aegypti*, das nove fêmeas injetadas com salina, cinco (55,5%) foram inseminadas. Já para as fêmeas injetadas com AG de machos coespecíficos, das 23 expostas, nenhuma foi inseminada (0%), enquanto para as fêmeas injetadas com AG de machos heteroespecíficos, das nove expostas, nenhuma foi inseminada (0%).

Tabela - Taxa de inseminação de fêmeas de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* após exposição a machos coespecíficos

	<i>Aedes aegypti</i>			<i>Aedes albopictus</i>		
	Salina (controle)	AG de ♂ de <i>Ae. aegypti</i>	AG de ♂ <i>Ae.</i> <i>albopictus</i>	Salina (controle)	AG de ♂ <i>Ae.</i> <i>albopictus</i>	AG de ♂ <i>Ae.</i> <i>aegypti</i>
Fêmeas inseminadas (%)	5 (55,5)	0	0	5 (45,5)	0	8 (57)
Fêmeas não inseminadas (%)	4 (44,5)	23	9	6 (54,5)	18	6 (43)
Total de fêmeas dissecadas	9	23	9	11	18	14

5. DISCUSSÃO

Em nosso estudo, observamos que a atividade locomotora de machos, fêmeas virgens e fêmeas inseminadas naturalmente de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*, oriundos de ovos coletados na primavera e no outono no Parque Piqueri apresentaram padrão de atividade diurno, com aumento evidente após a metade da fase clara nos quatro dias de experimento, sob CE 12:12 e a 25°C.

TRPIS e col. (1973), ao estudar a atividade de pouso de fêmeas de *Ae. aegypti* em hospedeiros humanos na Tanzânia (África) durante os meses de abril a junho, perceberam a presença de machos no local, possivelmente atraídos pela presença das fêmeas, e verificaram no decorrer do experimento que tanto as fêmeas quanto os machos demonstraram padrão bimodal de atividade, com picos ao início da manhã e ao fim da tarde. Este mesmo padrão bimodal com picos no início e após a metade da fase clara, antes do início da fase escura foi observado em nosso estudo pelos ***Ae. aegypti* machos**. O baixo número de machos de *Ae. aegypti* analisados na primavera pode explicar a maior atividade dos machos de *Ae. aegypti* no outono.

ALMEIDA e col. (2005), ao estudarem em campo o comportamento de machos e fêmeas de *Ae. albopictus* em Macau (China) verificaram que os mosquitos apresentaram na atividade de voo um padrão bimodal, com picos no início da manhã e no fim da tarde, observando também atividade diurna presente, porém, pouco marcada. Em nossos resultados constatamos similaridade do padrão bimodal na atividade dos ***Ae. albopictus* machos**, com picos no início da fase clara e antes do início da fase escura de ambas as estações de estudo.

Quanto as **Fêmeas virgens de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*** estas mostraram atividade locomotora diurna e bimodal, com picos após o acender e o apagar das luzes em todos os experimentos do outono e primavera. MCCLELLAND (1959) observou em *Ae. aegypti* de campo em Uganda (África) que na atividade entre 16:30 h e 17:50 h havia um pico mais intenso, que foi associado ao comportamento de cópula. Em nosso estudo também pudemos observar um aumento na atividade diurna nas **fêmeas virgens de *Ae. aegypti*** após a metade da fase clara. GENTILE e col. (2006), analisando a atividade locomotora de *Ae. aegypti* em CE 12:12 verificaram uma atividade essencialmente bimodal, com movimentação diurna elevada, principalmente no período que corresponderia ao entardecer. Este mesmo padrão bimodal, com

aumento da atividade diurna, após a metade da fase clara, em experimento feito com machos e fêmeas virgens de *Ae. aegypti* provenientes de colônias de laboratório foi estudado por TAYLOR e JONES (1969) e posteriormente confirmado por JONES (1981).

HAWLEY (1988) descreve a atividade de *Ae. albopictus* de campo em países asiáticos como bimodal, com picos ao início da manhã e ao fim da tarde, descrevendo um comportamento diurno mais evidente que noturno. Nossas **fêmeas de *Ae. albopictus* virgens e inseminadas naturalmente** coletadas em ambas as estações mostraram atividade com padrão bimodal, porém com picos menos marcados ao início da fase clara mas com picos bem marcados ao início da fase escura. Padrão este observado por DELATTE e col. (2010) em pesquisas da atividade de voo na busca por hospedeiros e alimentação sanguínea em fêmeas de *Ae. albopictus* de populações da Ilha La Reunion (França). Diferente de MARQUES e GOMES (1997) que encontraram padrão trimodal ao avaliarem a atividade de picada de fêmeas de *Ae. albopictus* em hospedeiros humanos na região do Vale do Paraíba, SP, (Brasil), mesmo as fêmeas apresentando comportamento diurno predominante. Também observamos atividade diurna presente tanto nas fêmeas virgens quanto nas inseminadas de *Ae. albopictus*.

Fêmeas inseminadas naturalmente de *Ae. aegypti* apresentaram atividade locomotora reduzida quando comparadas as fêmeas virgens nos experimentos realizados no outono e primavera. Resultados semelhantes foram apresentados por JONES (1981) e LIMA-CAMARA e col. (2014) em colônias de *Ae. aegypti*. O mesmo se aplicou as fêmeas de *Ae. albopictus* inseminadas (LIMA-CAMARA e col., 2014) assim como em outras espécies de mosquitos, como descrito por JONES e GUBBINS (1978) em *Anopheles gambiae* e por ROWLAND e col. (1989) em *Anopheles stephensi*.

No entanto, as **fêmeas de *Ae. albopictus* inseminadas naturalmente** coletadas no parque Piqueri em ambas as estações não apresentaram atividade reduzida significativa quando comparadas as fêmeas virgens.

As **fêmeas de *Ae. aegypti* injetadas com AG de machos coespecíficos e heteroespecíficos** mostraram uma redução na atividade locomotora durante a fase diurna quando comparadas com as fêmeas injetadas com salina. Essa observação foi

corroborada por LIMA-CAMARA e col. (2013) em *Ae. aegypti* de colônia onde houve redução na atividade diurna de fêmeas, com picos de atividade no acender e no apagar das luzes.

A redução na atividade de fêmeas inseminadas de *Ae aegypti* foi observada por KLOWDEN (1999), que relacionou o fato a substâncias presentes nas AG dos machos que, uma vez sendo transferidas para as fêmeas durante a inseminação, seriam responsáveis por inibir alguns comportamentos como o de oviposição, pré oviposição e busca por hospedeiro. De acordo com SIROT (2010), as AG de *Ae aegypti* apresentam substâncias específicas que não foram identificadas nas AG dos machos de outros dípteros, o que poderia causar uma redução mais acentuada no padrão de atividade das fêmeas. Ainda são necessários mais estudos para saber se isso ocorre nas AG de *Ae. albopictus* também.

Realizados pela primeira vez experimentos com **fêmeas de *Ae. albopictus* injetadas com AG de machos co e heteroespecíficos** e com salina verificamos uma atividade diurna e bimodal, com picos pouco marcados ao acender das luzes e picos bem marcados ao apagar das luzes, entretanto, não houve diferenças estatisticamente significantes entre as médias (total, diurna, noturna, diurna sem lighth-on, noturna sem lighth-off, lighth-on e lighth-off), podendo inferir que o extrato de AG dos machos co e heteroespecíficos não alterou a atividade locomotora das fêmeas de *Ae. albopictus* quando comparadas entre si, e nem quando comparadas com as fêmeas injetadas com salina, sendo assim, na ocorrência de cópula heteroespecífica na natureza, as fêmeas não mostrariam comportamento na atividade locomotora diferente do de fêmeas copuladas coespecificamente. Esse resultado foi semelhante ao observado em fêmeas de *Ae. albopictus* inseminadas naturalmente.

Evidenciando que a redução de atividade locomotora, característica nas fêmeas de *Ae. aegypti* inseminadas co e heteroespecificamente, não foi observada nas fêmeas de *Ae. albopictus* inseminadas co e heteroespecificamente, sugerindo que as substâncias presentes nas AG dos machos não causaram os mesmos efeitos observados em fêmeas de *Ae. aegypti*.

Para a avaliação da taxa de inseminação das fêmeas de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* expostas a seus machos coespecíficos, após o experimento da atividade locomotora das fêmeas injetadas com salina e AG co e heteroespecíficas, observamos

que em ambas as espécies, as fêmeas injetadas com salina resultou em cinco inseminadas/espécie, confirmadas pela positividade de espermatozoides nas espermatecas dissecadas. As fêmeas de *Ae. aegypti* injetadas com AG coespecíficas e AG heteroespecíficas não foram inseminadas após exposição aos machos. As fêmeas de *Ae. albopictus* injetadas com AG coespecíficas não foram inseminadas depois da exposição e as injetadas com AG heteroespecíficas apresentaram 57% (8) inseminadas de um total de 14.

LIMA-CAMARA e col. (2013) observaram que a maioria das fêmeas de *Ae. aegypti* com salina também foram inseminadas após exposição com machos coespecíficos (84%), já as fêmeas injetadas com AG co e heteroespecíficas se mostraram refratárias (100%) a posterior inseminação para AG de machos coespecíficos e (97,3%) para AG de machos heteroespecíficos, o que foi semelhante ao observado em nosso estudo, no entanto, a porcentagem de fêmeas com salina inseminadas verificada por nós foi inferior, possivelmente pelo baixo N amostral que obtivemos para esse experimento.

CRAIG JR. (1967) observou que fêmeas de *Ae. aegypti* inoculadas com AG de machos coespecíficos se mostraram refratárias à inseminação subsequente coespecífica, propondo deste modo que as AG dos machos possuem alguma ação inibidora, devido a presença de substâncias como proteínas ou peptídeos. NASCI e col. (1989) relataram que machos de *Ae. albopictus* foram muito eficientes ao inseminar naturalmente fêmeas de *Ae. aegypti* provocando uma esterilização considerável destas fêmeas, visto que a ocorrência de inseminação cruzada de uma população simpátrica contribuiu ao declínio da população de *Ae. aegypti* na região de Los Angeles (EUA). BARGIELOWSKI e col. (2013) verificaram com mosquitos de laboratório que as fêmeas de *Ae. aegypti* se mostraram mais receptivas a cópulas com machos heteroespecíficos do que as fêmeas de *Ae. albopictus*. TRIPET e col. (2011) injetaram AG de *Ae. albopictus* em fêmeas de *Ae. aegypti* verificando que a maior parte das fêmeas não foi inseminada após exposição com machos coespecíficos, bem como injetaram AG de *Ae. aegypti* em fêmeas de *Ae. albopictus* não houve cópula posterior com machos coespecíficos provenientes de ovos coletados em campo, na Florida (USA). Ao contrário de nossos resultados onde encontramos positividade da taxa de inseminação em fêmeas de *Ae. albopictus* (57%). CARRASQUILLA e LOUNIBOUS (2015) observaram que fêmeas de *Ae. aegypti* confinadas em gaiolas

com machos de *Ae. albopictus* após cópula se mostraram refratárias aos machos coespecíficos, mesmo quando o espermatozoides dos machos heteroespecíficos não foram detectado em suas espermatecas. Essa observação foi constatada também em nosso experimento, uma vez que as fêmeas de *Ae. aegypti* injetadas com AG heteroespecíficas e posteriormente expostas a machos coespecíficos também apresentaram espermatecas vazias.

Foi verificado por NAZNI e col. (2009) que as fêmeas de *Ae. aegypti* que copularam com machos heteroespecíficos geraram maior número de ovos que fêmeas de *Ae. albopictus* que copularam com machos heteroespecíficos, apesar da inseminação nas fêmeas de *Ae. aegypti* os ovos resultantes se mostraram inviáveis, confirmando a esterilização das fêmeas. Em nosso experimento, não avaliamos oviposição, porém, em *Ae. aegypti* fêmeas injetadas com AG de machos heteroespecíficos apresentaram as espermatecas vazias mesmo após exposição a machos coespecíficos, o que também caracteriza a ocorrência de esterilização.

SHUTT e col. (2010) relataram que fêmeas de *Anopheles* injetadas com AG de machos coespecíficos também foram refratárias a cópula com machos coespecíficos.

BARGIELOWSKI e col. (2013) estudaram população de campo simpátrica há 20 anos, na Florida (USA), de *Aedes aegypti* e *Ae. albopictus* nas quais confinaram fêmeas de *Aedes aegypti* em gaiolas com machos heteroespecíficos, que apesar de serem susceptíveis a cópula as gerações futuras destas fêmeas foram se tornando cada vez menos susceptíveis a cópulas heteroespecíficas. Já em populações da Florida e Arizona não simpátricas fêmeas de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*, quando expostas a machos heteroespecíficos em gaiolas se mostraram susceptíveis a cópula e porém ao passar de poucas gerações, verificaram que as fêmeas passaram a ser menos susceptíveis aos machos heteroespecíficos (BARGIELOWSKI e col. 2014). Resultado semelhante já havia sido observado anteriormente por HARPER e PAULSON (1994), ao relatarem resistência de fêmeas de *Ae. aegypti* a cópula heteroespecífica com *Ae. albopictus* de colônias. Todos esses resultados apontam a ocorrência de uma possível adaptação nos indivíduos a cada geração, a fim de minimizar a incidência de cópulas cruzadas nas populações onde as espécies ocorrem em simpatria.

GUBLER (1970) observou que fêmeas de *Ae. polynesiensis* isoladas em gaiolas com machos de *Ae. albopictus*, ambos provenientes de colônias, realizaram

cópula, porém com ovos inviáveis, o que indica que além de *Ae. aegypti*, fêmeas de outra espécie de mosquito são esterilizadas após cópula heteroespecífica com machos de *Ae. albopictus*.

Contradizendo os casos de inseminação heteroespecífica, onde as fêmeas tenham se mostrado inférteis em boa parte dos experimentos BONNET (1950) mostrou que fêmeas de *Ae. aegypti* confinadas em gaiolas com machos de *Ae. albopictus* produziram ovos férteis, gerando imaturos e adultos morfologicamente idênticos a *Ae. aegypti* em um experimento realizado no Havaí (USA). Devido a época em que o experimento foi conduzido, não foi possível a realização de testes moleculares nos exemplares. YANISLEY e col. (2014) realizaram cópula cruzada entre fêmeas de *Ae. aegypti*, obtidas de colônias do Instituto de Medicina Tropical Pedro Kouri (Cuba), com machos de *Ae. albopictus* de campo (F1), e observaram que os ovos resultantes eram viáveis, originando mosquitos adultos também muito semelhantes morfologicamente a *Ae. aegypti*. Esses estudos mostraram que em certas populações onde as espécies ocorram em simpatria, no caso de cópula heteroespecífica entre fêmeas de *Ae. aegypti* com machos de *Ae. albopictus*, as fêmeas mesmo eventualmente se tornando refratárias a cópulas posteriores com machos coespecíficos, ainda sim, se forem inseminadas, podem gerar ovos férteis. Diante desta abordagem justificou-se a realização deste estudo, que teve por objetivo contribuir e ampliar o conhecimento da atividade locomotora, cópula cruzada e esterilização, para melhor compreender o comportamento de mosquitos vetores.

6. CONCLUSÕES

- Nos **machos de *Ae. aegypti*** o padrão da atividade locomotora foi diurno e bimodal **no outono** e na **primavera**, com a atividade **mais evidente no outono**.

- Nos **machos de *Ae. albopictus*** o padrão da atividade locomotora foi diurno e bimodal **no outono** e na **primavera**, com a atividade **mais evidente na primavera**.

- Nas **fêmeas de *Ae. aegypti* virgens e inseminadas naturalmente** a atividade locomotora foi diurna e bimodal no **outono**, com a atividade das **fêmeas virgens** mais marcada que das **fêmeas inseminadas**.

- Nas **fêmeas de *Ae. aegypti* virgens e inseminadas naturalmente** a atividade locomotora foi predominantemente diurna e bimodal na **primavera**, onde a atividade das **fêmeas virgens** foi mais marcada que das **fêmeas inseminadas**.

- Nas **fêmeas de *Ae. albopictus* virgens e inseminadas naturalmente** a atividade foi diurna e bimodal, com picos de atividade mais marcados ao apagar das luzes no **outono** e na **primavera**.

- Nas **fêmeas de *Ae. aegypti* injetadas com salina e com AG de machos co e heteroespecíficos** a atividade locomotora foi predominantemente diurna, sendo que nas **fêmeas com salina** houve padrão bimodal e atividade mais marcada em relação as **fêmeas injetadas com AG de machos co e heteroespecíficos** que apresentaram padrão unimodal e atividade diurna menos marcada.

- Nas **fêmeas de *Ae. albopictus* injetadas com salina e com AG de machos co e heteroespecíficos** não houve diferença estatisticamente significante na atividade locomotora delas.

- A diminuição da atividade locomotora nas fêmeas de *Ae. aegypti* injetadas com AG de machos co e heteroespecíficos pôde significar uma possível interpretação de inseminação por parte desta fêmeas o que não ocorreu com as fêmeas de *Ae. albopictus*.

- Na **taxa de inseminação das fêmeas de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* injetadas com salina** houve inseminação em ambas após exposição aos machos coespecíficos.

- Na **taxa de inseminação das fêmeas injetadas com AG de machos co e heteroespecíficos e posteriormente expostas a cópula com seus machos coespecíficos:**

- fêmeas de *Ae. aegypti* injetadas com AG de machos co e heteroespecíficos foram refratárias a cópula com machos de *Ae. aegypti* (coespecíficos)
- fêmeas de *Ae. albopictus* injetadas com AG de *Ae. albopictus* foram refratárias a cópula com machos de *Ae. albopictus* (coespecíficos)
- fêmeas de *Ae. albopictus* injetadas com AG de *Ae aegypti* realizaram cópula com machos de *Ae. albopictus*

7. REFERÊNCIAS

- ALBERTS, B. e col. **Biologia molecular da célula**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 1396p.
- ALMEIDA, A. P. G. e col. Bioecology and vectorial capacity of *Aedes albopictus* (Diptera:Culicidae) in Macao, China, in relation to Dengue virus transmission. *J Med Entomol*, 42: 419-428, 2005.
- ALLADA, R.; CHUNG, B. Y. Circadian organization of behavior and physiology in *Drosophila*. *Annu Rev Physiol*, 72: 605-24, 2010.
- AMORETTY, P. R. e col. Uso de *Drosophila melanogaster* Como Modelo Para o Estudo do Relógio Circadiano em Insetos vetores. *AS&T Acta Scientiae & Technicae*, vol. 1:01, 2010.
- ATMOSOEDJONO, S. e col. Man – biting activity of *Aedes aegypti* in Djakarta, Indonesia. *Mosquito News*, 32:467-469, 1972.
- BARGIELOWSKI, I. E.; LOUNIBOS, L. P.; CARRASQUILLA, M. C. Evolution of resistance to satyrization through reproductive character displacement in populations of invasive dengue vectors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 110(8):2888–2892, 2013.
- BARGIELOWSKI, I. E.; LOUNIBOS, L. P. Rapid evolution of reduced receptivity to interspecific mating in the dengue vector *Aedes aegypti* in response to satyrization by invasive *Aedes albopictus*. *Evol. Ecol.*, 28:193–203, 2014.
- BARRETO, M. L.; TEIXEIRA, M. G. Dengue in Brazil: Epidemiological Situation and Contribution to a Research Agenda. *Estudos Avançados*, 22 (64), 2008, 2008.
- BARRETT, A. D.; Higgs, S. Yellow fever: a disease that has yet to be conquered. *Annu Rev Entomol*, 52:209–29, 2007.
- BESERRA, E. B. e col. Ciclo de vida de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera, Culicidae) em águas com diferentes características, 99(3): 281-285, 2009.
- BONNET, D. D. The hybridization of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Hawaii. *Proc Hawaii Entomol Soc*, 14:35, 1950.
- BRAGA, I. A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: Histórico do Controle no Brasil. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, 16(2): 113 – 118, 2007.

BRAKS, M. A. H. e col. L. P. Convergent habitat segregation of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in southeastern Brazil and Florida. J Med Entomol, 40: 785-794, 2003.

BRAKS, M. A. H. e col. Interspecific Competition between two invasive species of container mosquitoes, *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae), in Brazil. Ann Entomol Soc Am, 97: 130-139, 2004.

BRITO, M. e col. Primeiro Encontro de *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse) no Estado de São Paulo, Brasil. Rev Saúde Pública, 20(6):489, 1986.

BRITO, A.F. e col. First Detection of Natural infection of *Aedes aegypti* with Zika Virus in Brazil and throughout South America. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 111(10): 655-658, 2016,

CAMPOS, G. S.; BANDEIRA, A. C.; SARDI, S. I. Zika Vírus Outbreak, Bahia, Brazil. Emerging Infectious Diseases, Vol. 21, No. 10, 2015.

CARRASQUILLA, M. C.; LOUNIBOUS, L. P. Satyrization without evidence of successful insemination from interspecific mating between invasive mosquitoes, Biol. Lett. 11:20150527, 2015.

CASTRO, M.G. e col. Dengue virus detection by using reverse transcription-polymerase chain reaction in saliva and progeny of experimentally infected *Aedes albopictus* from Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz, 99: 809-814, 2004.

CERRI, D. Cap.; Felix, M.; Almeida, C. E.; Serra-Freire, N. M.; Costa, J. Livro Eletrônico: Insetos: Uma Aventura Pela Biodiversidade. 376p. 2010.

CHOUIN-CARNEIRO, T. e col. Differential Susceptibilities of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from the Americas to ZikaVirus. PLoS Negl Trop Dis vol.10, n. 3, 2016.

CIEVS/MG – Centro de Inf Estrat em Vigil em Saúde de Minas Gerais – Nota Téc. Mai/2015

CLEMENTS, A. N. Adult circadian rhythms. In: The biology of mosquitoes. V 2. Sensory reception and behaviour. UK: CABI publishing, p. 206-238, 1999.

CONSOLI, R. A. G. B.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. **Principais Mosquitos de Importância Sanitária no Brasil**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 228p. 1994.

CHRISTOPHERS, R. S. *Aedes aegypti* (L.) The Yellow Fever Mosquito. New York: Cambridge University Press, 1960.

CRAIG Jr, G. B. Mosquitoes: Female monogamy induced by male accessory gland substance. *Science*, 156: 1499–1500, 1967.

CUGOLA, F. R. e col. The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. *Nature*, 534(7606): 267-271, 2016.

DELATTE, H. e col. Blood-feeding behavior of *Aedes albopictus*, a vector of Chikungunya on La Réunion. *Vector borne Zoonotic disease*, 10: 249-258, 2010.

FAY, R. W.; PERRY, A. S. Laboratory studies of ovipositional preferences of *Aedes aegypti*. *Mosq. News*, 25: 276-81, 1965.

FAY, R. W.; Eliason, D. A. A preferred oviposition site as a surveillance method for *Aedes aegypti*. *Mosq. News*, 26: 531-5, 1966.

FAYE, O. Dupressoir A, Weidmann M, Ndiaye M, Sall AA 2008. One-step RT-PCR for detection of Zika virus. *J Clin Virol*. 43: 96-101, 2014.

FORATTINI, O. P. **Culicidologia Médica**. vol 1. Editora da Universidade de São Paulo, 547p. 1996a.

FORATTINI, O. P.; MARQUES, G. R. A. M. Nota sobre o encontro de *Aedes aegypti* em bromélias. *Rev Saude Publica*, 34: 543-544, 2000b.

FORATTINI, O. P. **Culicidologia Médica**. vol 2. Editora da Universidade de São Paulo, 860p. 2002c.

GENTILE, C. e col. Cloning and daily expression of the timeless gene in *Aedes aegypti* (Diptera:Culicidae). *Insect Biochem Mol Biol*, 36: 878-884, 2006.

GLASSER, C. M.; Gomes, A. C. Climate and the superimposed distribution of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* on infestation of São Paulo State, Brazil. *Rev Saúde Pública*, 36: 166-172, 2002.

- GUBLER, D. J. Induced sterility in *Aedes (Stegomyia) polynesiensis* marks by cross-inseminating with *Aedes (Stegomyia) albopictus* Skuse. *J Med Entomol*, 7: 65 – 70, 1970.
- HAWLEY, W. A. The biology of *Aedes albopictus*. *J Am Mosq Control Assoc*, 4 (Suppl. 1): 1-40, 1988.
- HARDIN, P. E. The circadian timekeeping system of *Drosophila*. Review. *Current Biology*, 15:R714-R722, 2005.
- HARPER, J. P.; PAULSON, S. L. Reproductive isolation between Florida strains of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *J Am Mosq Control Assoc*, 10 : 88-92, 1994.
- HAYES, E. B. Zika Virus Outside Africa. *Emerging Infectious Diseases*, 15 (9), 2009.
- HONÓRIO, N. A.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. Frequencia de larvas e pupas de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* em armadilhas, Brasil. *Rev Saúde Pública*, 35(4):385-91, 2001a.
- HONÓRIO, N. A.; Castro, M. G.; Barros, F. S.; Magalhães, M. A.; Sabroza, P. C. The spatial distribution of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in a transition zone, Rio de Janeiro, Brazil. *Cad Saude Publica*, 25: 1203-14, 2009b.
- HUANG, Y. M. Contributions to the mosquito fauna of Southeast Ásia. XVI. The subgenus *Stegomyia* of *Aedes* in Southeast Ásia. I – The scutellaris group of species. *Contributoins of the American Entomological Institute*, 9(1): 1-109, 1972.
- IBGE – Inst Brasileiro de Geografia e Estatística. 2016 Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/estadosat/perfil.php?sigla=sp>. Acessado em 19/05/2017.
- IOC - Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz 2010. Disponível em: <http://www.ioc.fiocruz.br/dengue/textos/sobreovirus.html> Acessado em: 12/05/2017.
- JONES, M. D. R.; GUBBINS, S. J. Changes in the circadian Flight Activity of the Mosquito *Anopheles gambiae* in Relation to Insemination, Feeding and oviposition. *Physiological Entomology*, 3,213-220, 1978.

JONES, M. D. R. The programming of circadian flight activity in relation to mating and the gonotrophic cycle in the mosquito *Aedes aegypti*. *Physiol Entomol*, 6: 307-313, 1981.

KLOWDEN, M. J. The check is in the male: male mosquitoes affect female physiology and behavior. *J Am Mosq Control Assoc*, 15: 213-220, 1999.

KYLE, J. L.; HARRIS, E. Global Spread and Persistence of Dengue. *An Review of Microb*, 62:71-92, 2008.

LIMA-CAMARA, T. N.; HONÓRIO, N. A.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. Frequencia e Distribuição Espacial de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) no Rio de Janeiro, Brasil. *Cadernos de Saúde Pública Rio de Janeiro*, 22(10):2079-2084, 2006a.

LIMA-CAMARA, T. N. e col. Sorgine, MHF; Peixoto, AA. Dengue Infection Increases the Locomotor Activity of *Aedes aegypti* Females. *Journal PLoSOne*, Vol. 6. 2011b.

LIMA-CAMARA T. N.; BRUNO, R. V.; PEIXOTO, A. A. Cap 10 - **Ritmos Biológicos em Insetos Vetores e seu Controle Molecular**. In: **Tópicos Avançados em Entomologia Molecular Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular**. INCT – EM – 2012c.

LIMA-CAMARA, T. N. Cap. 6 – **O Relógio Biológico e o Dengue**. In: Figueiró, R; **Saúde & Ambiente: Da Educação Ambiental à Ecologia das Doenças**. 1ª edição, 53p. 2012d.

LIMA-CAMARA, T. M. e col. Male accessory gland substances from *Aedes albopictus* affect the locomotor activity of *Aedes aegypti* females. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 108 (Supl. 1), 18-25, 2013e.

LIMA-CAMARA, T. M.; URBINATTI, P. R.; CHIARAVALLLOTI-NETO, F. Encontro de *Aedes aegypti* em criadouro natural de área urbana, São Paulo, SP, Brasil. *Rev Saúde Pública*, 50:3, 2016f.

MARQUES, C. C. A. e col. Estudo comparativo de eficácia de larvitampas e ovitampas para vigilância de vetores de dengue e febre amarela. *Revista de Saúde Pública*, 27: 237-241, 1993.

MARQUES, G. R.; GOMES, A. de C. Comportamento antropofílico de *Aedes albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae) na região do Vale do Paraíba, Sudeste do Brasil. *Rev Saúde Pública*, 31: 125-130, 1997.

MARQUES, M. D.; GOLOMBEK, D.; MORENO, C. Adaptação temporal. *In*. Marques N, Menna-Barreto L. Orgs. **Cronobiologia: princípios e aplicações**. São Paulo: EDUSP-Fiocruz, p. 45-84, 1997.

MCCLELLAND, G. A. H. Observations on the mosquito *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (L.) in East Africa, I. The biting cycle in an out - door population at Entebbe, Uganda. *Bull. Ent. Res.* 50:227-235, 1959.

MEIRELES-FILHO, A. C. A. e col. The biological clock of an hematophagous insect: locomotor activity rhythms, circadian expression and downregulation after a blood meal. *FEBS Lett*, 580: 2-8, 2006.

MILLER, B. R.; BALLINGER, M. E. *Aedes albopictus* mosquitoes introduced into Brazil: vector competence for yellow fever and dengue viruses. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 82: 476- 477, 1988.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, Fund Nac da Saúde. Dengue: aspectos epidemiológicos, diagnóstico e tratamento. Normas e Manuais Técnicos nº 176; 2002.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, Sec. Vigilância Saúde, Depto Vigilância Doenças Transmissíveis. Preparação e resposta à introdução do vírus Chikungunya no Brasil; 2014.

MOORE-EDE, M. C.; SULZMAN, F. M.; FULLER, C. A. The clocks that time us- Physiology of the circadian timing system. London: Harvard University Press, 1982.

MS/PORTAL DE SAÚDE. Boletim Epidemiológico: Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 19, 48, 2017.

MS/PORTAL SAÚDE FEBRE AMARELA. Disponível em: <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/marco/14/COES-FEBRE-AMARELA-INFORME-30.pdf>. Acesso em: 05/04/2017.

MUSSO, D. e col. Potential for Zika virus transmission through blood transfusion demonstrated during an outbreak in French Polynesia, November 2013 to February 4:14, 2014a.

MUSSO, D. Zika Vírus Transmission from French Polynesia to Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, 21:10, 2015b.

NASCI, R.; HARE, C.; WILLIS, F. Interspecific mating between Louisiana strain of *Ae. albopictus* and *Ae. aegypti* in the field and the laboratory. *J Am Mosq Control Assoc*, 5: 416-421, 1989.

NATAL, D. Bioecologia do *Aedes aegypti*. *Biológico*, 64(2): 205-207, 2002.

NAZNI, W. A. E col. Cross-mating between Malaysian strains of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in the laboratory. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 40: 40-46, 2009.

NIAMS. *Guillain-Barré Syndrome Fact Sheet* (2016) Disponível em: <https://www.ninds.nih.gov/Disorders/Patient-Caregiver-Education/Fact-Sheets/Guillain-Barr%C3%A9-Syndrome-Fact-Sheet> . Acesso em: 17/05/2017

NUNES, M. R. T. e col. Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil. *BMC Medicine*, 13:102, 2015.

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

OEHLER, E. e col. Zika virus infection complicated by Guillain-Barré syndrome – case report, French Polynesia, December 2013. *Euro Surveill*, 19(9), 2014.

OMS - Dengue y dengue grave (mayo 2015). Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/es/>. Acesso em 02/01/2016.

PAHO -Epidemiological Update Chikungunya, Acesso em 10/05/2016.

http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=25702+&Itemid=999999&lang=fr. Acesso em 20/02/2015.

PANCETTI, F. G. M. e col. Twenty-eight years of *Aedes albopictus* in Brazil: a rationale to maintain active entomological and epidemiological surveillance. Rev Soc Bras de Med Tropical, 48 (1): jan-fev, 2015.

PORTAL BRASIL 2016. Disponível em: <http://www.brasil.gov.br/saude/2016/01/saiba-mais-sobre-dengue-chikungunya-e-zika> Acesso em: 18/05/2017.

PORTAL DE SAÚDE 2014. European Centre for Disease Prevention and Control. Rapid risk assessment: Zika virus infection outbreak, French Polynesia 2014; Stockholm: ECDC.

PORTAL DE SAÚDE 2015. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/cidadao/principal/agencia-saude/21447-nota-sobre-o-registro-da-primeira-vacina> Acesso em: 03/01/2016.

POWERS, A. M.; LOGUE, C. H. Changing patterns of chikungunya virus: re-emergence of a zoonotic arbovirus. Journal of General Virology, 2007. 88(9), 2363-2377.

PMSP - PREFEITURA DE SÃO PAULO. Disponível em: http://www.prefeitura.sp.gov.br/cidade/secretarias/meio_ambiente/parques/regiao_leste/index.php?p=5761 Acesso em 24/02/2015.

RAFAEL, J. A. e col. **Insetos do Brasil**. vol 1. Editora olos, 810pp. 2012.

REITER, P.; AMADOR, M. A.; COLON, N. Enhancement of the CDC Ovitrap with Hay Infusions for Daily Monitoring of *Aedes aegypti* Populations. Journal of the American Mosquito Control Association, Vol. 7, No. 1. 1991a.

REITER, P. Oviposition, Dispersal and Survival in *Aedes aegypti*: Implications for the Efficacy of Control Strategies. Vector-Borne and Zoonotic Diseases, 2007b.

RODRIGUES, L. C.; Microcephaly and Zika Virus Infection. TheLancet, Vol. 387, 2016.

ROTENBERG, L.; MARQUES, N.; MENNA-BARRETO, L. Desenvolvimento da Cronobiologia. In: Marques N, Menna-Barreto L, orgs. Cronobiologia: princípios e aplicações. São Paulo: EDUSP-Fiocruz, p. 23-44, 1997.

ROWLAND, M. Changes in the circadian flight activity of the mosquito *Anopheles stephensi* associated with insemination, blood-feeding, oviposition and nocturnal light intensity. *Physiological Entomology*, 14, 77-84, 1989.

SANTANA, A. C. S. e col. Primeira Ocorrência de *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* (Skuse) no Estado de Sergipe. *Periodico Online EntomoBrasilis*, 7 (3): 227-229, 2014.

SANTOS, R. L. C. Atualização da distribuição de *Aedes albopictus* no Brasil (1997-2002). *Rev. Saúde Pública*, 37(5) : 671-673, 2003.

SAUNDERS, D. S. *Insect Clocks*. Amsterdam: Elsevier Science, 280pp. 2002.

SILVA, M.R.H. Distribuição espacial e sazonal de *Ae aegypti* e *Ae albopictus* no Parque Municipal do Piqueri, SP. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

SIROT, L. K. e col. Identity and transfer of male reproductive gland proteins of the dengue vector mosquito, *Aedes aegypti*: potential tools for control of female feeding and reproduction. *Insect Biochem Mol Biol*, 38: 176-189, 2008.

SHUTT, B. e col. Male accessory gland proteins induce female monogamy in anopheline mosquitoes. *Med. Vet. Entomol.*, 24: 91-94, 2010.

TAUIL, P. L. Urbanização e Ecologia do dengue. *Cad Saúde Púb Rio de Janeiro*, 17: 99-102, 2002.

TAUIL, P. L. **Critical aspects of yellow fever control in Brazil**. *Rev. Saúde Pública*, São Paulo, 44(3), 2010.

TRIPET, F. M. Competitive reduction by satyrization? Evidence for interspecific mating in nature and asymmetric reproductive competition between invasive mosquito vectors. *Am J Trop Med Hyg*, 85: 265-270, 2011.

TRPIS, M. e col. Diel periodicity in the landing of *Aedes aegypti* on man. *bulletin of the World Health Organization*, 48: 623-629, 1973.

VAREJÃO, J. B. M. e col. Criadouros de *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (Linnaeus, 1762) em bromélias nativas na cidade de Vitória, ES. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 38:238-240, 2005.

VEGA-RÚA, A. e col. High vector competence of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from American countries as a crucial factor of the spread of Chikungunya. *Journal of Virology American Society for Microbiology*, 88:6294-6306, 2014.

WEAVER, S. C. Arrival of Chikungunya Virus in the New World: Prospects for Spread and Impact on Public Health. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, vol. 8. 2014.

WHO – World Health Organization. Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control. 2nd edition. Geneva. 1997.

WHO - 2014. Dengue and Severe Dengue. Disponível:<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en>. Acessado em: 04/03/2015.

WHO - 2016. Yellow Fever. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs100/en/>. Acesso em: 12/02/2017.

WRBU – Mosquito Identification Resources. Disponível em: http://www.wrbu.org/mqID/mq_gnra.html. Acesso em: 10/07/2017.

YANISLEY, M. L. e col. Cruzamiento interespecífico entre *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* en el laboratorio. *Rev Cubana Med Trop*, 66(1) :148-151, 2014.

ZANLUCA, C. e col. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 110(4): 569-572, 2015.