

Rafaella Sayuri Ioshino

**Impactos da infecção pelos vírus
Dengue e Zika na reprodução de *Aedes
aegypti***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno – Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo

2018

Rafaella Sayuri Ioshino

**Impactos da infecção pelos vírus
Dengue e Zika na reprodução de *Aedes
aegypti***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Biologia da relação Patógeno – Hospedeiro.

Orientadora: Prof. Dra. Margareth de Lara Capurro Guimarães.

Co-orientador: André Luis da Costa da Silva

Versão original

São Paulo

2018

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Rafaella Sayuri Ioshino

Titulo da Dissertação/Tese: Impactos da infecção pelos vírus Dengue e Zika na reprodução de *Aedes aegypti*

Orientadora: Margareth de Lara Capurro Guimarães

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou o(a) candidato(a):

() **Aprovado(a)** () **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508-000
Comissão de Ética no Uso de Animais - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

Of. CEUA.114.16

São Paulo, 12 de dezembro de 2016.

Prezado(a) Professor(a),

Informo que o projeto intitulado "**Controle Alternativo de doenças transmitidas por mosquitos**", registrado sob o protocolo nº **187/2012** e aprovado em 03/12/2012 que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica, foi **prorrogado até 03/12/2020**.

Diante desta prorrogação e da declaração de que não houve alteração da metodologia e das técnicas descritas na licença inicial para o uso de animais, autorizo a inclusão das espécies e quantidades descritas abaixo para continuidade ao referido projeto:

Espécie	Linhagem	Sexo	Idade/Peso	Quantidade por ano
Camundongo	Balb-C	Fêmea/Macho	30 dias	1º: 500 2º: 500 3º: 500 4º: 500

Reitero que havendo alteração de metodologia e inserção de novos alunos ao projeto de pesquisa vinculado à referida licença a CEUA-ICB deverá ser informada.

Cordialmente,

Prof. Dr. **Anderson de Sá Nunes**
Coordenador - CEUA-ICB/USP

Prof.(a) Dr.(a) **Margareth de Lara Capurro-Guimarães**
Departamento de **Parasitologia**
Instituto de Ciências Biomédicas - USP

“Dedico este trabalho aos meus Pais Iwaho e Aparecida Ioshino, Irmãos Leonardo e Shody, meu Marido Norio e ao meu Filho que, com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida.”

AGRADECIMENTOS

Em uma noite quente de fevereiro de 2005, estávamos na cidade de Mogi das Cruzes – SP aproveitando o período de “férias”, quando o resultado do vestibular para Universidade Estadual de Maringá havia sido liberado. Fui eufórica atrás do meu nome na lista de aprovados e lá estava ele. Aprovada para o Curso de Ciências Biológicas. Naquele momento, me deu uma alegria imensa e sabia que a partir daquele dia eu teria a chance de aprofundar meus conhecimentos na matéria que tanto me fascinava: Biologia. Naquele dia, ao comunicar os meus pais, lembro como se fosse ontem, meu pai perguntou: “Mas você tem certeza que irá fazer Biologia, filha? Você só vai dar aula?”. E eu, ingênua, apenas respondi com muita felicidade e euforia: “Não pai! Vou dar aulas E serei uma Pesquisadora!”.

Meu pai sem entender muito bem o que faria uma Pesquisadora, apenas disse que ok e que estava feliz por mim!!

Iniciei a minha faculdade e no primeiro ano fui atrás de um estágio no Departamento de Parasitologia. Consegui uma bolsa de Iniciação Científica e nesse laboratório fiquei durante toda a graduação! Me sentia feliz e realizada! Adorava fazer os experimentos e participar dos Encontros Anuais de Iniciação Científica, onde eu conseguia apresentar um pôster e mostrar toda pesquisa que tinha feito durante o ano!

Ao final da graduação, enviei um e-mail para a Dra. Margareth perguntando se eu poderia conhecer o seu laboratório. Ela foi super gentil e me deu a oportunidade de conhecer e, em seguida, de iniciar um mestrado na Universidade de São Paulo! Na época, sentia que seria uma grande oportunidade de crescer na carreira e isso me ajudaria a ser a tão sonhada Pesquisadora!

Durante o mestrado, amadureci e aprendi muito, inclusive, comecei a aprender que as pessoas são difíceis e que as vezes não basta você ser bom ou muito bom, ou fazer uma ótima apresentação, porque outras coisas, que as vezes fogem do seu controle, estão envolvidas. E por isso, ao final do mestrado fiquei quase 1 ano parada, pensando se era realmente isso que queria para a minha vida.

Com o passar desse 1 ano, comecei a sentir falta de fazer um experimento. Depois, sentia um vazio / buraco dentro de mim e foi aí eu percebi que me faltava a Pesquisa! Pensei em tantas coisas para o projeto de Doutorado, tantos experimentos que eu poderia fazer para descobrir algo novo e contribuir com a comunidade científica, mas descobri que, muitas vezes, temos que remar a favor da maré.

Digo isso porque tive oportunidades INCRÍVEIS durante esses 4 anos de doutorado! Aprendi muito mais do que eu queria e almejava no início desse projeto. E isso só foi possível porque a **Dra. Margareth Capurro** me recebeu e deu a oportunidade de estar ali desde o início do meu mestrado! Por isso, a agradeço imensamente pela oportunidade de sentir o gosto do que é ser Pesquisadora e fazer Ciência dentro de uma das maiores Universidades do País. Muito Obrigada!

Mas ninguém cresce sozinho dentro de um laboratório. Durante a minha formação acadêmica, conheci uma pessoa MUITO Especial. Me ensinou a ter o pensamento científico, a traçar os desenhos experimentais (principalmente a fazer o controle do controle do controle), escrever um artigo científico e a me questionar sobre as hipóteses do trabalho. Por diversas vezes ele também puxou a minha orelha, principalmente no doutorado! Quantas vezes ficamos horas discutindo os resultados, de como montar os gráficos para um artigo, como resolver um problema experimental e quantas vezes, mesmo não concordando muito naquele momento, (e com as orelhas bem vermelhas) aceitei e vi que no final tinha sido o melhor caminho a ser tomado? Por tudo isso, hoje você é meu co-orientador, o preferido! Não porque é o único co-orientador, mas porque me ensinou a ser uma pessoa melhor, com ética e sabedoria para enfrentar e tomar as melhores decisões nos momento difíceis! Obrigada, **André Luis da Costa da Silva**! Todos sabem, mas não custa deixar registrado: você é um GRANDE AMIGO, um dos maiores presentes que ganhei com o meu sonho maluco!!

Além dos vários experimentos do doutorado, também tive a oportunidade de aprender a auxiliar os alunos de graduação. Por isso, agradeço com todo coração os meus alunos de iniciação científica **Larissa Tanaka** e **Carlos Eduardo Barbosa**! Juntos aprendemos a desenvolver o conhecimento científico e vocês me ensinaram que a ciência vai muito além

dos experimentos em um laboratório! Adorei sair da minha zona de conforto!
Muito Obrigada!

Durante o doutorado, eu trabalhei até que razoavelmente bastante, principalmente no último ano. Cada dia da semana era uma grande batalha e, por isso, os materiais de consumo (principalmente tubos e ponteiras) reduziam em quantidades avançadas! Porém, os materiais nunca faltavam quando os meus experimentos estavam acontecendo porque eu tinha um suporte técnico que permitia a execução dos experimentos. Além do suporte dentro do laboratório, ela foi a única pessoa que, no momento mais corrido e turbulento do doutorado, estendeu a mão e me ajudou no insetário com a manutenção dos mosquitos! **Ediane Saraiva**, eu nunca vou esquecer do que você fez por mim em 2016 e 2017! Sou extremamente AGRADECIDA pela sensibilidade e carinho que teve comigo quando eu estava passando por toda aquela turbulência! Obrigada por ter me dado o apoio e, acredite, ele foi essencial para que eu terminasse esse doutorado!

Além do Laboratório de Mosquitos Geneticamente Modificados, esse trabalho contou com a ajuda de outros Professores do Instituto que auxiliaram com esclarecimentos, discussões, suporte com equipamentos e reagentes, enfim! Se não fossem esses professores, esse projeto não teria acontecido. Obrigada Professores **Lincoln Suesdek, Gerhard Wunderlich, Carsten Wrenger, Paolo Zanotto, Edison Durigon, Danielle Leal e Danielle Bastos Araujo** pela grande colaboração!

Quando viramos adultos e começamos a trabalhar fora de casa, é muito comum você passar mais tempo com os colegas de trabalho do que com a sua própria família ou marido, caso ele não esteja na mesma área que você! E nesses quase 9 anos de USP eu conheci pessoas MARAVILHOSAS que quero carregar pro resto da vida. São Amigos para desabafar, rir, chorar as mágoas, sair para descontrair de vez em quando, aprender, ensinar, ajudar nos experimentos quando necessário ou apenas para trocar um abraço apertado pelo corredor. Alguns estão finalizando a pós, outros já estão trabalhando em outros lugares ou até mesmo estão em outros Estados ou Países, mas a amizade e o carinho que tenho por cada um ficou! Obrigada meus Amigos **André Cardoso, Ceres Maciel, Bianca Kojin, Danilo Carvalho, Caroline Louise Garcia Mendes, Alexandre Moura, Larissa Martins, Vivian**

Petersen, Michele Barros, Kelly Amorim, Carlos Felipe Filietáz, Michele Pedrosa, Marielton Cunha, Shahab Zaki Pour e Jiri Cerny, por tudo que fizeram por mim nesses anos USPianos! Amizade sempre!

Como disse anteriormente, ao ingressar no doutorado o meu objetivo era apenas adquirir mais conhecimentos e assim contribuir com o meio científico. Mas como tudo na vida de um adulto, nada são somente flores! Além de aprender muito sobre ciência, eu também tive a oportunidade de aprender sobre as pessoas. Infelizmente, aprendi da forma mais dolorida... mas aprendi! Nessa pós-graduação, descobri o verdadeiro sentido da frase “uma andorinha só não faz verão”.. porque quando se trabalha em equipe (as vezes uma equipe de 2 que tem o mesmo objetivo e força de vontade) tudo fica mais fácil; aprendi que os personagens / grupinhos maus das novelas brasileiras e mexicanas existem na vida real; aprendi que quem diz que é religioso não significa, necessariamente, ser uma pessoa boa e confirmei que o reconhecimento e o ato de valorizar as pessoas são atitudes importantíssimas para a saúde mental de qualquer indivíduo (isso vale até para os mosquitos!!!). Eu vi, também, que não sou perfeita (todos têm defeitos), mas isso não dá o direito a ninguém de me desrespeitar e maltratar, até porque o doutorado por si só já te machuca bastante!

Durante essa etapa turbulenta, eu só consegui superar e continuar a caminhada, porque tive pessoas muito boas por perto me dando conselhos! Além de alguns amigos (já citados acima), tive um GRANDE apoio do marido, **Norio Takara**. Pensem em um homem com a paciência oriental e multiplica por 1.000. Esse é o meu esposo que durante o “aprendizado humanóide”, escutou os meus desabaços, me deu conselhos, por meses secou as minhas lágrimas, por outras várias e várias vezes fez a janta pra mim e que junto comigo, concretizou os dois dias mais felizes da vida: o SIM no nosso casamento e o POSITIVO no exame de gravidez! Ao meu porto seguro, só tenho que dizer MUITO MUITO MUITO obrigada pelo esposo, marido, companheiro e amigo que é, Te amo!

Além do meu marido, outras pessoas que ajudaram indiretamente a superar essa fase, foram meus pais e irmãos. Quando a tristeza e vontade de abandonar tudo se fazia presente, pensei em tudo que meus pais já fizeram por mim. O quanto trabalharam para me dar estudos e o quanto acreditaram que

eu realmente deveria fazer pesquisa e dar aulas, porque era o que eu queria desde o princípio. Então fui forte porque era a minha única opção. Por isso, agradeço meus pais **Iwaho e Aparecida Ioshino** por acreditarem em mim e confiar que fazer Pesquisa também é bom. E os meus irmãos mais novos **Leonardo e Shody Ioshino**, agradeço por existirem e sempre me darem forças para continuar em frente, até porque eu sou a Netchan né?! Amo vocês!

E para finalizar de vez os meu Agradecimentos, eu acho que também tenho que agradecer a mim mesma. Por ter superado cada obstáculo de cabeça erguida, pela força que tirei não sei de onde para conseguir finalizar os experimentos, por voltar a confiar que eu posso, sim, muito mais do que ontem e por continuar acreditando que “a personalidade pode abrir muitas portas, mas é o caráter que as mantêm abertas”. Se o meu objetivo foi aprender mais sobre os mosquitos, hoje eu vejo que aprendi muito mais sobre as pessoas.

“Quanto mais nos elevamos, menores parecemos aos olhos daqueles que não sabem voar...”

Friedrich Nietzsche

RESUMO

IOSHINO, R. S. **Impactos da infecção pelos vírus Dengue e Zika na reprodução de *Aedes aegypti***. 2018. 162f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

É através da alimentação sanguínea que as fêmeas do mosquito *Aedes aegypti* adquirem e transmitem os vírus da Dengue (DENV) e Zika (ZIKV). Com base nessa característica, o objetivo deste trabalho foi compreender os impactos da infecção por DENV e ZIKV na reprodução do *Ae. aegypti*. Dentre as 3 linhagens analisadas (RED, ROCK e HIGGS), ROCK se mostrou mais susceptível com 90% de infectados no 14º dia após a alimentação sanguínea infectada para ambos os vírus. Ao analisar a taxa de fecundidade após se alimentarem com sangue contendo os vírus (1º ciclo gonotrófico - CG) e nos 2º e 3º CG consecutivos dessas fêmeas, observamos que os mosquitos infectados pelo ZIKV apresentam uma redução de fecundidade a partir do 2º CG (17,2 e 13%, respectivamente). Já nos mosquitos infectados pelo DENV essa redução só ocorreu no 3º CG (18,2% comparando com o grupo controle). Análises estatísticas mostraram que a redução foi significativa para os 2º e 3º CGs das fêmeas infectadas por ZIKV^{BR} e DENV-2, respectivamente. Estudos mostram que a redução da fecundidade ocorre devido a morte de células que compõem os ovários. Por isso, no presente estudo genes relacionados a morte celular por apoptose (IAP1, DRONC, CASP7 e CASP16) e autofagia (ATG4, ATG8 e ATG12) foram analisados quanto ao nível de expressão nos ovários 12 e 24 horas após a alimentação sanguínea (hpbm) infectada nos 3 CG consecutivos. Observamos que no 1º CG ocorre um aumento da expressão de todos os genes relacionados à apoptose e autofagia analisados. Em 12 hpbm do 2º CG, os ovários das fêmeas infectadas por ZIKV apresentam um aumento da expressão dos genes relacionados à apoptose e do gene ATG8 e, 24 hpbm, os genes apoptóticos diminuem sua expressão mas os genes ATG4 e ATG12 estão com seus níveis aumentados. Por outro lado, ovários das fêmeas infectadas por DENV-2 apresentaram um aumento do nível de expressão de todos os genes autofágicos e apoptóticos, exceto CASP16, no tempo de 24 hpbm. No 3º e último CG, todos os genes analisados demonstram uma expressão suprimida. Este estudo nos dá um indício de que a redução da fecundidade não está correlacionada à infecção dos ovários pelos DENV-2 e

ZIKV, mas sim pelas vias imunológicas ativadas durante as diferentes fases da infecção no mosquito que, por consequência, ativa a morte celular nos ovários. Neste estudo, também mostramos que os mosquitos machos que copulam com fêmeas infectadas podem adquirir e, posteriormente, transmitir o ZIKV para fêmeas saudáveis, ou seja, os machos assim como as fêmeas também desempenham um papel importante na epidemiologia do ZIKV.

Palavras-chave: *Aedes aegypti*. Reprodução. Transmissão venérea. Vírus da Dengue. Zika Vírus.

ABSTRACT

IOSHINO, R. S. **Impact of Dengue and Zika viruses on mosquito *Aedes aegypti* reproduction.** 2018. 162f. Tese (PhD in Science) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Through the blood meal that *Aedes aegypti* female mosquitoes acquire and transmit Dengue (DENV) and Zika (ZIKV) viruses. Based on these characteristics, the objective of this study was to understand the impact of DENV-2 and ZIKV^{BR} on the *Ae. aegypti* reproduction. Among the three laboratory strains analyzed (RED, ROCK and HIGGS), the ROCK strain was the most susceptible to ZIKV and DENV infection with 90% of infection rate at 14th day post infected blood meal for both infections. Analyzing the fecundity rate after the blood feeding containing the viruses (1st gonotrophic cycle – GC) and in the consecutive 2nd and 3rd GC, we noted that ZIKV-infected mosquitoes have a fertility reduction after the 2nd GC (17.2 and 13%, respectively). On the other hand, in DENV-infected mosquitoes the reduction just occurred on 3rd GC (18.2%, compared to control group). Studies show that fecundity reduction occurs by the ovaries cell death, so genes correlated with apoptosis (IAP1, DRONC, CASP7, CASP16) and autophagy (ATG4, ATG8 and ATG12) cell death genes expression level were analyzed at 12 and 24 hours post blood meal (hpbm) during the 3 consecutive GC on ovaries. Analysis showed that there is an expression-up-regulation of all cell death genes analyzed on the 1st GC. At 12 hpbm of 2nd GC, the ZIKV-infected ovaries also have a higher expression level in all apoptosis genes and ATG8 but all the apoptotic genes were down-regulated at 24 hpbm. In contrast, ATG4 and ATG12 were also up-regulated in this period. However, DENV-infected female ovaries showed higher expression levels of all autophagic and apoptotic genes, except CASP16 at 24 hpbm. In the 3rd and last GC, all of analyzed genes are down-regulated. This study provides an indication that fertility reduction is not correlated to DENV-2 and ZIKV ovaries infection, but rather by immunologic pathways that were activated during the different stages of mosquito infection, which consequently activates cell death in ovaries. In this study we also report that when males copulate with ZIKV-infected females, they can acquire and transmit the virus to healthy females, it means that males, as females, also play an important role in the epidemiology of ZIKV.

Keywords: *Aedes aegypti*. Reproduction. Venereal transmission. Dengue virus. Zika virus.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Mosquitos fêmeas da Ordem Diptera e Família Culicidae	29
Figura 2 – Ovários e ovaríolos de mosquitos <i>Aedes aegypti</i>	31
Figura 3 – Esquema do folículo ovárico primário	32
Figura 4 – Separador vertical das fases imaturas do mosquito <i>Ae. aegypti</i> ...	46
Figura 5 – Cabine de segurança utilizada para manipular os mosquitos infectados	48
Figura 6 – Caixa plástica para dupla contenção	49
Figura 7 – Placa de oviposição individual para fêmeas <i>Ae. aegypti</i>	51
Figura 8 – Esquema para obter o número de ovos depositados por fêmeas <i>Ae. aegypti</i> nos 3 ciclos gonotróficos	51
Figura 9 – Esquema para obter os ovários saudáveis e infectados das fêmeas de <i>Ae. aegypti</i> nos diferentes ciclos gonotróficos	53
Figura 10 – Esquema da metodologia utilizada para obter os machos de <i>Ae. aegypti</i> infectados com ZIKV ^{BR}	57
Figura 11 – Esquema para confirmar se fêmeas saudáveis podem se infectar com ZIKV ^{BR} após copular com machos infectados	59
Figura 12 – Número de ovos ovipostos por fêmeas de <i>Ae. aegypti</i> saudáveis ou infectadas por ZIKV ^{BR} e DENV-2	62
Figura 13 – Eletroforese em gel de agarose com produtos amplificados dos genes DREDD, DRONC, CASP7, CASP16, IAP1, ATG4A, ATG8 e ATG12 ..	63
Figura 14 – Nível de expressão relativa (delta-delta ct) dos genes relacionados a morte celular por apoptose no 1º CG	65
Figura 15 – Nível de expressão relativa (delta-delta ct) dos genes relacionados a morte celular por autofagia no 1º CG	66
Figura 16 – Nível de expressão relativa (delta-delta ct) dos genes relacionados a morte celular por apoptose no 2º CG	68
Figura 17 – Nível de expressão relativa (delta-delta ct) dos genes relacionados a morte celular por autofagia no 2º CG	69
Figura 18 – Nível de expressão relativa (delta-delta ct) dos genes relacionados a morte celular por apoptose no 3º CG	71
Figura 19 – Nível de expressão relativa (delta-delta ct) dos genes relacionados a morte celular por autofagia no 3º CG.....	72

Figura 20 – Envolvimento das caspases na ativação da autofagia em mosquitos *Ae. aegypti* após uma alimentação sanguínea 86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Sequências e características dos iniciadores para DENV e ZIKV..50	
Tabela 2 – Sequências dos iniciadores para amplificação do gene constitutivo RP49	54
Tabela 3 – Sequências dos iniciadores para amplificação do genes DRONC, CASP7, CASP16, IAP1, ATG4A, ATG8 e ATG12	55
Tabela 4 – Média do número de ovos e taxa de redução de fecundidade das fêmeas <i>Ae. aegypti</i> 3 ciclos	62
Tabela 5 – Cts (cycle threshold) dos RNAs de <i>Ae. aegypti</i> machos que copularam com as fêmeas 7 dpi (grupo A)	73
Tabela 6 – Cts (cycle threshold) dos RNAs de <i>Ae. aegypti</i> machos que copularam com as fêmeas 14 dpi (grupo B)	73
Tabela 7 – Cts (cycle threshold) dos RNAs de abômen de <i>Ae. aegypti</i> machos que copularam com as fêmeas 7 (grupo A) ou 14 dpi (grupo B)	74
Tabela 8 – Cts (cycle threshold) dos RNAs de <i>Ae. aegypti</i> fêmea que copularam com os machos infectados por fêmeas 7 dpi (grupo A)	75
Tabela 9 – Cts (cycle threshold) dos RNAs de <i>Ae. aegypti</i> fêmea que copularam com os machos infectados por fêmeas 14 dpi (grupo B)	76
Tabela 10 – Cts (cycle threshold) dos RNAs de abômen de <i>Ae. aegypti</i> fêmeas que copularam com as machos 7 (grupo A) ou 14 dpi (grupo B)	77

TABELAS SUPLEMENTARES

Tabela Suplementar 1 – Valores do Ct de cada amostra para o gene endógeno RPS7 nos ovários de fêmeas sadias e infectadas	106
Tabela Suplementar 2 – Valores do Ct de cada amostra para o gene IAP1 nos ovários de fêmeas sadias e infectadas	107
Tabela Suplementar 3 – Valores do Ct de cada amostra para o gene DRONC nos ovários de fêmeas sadias e infectadas	108
Tabela Suplementar 4 – Valores do Ct de cada amostra para o gene CASP7 nos ovários de fêmeas sadias e infectadas	109
Tabela Suplementar 5 – Valores do Ct de cada amostra para o gene CASP16 nos ovários de fêmeas sadias e infectadas	110
Tabela Suplementar 6 – Valores do Ct de cada amostra para o gene ATG4A nos ovários de fêmeas sadias e infectadas	111
Tabela Suplementar 7 – Valores do Ct de cada amostra para o gene ATG8 nos ovários de fêmeas sadias e infectadas	112
Tabela Suplementar 8 – Valores do Ct de cada amostra para o gene ATG12 nos ovários de fêmeas sadias e infectadas	113

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

20E: 20 – hidroxiecdisona

ATG: Autofagia

CASP: Caspase

cDNA: DNA complementar

CF: Células foliculares

CG: Ciclo gonotrófico

DENV: Dengue vírus

GS: Glândula Salivar

HIGGS: Higgs White Eyes

HPBM: Horas após uma alimentação sanguínea

IAP: Inibidor de apoptose

IM: Intestino médio

MOCK: Controle

OEH: Hormônio ecdisteroidogênico ovariano

PBS: Salina tamponada com fosfato

PCR: Reação em cadeia da polimerase

PPV: Proteínas precursoras de vitelo

qPCR: PCR quantitativo

RED: Rexville

ROCK: Rockefeller

ZIKV: Zika vírus

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	28
1.1 <i>Aedes aegypti</i>: linhagens Rexville, Rockefeller e Higgs white eyes ..	29
1.2 Reprodução dos mosquitos	31
1.3 Flavivírus Dengue e Zika	33
1.4 Morte celular programada em mosquitos infectados por diferentes patógenos	34
1.5 Infecção viral e sistema reprodutivo de <i>Ae. aegypti</i>	38
1.6 Considerações finais	40
2 OBJETIVOS	43
3 MATERIAIS E MÉTODOS	45
3.1 Animais	45
3.1.1 Mosquitos <i>Aedes aegypti</i>	45
3.2 Cultivo de células C6/36	46
3.2.1 Replicação do DENV-2 e ZIKV ^{BR}	47
3.2.2 Titulação viral	47
3.3 Infecção dos mosquitos com DENV-2 e ZIKV^{BR}	48
3.4 Susceptibilidade das linhagens de laboratório aos flavivírus DENV-2 e ZIKV^{BR}	49
3.5 Teste de fecundidade das fêmeas infectadas com DENV-2 ou ZIKV^{BR} em 3 ciclos gonotróficos consecutivos	50
3.5.1 Análises estatísticas da fecundidade nos 3 ciclos gonotróficos	52
3.6 Análise dos ovários	52
3.6.1 Dissecando os ovários	52
3.6.2 Extração do RNA total dos ovários	53
3.6.3 Tratamento do RNA total com a DNase I e síntese do cDNA	53
3.6.4 Análise dos genes	54
3.6.4.1 Teste dos iniciadores	54
3.6.4.2 Nível de expressão dos genes	55
3.6.4.2.1 Análises estatísticas dos níveis de expressão gênica nos ovários de <i>Ae. aegypti</i>	56
3.7 Transmissão sexual do ZIKV^{BR}	56
3.7.1 Infecção e análise dos mosquitos <i>Ae. aegypti</i> macho pelo ZIKV ^{BR}	56

3.7.2 Análise da presença de vírus infectivo nos machos	57
3.7.2.1 Preparo das amostras	57
3.7.2.2 Isolamento viral em cultivo celular	58
3.7.2.3 Extração do RNA total do tapete celular exposto aos abdomens dos machos dos grupos A ou B e análise molecular para ZIKV ^{BR}	58
3.7.3 Transmissão do ZIKV ^{BR} de machos para fêmeas sadias.....	59
4 RESULTADOS	61
4.1 Susceptibilidade dos mosquitos <i>Ae. aegypti</i> aos vírus DENV-2 e ZIKV^{BR}	61
4.2 Fecundidade das fêmeas infectadas por DENV-2 e ZIKV nos 3 ciclos gonotróficos	61
4.3) Teste dos iniciadores correspondentes aos genes DRONC, CASP7, CASP16, IAP1, ATG4A, ATG8 e ATG12	63
4.4) Expressão dos genes envolvidos na modulação da via de morte celular nos ovários de fêmeas expostas aos DENV-2 ou ZIKV^{BR}	63
4.4.1 Primeiro Ciclo Gonotrófico	63
4.4.2 Segundo Ciclo Gonotrófico	67
4.4.3 Terceiro Ciclo Gonotrófico	69
4.5 Transmissão sexual do ZIKV entre fêmeas infectadas e machos de <i>Ae. aegypti</i>	72
4.5.1 Taxa de transmissão venérea do ZIKV em machos	72
4.5.2 Viabilidade do ZIKV ^{BR} nos machos sexualmente infectados	74
4.6 Transmissão sexual do ZIKV^{BR} entre machos sexualmente infectados para fêmeas sadias	75
4.6.1 Taxa de fêmeas sadias que se infectaram após a cópula com machos infectados	75
5 DISCUSSÃO	79
5.1 Taxa de susceptibilidade dos mosquitos <i>Ae. aegypti</i>	79
5.2 Fecundidade das fêmeas infectadas nos 3 CG	80
5.3 Estudo dos genes relacionados à morte celular nos ovários de fêmeas infectadas	83
5.3.1 Primeiro Ciclo gonotrófico	83
5.3.2 Segundo ciclo gonotrófico	85
5.3.3 Terceiro ciclo gonotrófico	87

5.4 Transmissão venérea do ZIKV entre fêmeas e machos de <i>Ae. aegypti</i>	88
6 CONCLUSÃO	92
7 REFERÊNCIAS	94
8 MATERIAL SUPLEMENTAR	106
9 ANEXOS	115
9.1 <i>Aedes aegypti</i> Control Strategies in Brazil: Incorporation of New Technologies to Overcome the Persistence of Dengue Epidemics	115
9.2 Glytube: A Conical Tube and Parafilm M-Based Method as a Simplified Device to Artificially Blood-Feed the Dengue Vector Mosquito, <i>Aedes aegypti</i>	134
9.3 Laboratory strains of <i>Aedes aegypti</i> are competent to Brazilian Zika virus	139
9.4 Oviplate: A Convenient and Space-Saving Method to Perform Individual Oviposition Assays in <i>Aedes aegypti</i>	152

1 Introdução

O Brasil é um país subdesenvolvido, cujo a economia está baseada principalmente nos agronegócios. São 8.515.676.049 Km² preenchidos por uma vasta biodiversidade (distribuída principalmente pelo Cerrado, Caatinga, Mata Atlântica e Floresta Amazônica) e uma grande quantidade de cidades onde estão vivendo, aproximadamente 210 milhões de pessoas. Boa parte do território brasileiro está localizado entre duas linhas imaginárias (Linha do Equador e Trópico de Capricórnio) e por esse motivo diz-se que o Brasil é um país tropical com temperaturas normalmente altas e chuvas abundantes durante todo o ano.

Apesar de ser um país onde os desastres naturais são quase inexistentes, a água potável e saneamento básico não são realidade em todas as cidades brasileiras (IBGE, 2018). Essa situação é nítida quando percorremos o interior das regiões norte e nordeste do Brasil onde, para suprir essa deficiência, estoca-se água em baldes e caixas de forma inadequada e, sem muitas escolhas, crianças brincam em meio aos esgotos e lixos acumulados (IBGE, 2018).

Infelizmente, viver nessas condições causa um aumento significativo de doenças como diarreia, infecções parasitárias, verminoses e também doenças que podem ser veiculadas por insetos (IBGE, 2018).

Alguns insetos envolvidos na transmissão de patógenos são conhecidos popularmente como mosquitos, muriçocas ou pernilongos e podem ser considerados como os principais vetores da transmissão de patógenos causadores de doenças tropicais como, por exemplo, Filariose, Dengue, Zika e Malária (COSTA-DA-SILVA et al., 2017; GOULD; SOLOMON, 2008; MARCHETTE et al., 1969; REITER, 2001). Os mosquitos vetores desses patógenos pertencem à família Culicidae, ordem Diptera e podem ser subdivididos em três gêneros distintos principais: *Culex*, *Anopheles* e *Aedes* (CLEMENTS, 1992).

Os mosquitos do gênero *Culex* possuem uma coloração marrom claro (fig. 01A), são mais ativos nos períodos crepuscular e noturno e podem ser os vetores de parasitas como filárias, que causam a elefantíase, e alguns vírus responsáveis por algumas encefalites humana (DA SILVA et al., 2018; GOULD; SOLOMON, 2008; SAMY et al., 2016). A elefantíase está praticamente erradicada no território brasileiro, podendo ser encontrado alguns

casos apenas no estado do Pernambuco (DA SILVA et al., 2018). Já alguns vírus que causam a encefalite, como o Vírus do Nilo Ocidental, foram introduzidos no Brasil pelos EUA e o mesmo pode se espalhar pelo território brasileiro causando tanto um aumento na demanda na saúde pública, como também uma perda econômica, uma vez que esses vírus podem infectar equinos (Agência FAPESP, 2018).

Os mosquitos Anophelinos, também conhecidos como mosquitos prego, devido a posição que ficam quando pousam em uma determinada superfície, possuem o corpo na cor marrom (fig. 01B) e são vetores dos protozoários do gênero *Plasmodium*. Esses parasitas são responsáveis pela enfermidade conhecida como malária que somente em 2017 acometeu quase 140 mil pessoas nas Regiões Norte do Brasil (Acre, Amazonas e Pará) (PAHO, 2018).

Por fim, alguns mosquitos do gênero *Aedes*, que possuem o corpo preto com manchas brancas (fig. 01C). Apesar do período diurno ser o de maior atividade desse gênero, sabe-se que esses mosquitos são oportunistas, por isso podem se alimentar em um hospedeiro durante o período noturno. Dentro desse grupo, a espécie *Ae. aegypti* é considerada a principal vetora urbana de algumas arboviroses, como os vírus da Dengue (DENV) e Zika (ZIKV), que anualmente prejudicam milhares de pessoas na região norte e nordeste do Brasil (BASTOS et al., 2012; FIGUEIREDO, 2007; ZANLUCA et al., 2015).

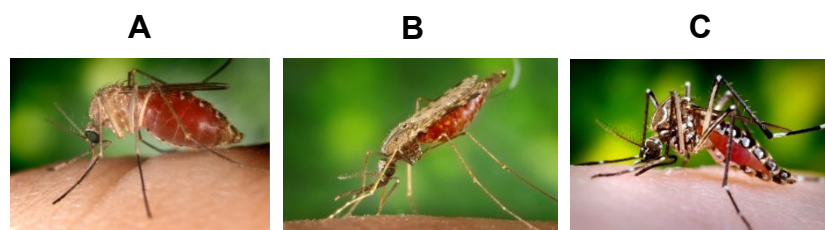


Figura 01. Mosquitos fêmea da Ordem Diptera e Família Culicidae. A) *Culex quinquefasciatus* B) *Anopheles albimanus* C) *Aedes aegypti*. Fonte: VectorBase.

1.1 *Aedes aegypti*: linhagens Rexville, Rockefeller e Higgs white eyes

Inicialmente os mosquitos *Ae. aegypti* eram insetos que viviam apenas no meio das matas e desempenhavam um papel importante no ciclo de

transmissão de patógenos no meio silvestre (mosquitos vs mamíferos silvestres). Porém, com o aumento do desmatamento e crescimento das cidades, este inseto passou a conviver entre os homens. Devido as condições favoráveis para o seu estabelecimento no meio urbano (disponibilidade de criadouros artificiais e facilidade de realizar uma alimentação sanguínea), hoje ele é considerado o principal vetor urbano de arboviroses em países tropicais e subtropicais.

Apesar dos estudos com esse vetor terem se iniciado há muitas décadas, hoje ele ainda continua sendo um dos principais objeto de estudos de pesquisas científicas relacionadas à interação patógeno – hospedeiro. Isso acontece porque, além de ser um vetor com potencial para novos patógenos, há um avanço das tecnologias empregadas nos laboratórios que auxiliam tanto no esclarecimento dos mecanismos de ação de vírus dentro do mosquito, como também na otimização das técnicas utilizadas para controlar o vetor no meio urbano.

Diante desta realidade, algumas linhagens de *Ae. aegypti* foram colonizadas em laboratório com o intuito de auxiliar no desenvolvimento destas frentes de pesquisas. Dentre as linhagens de laboratório, podemos citar os mosquitos Rexville (RED), Rockefeller (ROCK) e Higgs white eyes (HIGGS).

A linhagem RED corresponde a um mosquito que possui os olhos vermelhos e são muito utilizados em estudos que visam analisar as alterações fisiológicas do hospedeiro invertebrado a diferentes patógenos, como a interação do *Ae. aegypti* infectado pelo protozoário *P. gallinaceum* causador da malária aviária (ARAÚJO et al., 2011; THATHY et al., 1994). Já os mosquitos da linhagem ROCK são originários do Caribe e possuem os olhos pretos e, assim como o RED, também são bons modelos para os estudos da interação patógeno – hospedeiro (KUNO et al., 1998). Além disso, ela é muito utilizada em ensaios de teste de inseticidas e experimentos que visam identificar proteínas importantes para a replicação do DENV, por exemplo, uma vez que correspondem a uma cepa susceptível a compostos químicos (ARAÚJO et al., 2013; LONDONO-RENTERIA et al., 2015). Por fim, a linhagem HIGGS que possui uma deficiência na produção do pigmento dos olhos (deixando-os brancos) por esse motivo, é uma linhagem de laboratório empregada na obtenção de linhagens transgênicas do inseto, pois facilita a visualização de

uma proteína fluorescente nos olhos que sinaliza a inserção do gene de interesse no DNA do mosquito (KOJIN et al., 2016).

1.2 Reprodução dos mosquitos

Apesar de possuírem características morfológicas bem diferentes, uma característica fisiológica comum entre os gêneros *Culex*, *Anopheles* e *Aedes* é a existência de fêmeas hematófagas, ou seja, que se alimentam de sangue dos vertebrados. Esse comportamento é importante, pois é através da alimentação sanguínea que a fêmea obtém substâncias essenciais para a produção e desenvolvimento dos seus ovos (CLEMENTS, 1992).

O órgão central para a reprodução dos mosquitos são os ovários. Eles estão presentes em pares e cada ovário do mosquito *Ae. aegypti* possui entre 75 a 160 ovaríolos unidos pela membrana ovariolar (fig. 02A e B). Cada ovaríolo é formado por um germário, folículos ovarianos primários, secundários e terciários. O folículo ovariano primário é composto por uma túnica própria, células foliculares (CF), sete células acessórias (*nurse*) e um oócito maduro (fig. 2C e fig. 3) e será todo esse conjunto que originará o ovo (FORATTINI, 1996).

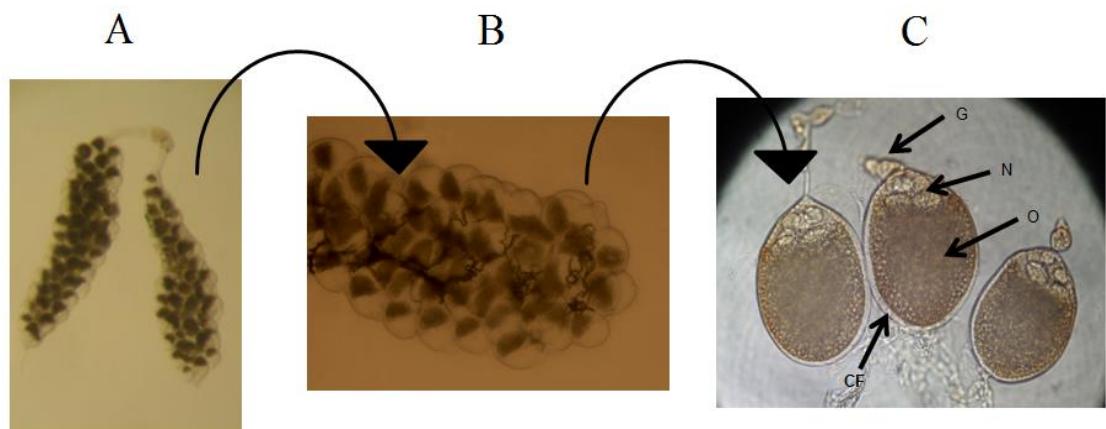


Figura 02: Ovários e ovaríolos de mosquitos *Aedes aegypti*. Fotos dos ovários (A e B). Ovaríolos (C) com suas estruturas: G) germário; N) células acessórias (*nurse*); O) oócito maduro com deposição de vitelo; CF) células foliculares (IOSHINO, 2013).

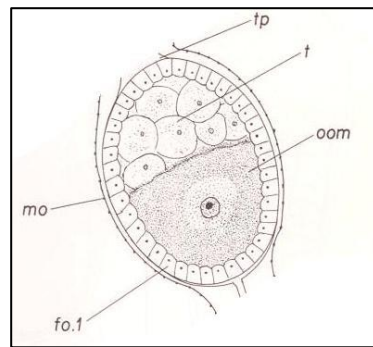


Figura 03: O folículo ovariano é formado por: membrana ovariolar (mo), a túnica própria (tp), folículo primário com células foliculares (fo. 1), sete células acessórias ou trofócito (t) e oócito maduro (oom). Fonte: FORATTINI et al., 1996.

O processo de formação das proteínas precursoras de vitelo (PPV) denomina-se vitelogênese e compreende o acúmulo de nutrientes para o embrião a partir de proteínas produzidas e secretadas pelo corpo gorduroso. Muitos estudos sobre a vitelogênese têm sido realizados em *Ae. aegypti* e para melhorar o entendimento desse processo, ele foi subdividido em três etapas: pré-vitelogênese, período vitelogênico e o término do período vitelogênico (CLEMENTS, 1992; BROWN et al., 1998; RAIKHEL et al., 2002).

A pré-vitelogênese corresponde à fase que antecede a alimentação sanguínea e nessa etapa os tecidos envolvidos são preparados e amadurecidos. Nessa fase ocorre uma proliferação das organelas biossintéticas nas células do corpo gorduroso e a separação das CF para permitir que as PPV sejam internalizadas e armazenadas no oócito maduro. Na pré-vitelogênese também ocorre a ação do hormônio juvenil III. Ele age sobre o corpo gorduroso e os ovários permitindo uma boa resposta desses órgãos aos hormônios envolvidos no período vitelogênico como o hormônio ecdisteroidogênico ovariano (OEH) e a 20-hidroxiecdisona (20E) (RAIKHEL et al., 2002).

O período vitelogênico inicia-se com a ingestão do sangue pelo mosquito que induz o cérebro a secretar o OEH (BROWN et al., 1998). Esse hormônio estimula os ovários a produzirem e secretarem ecdisona para a hemolinfa, que a transportará até o corpo gorduroso onde será convertida em 20E. Esse hormônio irá estimular a síntese das PPV (vitelogenina, carboxipeptidase vitelogênica e catepsina B vitelogênica) que serão secretadas para a hemolinfa pelo corpo gorduroso, endocitadas pelos ovários e

armazenadas nos oócitos. Essa fase ocorre entre 0 e 48 horas após o repasto sanguíneo (DEITSCH et al., 1995; RAIKHEL; DHADIALLA, 1992).

A última fase representa o fim da síntese das PPV pelo corpo gorduroso e a produção do córion que é uma camada glicoprotéica que protege o ovo. Essa fase ocorre 48 a 72 horas após a alimentação sanguínea e termina com a deposição dos ovos em uma superfície úmida (RAIKHEL; DHADIALLA, 1992).

1.3 *Flavivirus*

Apesar de ter uma importância fisiológica, o repasto sanguíneo também é a via de aquisição de patógenos, ou seja, é através desse tipo de alimentação que os mosquitos *Ae. aegypti* podem se infectar, tornando assim, vetores de agentes infecciosos, para os vírus que pertencem ao gênero *Flavivirus* (GUBLER, 1998; MARCHETTE et al., 1969).

Os *Flavivirus* são organismos relativamente pequenos, esféricos e possuem um envelope lipídico (GUBLER, 1998). Muitos dos vírus pertencentes a este gênero podem causar sérios problemas a saúde pública, como é o caso do DENV e ZIKV.

O DENV possui uma classificação molecular e antigênica dividida em 4 sorotipos distintos: DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4. Desde a primeira identificação laboratorial do vírus no Brasil, em 1981-1982, introduções sucessivas e contínuas foram registradas em território nacional, sendo atualmente são encontrados os quatro sorotipos em estado de cocirculação no país, sendo esta situação caracterizada como estado de hiperendemicidade (BASTOS et al., 2012; FARES et al., 2015; VILLABONA-ARENAS et al., 2014). O último boletim epidemiológico liberado pelo Ministério da Saúde, mostrou que até a semana epidemiológica 45 (4/11/2018 a 10/11/2018) foram registrados, aproximadamente, 63.800 e 83.590 mil casos prováveis de dengue somente nas regiões Sudeste (SE) e Centro-Oeste (CO), respectivamente, o que corresponde a um aumento de 24 e 11% comparado ao ano de 2017 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018).

O ciclo de desenvolvimento do DENV no mosquito inicia após a ingestão sanguínea contendo as partículas virais. Essas se alojam no tecido do

trato digestivo (intestino médio - IM), sofrem replicação e liberam novos vírus que irão infectar outros tecidos como as traquéias, corpo gorduroso e as glândulas salivares (GS) (SALAZAR et al., 2007).

Além do DENV, em 1947, foi identificado na Floresta de Ziika, Uganda, na África, um novo tipo de vírus denominado ZIKV (DICK et al., 1952). Esse foi inicialmente isolado do macaco rhesus 766, utilizado como sentinela, e após essa descoberta alguns casos isolados de infecções humanas na África e na Ásia foram detectadas (DUFFY et al., 2009). Porém, em 2007 na ilha Yap, localizado na Micronésia, ocorreu um surto dessa doença e foram detectados 49 casos confirmados e 59 casos suspeitos apenas nessa região (DUFFY et al., 2009). No Brasil, análises filogenéticas mostraram que o ZIKV foi introduzido no final de 2013, e em 2015 casos autóctones foram identificados em quase todos os Estados do Brasil, com circulação intensa na região Nordeste (EBC, 2015; FARIA et al., 2017; KUNO et al., 1998; LANCIOTTI et al., 2008; MARCONDES; XIMENES, 2015; PORTAL DA SAÚDE, 2015).

O ciclo de desenvolvimento do ZIKV dentro do mosquito ainda é uma incógnita, e até o momento não há estudos que mostram o seu mecanismo de replicação e os tecidos envolvidos nesse processo em mosquitos pertencentes ao gênero *Aedes*. Porém, é possível que o processo de replicação do ZIKV seja parecido ao que ocorre com o DENV, pois segue os mesmos padrões observados por Salazar e colaboradores (2007).

1.4 Morte celular programada em mosquitos infectados por diferentes patógenos

Estudos mostram que infecções podem promover alterações fisiológicas nos mosquitos e comprometer a sua capacidade reprodutiva, isto é, mosquitos infectados produzem menos ovos quando comparados aos sadios. Esta característica foi observada em mosquitos *An. stephensi* e *An. gambiae* infectados por *P. yoelii nigeriensis* e também em *Ae. aegypti* infectados por *P. gallinaceum* ou DENV-2 (AHMED et al., 1999; AHMED; HURD, 2006; ARAUJO et al., 2011; IOSHINO, 2013; HOGG; HURD, 1995; SYLVESTRE et al., 2013).

Uma explicação para essa redução da fecundidade é que ocorre a morte das CF dos ovários das fêmeas infectadas como foi observado em *An. stephensi* infectados por *P. yoelii nigeriensis* (HOPWOOD et al., 2001).

A morte celular é uma resposta celular fundamental que apresenta um papel importante no desenvolvimento corporal e na regulação da homeostase nos tecidos. Existem dois tipos de morte celular: necrose e a programada (ALBERTS et al., 2004).

A necrose tem como objetivo de eliminar as células de tecidos vivos de forma desordenada. Esse tipo de morte está muito relacionada aos processos inflamatórios em vertebrados, porém até o momento ele não foi descrito em artrópodes (ALBERTS et al., 2004).

Por outro lado, a morte celular programada pode ser subdividida em 3 tipos (MCPHEE; BAEHRECKE, 2009). O primeiro (Tipo I) corresponde à apoptose e pode ser definida como uma via de morte celular regulada ou programada responsável por manutenções fisiológicas como, por exemplo, eliminação das células indesejadas do organismo e regulação do sistema imunológico tanto dos animais vertebrados como, também, nos invertebrados (BOATRRIGHT; SALVESEN, 2003; DEGTEREV; YUAN, 2008; KAUFMANN; HENGARTNER, 2001; RICHARDSON; KUMAR, 2002). Neste tipo de morte celular está envolvida uma sequência de enzimas denominadas caspases (CASP) que desempenham diferentes funções na cascata apoptótica. As caspases são proteínas que pertencem à Família das Cisteínas Proteases e podem ser classificadas como iniciadoras ou executoras (BOATRRIGHT; SALVESEN, 2003; BRYANT et al., 2007; DEGTEREV; YUAN, 2008).

As caspases iniciadoras (também denominadas procaspases), como seu próprio nome diz, são as primeiras a serem ativadas e constituem o primeiro passo para ativar um segundo grupo de enzimas. Essas possuem uma porção denominada de domínio de morte, ou seja, uma região onde ocorrerá a interação proteína-proteína que ativará o início da apoptose (COOPER et al., 2007a, 2007b). Uma vez que essas procaspases são ativadas, um segundo grupo de enzimas, denominadas de caspases executoras, serão acionadas desencadeando uma cascata de eventos que irá promover a clivagem de proteínas citosólicas e lâminas nucleares resultando na morte da célula (BOATRRIGHT; SALVESEN, 2003; ALBERTS et al., 2004).

O segundo tipo de morte celular programada pode ser considerada um mecanismo de pró-sobrevivência e se caracteriza por um processo catabólico muito conservado entre as células eucarióticas (ENG et al., 2016; MCPHEE; BAEHRECKE, 2009; YORIMITSU; KLIONSKY, 2005). Esse tipo de morte denomina-se autofagia (Tipo II) e tem o objetivo de degradar as organelas celulares indesejadas (ou que não serão utilizadas pelas células) e auxiliar na síntese de aminoácidos para formação de novas proteínas (ENG et al., 2016; MCPHEE; BAEHRECKE, 2009). Sabe-se que este tipo de morte é ativada no IM de *Ae. aegypti* após uma alimentação sanguínea contendo partículas de DENV, mostrando que a autofagia (ATG) também pode ser um mecanismo importante para o controle da infecção nos mosquitos (ENG et al., 2016). O terceiro e último tipo de morte celular é o Tipo III que se caracteriza pela ausência de atividade lisossomal nas células que estão em morte celular (MCPHEE; BAEHRECKE, 2009).

A apoptose ou autofagia e a expressão dos genes relacionados a estes tipos de morte celular em fêmeas *Ae. aegypti* infectadas por algum patógeno, até o momento, não foram descritos em ovários. Porém, estudos realizados por Ocampo e colaboradores (2013) caracterizaram a expressão diferencial de três genes (DRONC, AeCasp-16 e AeIAP1) relacionados à apoptose no IM de mosquitos *Ae. aegypti* com diferentes níveis de susceptibilidade ao DENV-2.

O gene AeDronc (DRONC) produz uma caspase iniciadora e estudos mostraram que ele é homólogo a uma caspase encontrada em *Drosophila* (*Drosophila* Dronc). Tanto em *Drosophila* como em *Ae. aegypti* essa enzima desempenha uma importante ação no desenvolvimento fisiológico durante as fases imaturas (larvas e pupas) e é modulada pelo hormônio ecdisona (CAKOUROS et al., 2004; COOPER et al., 2007b). Além disso, em mosquitos, o DRONC apresenta-se altamente expresso nos tecidos IM, corpo gorduroso, OV e GS, além de ser uma caspase importante na transcrição e estabilidade de algumas caspases executoras da via apoptótica, como a caspase 7 que será discutida nos próximos parágrafos (COOPER et al., 2007b; ENG et al., 2016).

A CASP16 é uma proteína que pertence ao grupo das caspases executoras. Até o momento, as informações sobre essa enzima são vagas e não há a descrição de como ela participa do processo de apoptose celular, porém o nível de expressão desse gene no IM de mosquitos resistentes ao

DENV-2 foi muito maior quando comparado aos mosquitos susceptíveis após ambos se alimentarem com sangue contendo DENV-2 (BRYANT et al., 2007; OCAMPO et al., 2013). Dessa forma, há um grande indício de que CASP16 pode estar envolvida na cascata apoptótica no IM com intuito de impedir que os vírus invadam as células desse tecido (OCAMPO et al., 2013).

Outra proteína executora que pode ser encontrada em diferentes espécies de culicídeos como os mosquitos *Ae. aegypti* e em *An. stephensi* é a Caspase 7 (CASP7) (ENG et al., 2016). Quando esses mosquitos estão infectados por diferentes patógenos (DENV-2 ou *P. berghei*), há um aumento do nível de expressão da enzima CASP7 principalmente no primeiro tecido de contato do sangue com os patógenos: IM (ABRAHAM et al., 2004; ENG et al., 2016). Além dessas duas espécies, uma proteína homóloga a CASP7 encontrada em *Ae. aegypti* foi identificada em *Ae. albopictus* porém, não há estudos que mostram se essa proteína também é ativada por algum patógeno nesse hospedeiro (FENG et al., 2016). Essa enzima, além de ser uma proteína que auxilia na degradação e morte celular por apoptose (Tipo I), também pode estar envolvida na morte celular por autofagia (Tipo II) em mosquitos *Ae. aegypti*, porém o mecanismo de ação da CASP7 nesse tipo de morte ainda não está bem esclarecido (ENG et al., 2016).

Para evitar que todas as células que compõem um organismo entrem espontaneamente em morte celular por apoptose, há um mecanismo evolutivamente conservado, no qual um conjunto de proteínas denominadas inibidores de apoptose (IAP) são capazes de inibir algumas famílias de caspases (DEVERAUX et al., 1999). Uma das proteínas que está presente em *Ae. aegypti* é o AeIAP1 (IAP1) (ENG et al., 2016; WANG; CLEM, 2011). Estudos mostraram que ao silenciar o gene que produz essa proteína durante a infecção por DENV-2, ocorre morte significativa dos indivíduos reforçando a hipótese de que o IAP1 desempenha uma importante função na regulação do sistema imunológico de *Ae. aegypti* quando infectado por um patógeno (OCAMPO et al., 2013).

Além dessas proteínas que estão envolvidas tanto na apoptose como autofagia, existe um outro grupo de proteínas que estão envolvidas especificamente na morte celular por autofagia (ATG). Dentro deste grupo de proteínas, podemos citar três que se mostraram altamente expressas em

mosquitos *Ae. aegypti* após uma alimentação sanguínea: ATG4A, ATG8 e ATG12 (ENG et al., 2016). A primeira proteína possui uma atividade muito limitada no processo da autofagia participando apenas da clivagem de algumas proteínas específicas, porém sabe-se que durante a infecção por DENV-2, ocorre um aumento da regulação transcricional da ATG4A nos mosquitos *Ae. aegypti* (ENG et al., 2016; KLIONSKY et al., 2016). Já a ATG8 é uma proteína citoplasmática que, ao iniciar a autofagia celular, se liga a uma proteína da membrana do autofagossomo (vacúolo autofágico) (KLIONSKY et al., 2016).

Por fim, o ATG12, que codifica uma proteína endógena que encontra-se distribuída por todo citoplasma celular. No início da autofagia ela se associa ao fagóforo (membrana que irá envolver as estruturas celulares), por esse motivo é uma proteína muito utilizada para medir o processo de autofagia em determinadas células (KLIONSKY et al., 2016).

1.5 Infecção viral e sistema reprodutivo de *Ae. aegypti*

De acordo com os dados obtidos em nosso laboratório (IOSHINO, 2013) e todos os dados publicados citados acima, é possível observar que os tecidos mais estudados em insetos vetores são os que estão envolvidos no ciclo de replicação dos patógenos. Apesar dos ovários não serem um tecido, até o momento, importante para a replicação viral, sabe-se que ele possui uma glicoproteína de 45 kDa que, em cultura de células C6/36, pode ter uma importância na replicação do DENV (MENDOZA et al., 2002). Essa mesma proteína também foi identificada em IM e GS, dois tecidos importantes para a replicação e armazenamento do vírus até serem transmitidos para um novo hospedeiro vertebrado através do repasto sanguíneo, respectivamente (MENDOZA et al., 2002; SALAZAR et al., 2007).

Desde a década de 80, estudos mostraram que há a possibilidade de ocorrer a transmissão vertical (TV) natural de DENV, ou seja, fêmeas de mosquitos infectadas através de uma alimentação sanguínea em um hospedeiro infectado podem transmitir o vírus para a sua prole (LEQUIME; LAMBRECHTS, 2014; LEQUIME et al., 2016). Inicialmente, acreditava-se que menos de 0,1% da prole poderia eclodir portando o DENV, porém com o avanço dos estudos e, principalmente, das técnicas de identificação viral em

laboratório, sabe-se que a taxa de eficiência da TV são bem maiores (LEQUIME; LAMBRECHTS, 2014).

Dentre os mosquitos capazes de transmitir vírus a sua prole, os que pertencem ao gênero *Aedes* possuem uma vantagem maior na eficiência na TV de vírus do que os mosquitos *Culex* (LEQUIME et al., 2016). Uma explicação para essa vantagem, é a maior resistência dos ovos de *Aedes* às variações climáticas (FARNESI et al., 2015). Além disso, sabe-se que os *Aedes* têm uma maior taxa de eficiência na TV em regiões de clima árido quando comparado a regiões de clima equatorial e temperadas e quentes (LEQUIME et al., 2016). Essa característica reforça a hipótese de que a TV é um mecanismo importante para a manutenção do vírus em épocas de clima desfavorável como no período de estiagem e inverno, por exemplo (LEQUIME et al., 2016).

Muitos estudos de TV são realizados em países da Ásia e Américas do Norte e Sul. No Brasil, Martins e colaboradores (2012) mostraram uma evidência de que é possível ocorrer a transmissão transovariana do DENV-2 e 3. Esse perfil foi observado após larvas e pupas de *Ae. aegypti* coletados em Fortaleza (CE) apresentarem produtos de RT-PCR correspondentes ao DENV-2 e DENV-3 (MARTINS et al., 2012). Além de Fortaleza, a cidade de Cuiabá - MT também apresentou larvas positivas para DENV-4 em 2012 em um período de surto na cidade (CRUZ et al., 2015). Outro vírus que também foi detectado em larvas foi o ZIKV. Foram coletados ovos na cidade de Itacoatiara (Estado da Amazônia) e após eclosão das larvas de *Ae. aegypti* em laboratório, fragmentos correspondentes ao ZIKV foram identificados utilizando o qPCR (COSTA et al., 2018).

Além da transmissão vertical, estudos recentes mostram que a transmissão sexual também pode ocorrer entre os mosquitos *Ae. aegypti*, ou seja, fêmeas infectadas por ZIKV e machos induzidos à infecção (ZIKV injetado na região intratorácica) podem transmitir o vírus aos seus respectivos parceiros (as) sadios (as) através da cópula (PEREIRA-SILVA et al., 2017). As análises realizadas por estes autores mostraram que 45% das fêmeas sadias que copularam com machos induzidos à infecção com ZIKV e 35% dos machos que copularam com fêmeas infectadas através do repasto sanguíneo apresentaram um indício de infecção, pois foi detectado presença do genoma viral nos

indivíduos através de análises moleculares (qPCR) (PEREIRA-SILVA, et al., 2017).

A identificação dos vírus em mosquitos machos inteiros utilizando técnicas moleculares, nos dá apenas um indício de que o vírus está presente. Porém, não é possível determinar se o vírus detectado é infectante e se houve uma replicação viral capaz de atingir outros tecidos do mosquito. Até o momento, não há estudos que mostram a presença de ZIKV infectante em mosquitos machos que copularam com fêmeas infectadas, o que promoveria uma preocupação na epidemiologia desse vírus dentro de países tropicais e subtropicais.

1.6 Considerações finais

Os mosquitos *Ae. aegypti*, também conhecidos como mosquitos da dengue, possuem uma importância na cadeia alimentar do ecossistema, são responsáveis por transmitir vários tipos de arboviroses ao homem durante a alimentação sanguínea, possuem proteínas nas antenas capazes de identificar odores, são insetos que se reproduzem em criadouros artificiais como caixas d'água, pneus e pratos de vasos de plantas que contém água parada, enfim (ARAÚJO et al., 2015; FIGUEIREDO, 2007; HURD; CARTER, 2004; ROMANO et al., 2013; WICKRAMASINGHE; COSTA, 1986; ZHOU et al., 2008). Todas essas informações que a comunidade científica (ou não) possui sobre este inseto são provenientes de estudos e pesquisas que foram desenvolvidas nos últimos 250 anos.

Nesse período, novos arbovírus também foram descobertos e introduzidos no meio urbano. Por isso, continuar os estudos sobre estas interações patógeno – hospedeiro poderá elucidar novas hipóteses e idéias que auxiliarão na redução da transmissão de doenças, como DENV e ZIKV, entre a população brasileira.

Com base nessas possibilidades e com o intuito de auxiliar nas pesquisas científicas relacionadas ao *Ae. aegypti*, este estudo teve dois objetivos principais. O primeiro observar se há alteração dos níveis de expressão dos genes envolvidos na morte celular por apoptose e autofagia nos

ovários de fêmeas infectadas com DENV-2 ou ZIKV. E o segundo, mostrar a transmissão venérea de ZIKV entre os mosquitos *Ae. aegypti*.

2 Objetivos

Objetivo Geral

Analisar os impactos da infecção pelos vírus Dengue e Zika na reprodução de *Ae. aegypti*.

Objetivos Específicos

- 1) Determinar a susceptibilidade das linhagens de *Ae. aegypti* de laboratório, RED, HIGGS ou ROCK, aos DENV-2 e ZIKV;
- 2) Avaliar a fecundidade das fêmeas infectadas pelos vírus DENV-2 ou ZIKV durante 3 ciclos reprodutivos;
- 3) Analisar o nível de expressão dos genes IAP1, DRONC, CASP7, CASP16, ATG4A, ATG8 e ATG12 nos ovários de fêmeas infectadas por DENV e ZIKV, durante 3 ciclos reprodutivos do inseto;
- 4) Determinar se em condições de laboratório, ocorre a transmissão venérea do ZIKV em *Ae. aegypti*;
- 5) Analisar a presença de partículas virais infectivas de ZIKV nos mosquitos que contraíram o vírus através da cópula.

3 Materiais e Métodos

3.1 Animais

3.1.1 Mosquitos *Aedes aegypti*

Os mosquitos *Ae. aegypti* das linhagens RED, ROCK e HIGGS foram mantidos no insetário do Departamento de Parasitologia do Instituto Ciências Biomédicas - USP, em temperatura média de 27 °C ± 1 °C, 80% de umidade relativa do ar e fotoperíodo de 12/12 horas (claro/escuro).

Para iniciar as colônias de mosquitos *Ae. aegypti*, ovos aderidos a um papel filtro foram mergulhados em um frasco de vidro (hermeticamente fechado) contendo água autoclavada para a eclosão das larvas L1. A água autoclavada é muito importante para a eclosão das larvas de mosquitos *Aedes*, uma vez que a baixa concentração de oxigênio dissolvido na água induz as larvas L1 saírem dos ovos e, assim, crescerem de forma sincronizada. Ou seja, larvas L1 e L2 nos 2 primeiros dias, larvas L3 e L4 nos dias 3 até 5 e pupas nos dias 5 a 8 após a eclosão. Em torno de 250 - 300 larvas L1 foram distribuídas em caixas plásticas (37 cm x 25 cm x 13,5 cm) contendo água e ração de peixe moída (Tetramin®), sendo que após 4 dias a água é trocada diariamente e nova ração é adicionada de acordo com a fase de desenvolvimento das larvas.

Uma vez formadas, as pupas foram separadas das larvas e também entre machos e fêmeas, utilizando um separador vertical (fig. 04) que consiste em duas placas de vidro ajustáveis (fig. 04A) que permitem a separação das larvas, pupas machos e pupas fêmeas de acordo com o tamanho das mesmas. Inicialmente colocam-se as larvas, pupas machos e fêmeas em uma jarra com água, sendo essa mistura despejada entre as placas do separador (fig. 04B). Com o auxílio de uma mangueira, joga-se água na parte superior para ajudar no deslocamento vertical das formas imaturas. As larvas são as menores (fig. 04C), por isso são as primeiras a passarem entre os vidros. Em seguida vem os machos e por último as fêmeas que são maiores (fig. 04D) (CARVALHO et al., 2014).

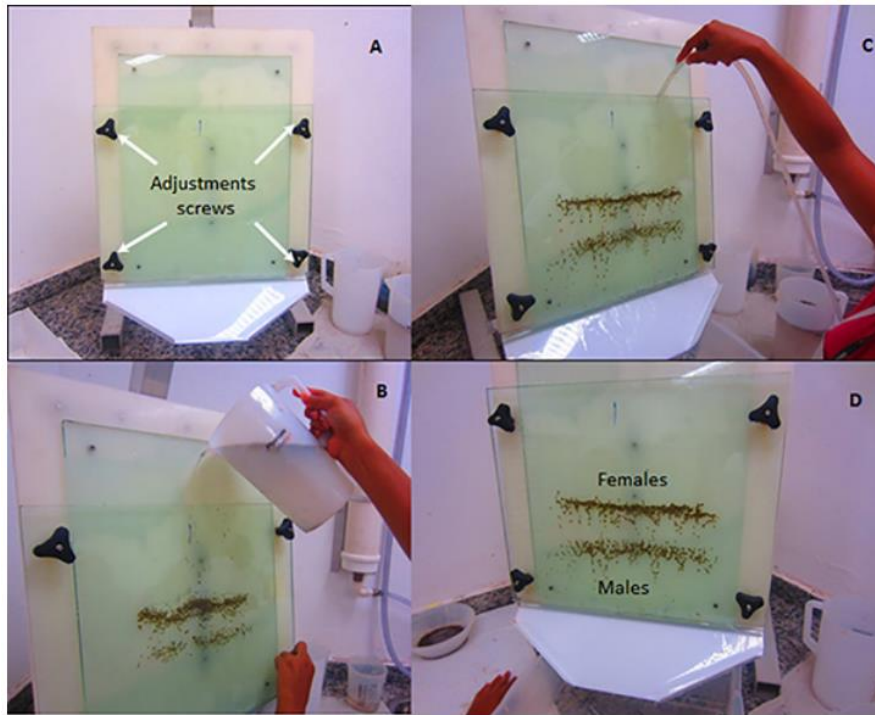


Figura 04: Demonstração do separador vertical das fases imaturas do mosquito *Ae. aegypti*. Fonte: CARVALHO et al., 2014.

Pupas macho e fêmea foram colocadas, separadamente, em diferentes recipientes plásticos, fechadas com um filó e mantidas no insetário até a emergência dos mosquitos adultos. Para montar a colônia, 2 copos de machos (~ 200 indivíduos) para 6 copos de fêmeas (~ 600 indivíduos) foram colocados em gaiolas de metal e mantidos com solução de sacarose 10% (p/v) *ad libitum*.

Para obter os ovos, as fêmeas foram alimentadas em camundongos da cepa BALB/c previamente anestesiados com injeção subcutânea de cloridrato de xilanzina (3 ng/Kg) e acepromazina (0,3 ng/Kg) por 40 minutos ou até que a maioria das fêmeas estivessem ingurgitadas. Após 3 dias dessa alimentação sanguínea, um pote contendo água deionizada e papel filtro, previamente identificado de acordo com a cepa do mosquito, foi colocado na gaiola por 2 dias para que as fêmeas depositassem os seus ovos. Após esse período, os ovos ficaram secando por 3 dias em temperatura ambiente e guardadas em sacos plásticos até serem utilizadas nos próximos experimentos.

3.2 Cultivo de células C6/36

A linhagem celular de mosquito denominada C6/36 (células do IM de mosquitos *Ae. albopictus*) foi mantida em garrafas plásticas estéreis de 25 cm² com meio de cultura Leibovitz L-15 (L15) (Gibco™, cat # 11415064) contendo de 5 % a 10 % de soro fetal bovino (SFB) (Gibco™, cat # 12657011) e antibiótico e antimicótico (1x) (Gibco™, cat # 15240062) para um volume final de 7 mL. O meio de cultivo foi renovado duas vezes por semana e as células armazenadas em estufa 28°C e na ausência de CO₂.

3.2.1 Replicação do DENV-2 e ZIKV^{BR}

O DENV-2 cepa ACS46 (ROMANO et al., 2010) foi gentilmente cedido pelo laboratório do Prof. Dr. José Eduardo Levi do Departamento de Virologia do Instituto de Medicina Tropical da USP. O vírus foi amplificado em uma garrafa estéril de 75 cm² com até 80% de confluência de células C6/36 e 4 mL de meio de cultivo (L15). A garrafa recebeu 1 mL de estoque DENV-2 passagem 8, foi agitado no equipamento Max Rotator (Lab-Line modelo 4631) em temperatura ambiente por 15 minutos e incubado a 37°C por 45 minutos. Após as incubações, foi adicionado 30 mL de meio L15 enriquecido com 2% de SFB. A garrafa ficou na estufa por 7 dias a 28°C e ausência de CO₂, em seguida, o sobrenadante foi coletado, aliquotado em tubos de 1,5 mL, resfriado em gelo seco e congelado a – 80°C. O controle (MOCK) foi obtido nas mesmas condições citadas acima, porém a garrafa recebeu 1 mL de sobrenadante estoque sem o vírus da mesma passagem (DAS et al., 2007).

O ZIKV^{BR} corresponde a um vírus isolado de um caso clínico brasileiro e sua amplificação foi realizada de acordo com Cugola e colaboradores (2016). Alíquotas de ZIKV^{BR} foram gentilmente cedidas pela Rede Zika, um Grupo Força Tarefa de São Paulo formado em 2016 (AGÊNCIA FAPESP, 2016).

3.2.2 Titulação viral

Para titular o DENV-2 (passagem 9), uma alíquota foi descongelada e o RNA total extraído utilizando o kit QIAamp® Viral RNA Mini Kit (Qiagen) de acordo com o manual do fabricante. O RNA total foi analisado através do qRT-PCR seguindo a metodologia descrita no item 3.4, porém adicionando uma

curva padrão composta por 7 diluições seriadas de um plasmídeo sintetizado de acordo com Costa-da-Silva e colaboradores (2013).

Após a análise da quantificação, ficou determinado que as alíquotas de DENV-2 (P.9) estavam na concentração de $1,7 \times 10^7$ cópias virais/mL.

O ZIKV^{BR} (passagem 4) foi titulado pelo laboratório de Virologia do Instituto de Ciências Biomédicas II da Universidade de São Paulo de acordo com Cugola e colaboradores (2016), sob coordenação do Professor Dr. Edison Luiz Durigon. As alíquotas de ZIKV^{BR} utilizadas nesse projeto estavam com uma titulação de 5.0×10^6 pfu/mL.

3.3 Infecção dos mosquitos com DENV-2 ou ZIKV^{BR}

Todos os procedimentos relacionados às infecções foram realizadas por, no mínimo, 2 pessoas no insetário de segurança nível 2 (BSL-2) localizado no Instituto de Ciências Biomédicas II, unidade USP Butantã. Uma vez infectados através do alimentador artificial Glytube, os mosquitos foram manipulados apenas dentro da cabine de segurança (fig. 5) (COSTA-DA-SILVA et al., 2013). Todos os copos contendo mosquitos infectados só deixaram o interior da cabine de segurança após fixar o filó com uma fita adesiva e estarem dentro de caixas plásticas (dupla contenção) (fig. 6A e B), seguindo as normas estabelecidas pelo Procedimento Operacional Padrão (POP) determinadas pelo Laboratório de Mosquitos Geneticamente Modificados.

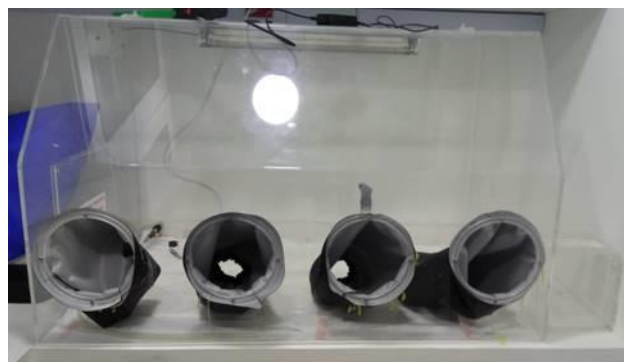


Figura 05: Itens de segurança utilizados durante a manipulação dos mosquitos infectados por arbovírus no insetário de segurança (BSL-2) localizado no Instituto de Ciências Biomédicas II, Universidade de São Paulo. Fonte: IOSHINO (2018b).



Figura 06: Dupla contenção: copos plásticos, com o filó fixados com a fita adesiva (A), armazenados dentro de uma caixa plástica fechada com uma tampa adaptada à circulação de ar e duas travas laterais (B). Fonte: IOSHINO (2018b).

Fêmeas adultas (5 a 7 dias) de *Ae. aegypti*, pré-copuladas (na proporção de 1 macho para 3 fêmeas) e depois de 24 horas sem sacarose 10%, foram alimentadas com sangue utilizando o alimentador artificial Glytube (COSTA-DA-SILVA et al., 2013). Cada Glytube continha um concentrado de hemácias, quantidades definidas de partículas do DENV-2 ($1,7 \cdot 10^7$ cópias/mL) e ZIKV^{BR} ($5,0 \times 10^6$ pfu/mL), de acordo com cada experimento, e soro humano previamente inativado na proporção de 10:10:1, respectivamente (COSTA-DA-SILVA et al., 2017a).

Para a obtenção do grupo controle negativo, necessário em alguns experimentos deste estudo, o Glytube foi oferecido aos mosquitos contendo o concentrado de hemáceas, o sobrenadante de cultura de células sem partículas virais e o soro humano previamente inativado (10:10:1).

Após o repasto sanguíneo artificial, cada grupo foi anestesiado com CO₂ e transferidos para placas de petri de vidro que ficou sobre gelo triturado por 5 a 10 min. As fêmeas ingurgitadas foram separadas e colocadas em copos plásticos até o momento das análises e as fêmeas que não se alimentaram, ou se alimentaram pouco, foram descartadas em etanol 70%, autoclavadas e descartadas no lixo de materiais biológicos.

3.4 Susceptibilidade das linhagens de laboratório aos flavivírus DENV-2 e ZIKV^{BR}

Quatorze dias após a alimentação sanguínea contendo os vírus, os mosquitos das linhagens HIGGS, RED e ROCK foram anestesiados, transferidos a uma placa de petri de vidro que foi posteriormente submersa em gelo triturado. Os mosquitos foram colocados individualmente em tubos de 1,5 mL, congelados em gelo seco e armazenados em freezer -80°C até a extração do RNA total utilizando o QIAamp® Viral RNA Mini Kit (Qiagen) de acordo com o manual do fabricante.

A análise da susceptibilidade foi realizada através de uma reação de qRT-PCR utilizando o Power SYBR® Green RNA-to-Ct One-Step Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) com os respectivos iniciadores para DENV-2 e ZIKV^{BR} (tab. 01). Cada RNA total foi analisado em triplicata técnica utilizando o equipamento Mastercycler Realplex 2 Thermocycler (Eppendorf) seguindo as condições de amplificação para DENV-2 (48°C por 30 min, 95°C por 10 min e 45 ciclos de 95°C por 30 seg, 55°C por 30 seg e 60°C por 30 seg) e ZIKV^{BR} (50°C por 30 min, 95°C por 15 min e 45 ciclos de 94°C por 15 seg, 57°C por 25 seg e 72°C por 20 seg), ambos finalizando com a curva de dissociação (*Melting*) (95°C por 1 min, 60°C por 30 seg, um aumento gradativo da temperatura de 6°C até 95°C [0,02°C / seg] e uma finalização de 95°C por 1 min) (COSTA-DA-SILVA et al., 2017a; LANCIOTTI et al., 1992, 2008).

A especificidade do amplicon foi avaliada pelo pico da curva de dissociação (*Melting*) em $79 \pm 1^\circ\text{C}$ para ZIKV^{BR} ou $82,5 \pm 1^\circ\text{C}$ para DENV-2. Cada amostra só foi considerada positiva para o vírus, se 2 ou 3 triplicatas técnica da mesma amostra apresentaram a especificidade do amplicon desejado.

Tabela 01: Sequências e características dos iniciadores para DENV e ZIKV. Fonte: Lanciotti et al., 1992 e Lanciotti et al., 2008.

Iniciadores	Sequência (5' → 3')
D1 TS2	TCAATATGCTGAAACGCGCGAGAAACCG CGCCACAAGGGCCATGAACAG
ZIKV 835 ZIKV 911c	TTGGTCATGATACTGCTGATTGC CCTTCCACAAAGTCCCTATTGC

3.5 Teste de fecundidade das fêmeas infectadas com DENV-2 ou ZIKV^{BR} em 3 ciclos gonotróficos consecutivos

No terceiro dia após o repasto sanguíneo contendo ou não as partículas DENV-2 ou ZIKV^{BR} (grupos controle e infectados, respectivamente), as fêmeas ingurgitadas previamente separadas foram colocadas em placas de oviposição para coleta dos ovos, denominadas Oviplacas (fig. 7), seguindo os métodos descritos em Ioshino e colaboradores (2018) (fig. 8). Essas foram mantidas no insetário de segurança (BSL-2) por 24 horas e, após esse período, as fêmeas foram anestesiadas no gelo, retiradas das placas, colocadas em um copo plástico e fechados com filó até a próxima alimentação sanguínea (IOSHINO et al., 2018). Os ovos depositados no papel filtro referente ao primeiro ciclo gonotrófico (1^oCG) foram contados utilizando um contador manual (FisherbrandTM) e um estereomicroscópio EZ4 (Leica).



Figura 07: Modelo de oviplaca utilizada para realizar a contagem de ovos nos 3 CG dos mosquitos *Ae. aegypti*. Cada poço contém um papel filtro embebido com água. Fonte: IOSHINO et al., 2018a.

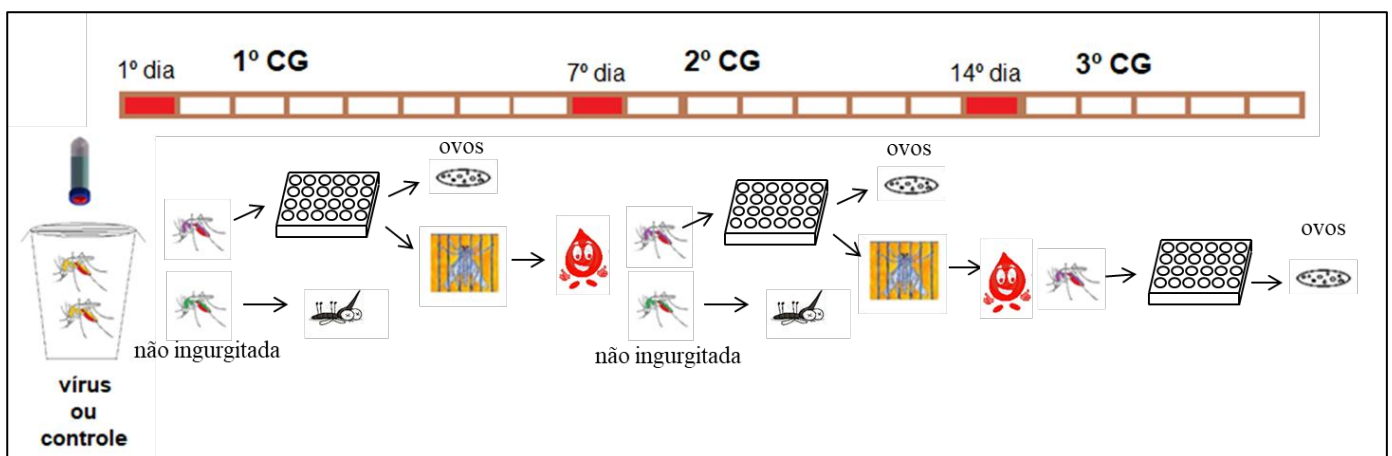


Figura 08: Esquema da metodologia utilizada para obter o número de ovos depositados pelas fêmeas de *Ae. aegypti* nos 3 diferentes ciclos gonotróficos. Fonte: IOSHINO (2018b).

Após uma e duas semanas do primeiro repasto sanguíneo, as fêmeas realizaram novas alimentações em camundongos BALB/C sadios e após 3 dias foram novamente colocadas nas Oviplacas para a postura individual. O número de ovos do segundo e terceiro ciclos gonotrófico (2° e 3° CG) também foram contabilizados (fig. 8). Os resultados foram obtidos a partir de quatro experimentos biológicos independentes.

Para todos os experimentos, 10 fêmeas expostas ao ZIKV^{BR} ou DENV-2 foram separadas e analisadas seguindo a metodologia descrita no item 3.4, para confirmar a infecção pelos vírus.

3.5.1 Análises estatísticas da fecundidade nos 3 ciclos gonotróficos

A análise estatística da fecundidade das fêmeas foi realizada utilizando o GraphPad Prism (version 5.00) for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA) através do teste Mann Whitney - não paramétrico ($P < 0,05$, IC 95%).

3.6 Análise dos ovários

3.6.1 Dissecando os ovários

Após 12 e 24 horas dos repastos sanguíneos controle ou infectados (DENV-2 ou ZIKV^{BR}) nos três CG, as fêmeas foram anestesiadas e mantidas em placas de petri resfriadas em gelo triturado. Cinco pares de ovários de cada grupo foram dissecados em solução tampão de PBS 1x (NaHPO₄ 7 mM, NaH₂PO₄ 2 mM, pH 7,0 contendo NaCl 140 mM), macerados em 200 µL de reagente Trizol (Invitrogen) e congelados a -80°C até o momento da extração do RNA total desses tecidos.

Nos intervalos entre o 1°, 2° e 3° CG, as fêmeas que não foram utilizadas para a dissecação dos ovários foram submetidas a oviposição em copos plásticos contendo água e um papel filtro. Após o depósito dos ovos, as fêmeas estavam aptas a realizar um novo repasto sanguíneo para desenvolver o ovos do 2° ou 3° CG (fig. 9).

Foram analisados ovários obtidos em 3 experimentos biológicos.

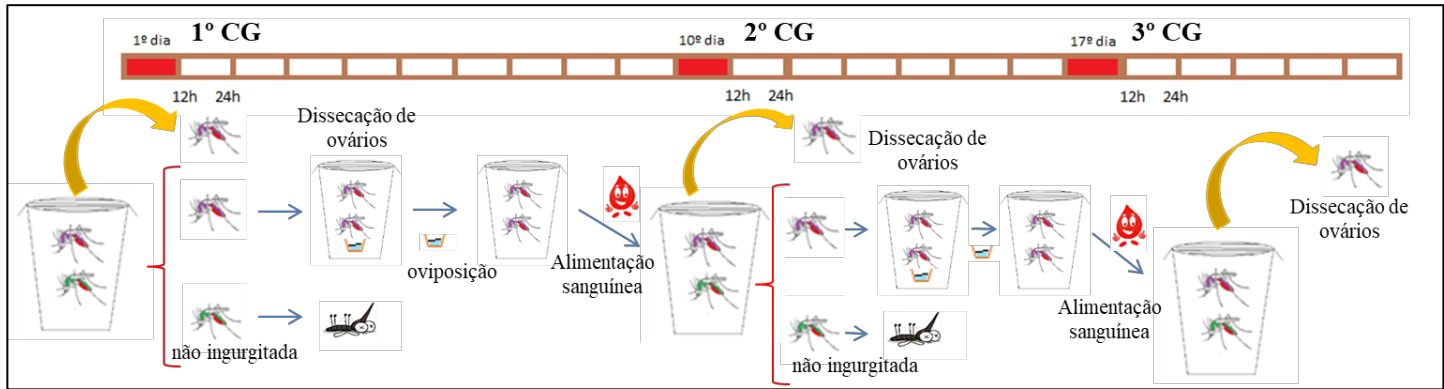


Figura 09: Esquema da metodologia utilizada para obter os ovários saudáveis e infectados das fêmeas de *Ae. aegypti* nos 3 diferentes ciclos gonotróficos. Fonte: IOSHINO (2018b).

3.6.2 Extração do RNA total dos ovários

O pool de 5 ovários previamente armazenados no reagente Trizol foram descongelados e o RNA total foi extraído utilizando o Kit Direct-zol™ RNA MiniPrep (Zymo Research) de acordo com o protocolo do fabricante. Ao final da extração, o RNA total foi quantificado no equipamento Nanodrop® 2000 (Thermo – Scientific, Waltham, MA, USA) e armazenado no freezer (- 80 °C) até o tratamento com DNase I e síntese do DNA complementar (cDNA).

3.6.3 Tratamento do RNA total com a DNase I e síntese do cDNA

Quinhentos nanogramas do RNA total de cada amostra de interesse foi tratado com a DNase I AMP Grade RNase free (Invitrogen) e em seguida foi feita a síntese do cDNA de acordo com os manuais dos fabricantes. Os 20 µL finais de cDNAs foram diluídos com H₂O DEPC (1:4) e mantidos em freezer - 20°C até o momento da análise por qPCR.

Para confirmar a descontaminação por essa enzima, os cDNAs foram analisados através do PCR convencional utilizando os iniciadores (tab. 2) que caracterizam o gene constitutivo PR49 (proteína ribossômica) que amplificam fragmentos de 249 pb (cDNA) ou 900 pb (DNA) dependendo do molde utilizado (AZEVEDO, 2014).

Tabela 02: Sequências dos iniciadores para amplificação do gene constitutivo RP49. Fonte: AZEVEDO (2014).

Iniciadores	Sequência (5' - 3')
RP49 F	CCAAGATCGTCAAGAAGCGG
RP49 R	GGTTGGTCACAGCGATGG

Para amplificar os fragmentos correspondentes, uma reação para 25 μL de volume final (1U de Taq DNA polimerase (Invitrogen), Tris-HCl 20 mM pH 8,4, KCl 50 mM, Mg^{++} 0,2 mM, 0,4 μM de cada iniciador, 1 μL RNA total e água DEPC q.s.p.) foi montada e analisada no termociclador Biometra® (Biometra, Rudolf-Wissel, Goettingen, Alemanha) seguindo uma ciclagem de 94°C por 2 min e 30 ciclos de 94°C por 1 min, 60°C por 30 seg e 72°C por 1 min e uma extensão final de 72 °C por 10 min.

3.6.4 Análise dos genes

3.6.4.1 Teste dos iniciadores

Com o intuito de determinar se os iniciadores estavam amplificando o fragmento de DRONC, CASP7, CASP16, IAP1, ATG4A, ATG8 e ATG12 correspondente, uma reação de PCR utilizando os diferentes pares de iniciadores (tab. 3) foi preparada com 1U de Taq DNA polimerase (Invitrogen), Tris-HCl 20 mM pH 8,4, KCl 50 mM, Mg^{++} 0,2 mM, 0,4 μM de cada iniciador, 1 μL de cDNA e água DEPC q.s.p. para 20 μL de reação total. Como molde para todas as reações foi utilizado um cDNA de mosquito da linhagem ROCK.

A amplificação dos produtos foi realizada no termociclador Biometra® (Biometra, Rudolf-Wissel, Goettingen, Alemanha) seguindo uma ciclagem de 95°C por 2 min e 40 ciclos de 95°C por 10 seg, 60°C por 15 seg e 72°C por 20 seg e uma extensão final de 72 °C por 7 min.

Os produtos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo e visualizado sob luz ultravioleta no equipamento InGenius 3.3 MP, Syngene, Frederick, USA.

Tabela 03: Sequências dos iniciadores para amplificação do genes DRONC, CASP7, CASP16, IAP1, ATG4A, ATG8 e ATG12. Fonte: OCAMPO et al., 2013 e ENG et al., 2016.

Gene	Iniciadores	Sequência (5' - 3')	Tamanho do fragmento (pb)
AeDronc	Dronc F Dronc R	CAACTTTCCAAGTGCCTATAAATTGC CTCCACCGTATCGTTATTGTTCTTAG	241
AeCasp-7	Casp7 F Casp7 R	CCAACATGGCAAGAAGTACG TTCTGCTGGTGCATCATAGG	110
AeCasp-16	Casp16 F Casp16 R	TCCGCTATCTTCATATTGTATCCTTTG GACCCGCCACTGTATCTCTG	166
AeIAP1	IAP F IAP R	CTGAAACTAATGAAGGGCGAAGC TTGAGATGACTGAAGCGAGGATG	147
ATG4A	ATG4 F ATG4 R	CCGAAGCATTGCTGTACTT CGGAAAGTTCTCCTGGTTGA	107
ATG8	ATG8 F ATG8 R	GTGAGCAAGCGTCAAATCTC GGATACAGTCCGCCGATAAA	150
ATG12	ATG12 F ATG12 R	ATTCTCCATGCAACGGGTAG TATCTGATCTGGCGATGGTG	173

3.6.4.2 Nível de expressão dos genes

Para analisar o nível de expressão dos genes envolvidos na apoptose e autofagia (DRONC, CASP7, CASP16, IAP1, ATG4A, ATG8 e ATG12), uma reação de volume final de 20 µL contendo 5 µL de cDNA diluído (item 3.6.3) foi analisado através do kit Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) com os respectivos iniciadores de interesse (tab. 3). Como molde foram utilizados os cDNAs dos ovários 12 e 24 horas após o repasto sanguíneo sadio ou infectado (ZIKV^{BR} ou DENV-2) dos 3 CG dos mosquitos *Ae. aegypti* sintetizados conforme o Item 3.6.3. Como gene constitutivo, foi analisado o acúmulo de transcritos da proteína ribossômica RPS7, de acordo com a metodologia descrita por Calkins e Piermarini (2015). Esse gene foi selecionado, pois apresentou uma expressão constante nos ovários e ele tem a função de normalizar as diferenças na quantidade de RNA inicial, devido a possíveis variações na síntese do cDNA. Cada amostra da triplicata biológica foi avaliada em 3 réplicas técnicas.

A amplificação dos produtos foi feita no equipamento Mastercycler® ep Realplex (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) utilizando uma ciclagem de 95°C por 2 min e 40 ciclos de 95°C por 10 seg, 60°C por 15 seg e 72°C por 20 seg e finalizando com a curva de dissociação (*Melting*) (95°C por 15 seg, 60°C por 15 seg, um aumento gradativo de 60°C a 95°C [0,02°C/seg] e 95°C por 15 seg). A análise da expressão dos genes foi feita através do método do delta-delta-Ct, seguindo a metodologia descrita por Livak et al., 2001.

3.6.4.2.1 Análises estatísticas dos níveis de expressão gênica nos ovários de *Ae. aegypti*

As análises estatísticas do nível de expressão gênica foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism (version 5.00) para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA). Para as análises dos genes com triplicata biológica (IAP1, DRONC, CASP7, CASP16 e ATG4A) o teste utilizado foi o Teste t – pareado – paramétrico ($P < 0,05$, 95% IC). Já para os genes analisados em uma duplicata biológica (ATG8 e ATG12), o teste utilizado foi o Mann Whitney – não paramétrico ($P < 0,05$, 95% IC).

3.7 Transmissão venérea do ZIKV^{BR}

3.7.1 Infecção e análise dos mosquitos *Ae. aegypti* macho pelo ZIKV^{BR}

Para verificar se os mosquitos macho adquirem o vírus através da cópula, fêmeas foram infectadas com o ZIKV^{BR}, seguindo a metodologia descrita no item 3.3, e após 7 (grupo A) e 14 (grupo B) dias após a alimentação sanguínea infectada (dpi), machos sadios (com 5 – 7 dias de emersão) foram adicionados aos copos das fêmeas infectadas (na proporção de 1:1) e tiveram a oportunidade de copular por 7 dias. Ao final desse período, 10 machos foram anestesiados em CO₂, aliqüotados individualmente em tubos de 1,5 mL e congelados no freezer -80°C até a extração do RNA total (fig. 10).

Com o intuito de confirmar a infecção pelo ZIKV^{BR} das fêmeas 7 e 14 dpi, 10 fêmeas expostas ao ZIKV^{BR} foram separadas individualmente em tubos de 1,5 mL e analisadas de acordo com a metodologia descrita no item 3.4.

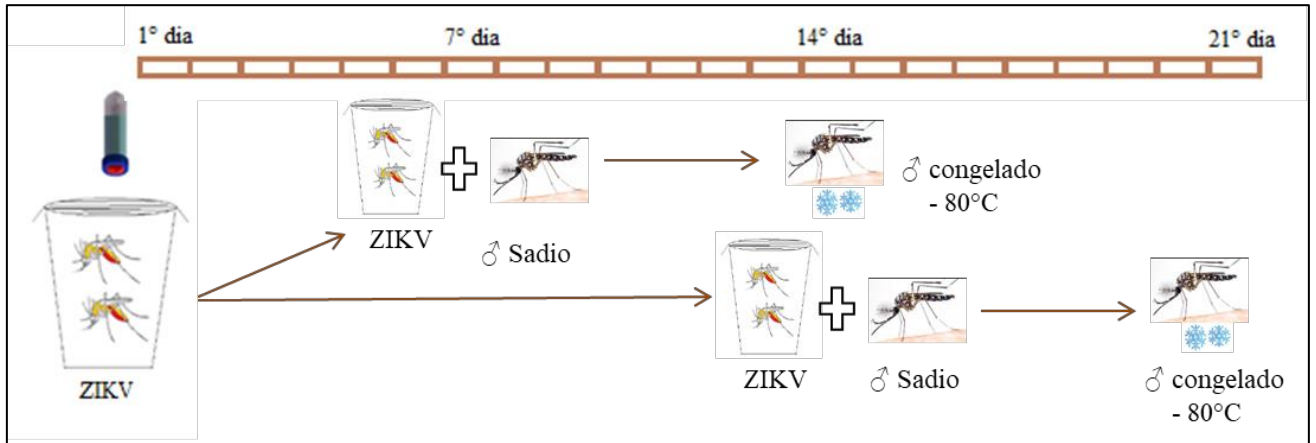


Figura 10: Esquema da metodologia utilizada para obter os machos de *Ae. aegypti* infectados pelo ZIKV^{BR}.
Fonte: IOSHINO (2018b).

Para verificar se os mosquitos machos possuíam RNA viral para ZIKV^{BR}, 10 machos (corpo inteiro) dos grupos A ou B foram individualmente analisados pelo qRT-PCR seguindo os procedimentos do item 3.4. A análise da transmissão venérea do ZIKV^{BR} para machos sadios foi realizada em 2 experimentos biológicos independentes (EXP 1 e EXP 2).

Para quantificar o número de cópias de RNA de ZIKV^{BR} presentes na região do abdômen (região onde se encontra o aparelho reprodutivo) dos mosquitos machos, cinco abdomens foram separados do restante do corpo do inseto e a análise, através do qRT-PCR, foi realizada seguindo a metodologia descrita no item 3.4, porém adicionando uma curva padrão formada por sete diluições seriadas de um plasmídeo linearizado contendo um fragmento de 76 pb (amplificado com os iniciadores ZIKV 911c e ZIKV 835) do ZIKV^{BR}. As sete diluições seriadas variam de 10^{-11} a 10^{-17} g, sendo que o limite de detecção foi de 2,3 partículas virais (10^{-17} g). A quantificação viral foi realizada em apenas um experimento biológico.

Os machos (corpo inteiro) que não apresentaram a especificidade do amplicon com o pico da curva de Melting em $79 \pm 1^\circ\text{C}$ nas duas réplicas experimentais, foram considerados negativos para o ZIKV^{BR}.

3.7.2 Análise da presença de vírus infectivo nos machos

3.7.2.1 Preparo das amostras

Para observar a presença de ZIKV^{BR} infectivo no abdômen dos machos potencialmente infectados, metade do abdômen (porção final com as genitálias masculinas) de 10 machos que copularam com fêmeas 7 dpi (grupo A) ou 10 machos que copularam com fêmeas 14 dpi (grupo B) foram adicionados a 1 mL de meio de cultura DEMEN, homogeneizados com o auxílio de um pistilo, incubados por 30 min em temperatura ambiente e, ao final, congelados em nitrogênio líquido (10 a 15 seg). Os tubos contendo as amostras foram congeladas no freezer -80°C até o momento do isolamento viral em cultura celular.

3.7.2.2 Isolamento viral em cultivo celular

O volume de 1 mL da alíquota contendo os abdômens dos mosquitos machos (grupos A ou B) preparados no item anterior, foram descongelados, macerados no equipamento TissueLyzer® (Roche) e inoculados em garrafas de cultivo celular de 25 cm³ com tapete confluyente (~ 90%) de células VERO-E6 linhagem CCL-81. Após 1h de adsorção em estufa a 37°C com 5% de CO₂ as garrafas foram completadas com 4 mL de meio para cultivo celular DMEM (Dulbeco MEM Alta glicose, Vitrocel®) contendo 2% de soro fetal bovino (Vitrocel®) e 1% de solução de antibiótico e antifúngico (Hyclone®). As garrafas foram incubadas a 37°C com 5% de CO₂ e a cada 48h a integridade do tapete celular foi observada em microscópio ótico. Após 7 dias o tapete celular infectado foi coletado e submetido a PCR Quantitativo em Tempo Real (qRT-PCR) para determinação de crescimento viral.

3.7.2.3 Extração do RNA total do tapete celular exposto aos abdomens dos machos dos grupos A ou B e análise molecular para ZIKV^{BR}

O RNA total do tapete celular foi extraído em extrator automático NucliSENS® easyMag® (BioMerieux, Lyon, France) e submetido ao qRT-PCR de acordo com protocolo citado no item 3.4 (LANCIOTTI et al., 2008). Para a reação de PCR, 5 µL do RNA extraído foi adicionado a 1 µL de uma mistura de *primers* (tab. 1) e sonda (10 pM / 1 µL de cada) e 19 µL da solução da reação

utilizando o AgPath-ID One-Step RT-PCR Kit (Applied Biosystems Inc., EUA) conforme as instruções do fabricante.

3.7.3 Transmissão do ZIKV^{BR} de machos para fêmeas sadias

Machos infectados por ZIKV^{BR} dos grupos A ou B foram colocados para copular com fêmeas sadias (com 5 – 7 dias de emergência) por um período de 7 dias. Após esse intervalo, as fêmeas foram anestesiadas, colocadas individualmente em tubos 1,5 mL e congeladas -80°C até o momento da extração do RNA viral conforme descrito no item 3.4 (fig. 11).

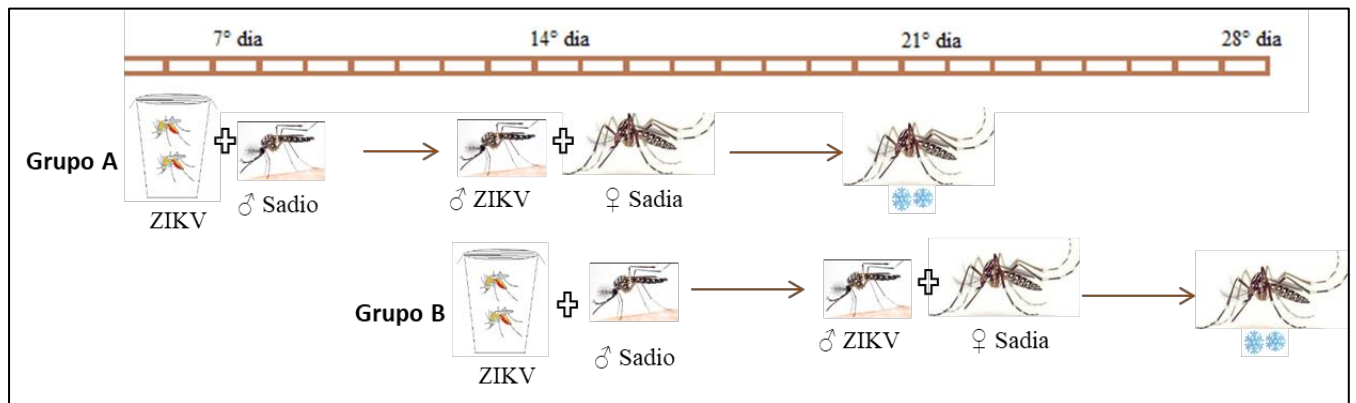


Figura 11: Esquema da metodologia utilizada para confirmar que fêmeas sadias podem se infectar com ZIKV^{BR} após copular com machos infectados. Fonte: IOSHINO (2018b).

Para verificar se as fêmeas possuíam RNA viral de ZIKV^{BR}, 10 fêmeas dos grupos A ou B foram individualmente analisados pelo qRT-PCR nos mesmos procedimentos citados no item 3.4. Essa análise da transmissão sexual de foi realizada em 2 experimentos biológicos independentes (EXP 1 e EXP 2).

4 Resultados

4.1 Susceptibilidade dos mosquitos *Ae. aegypti* aos vírus DENV-2 ou ZIKV^{BR}

As linhagens de laboratório RED, HIGGS e ROCK de *Ae. aegypti* foram testadas em laboratório para determinar a taxa de susceptibilidade aos vírus DENV-2 e ZIKV^{BR}. As análises mostraram que a taxa de infecção de HIGGS, ROCK e RED com o DENV-2 é de 40, 90 e 80%, respectivamente. Durante a infecção pelo vírus ZIKV^{BR}, a susceptibilidade da linhagem HIGGS também foi a menor. Apenas 65% dos mosquitos foram positivos no 14º dia após a infecção pelo vírus, enquanto os mosquitos RED e ROCK apresentaram uma positividade de 95%. Os dados referentes a susceptibilidade das linhagens citadas pelo ZIKV^{BR}, foram recentemente publicados pelo nosso laboratório de minha co-autoria (COSTA-DA-SILVA et al., 2017a).

Diante dos resultados obtidos, a linhagem selecionada para desenvolver esse estudo foi a ROCK, pois a taxa de susceptibilidade para DENV-2 e ZIKV^{BR} foi, respectivamente, de 90 e 95%.

4.2 Fecundidade das fêmeas infectadas por DENV-2 ou ZIKV^{BR} nos 3 ciclos gonotróficos

Ao analisar o número de ovos depositados por fêmeas nos três CG (item 3.5), foi possível observar que após se alimentarem artificialmente com sangue sadio ou infectados (1º CG), não houve diferença no número de ovos entre os grupos controle, DENV-2 e ZIKV^{BR} (tab. 4) e a média de ovos depositados por essas fêmeas foi de 67,9, 66,9 e 67,2 ovos, respectivamente. Por outro lado, a média do número de ovos depositados por fêmeas infectadas pelos vírus foi menor do que o do grupo controle nos 2º e 3º CG (tab. 4).

As fêmeas que se alimentaram com o ZIKV^{BR} apresentaram uma redução de 17,2% da fecundidade. Já as que se alimentaram com DENV-2 apresentaram uma queda de 6,1% no 2º CG (tab. 4). Por fim, no último CG analisado (3º) foi possível notar que houve uma redução de 13 e 18,2% da fecundidade quando infectados por ZIKV^{BR} ou DENV-2, respectivamente (tab. 4).

Análises estatísticas mostram que no 1º CG não houve uma diferença significativa ($P > 0,05$) entre a média do número de ovos depositados por fêmeas do grupo controle e infectados por ZIKV^{BR} ou DENV-2 (fig. 12). Por outro lado, no 2º CG, houve uma redução significativa ($P = 0,0154$) entre a média do número de ovos do grupo controle e infectado por ZIKV^{BR} (fig. 12). Por fim, no 3º CG, há uma diferença significativa ($P = 0,0063$) apenas entre o grupo controle e infectado pelo DENV-2 (fig. 12).

Tabela 04: Média do número de ovos depositados por fêmeas sadias (CTR) e infectadas por ZIKV^{BR} ou DENV-2 e suas respectivas taxas de redução da fecundidade nos 3 ciclos gonotróficos do *Ae. aegypti* (ROCK) comparadas ao grupo CTR. Fonte: IOSHINO (2018b).

	Média de ovos / fêmea			Taxa de redução	
	CTR	ZIKV ^{BR}	DENV-2	ZIKV ^{BR}	DENV-2
1º CG	67,9	66,9	67,2	1,4%	1,0%
2º CG	112,9	93,5	106	17,2%	6,1%
3º CG	110,7	96,5	90,6	13,0%	18,2%

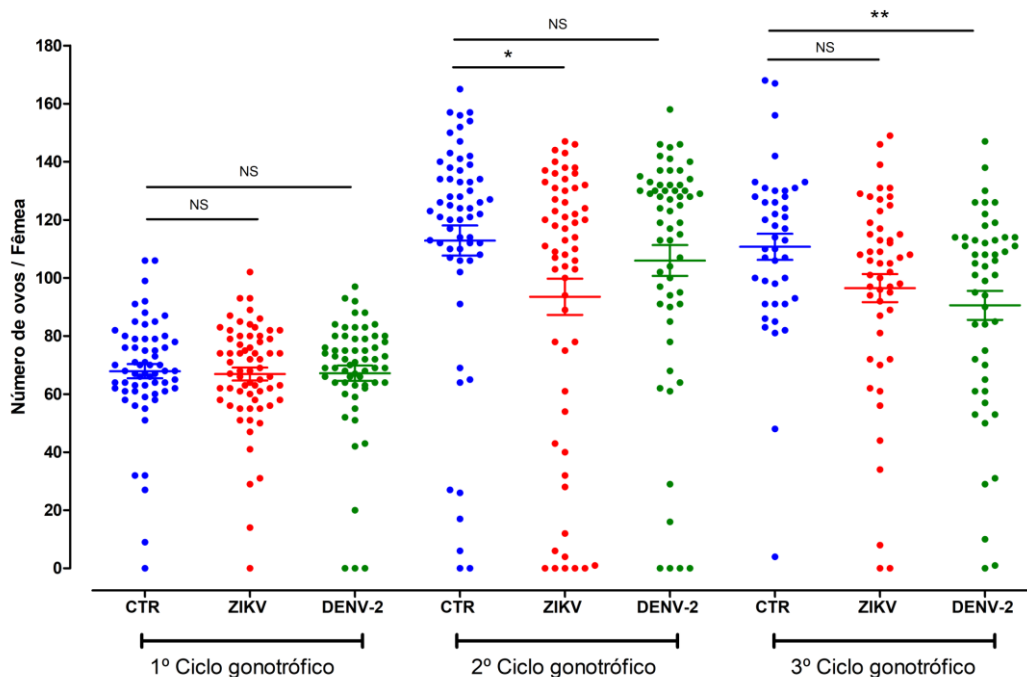


Figura 12: Número de ovos depositados por fêmeas de *Ae. aegypti* sadias (CTR) ou infectadas por ZIKV^{BR} ou DENV-2 no 1º, 2º e 3º ciclos gonotrófico em uma quadruplicata biológica contendo aproximadamente 60, 60 e 45 mosquitos, respectivamente. Os testes estatísticos mostraram que não há diferença significativa (NS) entre os grupos CTR e infectados (ZIKV ou DENV-2) no 1º CG ($P > 0,05$), porém no 2º CG, há uma redução significativa da média do número de ovos depositados pelas fêmeas infectadas por ZIKV^{BR} quando comparada ao grupo CTR (*, $P = 0,0154$). Já no 3º CG, há uma diferença significativa na média do número de ovos entre os grupos CTR e DENV-2 (**, $P = 0,0063$) (teste não-paramétrico Kruskal-Wallis seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunn's, $P < 0,05$, 95% IC, média com SEM). Fonte: IOSHINO (2018b).

4.3 Teste dos iniciadores correspondentes aos genes DRONC, CASP7, CASP16, IAP1, ATG4A, ATG8 e ATG12

Para determinar se há uma correlação entre a infecção pelos vírus ZIKV^{BR} ou DENV-2 e a modulação dos genes DRONC, CASP7, CASP16, IAP1, ATG4A, ATG8 e ATG12 nos ovários das fêmeas *Ae. aegypti*, foram feitos os testes dos iniciadores para os respectivos genes de interesse citados.

Foi observado que todos os iniciadores amplificaram os fragmentos esperados para cada gene, exceto para o DREDD (fig. 13). A análise mostra que DRONC, CASP7, CASP16, IAP1, ATG4A, ATG8 e ATG12 amplificaram fragmentos que correspondem, respectivamente, a 241, 110, 166, 147, 107, 150 e 173 pb, de acordo com o esperado (fig. 13) (OCAMPO et al., 2013; ENG et al., 2016).

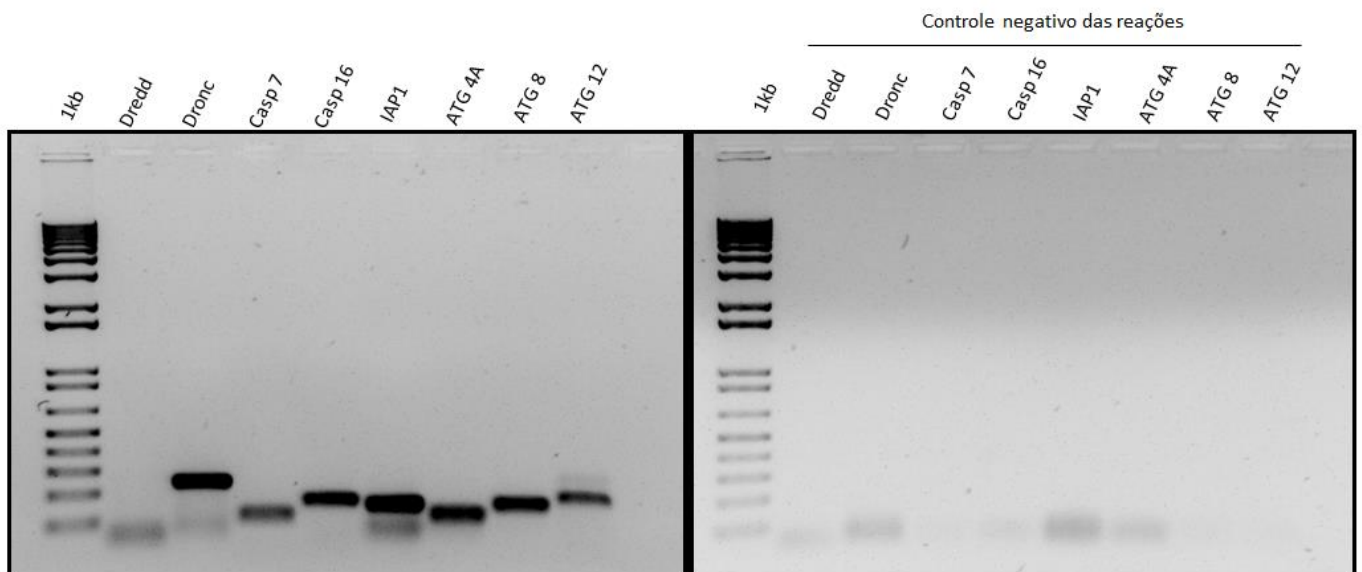


Figura 13: Eletroforese em gel de agarose (1,0%) com os produtos amplificados dos genes DRONC, CASP7, CASP16, IAP1, ATG4A, ATG8 e ATG12 corados com brometo de etídeo, utilizando como molde cDNA sintetizado a partir do RNA total de um mosquito do *Ae. aegypti* (ROCK). Para cada uma das reações, foi feito um controle negativo sendo o molde de cDNA substituído por H₂O DEPC. Fonte: IOSHINO (2018b).

4.4 Expressão dos genes envolvidos na modulação da via de morte celular nos ovários de fêmeas expostas aos DENV-2 ou ZIKV^{BR}

4.4.1 Primeiro ciclo gonotrófico

Os ovários das fêmeas que se alimentaram com sangue contendo partículas de ZIKV^{BR} ou DENV-2, apresentaram uma diferença na expressão dos genes relacionados à apoptose e autofagia.

Durante as 12 primeiras horas após o repasto sanguíneo contendo partículas de ZIKV^{BR}, todos os genes relacionados à morte celular por apoptose apresentaram-se reduzidos quando comparado ao grupo controle. Dentre os genes analisados, a CASP16 foi a que se mostrou mais reduzida quando comparada aos genes IAP1, DRONC e CASP7 (fig. 14). Por outro lado, após 24h da alimentação sanguínea, há uma alteração do perfil de expressão desses mesmos genes e todos os genes apoptóticos apresentaram um aumento do nível de expressão quando comparados aos seus respectivos controles (fig. 14).

Dentre os genes apoptóticos analisados nos ovários da fêmeas expostas ao ZIKV^{BR} no período de 12 e 24h, três genes apresentaram um aumento significativo: DRONC (P = 0,0377), CASP7 (P = 0,0321) e CASP16 (P = 0,0005) (fig. 14).

Ao analisar os genes nos ovários de fêmeas de *Ae. aegypti* alimentadas com partículas de DENV-2, observamos que após 12 horas, os genes envolvidos na apoptose apresentam variação quanto ao nível de expressão. Enquanto que IAP1 e DRONC se mostram reduzidos, os genes CASP7 e CASP16 estão aumentados quando comparado ao grupo controle (fig. 14). Por outro lado, 24 horas após o repasto sanguíneo, todos os genes envolvidos na apoptose estão com o nível de expressão gênica igual ou aumentados quando comparados ao grupo controle (fig. 14). Apesar do gene CASP16 se mostrar aumentado em ambos os tempos analisados, é possível observar que no intervalo de 12 horas houve uma redução do nível de expressão desse gene. Todos os genes apoptóticos analisados durante a infecção por DENV-2 não apresentaram níveis de expressão gênica com diferença significativa entre 12 e 24 horas (fig. 14).

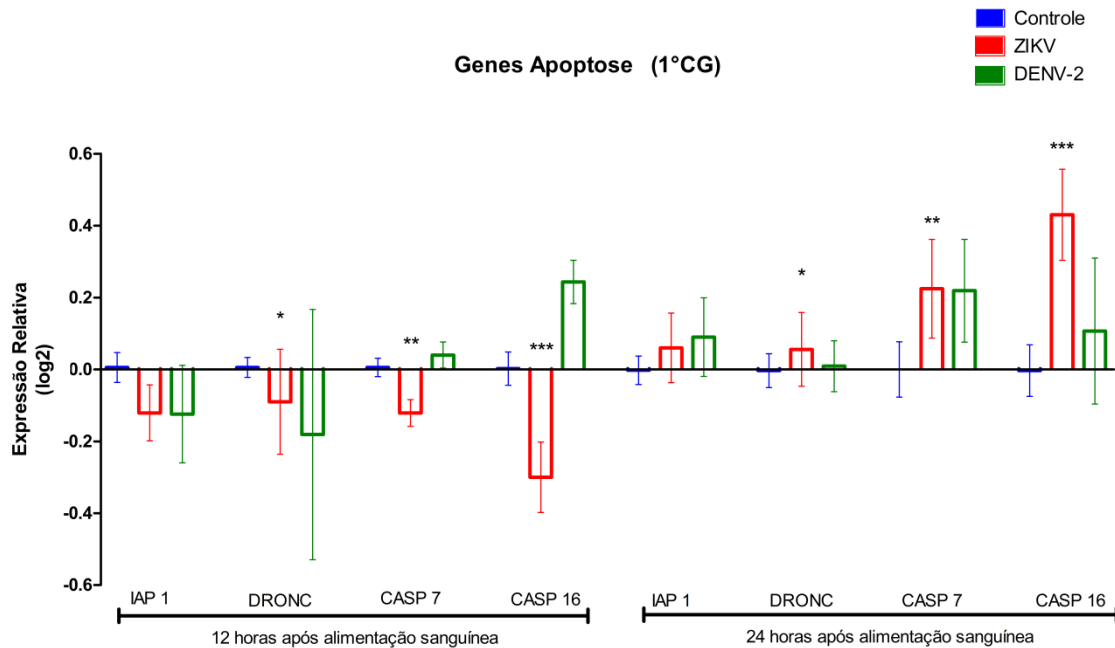


Figura 14: Nível de expressão relativa (delta-delta ct) dos genes relacionados a morte celular por apoptose (IAP1, CASP7, CASP16 e DRONC) em ovários de fêmeas sadias (CTR) e infectadas por ZIKV^{BR} ou DENV-2, 12 e 24 horas após a alimentação sanguínea no 1° CG do mosquito *Ae. aegypti*. As barras representam os dados obtidos em uma triplicata biológica e cada amostra foi analisada em 3 replicatas técnicas e os valores de expressão normalizados com o RPS7 (Teste paired t - paramétrico, 95% IC, média com SEM). *, P = 0,0377 (DRONC, ZIKV^{BR} 12h vs ZIKV^{BR} 24h); **, P = 0,0321 (CASP7, ZIKV^{BR} 12h vs ZIKV^{BR} 24h); ***, P = 0,0005 (CASP16, ZIKV^{BR} 12h vs ZIKV^{BR} 24h). Fonte: IOSHINO (2018b).

Ao analisar os genes envolvidos na autofagia durante a exposição pelo ZIKV^{BR}, observa-se que 12 horas após a alimentação sanguínea infectada, o ATG4A e ATG8 estão com os níveis de expressão relativa reduzidos e apenas o ATG12 está aumentado (fig. 15). No período de 24 horas após o repasto contendo partículas de ZIKV^{BR}, o ATG4A continua reduzido, porém há um aumento da expressão dos ATG8 e ATG12, sendo que o aumento da expressão relativa do ATG8 foi significativo (P = 0,0260) entre o intervalo de 12 e 24h (Fig. 15). De uma forma geral, nota-se que no período de 12 horas após a alimentação contendo as partículas virais (ZIKV^{BR}) há um aumento do nível de expressão dos genes envolvidos tanto na morte celular por apoptose como por autofagia (fig. 14 e 15).

Por outro lado, os genes relacionados a autofagia nos ovários da fêmeas infectadas por DENV-2 também apresentaram variações nos períodos analisados. Enquanto o ATG8 apresentou um nível de expressão relativa inicialmente (12h após o repasto sanguíneo) reduzido, após 24h da

alimentação infectada houve um aumento desse gene quando comparado aos grupos controles. Já o gene ATG4A se mostrou suprimido nos dois intervalos de tempo (12 e 24h) analisados (fig. 15). Nesses mesmos momentos, foi verificado uma redução da expressão do gene ATG12. Inicialmente esse gene apresentava-se com uma expressão similar ao controle, porém após 12h o ATG12 foi inibido (fig. 15).

Assim como foi observado nos ovários de fêmeas infectadas por ZIKV^{BR}, o gene ATG8 também exibiu uma diferença significativa ($P = 0,0152$) do nível de expressão relativa entre o intervalo de 12 e 24h horas nos ovários das fêmeas que se alimentaram de partículas DENV-2 (fig. 15).

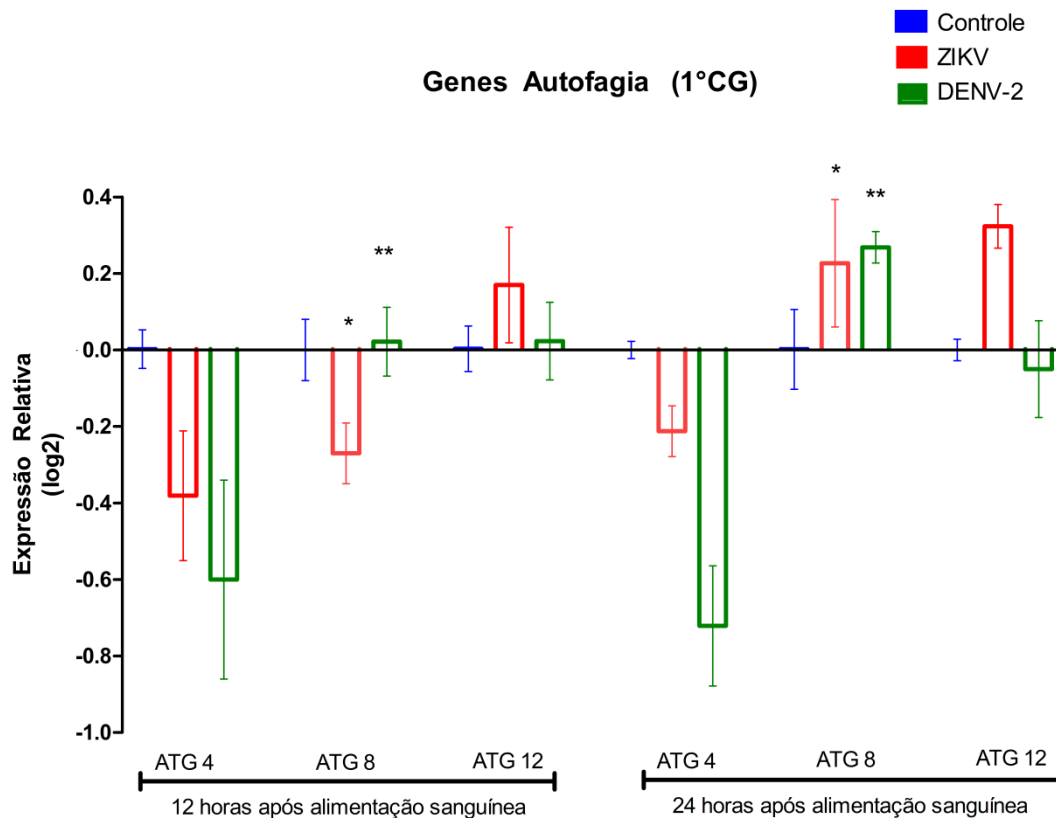


Figura 15: Nível de expressão relativa (delta-delta ct) dos genes relacionados a morte celular por autofagia (ATG4A, ATG8 e ATG12) em ovários de fêmeas sadias (CONTROLE) e infectadas por ZIKV^{BR} ou DENV-2, 12 e 24 horas após a alimentação sanguínea no 1º CG do mosquito *Ae. aegypti*. As barras representam os dados obtidos em uma triplicata biológica e cada amostra foi analisada em 3 replicatas técnicas e os valores de expressão normalizados com o RPS7 (Teste paired t - paramétrico, 95% IC, média com SEM, para ATG4A; teste Mann Whitney, 95% IC, média com SEM, para ATG8 e 12). *, $P = 0,0260$ (ATG8, ZIKV^{BR} 12h vs ZIKV^{BR} 24h). **, $P = 0,0152$ (ATG8, DENV-2 12h vs DENV-2 24h). Fonte: IOSHINO (2018b).

4.4.2 Segundo ciclo gonotrófico

Doze e vinte e quatro horas após a segunda alimentação sanguínea em camundongo sadio, ovários das fêmeas controle e infectadas (ZIKV^{BR} ou DENV-2) foram analisados quanto ao nível de expressão dos mesmos genes citados acima.

Os ovários das fêmeas infectadas pelo ZIKV^{BR} apresentaram uma ativação de todos os genes relacionados à apoptose (IAP1, DRONC, CASP7 e CASP16) 12 horas após a alimentação sanguínea sadia quando comparado aos seus controles (fig. 16). Ao analisar os mesmos genes nos ovários após 24 horas do repasto, observamos que IAP1 e CASP16 continuam aumentados, por outro lado os genes DRONC e CASP7 foram inibidos quando comparados à primeira análise (12h) (fig. 16). De acordo com as análises estatísticas, dentre todos os genes apoptóticos analisados durante a infecção por ZIKV^{BR} no 2º CG, há diferença significativa ($P < 0,05$) do nível de expressão apenas para DRONC ($P = 0,0022$) e CASP7 ($P = 0,0180$) entre o intervalo de 12 a 24h após a alimentação sanguínea (fig. 16).

Para o grupo infectado pelo DENV-2, os genes relacionados à apoptose, IAP1 e CASP7, estão com o nível de expressão gênica aumentado 12h após a alimentação sanguínea. Por outro lado, nesse mesmo período, os genes DRONC e CASP16 se mostraram suprimidos nos ovários das fêmeas de *Ae. aegypti* (fig. 16). Analisando o intervalo de 24h, os genes IAP1, DRONC e CASP7 estão aumentados com relação aos seus respectivos controles e a CASP16, assim como 12h após o repasto sanguíneo, continua reduzida (fig. 16). Apesar das variações dos genes apoptóticos nos ovários das fêmeas infectadas pelo DENV-2, inclusive do gene DRONC que apresentou a maior variação no intervalo de 12h, as diferenças não foram significativas ($P > 0,05$) (fig. 16).

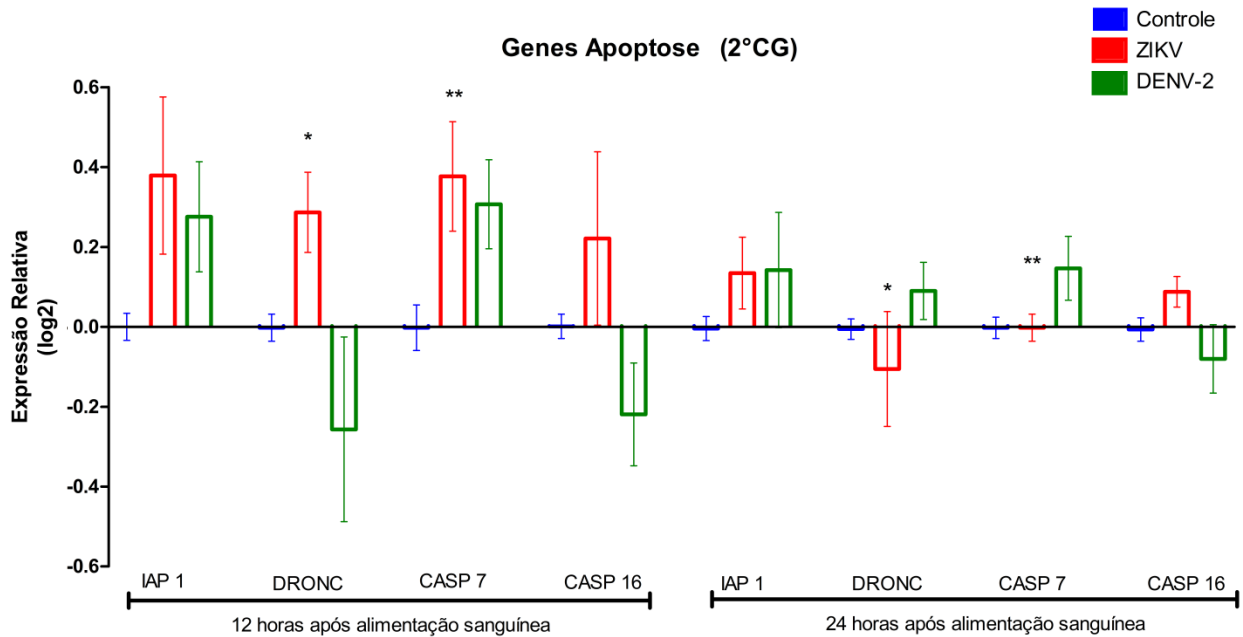


Figura 16: Nível de expressão relativa (delta-delta ct) dos genes relacionados a morte celular por apoptose (IAP1, CASP7, CASP16 e DRONC) em ovários de fêmeas sadias (CONTROLE) e infectadas por ZIKV^{BR} ou DENV-2, 12 e 24 horas após a alimentação sanguínea no 2° CG do mosquito *Ae. aegypti*. As barras representam os dados obtidos em uma triplicata e cada amostra foi analisada em 3 replicatas técnicas e os valores de expressão normalizados com o RPS7 (Teste paired t - paramétrico, 95% IC, média com SEM). *, P = 0,0022 (DRONC, ZIKV^{BR} 12h vs ZIKV^{BR} 24h); **, P = 0,0180 (CASP7, ZIKV^{BR} 12h vs ZIKV^{BR} 24h). Fonte: IOSHINO (2018b).

Para os genes autofágicos analisados, 12h após o repasto, os ovários das fêmeas infectadas pelo ZIKV^{BR} apresentam uma redução do nível de expressão dos genes ATG4A e ATG12 (fig. 17) e um aumento do gene ATG8 (fig. 17). Quando esses mesmos genes são analisados 24 hpbm, observa-se uma inversão do nível de expressão. Àqueles que em 12h estavam reduzidos, neste momento apresentaram-se aumentados como é o caso do ATG4A e ATG12 (fig. 17). Já o gene ATG8 foi inibido neste mesmo intervalo de tempo (fig. 17). Diante dessas alterações na expressão dos genes, somente o ATG4A apresentou diferença significativa (P = 0,0493) entre o intervalo de 12 e 24h (fig. 17).

Durante a infecção por DENV-2, os ovários apresentam uma super expressão dos genes correlacionados a autofagia ATG4A e ATG8, tanto no período de 12 como em 24 hpbm (fig. 17). Enquanto o ATG4A aumentou nesse intervalo de 12 horas, houve uma redução do nível de expressão do ATG8 (fig. 17). Por outro lado, o ATG12, que em 12h estava diminuído, aumentou no

período de 24h quando comparado ao grupo controle (fig. 17). Assim como foi observado nos ovários de fêmeas infectadas por ZIKV^{BR}, durante a infecção DENV-2, somente o ATG4A apresenta uma diferença significativa ($P = 0,0445$) do nível de expressão relativa entre 12 e 24h (fig. 17).

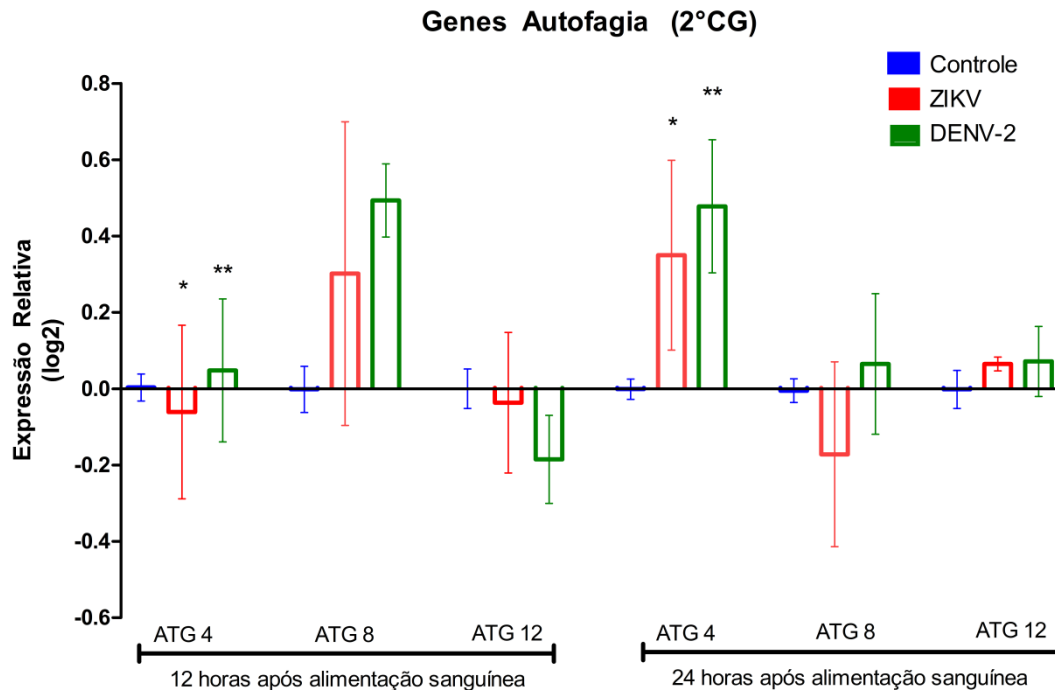


Figura 17: Nível de expressão relativa (delta-delta ct) dos genes relacionados a morte celular por autofagia (ATG4A, ATG8 e ATG12) em ovários de fêmeas sadias (CONTROLE) e infectadas por ZIKV^{BR} ou DENV-2, 12 e 24 horas após a alimentação sanguínea no 2° CG do mosquito *Ae. aegypti*. As barras representam os dados obtidos em uma triplicata biológica e cada amostra foi analisada em 3 replicatas técnicas e os valores de expressão normalizados com o RPS7 (Teste paired t - paramétrico, 95% IC, média com SEM, para ATG4A; teste Mann Whitney, 95% IC, média com SEM, para ATG8 e 12). *, $P = 0,0493$ (ATG4A, ZIKV^{BR} 12h vs ZIKV^{BR} 24h). **, $P = 0,0445$ (ATG4, DENV-2 12h vs DENV-2 24h). Fonte: IOSHINO (2018b).

4.4.3 Terceiro ciclo gonotrófico

No 3° CG, os ovários das fêmeas infectadas pelo ZIKV^{BR} ou DENV-2 apresentaram uma redução do nível de expressão de quase todos os genes relacionados à apoptose e autofagia no intervalo de 12h a 24h.

As análises mostraram que os ovários das fêmeas infectadas por ZIKV^{BR} no tempo de 12h após a alimentação sanguínea sadia, não apresentam alteração no nível de expressão do gene inibidor de apoptose (IAP1). Porém,

nesse mesmo momento, há um aumento dos genes DRONC e CASP7 e uma pequena supressão do gene CASP16 (fig. 18). Por outro lado, após 24h do respasto, o gene inibidor de apoptose (IAP1) e as caspases executoras (CASP7 e CASP16) se mostraram reduzidos quando comparados aos seus controles (fig. 18). Já a caspase iniciadora (DRONC) continua super expressa no tempo de 24h mas, comparando com o intervalo entre 12 e 24h, houve uma redução do nível de expressão (fig. 18). Análises estatísticas mostraram que entre os genes apoptóticos, apenas a supressão do gene IAP1 entre os tempos 12 e 24h apresenta uma diferença significativa ($P = 0,0022$) (fig. 18).

Ao analisar o nível de expressão relativa dos genes envolvidos na apoptose nos ovários de *Ae. aegypti* infectadas por DENV-2, observamos que no tempo de 12 horas, o IAP1 e CASP7 não apresentam diferença na expressão quando comparado aos grupos controles (fig. 18). Por outro lado, a caspase iniciadora (DRONC), assim como em mosquitos com ZIKV, está aumentada e a executora (CASP16) está reduzida (fig. 18). No tempo de 24h, todos os genes apoptóticos estão reduzidos nos ovários, inclusive o DRONC que foi suprimido no intervalo de 12 horas. Os outros genes analisados também estão reduzidos nesse momento: IAP1, CASP7 e CASP16 comparado aos seus respectivos controles. Mesmo com a redução do nível de expressão dos genes entre 12 e 24 horas, não houve diferença significativa na expressão gênica neste intervalo ($P > 0,05$) nos ovários durante a infecção pelo DENV-2.

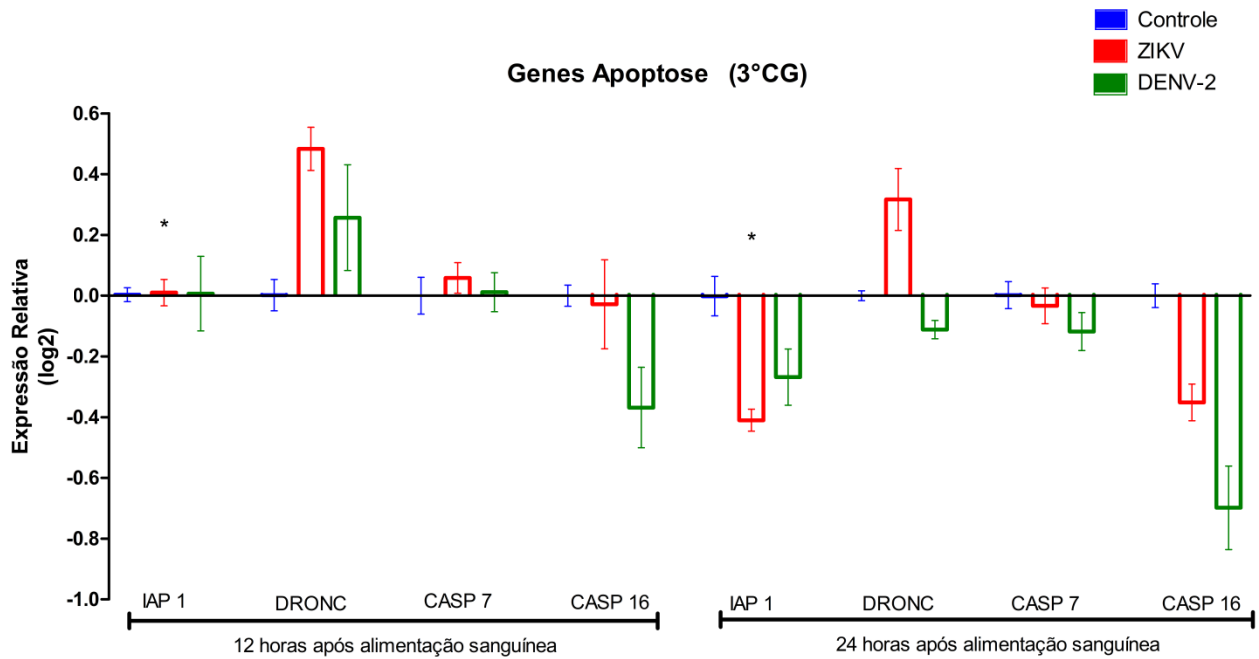


Figura 18: Nível de expressão relativa (delta-delta ct) dos genes relacionados a morte celular por apoptose (IAP1, CASP7, CASP16 e DRONC) em ovários de fêmeas sadias (CONTROLE) e infectadas por ZIKV^{BR} ou DENV-2, 12 e 24 horas após a alimentação sanguínea no 3° CG do mosquito *Ae. aegypti*. As barras representam os dados obtidos em uma triplicata biológica e cada amostra foi analisada em 3 replicatas técnicas e os valores de expressão normalizados com o RPS7 (teste Mann Whitney, 95% IC, média com SEM). *, P = 0,0022 (IAP1, ZIKV^{BR} 12h vs ZIKV^{BR} 24h). Fonte: IOSHINO (2018b).

A expressão dos genes relacionados a autofagia estão reduzidos tanto 12 como 24 hpbm contendo partículas ZIKV^{BR}. Durante as 12 primeiras horas, o gene que se mostrou mais reduzido é o ATG8, seguido do ATG4A e ATG12 (fig. 19). No tempo de 24h, o gene ATG4A continua reduzido na mesma proporção de 12h, porém os ATG8 e 12 apresentam-se menos suprimidos quando comparado aos respectivos grupos controle (fig. 19). Diante desses dados, observamos que o ATG8 aumentou o seu nível de expressão entre o intervalo de 12 e 24h e, dentre os genes autofágicos analisados, esse foi o único que apresentou um aumento significativo durante a infecção pelo ZIKV^{BR} (P = 0,0043) (fig 19).

Durante a infecção DENV, os genes relacionados a autofagia também foram mensurados. Observamos que os genes ATG4A e ATG12 estão inibidos enquanto que o ATG8 está aumentado no tempo de 12h após a alimentação sanguínea (fig. 19). Após 24h dessa mesma alimentação, todos os genes estão suprimidos, sendo que os genes ATG4A e ATG12 reduziram ainda mais o seu nível de expressão (fig. 19). Entre todas as alterações na expressão relativa,

houve uma redução significativa dos genes ATG4A ($P = 0,0247$) e ATG8 ($P = 0,0022$) entre o intervalo de 12 e 24h (fig. 19).

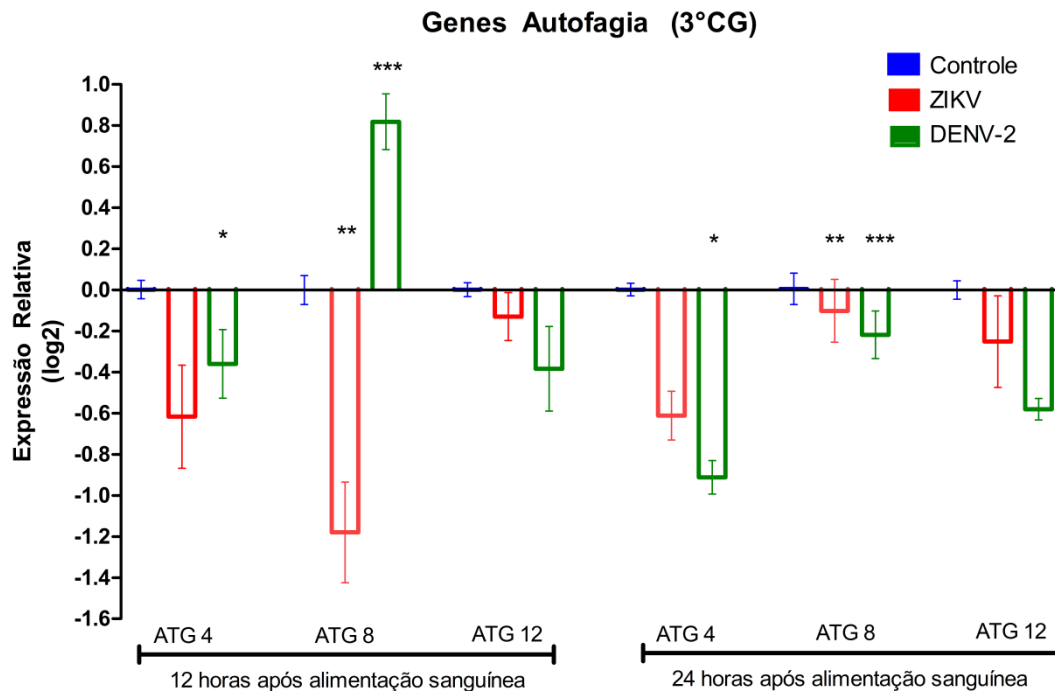


Figura 19: Nível de expressão relativa (delta-delta ct) dos genes relacionados a morte celular por autofagia (ATG4AA, ATG8 e ATG12) em ovários de fêmeas saudáveis (CONTROLE) e infectadas por ZIKV^{BR} ou DENV-2, 12 e 24 horas após a alimentação sanguínea no 3º CG do mosquito *Ae. aegypti*. As barras representam os dados obtidos em uma triplicata biológica e cada amostra foi analisada em 3 replicatas técnicas e os valores de expressão normalizados com o RPS7 (teste Mann Whitney, 95% IC, média com SEM). *, $P = 0,00247$ (ATG4A, DENV-2 12h vs DENV-2 24h); **, $P = 0,0043$ (ATG8, ZIKV^{BR} 12h vs ZIKV^{BR} 24h); ***, $P = 0,0022$ (ATG8, DENV-2 12h vs DENV-2 24h). Fonte: IOSHINO (2018b).

4.5 Transmissão venérea do ZIKV entre fêmeas infectadas e machos de *Ae. aegypti*

4.5.1 Taxa de transmissão venérea do ZIKV em machos

Ao analisar 10 mosquitos machos (corpo inteiro) que copularam com fêmeas com 7 (grupo A) ou 14 (grupo B) dias de infecção (dpi), observamos que 80% (8/10) dos machos copulados com fêmeas 7 dpi (tab. 5) e 80% (8/10) dos machos que copularam com fêmeas 14 dpi (tab. 6) são positivos para RNA do ZIKV^{BR}, com os Cts variando entre 31 e 35.

Tabela 05: Cts (cycle threshold) dos RNAs de *Ae. aegypti* machos que copularam com as fêmeas 7 dpi (grupo A). A verificação da taxa de transmissão venérea foi realizada em uma duplicata biológica (EXP 1 e EXP 2) e cada amostra foi analisada através do qRT-PCR em duas réplicas experimentais. Os Cts e média dos Cts marcados pela cor vermelha, correspondem aos mosquitos negativos pelo pico da curva de dissociação (*Melting*). Fonte: IOSHINO (2018b).

	EXP 1		EXP 2	
	Ct réplica	Média dos Cts	Ct réplica	Média dos Cts
♂ 1	34	34,26	33,67	33,46
	34,51		33,24	
♂ 2	33,5	34,36	35,52	35,74
	35,22		35,97	
♂ 3	33,85	33,81	33,09	33,35
	33,77		33,62	
♂ 4	34,75	34,35	32,87	32,93
	33,95		32,99	
♂ 5	34,29	34,33	34,37	35,16
	34,37		35,95	
C+	10,96	10,95	15,33	15,43
	10,95		15,52	

Tabela 06: Cts (cycle threshold) dos RNAs de *Ae. aegypti* machos que copularam com as fêmeas 14 dpi (grupo B). A verificação da taxa de transmissão venérea foi realizada em uma duplicata biológica (EXP 1 e EXP 2) e cada amostra foi analisada através do qRT-PCR em duas réplicas experimentais. Os Cts e média dos Cts marcados pela cor vermelha, correspondem aos mosquitos negativos pelo pico da curva de dissociação (*Melting*). Fonte: IOSHINO (2018b).

	EXP 1		EXP 2	
	Ct réplica	Média dos Cts	Ct réplica	Média dos Cts
♂ 1	34,77	34,31	32,19	32,22
	33,86		32,25	
♂ 2	33,58	33,76	33,2	33,96
	33,94		34,73	
♂ 3	32,94	32,58	35,44	35,07
	32,22		34,71	
♂ 4	33,76	33,53	35,67	35,74
	33,3		35,8	
♂ 5	31,81	31,92	38,72	...
	32,04		...	
C+	10,96	10,95	15,59	15,6
	10,95		15,61	

A partir do resultado positivo para RNA viral de ZIKV^{BR} em machos copulados com fêmeas previamente infectadas, uma análise do abdômen do

macho (região onde se encontram os órgãos reprodutores masculinos) foi feita para determinar a quantidade de partículas virais presentes nesta região. Dos abdomens analisados, 1/5 (20%) foi positivo para ZIKV^{BR} após a cópula com fêmeas 7dpi (grupo A) (tab. 7), e este apresentou aproximadamente 12 cópias de RNA viral.

Por outro lado, 40% (2/5) dos abdomens dos machos que copularam com fêmeas 14 dpi (grupo B) foram positivos para ZIKV (tab. 7). Neste caso, o número de partículas foi de 25 e 63 cópias de RNA viral por abdômen.

Tabela 07: Cts (cycle threshold) dos RNAs de abdômen de *Ae. aegypti* machos que copularam com as fêmeas 7 (grupo A) ou 14 dpi (grupo B). A taxa de positividade do abdômen foi obtida em um único experimento biológico e cada amostra foi analisada através do qRT-PCR em duas réplicas experimentais. Os Cts e média dos Cts marcados pela cor vermelha, correspondem aos mosquitos negativos pelo pico da curva de dissociação (*Melting*). Fonte: IOSHINO (2018b).

	GRUPO A		GRUPO B	
	Ct réplica	Média dos Cts	Ct réplica	Média dos Cts
♂ 1	36,54	36,93	35,94	...
	37,31		...	
♂ 2	34,34	35,34
	...		36,33	
♂ 3	35,15	35,42	36,47	...
	35,69		...	
♂ 4	35,74	35,95	33,6	33,73
	36,16		33,86	
♂ 5	36,32	35,99	35,71	35,81
	35,66		35,92	
C+	15,33	15,43	15,59	15,6
	15,52		15,61	

4.5.2 Viabilidade do ZIKV^{BR} nos machos sexualmente infectados

Noventa e seis horas após a inoculação das células Vero com o pool de abdomens de machos que copularam com fêmeas 7 (grupo A) ou 14 dpi (grupo B), foram observadas a formação de sincícios e destruição do tapete celular (efeitos citopáticos) nas duas garrafas que receberam os pools de abdomens dos machos do grupo A ou B (dados não mostrados).

Além disso, as análises moleculares (qRT-PCR) do tapete celular foram positivos para o ZIKV^{BR}, pois apresentaram Ct de 21,41 para os abdomens de machos que copularam com fêmeas 7 dpi e Ct 18,14 para os abdomens de machos que copularam com fêmeas 14 dpi.

4.6 Transmissão sexual do ZIKV^{BR} entre machos sexualmente infectados para fêmeas sadias

4.6.1 Taxa de fêmeas sadias que se infectaram após a cópula com machos infectados

Para verificar a taxa de fêmeas infectadas através da cópula, 10 fêmeas inicialmente sadias que copularam com machos infectados por fêmeas 7 (grupo A) e 14 dpi (grupo B) foram analisadas e concluiu-se que 70% (7/10) das fêmeas de ambos os grupos foram positivas para ZIKV^{BR} com Cts variando entre 32 a 36 (tab. 8 e 9).

Tabela 08: Cts (cycle threshold) dos RNAs de *Ae. aegypti* fêmea que copularam com os machos infectados por fêmeas 7 dpi (grupo A). A verificação da taxa de transmissão venérea para fêmea sadia foi realizada em uma duplicata biológica (EXP 1 e EXP 2) e cada amostra foi analisada através do qRT-PCR em duas réplicas experimentais. Os Cts e média dos Cts marcados pela cor vermelha, correspondem aos mosquitos negativos pelo pico da curva de dissociação (*Melting*). Fonte: IOSHINO (2018b).

	EXP 1		EXP 2	
	Ct réplica	Média dos Cts	Ct réplica	Média dos Cts
♀ 1	35,85	35,58	35,21	35,5
	35,32		35,8	
♀ 2	32,96	32,57	35,54	...
	32,17		...	
♀ 3	37,19	37,59	38,35	37,56
	37,98		36,77	
♀ 4	36,08	36,3	35,88	35,57
	36,53		35,26	
♀ 5	37,86	36,79	33,69	33,74
	35,73		33,8	
C+	15,24	15,12	15,33	15,43
	15		15,52	

Tabela 09: Cts (cycle threshold) dos RNAs de *Ae. aegypti* fêmea que copularam com os machos infectados por fêmeas 14 dpi (grupo B). A verificação da taxa de transmissão venérea para fêmea sadia foi realizada em uma duplicata biológica (EXP 1 e EXP 2) e cada amostra foi analisada através do qRT-PCR em duas réplicas experimentais. Os Cts e média dos Cts marcados pela cor vermelha, correspondem aos mosquitos negativos pelo pico da curva de dissociação (*Melting*). Fonte: IOSHINO (2018b).

	EXP 1		EXP 2	
	Ct réplica	Média dos Cts	Ct réplica	Média dos Cts
♀ 1	35	35,57	36,62	35,92
	36,14		35,22	
♀ 2	35,9	36,09	35,3	35,15
	36,27		34,99	
♀ 3	36,11	36,43	36,75	36,15
	36,75		35,54	
♀ 4	36,99	36,7	36,65	...
	36,41		...	
♀ 5	33,22	33,55	33,6	33,11
	33,88		32,62	
C+	15,24	15,12	15,59	15,6
	15		15,61	

Ao observar que o RNA de ZIKV^{BR} foi detectado nas fêmeas que copularam com machos infectados, uma análise do abdômen da fêmea (região onde se encontram os ovários) também foi realizada para determinar a quantidade de partículas virais presentes nesta região. Observou-se que 60% (3/5) dos abdomens das fêmeas que copularam com machos infectados por fêmeas 7 dpi foram positivos para ZIKV (tab. 10) e a quantidade de partículas virais variou entre 12 e 747 por abdômen. Por outro lado, 40% (2/5) dos abdomens das fêmeas que copularam com machos infectados por fêmeas 14 dpi apresentaram RNA de ZIKV no abdômen (tab. 10) Neste caso, os abdomens apresentaram entre 3 e 24 cópias de RNA de ZIKV^{BR}.

Tabela 10: Cts (cycle threshold) dos RNAs de abdômen de *Ae. aegypti* fêmeas que copularam com os machos 7 (grupo A) ou 14 dpi (grupo B). A taxa de positividade do abdômen foi obtida em um único experimento biológico e cada amostra foi analisada através do qRT-PCR em duas réplicas experimentais. Os Ct e média dos Cts marcados pela cor vermelha, correspondem aos mosquitos negativos pelo pico da curva de dissociação (*Melting*). Fonte: IOSHINO (2018b).

	GRUPO A		GRUPO B	
	Ct	Média dos Cts	Ct	Média dos Cts
♀ 1	36,72	36,14	37,31	38,19
	35,57		39,08	
♀ 2	35,8
	...		35,51	
♀ 3	36,19	36,62	35,64	...
	37,06		...	
♀ 4	36,81	35,63	35,39	35,13
	34,45		34,86	
♀ 5	30,37	30,28	33,94	34,07
	30,19		34,2	
C+	15,33	15,43	15,59	15,6
	15,52		15,61	

5 Discussão

5.1 Taxa de susceptibilidade de *Ae. aegypti*

Compreender a fisiologia básica e os impactos que uma infecção pode causar em nível reprodutivo nos mosquitos *Ae. aegypti* é de suma importância, uma vez que esses insetos são os responsáveis por transmitir arboviroses que, anualmente, comprometem parte dos gastos em saúde pública com internações e medicamentos. Por isso, investir em estudos científicos relacionados à interação patógeno hospedeiro é uma das formas de gerar conhecimentos que irão auxiliar no combate e controle dessas doenças.

Muitos estudos sobre a interação patógeno - hospedeiro já são realizados, dentre eles podemos citar a análise da susceptibilidade e/ou capacidade vetorial que uma determinada população de mosquitos possui perante a um patógeno (GAYE et al., 2014; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA et al., 2002; POMPON et al., 2017; SOUZA-NETO et al., 2018; TURELL et al., 1992). Esse tipo de análise pode, muitas vezes, alertar a população de uma determinada região quanto a circulação ou introdução de novos vírus, bem como auxiliar nos estudos sobre genética populacional e importância de praticar o controle integrado do vetor (retirada dos criadouros artificiais e uso de larvicidas, por exemplo).

Sendo assim, desenvolver estudos sobre a interação de um patógeno com o hospedeiro invertebrado também pode gerar conhecimentos inéditos que auxiliem no desenvolvimento de novos meios para o controle do inseto vetor. Uma linha de pesquisa interessante, porém com pouca investigação científica, está relacionada aos impactos que as infecções (DENV ou ZIKV) podem promover a nível reprodutivo no mosquito *Ae. aegypti*. Esse tipo de estudo já foi desenvolvido em 1995 por Hurd e colaboradores, porém observando a redução de fecundidade dos mosquitos *An. stephensi* infectados por *P. yoelii nigenriensis* e a morte celular foi uma explicação para esse comprometimento reprodutivo.

Para verificar se os *Ae. aegypti* também apresentam uma redução na produção do número de ovos, o primeiro passo deste estudo foi definir o quão susceptível são as linhagens de mosquitos de laboratório (RED, HIGGS e ROCK) aos DENV-2 e ZIKV.

Os dados obtidos mostram que estas diferentes linhagens apresentam taxas de susceptibilidades distintas para o DENV-2. Enquanto as linhagens RED e ROCK são altamente susceptíveis à esse vírus (80 e 90%, respectivamente), os mosquitos da linhagem HIGGS se mostraram menos suscetíveis (40%). Essa mesma característica foi observada para a infecção com ZIKV^{BR}. Enquanto o RED e ROCK apresentaram 95% de infecção no 14º dia após a alimentação, apenas 65% dos mosquitos HIGGS foram positivos ao ZIKV, um vírus que é estruturalmente semelhante ao DENV-2 (COSTA-DA-SILVA et al., 2017a).

Selecionar uma linhagem de mosquito que apresenta alta susceptibilidade aos DENV-2 e ZIKV^{BR}, proporciona duas vantagens para o desenvolvimento deste estudo. A primeira corresponde ao aumento da chance do evento observado (redução da fecundidade e modulação de diferentes genes nos ovários) ser uma consequência da infecção no mosquito, reforçando, assim, a confiança nos resultados obtidos. Já a segunda vantagem está relacionada a alta susceptibilidade que os mosquitos de campo também apresentam para às infecções com os DENV-2 e ZIKV, reforçando as chances das alterações fisiológicas observadas nos mosquitos de laboratório também ocorrerem nos mosquitos selvagens / de campo (GARCIA-LUNA et al., 2018; GONÇALVES et al., 2014; MOURA et al., 2015; ROUNDY et al., 2017).

Diante disso, a linhagem que foi utilizada para desenvolver os experimentos deste estudo foi a ROCK, pois apresentou uma taxa de aproximadamente 90% de infecção para ambos os vírus no 14º dia após a alimentação sanguínea contendo as partículas virais.

5.2 Fecundidade das fêmeas infectadas nos 3 CG

Além da diferença na susceptibilidade que cada linhagem pode apresentar perante a um vírus, estudos mostram que diferentes patógenos podem promover alterações fisiológicas positivas e negativas aos mosquitos. Dentre as alterações positivas, podemos citar a ativação de vias imunológicas que, através da síntese de algumas proteínas, tentam combater a infecção no mosquito (ANGLERÓ-RODRÍGUEZ et al., 2017; SOUZA-NETO et al., 2009; XI et al., 2008). Por outro lado, a alimentação sanguínea infectada pode promover

um comprometimento da capacidade reprodutiva, isto é, mosquitos infectados produzem menos ovos quando comparados aos mosquitos sadios. Diante dessa característica, observamos que, ao alimentar os mosquitos *Ae. aegypti* (ROCK) com um sangue contendo as partículas virais de ZIKV^{BR} ou DENV-2 (1º CG), não ocorre uma redução da média do número de ovos desses mosquitos quando comparado ao grupo controle (sadio) (tab. 4). Estes dados corroboram com os observados por Maciel-de-Freitas (2011) e Sylvestre (2013) e seus colaboradores que ao expor os *Ae. aegypti* ao DENV-2, também não observaram uma redução do número de ovos depositados pelas fêmeas expostas ao vírus. Por outro lado, um estudo recente mostra que ao realizar o repasto sanguíneo contendo as partículas do ZIKV, os mosquitos produzem mais ovos do que o grupo controle no 1º CG, divergindo dos dados obtidos no presente estudo (PETERSEN et al., 2018).

Diferentemente do que foi observado no 1º CG dos *Ae. aegypti* expostos aos arbovírus citados, sabe-se que no modelo de laboratório *Ae. aegypti* infectado por *Plasmodium gallinaceum* e também em outras espécies de culicídeos, como os do gênero *Anopheles* infectado por *P. yoelii nigeriensis*, há uma redução de 19 e 41%, respectivamente, da fecundidade desses insetos (AHMED et al., 1999; IOSHINO, 2013).

Por outro lado, quando os mosquitos com 7 e 14 dias após a alimentação sanguínea infectada (correspondendo neste estudo, respectivamente, ao 2º e 3º CG) realizam uma nova alimentação sanguínea em camundongos sadios, observamos que há uma redução do número de ovos produzidos por fêmeas infectadas (ZIKV^{BR} ou DENV-2) quando comparado ao grupo controle (tab. 4). Enquanto os mosquitos infectados pelo ZIKV^{BR} apresentam uma taxa de redução acima de 10%, tanto no 2º como no 3º CG (17,2% e 13%, respectivamente) (tab. 4), os mosquitos infectados por DENV-2 apresentaram uma queda de apenas 6,1% no 2º CG quando comparado ao grupo controle (tab. 4). Por outro lado, no 3º CG houve uma redução significativa da fecundidade (18,2%) (tab. 4) (fig. 12). Essa mesma característica também foi observada por outros pesquisadores, nos quais mosquitos *Ae. aegypti* infectados por DENV-2 apresentaram uma redução de 40 a 50% da taxa de fecundidade apenas a partir do 3º CG (MACIEL-DE-FREITAS et al., 2011; SYLVESTRE et al., 2013).

Uma correlação interessante que podemos fazer diante dessa redução da fecundidade observada nos *Ae. aegypti* (ROCK) infectados pelo ZIKV^{BR} no 2ºCG e pelo DENV-2 no 3º CG, é o tempo de replicação e disseminação de cada vírus após serem ingeridos durante a alimentação sanguínea. Sabe-se que a replicação do DENV-2 em algumas linhagens de *Ae. aegypti*, como na Porto Rico - Rex-D (Rex-D) (colonizada há muito tempo em laboratório), ocorre de forma mais lenta quando comparado à replicação do ZIKV^{BR} em ROCK. Enquanto apenas 15% das fêmeas de Rex-D apresentam antígeno de DENV-2 na GS após 7 dias da alimentação sanguínea infectada, 95% das cabeças dos mosquitos ROCK foram positivos para o RNA de ZIKV^{BR} nesse mesmo intervalo de tempo (COSTA-DA-SILVA et al., 2017a; SALAZAR et al., 2007). Dessa forma, podemos deduzir que no 2º CG (7 dias após a alimentação com vírus), o ZIKV^{BR} já está presente na hemolinfa do mosquito e, provavelmente, em outros tecidos como GS e corpo gorduroso (um tecido importante para síntese das proteínas que formarão os ovos). Por outro lado, no 7º dia, a replicação do DENV-2 ainda está ocorrendo em maior proporção no IM do mosquito *Ae. aegypti* e poucos vírus foram liberados para a hemolinfa neste período (SALAZAR et al., 2007).

Em paralelo ao nível de replicação do vírus, os mosquitos possuem algumas vias imunológicas que são ativadas após um repasto sanguíneo infectado, com o intuito de combater ou controlar a infecção viral. Dentre essas vias, podemos citar a Janus quinase - transdutor de sinal e ativador de transcrição (JAK-STAT) e Toll que são ativadas após uma alimentação sanguínea contendo tanto as partículas virais de DENV-2 como ZIKV (ANGLERÓ-RODRÍGUEZ et al., 2017; SOUZA-NETO et al., 2009; XI et al., 2008).

Sendo assim, a redução significativa do número de ovos depositados por fêmeas infectadas por ZIKV^{BR} no 2º CG, pode ser explicada pela ativação das vias imunológicas uma vez a replicação e disseminação desse vírus demonstra-se mais rápida no mosquito *Ae. aegypti* quando comparada ao DENV-2.

Seguindo essa mesma linha de raciocínio, sabe-se que entre o 7º e 14º dias após a alimentação sanguínea (entre o 2º e 3º CG), a infecção pelo ZIKV^{BR} se estabelece nos mosquitos ROCK (COSTA-DA-SILVA et al., 2017a).

No entanto, neste mesmo período, os mosquitos infectados pelo DENV-2 iniciam a liberação e disseminação de novas partículas virais (consequência da replicação nas células do IM) para a hemolinfa das células infectadas (SALAZAR et al., 2007). Consequentemente, há ativação das vias imunológicas e um comprometimento significativo da produção dos ovos no 3º CG, ou seja, as fêmeas infectadas pelo DENV-2 produzem menos ovos quando comparado ao grupo controle.

Dessa forma, podemos concluir que a replicação e disseminação viral no mosquito podem influenciar na taxa de fecundidade dos *Ae. aegypti* infectados pelos flavivírus ZIKV^{BR} ou DENV-2.

5.3 Estudo dos genes relacionados à morte celular nos ovários de fêmeas infectadas

5.3.1 Primeiro Ciclo gonotrófico

Os órgãos responsáveis pelo armazenamento de proteínas que darão origem aos ovos são os ovários. Apesar de estarem em contato direto com a hemolinfa dos mosquitos, até o momento, não há evidências de que esses tecidos participam da replicação dos vírus DENV e ZIKV. Por outro lado, sabe-se que alguns ovariolos dos ovários podem ser, esporadicamente, infectados promovendo a transmissão vertical, ou seja, as larvas já nascem portando os vírus (COSTA et al., 2018; LE GOFF et al., 2011; MARTINS et al., 2012).

Compreender se a infecção pelos DENV-2 ou ZIKV^{BR} pode promover a ativação da morte das células que compõem esse tecido, como observado no IM de *Ae. aegypti* infectado por DENV-2, pode explicar a redução das fecundidade das fêmeas durante o 2º e 3º CG durante a infecção pelo ZIKV^{BR} ou DENV-2, respectivamente. Por isso, um conjunto de genes (IAP1, DRONC, CASP7, CASP16, ATG4A, ATG8 e ATG12) que estão envolvidos na morte celular por apoptose e autofagia foram analisados quanto aos seus níveis de expressão nos ovários nos diferentes CG (OCAMPO et al., 2013; ENG et al., 2016).

Durante o 1º CG, análises moleculares mostram que ao se alimentarem com sangue contendo partículas de ZIKV^{BR}, há um aumento de todos os genes relacionados a morte celular por apoptose e autofagia entre 12 e 24 horas nos

ovários das fêmeas *Ae. aegypti*, exceto o gene ATG4A que, apesar de ter aumentado seu nível de expressão, continua diminuído quando comparado ao grupo controle (fig. 14 e 15). Para os mosquitos que se alimentaram com o DENV-2, esse perfil de expressão foi semelhante ao observado com ZIKV. Houve um aumento dos genes apoptóticos IAP1, DRONC e CASP7 e autofágico ATG8, mas os genes CASP16, ATG4A e ATG12 sofreram uma redução no intervalo de 12 horas (fig. 14 e 15). Apesar de todos os indícios da ativação da apoptose e autofagia nos ovários das fêmeas infectadas por ZIKV^{BR} ou DENV-2, durante o 1º CG não houve redução do número de ovos nos grupos expostos aos vírus.

Como foi citado anteriormente, os mosquitos foram infectados utilizando o alimentador artificial Glytube e todas as fêmeas ingurgitadas foram separadas para as análises experimentais. Além das partículas virais e um concentrado de hemáceas, 10% do volume total de soro também compõe a mistura oferecida aos mosquitos (COSTA-DA-SILVA et al., 2013).

Sabe-se que o soro é um componente importante para a produção das proteínas precursoras de vitelo (PPV) e durante um repasto em hospedeiro vertebrado, os mosquitos irão se alimentar de sangue e soro, seguindo a proporção de 1:1 (GONZALES et al., 2015). Nessas condições, uma única fêmea é capaz de produzir em média de 100 a 120 ovos no 1º CG (ARAUJO et al., 2011; IOSHINO, 2013). Em contrapartida, neste estudo observou-se que o número de ovos depositados no 1º CG foi, em torno, de 67 ovos por fêmea sadia ou infectada (tab. 4), uma diferença de, aproximadamente, 39% em comparação com os mosquitos que se alimentam em um hospedeiro vertebrado. Dessa forma, o que poderia explicar o aumento da expressão dos genes relacionados a autofagia e apoptose nos ovários das fêmeas infectadas e a indiferença no número de ovos no 1º CG entre os grupos analisados, é a reabsorção dos folículos ovarianos que não receberam as PPV, importantes para o desenvolvimento dos ovos. Estudos mostram que fêmeas de *Ae. aegypti* que se alimentam com um volume menor de sangue durante o repasto sanguíneo, apresentam uma redução na produção do número de ovos, pois ocorre uma reabsorção dos oócitos em desenvolvimento nos ovários dessas fêmeas (CLEMENTS; BOOCOOCK, 1984; LEA et al., 1978). Até o momento não existem trabalhos que mostram a morte celular (apoptose e/ou autofagia)

auxiliando no processo de reabsorção folicular nos ovários de *Ae. aegypti*, porém os resultados apresentados nesse estudo, ajudam a fortalecer essa hipótese.

5.3.2 Segundo ciclo gonotrófico

Analisando a expressão dos genes no 2ºCG dos mosquitos infectados pelo ZIKV, observamos que há um aumento da expressão relativa do inibidor de apoptose (IAP1), da caspase iniciadora (DRONC) e das caspases executoras (CASP7 e 16) nas primeiras 12 horas após a alimentação (fig. 16). Essa característica pode indicar que as células dos ovários dessas fêmeas estão em morte celular por apoptose, mesmo que o IAP1 esteja com nível de expressão relativa aumentada, uma vez que essa proteína é importante para impedir que todas as células entrem em apoptose de forma desordenada (fig. 16) (DEVERAUX et al., 1999; ENG et al., 2016; WANG; CLEM, 2011). Por outro lado, no ponto de 24h, a expressão de todos os genes diminui porém, observamos que os genes IAP1 e CASP16 ainda se encontram aumentados comparando ao grupo controle, indicando que a apoptose ainda pode estar acontecendo nesses tecidos (fig. 16). Mesmo com essa redução da expressão dos genes apoptóticos em um intervalo de 12h, vale lembrar que a morte celular por apoptose é irreversível, ou seja, uma vez que o processo de cascata apoptótica se inicia, as células entram em morte e todas as proteínas resultantes da clivagem e degradação podem ser reabsorvidas e / ou reaproveitadas pelas células vizinhas.

Estudos demonstraram que alguns genes, que até então eram correlacionados apenas com apoptose, podem ter uma ação na autofagia de alguns tecidos de *Ae. aegypti* (fig. 20) (ENG et al., 2016). Entre os genes que podem desempenhar essa correlação estão os genes DRONC e CASP7. Eng e colaboradores (2016) mostraram que há um aumento do número de transcritos de DRONC e CASP7 durante a morte celular por autofagia em tecidos como GS e IM. Baseado nesses dados, observamos que no 2º CG os mosquitos infectados por ZIKV^{BR} apresentaram um aumento do nível de expressão desses dois genes apoptóticos nas primeiras 12h após o repasto sanguíneo, porém no tempo de 24h esses genes apresentam-se reduzidos (fig. 16). Em

contrapartida, os genes envolvidos na autofagia ATG4A e ATG12 que inicialmente (12h) estavam reduzidos, se mostraram super expressos no mesmo intervalo de redução dos genes apoptóticos (24h) indicando que, além da apoptose, a autofagia também pode estar ocorrendo nos ovários das fêmeas infectadas (fig. 17).

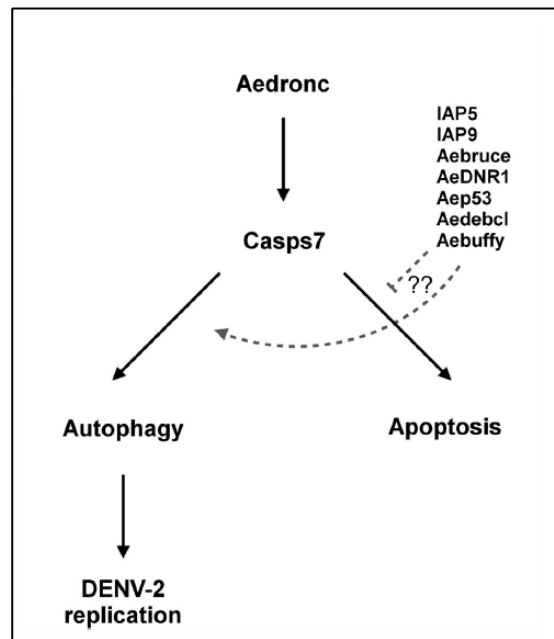


Figura 20: Sequência demonstrativa do provável envolvimento das caspases na ativação da autofagia em mosquitos *Ae. aegypti* após uma alimentação sanguínea. Fonte: ENG, et al., 2016.

Dessa forma, tanto a ativação da morte celular por apoptose como por autofagia nos ovários podem explicar a redução significativa de 17,2% (tab. 4) da taxa de fecundidade das fêmeas infectadas pelo ZIKV no 2º CG (fig. 12).

Já no 2º CG dos mosquitos infectados pelo DENV-2, a redução do número de ovos foi menor (6.1%) quando comparada à infecção por ZIKV (tab. 4). Porém, foi observada que quase todos os genes envolvidos na apoptose (IAP1, DRONC e CASP7) estão ativados 24h após a alimentação sanguínea (fig. 16). De acordo com os resultados, o IAP1 sofreu uma redução no intervalo de 12 e 24h o que provavelmente permitiu a ativação de genes apoptóticos como é o caso da caspase iniciadora (DRONC), que em 24h se mostrou aumentada (fig. 16). Além dessa caspase apoptótica, a CASP7 que apesar de ter reduzido no intervalo de 12h, continua aumentada no tempo de 24h (fig. 16). Por outro lado, a CASP16 em ambos os tempos analisados se encontra

reduzida quando comparado ao grupo controle, reforçando a idéia de que a apoptose não está ocorrendo nos ovários das fêmeas infectadas pelo DENV-2. Outro fato que acetua essa hipótese é a análise dos genes relacionados a autofagia que se apresentam expressos no tempo de 24h após a alimentação sangínea mostrando que, talvez, a pequena diferença da taxa de fecundidade das fêmeas esteja relacionada a autofagia de alguns ovariolos nos ovários das fêmeas infectadas por DENV (fig. 17).

5.3.3 Terceiro ciclo gonotrófico

Ao avaliar a expressão dos genes relacionados a apoptose e autofagia nos ovários das fêmeas no 3º CG, observamos que os mosquitos infectados por ZIKV^{BR} ou DENV-2 produziram menos ovos quando comparado ao grupo controle e que a redução da fecundidade das fêmeas infectadas pelo DENV-2 foi significativa (fig. 12) (tab. 4). Em contrapartida, também houve uma inibição do nível de expressão relativa de quase todos os genes envolvidos nas mortes celular analisadas (fig. 18 e 19). Os únicos genes que se mostraram expressos nos dois tempos (12 e 24h) analisados foram DRONC e o ATG8 (fig. 18 e 19). Com esses resultados, podemos concluir que a redução da fecundidade nesse CG pode não estar relacionada com a morte celular dos ovariolos das fêmeas. Uma explicação para essa redução é a ativação das vias imunológicas JAK-STAT e Via Toll.

Estudos demonstram que essas vias de defesa são ativadas nos mosquitos após uma alimentação sanguínea contendo partículas de DENV-2 ou ZIKV e têm como objetivo principal combater / controlar as infecção virais nesse vetor (ANGLERÓ-RODRÍGUEZ et al., 2017; SOUZA-NETO et al., 2009; XI et al., 2008). Xi e colaboradores (2008) também mostraram que no 10º dia após a infecção por DENV, há um grande número de genes expressos na carcaça (todo corpo do mosquito, menos o IM) dos mosquitos *Ae. aegypti*, revelando que os tecidos presentes nessa região estão ativos para tentar combater o processo infeccioso. Dentre esses genes super expressos, podemos citar os inibidores de serino proteases – serpina, hexamerinas e peptídeos antimicrobianos que estão envolvidos nas vias imunológicas dos mosquitos e genes com funções diversas como os que caracterizam o receptor

de somatostatina, proteínas ricas em cisteínas e adenosina kinase (XI et al., 2008).

Com base neste dado, é possível predizer que no 14º dia após a alimentação com as partículas virais (3º CG) DENV ou ZIKV, vias imunológicas continuam ativadas na tentativa de combater novas replicações e infecção viral, inclusive no corpo gorduroso importante na síntese das PPV que, ao ser acumulada no oócito maduro, dará origem aos ovos. Então, a ação das vias imunológicas nos tecidos importantes na vitelogênese durante a infecção viral, pode promover uma alteração da fecundidade de fêmeas infectadas no 3º CG.

Durante as análises da expressão gênica relativa nos diferentes CG, observamos que o gene constitutivo RPS7 (housekeeping) não apresentou variações entre as replicatas experimentais (n=3) (tab. Sup. 1). Por outro lado, observamos que os níveis de expressão de alguns genes (tab. Sup. 2 a 8) de interesse analisados, são modulados entre um intervalo grande nas triplicatas biológicas (fig. 15 a 19). Esse fato sugere que as infecções e mecanismos de defesa (vias imunológicas) não ocorrem de forma homogênea entre *Ae. aegypti* e o seu patógeno. Para mostrar que as vias imunológicas de cada indivíduo é importante durante a infecção e que os genes da cascata apoptótica podem ser influenciados por essas vias, serão necessários novas investigações, como a análise da expressão gênica envolvida nas vias imunológicas como JAK-Stat e Toll.

5.4 Transmissão venérea do ZIKV entre fêmeas e machos de *Ae. aegypti*

O principal vetor urbano na transmissão de doenças tropicais é a fêmea do mosquito *Ae. aegypti*. Como já foi dito anteriormente, elas são as responsáveis por adquirir e transmitir as partículas virais durante a alimentação sanguínea. Por outro lado, os mosquitos machos se alimentam apenas de compostos açucarados e são muito importantes para a manutenção da espécie (CLEMENTS, 1992).

Até o ano de 2015, o único meio conhecido de transmissão das arboviroses entre humanos ocorria, principalmente, através da picada do mosquito vetor infectado. Porém, estudos mostraram que o flavivírus ZIKV possui uma biologia diferente e apresenta um tropismo para as células do

sistema reprodutivo do hospedeiro vertebrado e, por isso, pode ser encontrado no líquido seminal do homem. Dessa forma, descobriu-se que esse vírus também pode ser transmitido através da relação sexual entre homens e mulheres (D'ORTENZIO et al., 2016; MCCARTHY, 2016; ROWLAND et al., 2016). A partir da descoberta dessa nova via de transmissão de um arbovírus em humanos, iniciamos ensaios para observar se essa característica também se mantém nos mosquitos *Ae. aegypti*.

Os resultados obtidos desta hipótese, nos mostrou que entre 80% dos machos sadios que copularam com fêmeas infectadas com idade de infecção de 7 e 14 dias apresentam o RNA de ZIKV em todo o corpo (tab. 5 e 6). Essa mesma característica também foi observada por Pereira-Silva e colaboradores (2017) utilizando a terceira geração de mosquitos provenientes de Manaus (AM) e uma cepa de ZIKV isolada de uma paciente. Ao copularem os machos sadios com fêmeas infectadas artificialmente, obtiveram uma porcentagem de 35% de machos positivos para o ZIKV (PEREIRA-SILVA et al., 2017).

Detectar o material genético (RNA) através de técnicas moleculares, nos dá apenas um indício de que a transmissão venérea do ZIKV pode estar ocorrendo entre as fêmeas infectadas e machos inicialmente sadios. Já que o RNA por si só não representa uma ameaça para a epidemiologia do vírus. Então, ao inocular em cultura de células C6/36 um pool de metade do abdômen de machos positivos para ZIKV, observamos que tanto os machos que copularam com fêmeas 7 dpi ou com 14 dpi possuem o vírus infectivo. Além das análises dos efeitos citopáticos causados pelo vírus em cultura de células, o sobrenadante de cada cultura celular positiva foi analisada por qRT-PCR para confirmação da presença de cDNA específico para ZIKV. Até o momento, este é o primeiro trabalho que mostra a presença de partículas infectivas de ZIKV em machos após uma cópula infectada.

O macho por si só não possui a capacidade de transmitir o ZIKV ao homem. Porém ao copular com fêmeas sadias, notamos que o RNA de ZIKV também foi detectado nas fêmeas copuladas (tab 8 e 9). Se o RNA viral identificado nessas fêmeas corresponder ao ZIKV infectivo, como observado nos abdomens dos machos, estaremos diante de uma situação epidemiológica preocupante para essa arbovirose, pois além de se tratar de um vírus capaz de

ser transmitido entre machos e fêmeas de *Ae. aegypti*, há a possibilidade de ocorrer a transmissão vertical (fêmeas para a prole) (LI et al., 2017).

De uma forma geral, os mosquitos machos sempre foram considerados importantes, apenas, para a manutenção da espécie (reprodução) uma vez que, durante seu curto período de vida na forma alada, se alimentam exclusivamente de açúcares (por exemplo, seiva ou néctar) provenientes das plantas. Porém, diferente do que acontece com algumas espécies de aves, um único macho de *Ae. aegypti* pode copular com até 10 fêmeas diferentes. Então cruzando essas características sexo específicas do macho com os dados obtidos nesse estudo, se o ZIKV pode ser transmitido entre fêmeas infectadas para os machos sadios, e machos sexualmente infectados podem transmitir o vírus para até 10 fêmeas e, para piorar, as fêmeas podem transmitir o vírus para sua prole, podemos concluir que o ZIKV poderá causar muitos problemas durante o verão nos países de clima tropical e subtropical. Ainda mais por se tratar de um vírus que, até o momento, não possui uma vacina eficaz, pode ser transmitido entre humanos através da relação sexual e pode causar a microcefalia em bebês (D'ORTENZIO et al., 2016; DE ARAÚJO et al., 2016; MCCARTHY, 2016; ROWLAND et al., 2016).

Por isso, realizar o controle integrado do vetor se torna primordial, pois ao eliminar o mosquito, outras doenças como dengue, chikungunya e febre amarela urbana também poderão ser controladas.

As análises dos mosquitos machos perante à infecção ZIKV, confirmou que, assim como as fêmeas, os machos também possuem um papel importante na disseminação e transmissão do ZIKV como ocorre em humanos.

6 Conclusão

Os vírus pertencentes à Família Flaviviridae ZIKV e DENV-2 podem promover a redução da fecundidade das fêmeas *Ae. aegypti* no 2º e 3º CG. Esse comprometimento reprodutivo, pode estar correlacionado à morte das células que compõem os ovários dependendo do estágio de infecção no vetor.

Além disso, ficou evidente que o macho também possui uma importância na epidemiologia do ZIKV uma vez que, além de se infectar pelo vírus através da cópula, há a possibilidade de transmitir o ZIKV para fêmeas sadias.

7 Referências

ABRAHAM, E. G.; ISLAM, S.; SRINIVASAN, P.; GHOSH, A. K.; VALENZUELA, J.G.; RIBEIRO, J. M. C.; KAFATOS, F. C.; DIMOPOULOS, J.; JACOBS-LORENA, M. Analysis of the Plasmodium and Anopheles Transcriptional Repertoire during Ookinete Development and Midgut Invasion. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 7, p. 5573–5580, 2004.

AGÊNCIA FAPESP - Rede Zika elenca prioridades e define estratégias de operação. Disponível em: <http://agencia.fapesp.br/rede-zika-elenca-prioridades-e-define-estrategias-de-operacao/22706>. Último acesso em: 01/12/2018.

AHMED, A. M.; MAINGON, R. D.; TAYLOR, P. J.; HURD, H. The effects of infection with plasmodium yoelii nigeriensis on the reproductive fitness of the mosquito anopheles gambiae. **Invertebrate Reproduction and Development**, v. 36, n. 1–3, p. 217–222, 1999.

AHMED, A. M.; HURD, H. Immune stimulation and malaria infection impose reproductive costs in Anopheles gambiae via follicular apoptosis. **Microbes and Infection**, v. 8, p. 308–315, 2006.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. Ciclo celular e morte celular programada. In: _____ **A Célula**, 4 ed. São Paulo: Ed. Artmed;, 2004, p. 983-1026.

ANGLERÓ-RODRÍGUEZ, Y. I.; MACLEOD, H. J.; KANG, S.; CARLSON, J. S.; JUPATANAKUR, N.; DIMOPOULOS, G. Aedes aegypti molecular responses to Zika Virus: Modulation of infection by the toll and Jak/Stat immune pathways and virus host factors. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. OCT, p. 1–12, 2017.

ARAÚJO, A. P.; DINIZ, D. F. A.; HELVECIO, E.; DE BARROS, R. A.; DE OLIVEIRA, C. M. F.; AYRES, C. F. J.; MELO-SANTOS, M. A. V.; REGIS, L. N.; SILVA-FILHA, M. H. N. L. The susceptibility of Aedes aegypti populations displaying temephos resistance to Bacillus thuringiensis israelensis: A basis for management. **Parasites and Vectors**, v. 6, n. 1, p. 1–9, 2013.

ARAÚJO, H. R. C.; CARVALHO, D. O.; IOSHINO, R. S.; COSTA-DA-SILVA, A. L.; CAPURRO, M. L. Aedes aegypti Control Strategies in Brazil: Incorporation of New Technologies to Overcome the Persistence of Dengue Epidemics. **Insects**, 2015.

ARAÚJO, R. V.; MACIEL, C.; HARTFELDER, K.; CAPURRO, M. L. Effects of Plasmodium gallinaceum on hemolymph physiology of Aedes aegypti during parasite development. **Journal of Insect Physiology**, v. 57, n. 2, p. 265–273, fev. 2011.

AZEVEDO, D. S. **Caracterização do perfil de expressão de actina em *Aedes aegypti***. Dissertação de mestrado. Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. São Paulo, 2014.

BASTOS, M. S.; DE FIGUEIREDO, R. M. P.; RAMASAWMY, R.; ITAPIREMA, E.; GIMAQUE, J. B. L.; SANTOS, L. O.; FIGUEIREDO, L. T. M.; MOURÃO, M. P. G. Simultaneous circulation of all four dengue serotypes in Manaus, State of Amazonas, Brazil in 2011. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 3, p. 393–394, jun. 2012.

BOATRIGHT, K. M.; SALVESEN, G. S. Mechanisms of caspase activation. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 15, n. 6, p. 725–731, dez. 2003.

BROWN, M. R.; GRAF, R.; SWIDEREK, K. M.; FENDLEY, D.; STRACKER, T. H.; CHAMPAGNE, D. E.; LEA, A. O. Identification of a steroidogenic neurohormone in female mosquitoes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 7, p. 3967–3971, 1998.

BRYANT, B.; BLAIR, C. D.; OLSON, K. E.; CLEM, R. J. Annotation and expression profiling of apoptosis-related genes in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 38, n. 3, p. 417–428, 2008.

CAKOUROS, D.; DAISH, T. J.; KUMAR, S. Ecdysone receptor directly binds the promoter of the *Drosophila* caspase *dronc*, regulating its expression in specific tissues. **Journal of Cell Biology**, v. 165, n. 5, p. 631–640, 2004.

CALKINS, T. L.; PIERMARINI, P. M. A Blood Meal Enhances Innexin mRNA Expression in the Midgut, Malpighian Tubules, and Ovaries of the Yellow Fever Mosquito *Aedes aegypti*. **Insects**, v. 8, n. 4, p. 122, 6 nov. 2017.

CARVALHO, D. O.; NIMMO, D.; NAISH, N.; MCKEMEY, A. R.; GRAY, P.; WILKE, A. B. B.; MARRELLI, M. T.; VIRGINIO, J. R.; ALPHEY, L.; CAPURRO, M. L. Mass Production of Genetically Modified *Aedes aegypti* for Field Releases in Brazil. **Journal of Visualized Experiments**, n. 83, p. 1–10, 4 jan. 2014.

CLEMENTS, A. N. Development, nutrition and reproduction. In: **The Biology of Mosquitoes**, v. 1. Londres: Chapman & Hall, 1992, p. 360-405.

CLEMENTS, A. N.; BOOCOOCK, M. R. Ovarian development in mosquitoes: stages of growth and arrest, and follicular resorption. **Physiological Entomology**, v. 9, n. 1, p. 1–8, 1984.

COOPER, D. M.; PIO, F.; THI, E. P.; THEILMANN, D.; LOWENBERGER, C. Characterization of Aedes Dredd: A novel initiator caspase from the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 37, p. 559–569, 2007a.

COOPER, D. M.; THI, E. P.; CHAMBERLAIN, C. M.; PIOR, F.; LOWENBERGER, C. Aedes Dronc: A novel ecdysone-inducible caspase in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. **Insect Molecular Biology**, v. 16, p. 563–572, 2007b.

COSTA-DA-SILVA, A. L.; NAVARRETE, F. R.; SALVADOR, F. S.; COSTA, M. K.; IOSHINO, R. S.; AZEVEDO, D. S.; ROCHA, R. D.; ROMANO, C. M.; CAPURRO, M. L. Glytube: A Conical Tube and Parafilm M-Based Method as a Simplified Device to Artificially Blood-Feed the Dengue Vector Mosquito, *Aedes aegypti*. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, p. e53816, 14 jan. 2013.

COSTA-DA-SILVA, A. L.; IOSHINO, R. S.; ARAÚJO, H. R. C.; KOJIN, B. B.; ZANOTTO, P. M. A.; OLIVEIRA, D. B. L.; MELLO, S. R.; DURIGON, E. L.; CAPURRO, M. L. Laboratory strains of *Aedes aegypti* are competent to Brazilian Zika virus. **PLoS ONE**, 2017a.

COSTA-DA-SILVA, A. L.; IOSHINO, R. S.; PETERSEN, V.; LIMA, A. F.; CUNHA, M. P.; WILLEY, M. R.; LADNER, J. T.; PRIETO, K.; PALACIOS, G.; COSTA, D. D.; SUESDEK, L.; ZANOTTO, P. M. A.; CAPURRO, M. L. First report of naturally infected *Aedes aegypti* with chikungunya virus genotype ECSA in the Americas. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 6, p. e0005630, 14 jun. 2017b.

COSTA, C. F.; DA SILVA, A. V.; NASCIMENTO, V. A.; SOUZA, V. C.; MONTEIRO, D. C. S.; TERRAZAS, W. C. M.; PASSOS, R. A.; NASCIMENTO, S.; LIMA, J. B. P.; VANECA, F. G. Evidence of vertical transmission of Zika virus in field-collected eggs of *Aedes aegypti* in the Brazilian Amazon. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 7, p. e0006594, 16 jul. 2018.

CRUZ, L. C. T. A.; SERRA, O. P.; LEAL-SANTOS, F. A.; RIBEIRO, A. L. M.; SLHESSARENKO, R. D.; DOS SANTOS, M. A. Natural transovarial transmission of dengue virus 4 in *Aedes aegypti* from Cuiabá, State of Mato Grosso, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, n. 1, p. 18–25, fev. 2015.

CUGOLA, F. R.; FERNANDES, I. R.; RUSSO, F. B.; FREITAS, B. C.; DIAS, J. L. M.; GUIMARÃES, K. P.; BENAZZATO, C.; ALMEIDA, N.; PIGNATARI, G. C.; et al. The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. **Nature**, v. 534, n. 7606, p. 267–271, 2016.

D'ORTENZIO, E.; NASCIMENTO, V. A.; BELCHIOR, H. C. M.; ALMEIRA, J. F.; PESSOA, F. A. C.; NAVECA, F. G.; RÍOS-VELÁSQUEZ, C. M.. Evidence of Sexual Transmission of Zika Virus. **New England Journal of Medicine**, v. 374, n. 22, p. 2195–2198, 2 jun. 2016.

DA SILVA, J. S. F.; BRAGA, C.; DUARTE, F. M.; OLIVEIRA, P.; LUNA, C. F.; MARCONDES, M.; ARAÚJO, J.; GRILIS, M. R.; MELO, P. A. F. S. M.; BRANDÃO, E.; ROCHA, A. Effectiveness of annual single doses of diethylcarbamazine citrate among bancroftian filariasis infected individuals in an endemic area under mass drug administration in Brazil. **Pathogens and Global Health**, v. 00, n. 00, p. 1–7, 2018.

DAS, S.; GARVER, L.; RAMIREZ, J. R.; CI, Z.; DIMOPOULOS, G. Protocol for Dengue Infections in Mosquitoes (*A. aegypti*) and Infection Phenotype Determination. **Journal of Visualized Experiments**, n. 5, p. 4–5, 4 jul. 2007.

DE ARAÚJO, T. V. B.; RODRIGUES, L. C.; XIMENES, R. A. A.; MIRANDA-FILHO, D. B.; MONTARROYOS, U. R.; MELO, A. P. L.; et al. Association between Zika virus infection and microcephaly in Brazil, January to May, 2016: preliminary report of a case-control study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 16, n. 12, p. 1356–1363, dez. 2016.

DEGTEREV, A.; YUAN, J. Expansion and evolution of cell death programmes. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 9, n. 5, p. 378–90, maio 2008.

DEITSCH, K. W.; CHEN, J. S.; RAIKHEL, A. S. Indirect control of yolk protein genes by 20-hydroxyecdysone in the fat body of the mosquito, *Aedes aegypti*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 25, n. 4, p. 449–454, 1995.

DEVERAUX, Q. L.; STENNICKE, H. R.; SALVESEN, G. S.; REED, J. C. Endogenous inhibitors of caspases. **Journal of clinical immunology**, v. 19, n. 6, p. 388–398, 1999.

DICK, G. W. A.; KITCHEN, S. F.; HADDOW, A. J. Zika Virus (I). Isolations and serological specificity. v. 46, n. 5, p. 509–520, 1952.

DUFFY, M. R.; CHE, T. H.; HANCOCK, W. T.; POWERS, A. M.; KOOL, J. L.; LANCIOTTI, R. S.; PRETRICK, M.; MARFEL, M.; et al. Zika Virus Outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. **New England Journal of Medicine**, v. 360, n. 24, p. 2536–2543, 11 jun. 2009.

ENG, M. W.; VAN ZUYLEN, M. N.; SEVERSON, D. W. Apoptosis-related genes control autophagy and influence DENV-2 infection in the mosquito vector, *Aedes aegypti*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 76, p. 70–83,

set. 2016.

FARES, R. C. G.; SOUZA, K. P. R.; AÑEZ, G.; RIOS, M. Epidemiological Scenario of Dengue in Brazil. **BioMed Research International**, v. 2015, 2015.

FARIA, N. R.; QUICK, J.; CLARO, I. M.; THÉZÉ, J.; JESUS, J. G.; GIOVANETTI, M.; KRAEMER, M. U. G.; et al. Establishment and cryptic transmission of Zika virus in Brazil and the Americas. **Nature**, v. 546, n. 7658, p. 406–410, 2017.

FARNESI, L. C.; MENNA-BARRETO, R. F. S.; MARTINS, A. J.; VALLE, D.; REZENDE, G. L. Physical features and chitin content of eggs from the mosquito vectors *Aedes aegypti*, *Anopheles aquasalis* and *Culex quinquefasciatus*: Connection with distinct levels of resistance to desiccation. **Journal of Insect Physiology**, v. 83, p. 43–52, dez. 2015.

FENG, L.; LIU, H.; LI, X.; QIAO, J.; WANG, S.; GUO, D.; LIU, Q. Identification of AaCASPS7, an effector caspase in *Aedes albopictus*. **Gene**, v. 593, n. 1, p. 117–125, 2016.

FIGUEIREDO, L. T. M. Emergent arboviruses in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 2, p. 224–229, abr. 2007.

FORATTINI, O. P. Família Culicidae – Morfologia . In: **Culicidologia médica**, v. 1. São Paulo: Edusp; 1996, p. 193 - 267.

GARCIA-LUNA, S. M.; WEGER-LUCARELLI, J.; RU, C.; MURRIETA, R. A.; YOUNG, M. C.; BYAS, A. D.; FAUVER, J. R.; PERERA, R.; FLORES-SUAREZ, A. E.; PONCE-GARCIA, G.; RODRIGUEZ, A. D.; EBEL, G. D.; BLACK, E. C. Variation in competence for ZIKV transmission by *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Mexico. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 7, p. e0006599, 2 jul. 2018.

GAYE, A.; FAYE, O.; DIAGNE, C. T.; FAYE, O.; DIALLO, D.; WEAVER, S. C.; SALL, A. A.; DIALLO, M. Oral susceptibility of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Senegal for dengue serotypes 1 and 3 viruses. **Tropical Medicine & International Health**, v. 19, n. 11, p. 1355–1359, nov. 2014.

GONÇALVES, C. M.; MELO, F. F.; BEZERRA, J. M. T.; CHAVES, B. A.; SILVA, B. M.; SILVA, L. D.; PESSANHA, J. E. M.; ARIAS, J. R.; SECUNDINO, N. F. C.; DOUGLAS E NORIS, PIMENTA, P. F. P. Distinct variation in vector competence among nine field populations of *Aedes aegypti* from a Brazilian dengue-endemic risk city. **Parasites and Vectors**, v. 7, n. 1, p. 1–8, 2014.

GONZALES, K. K.; TSUJIMOTO, H.; HANSEN, I. A. Blood serum and BSA, but neither red blood cells nor hemoglobin can support vitellogenesis and egg production in the dengue vector *Aedes aegypti*. **PeerJ**, v. 3, p. e938, 2015.

GOULD, E.; SOLOMON, T. Pathogenic flaviviruses. **The Lancet**, v. 371, n. 9611, p. 500–509, fev. 2008.

GUBLER, D. J. Dengue and dengue hemorrhagic fever. v. 11, n. 3, p. 480–496, 1998.

HOPWOOD, J. A.; AHMED, A. M.; POLWART, A.; WILLIAMS, G. T.; HURD, H. Malaria-induced apoptosis in mosquito ovaries: a mechanism to control vector egg production. **The Journal of Experimental Biology**, v. 204, p. 2773–2780, 2001.

HURD, H.; CARTER, V. The role of programmed cell death in Plasmodium-mosquito interactions. **International Journal for Parasitology**, v. 34, p. 1459–1472, 2004.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Saneamento básico: aspectos gerais da gestão da política de saneamento básico 2017. Rio de Janeiro: 2018.

IOSHINO, R. S. Mecanismo de redução de fertilidade em *Aedes aegypti* infectados por *Plasmodium gallinaceum*. Dissertação de Mestrado. Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. São Paulo, 2013a.

IOSHINO, R. S. Impactos da infecção pelos vírus Dengue e Zika na reprodução de *Aedes aegypti*. Tese de doutorado. Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. São Paulo, 2013b.

IOSHINO, R. S.; CARVALHO, D. O.; MARQUES, I. C. S.; FERNANDES, E. S.; CAPURRO, M. L.; COSTA-DA-SILVA, A. L. Oviplate: A Convenient and Space-Saving Method to Perform Individual Oviposition Assays in *Aedes aegypti*. **Insects**, v. 9, n. 3, p. 103, 15 ago. 2018.

KAUFMANN, S. H.; HENGARTNER, M. O. Programmed cell death: Alive and well in the new millennium. **Trends in Cell Biology**, v. 11, n. 12, p. 526–534, 2001.

KLIONSKY, D. J.; ABDELMOHSEN, K.; ABE, A.; ABEDINI, M. J.; ABELIOVICH, H.; AROZENA, A. A.; ADACHI, H.; ADAMS, C. M.; ADAMS, P. D.; ADELI, K., et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for

monitoring autophagy (3rd edition). v. 12, n. 1, p. 1–222, 2016.

KOJIN, B. B.; COSTA-DA-SILVA, A. L.; MACIEL, C.; HENRIQUES, D. A.; CARVALHO, D. O.; MARTIN, K.; MARINOTTI, O.; JAMES, A. A.; BONALDO, M. C.; CAPURRO, M. L. Endogenously-expressed NH₂-terminus of circumsporozoite protein interferes with sporozoite invasion of mosquito salivary glands. **Malaria Journal**, v. 15, n. 1, p. 1–11, 2016.

KUNO, G.; CHANG, G. J.; TSUCHIYA, R.; KARABATSOS, N.; CROPP, B. Phylogeny of the genus Flavivirus. **Journal of virology**, v. 72, n. 1, p. 73–83, 1998.

LANCIOTTI, R. S.; CALISHER, C. H.; GUBLER, D. J.; CHANG, G. J.; VORDAM, A. V. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 3, p. 545–551, 1992.

LANCIOTTI, R. S.; KOSOY, O. L.; LAVEN, J. J.; VELEZ, J. O.; LAMBERT, A. J.; JOHNSON, A. J.; STANFIELD, S. M.; DUFFY, M. R. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 8, p. 1232–1239, 2008.

LE GOFF, G.; REVOLLO J.; GUERRA M.; CRUZ M.; BARJA SIMON Z.; ROCA Y.; VARGAS FLORÈS J.; HERVÉ J.P. Natural vertical transmission of dengue viruses by *Aedes aegypti* in Bolivia. **Parasite (Paris, France)**, v. 18, n. 3, p. 277–80, ago. 2011.

LEA, A. O.; BRIEGEL, H.; LEA, H. M. Arrest, resorption, or maturation of oöcytes in *Aedes aegypti*: dependence on the quantity of blood and the interval between blood meals. **Physiological Entomology**, v. 3, n. 4, p. 309–316, dez. 1978.

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

LEQUIME, S.; PAUL, R. E.; LAMBRECHTS, L. Determinants of Arbovirus Vertical Transmission in Mosquitoes. **PLOS Pathogens**, v. 12, n. 5, p. e1005548, 12 maio 2016.

LI, C.; GUO, X.; DENG, Y.; XING, D.; SUN, A.; LIU, Q.; WU, Q.; DONG, Y.; ZHANG, Y.; ZHANG, Z.; ZHANG, H.; CAO, W.; QIN, C.; ZHAO, T. Vector competence and transovarial transmission of two *Aedes aegypti* strains to Zika virus. **Emerging Microbes & Infections**, v. 6, n. 4, p. e23–e23, 26 abr. 2017.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real- Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Method. v. 408, p. 402–408, 2001.

LONDONO-RENTERIA, B.; TROUPIN, A.; CONWAY, M. J.; VESELY, D.; LEDIZET, M.; ROUNDY, C. M.; CLOHERTY, E.; HAMESON, S.; VANLANDINGHAM, D.; HIGGS, S.; FIKRIG, E.; COLPITTS, T. M. Dengue Virus Infection of *Aedes aegypti* Requires a Putative Cysteine Rich Venom Protein. **PLoS Pathogens**, v. 11, n. 10, p. 1–23, 2015.

LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R.; VAZEILLE, M.; FILIPPIS, M. B.; FAILLOUX, A. Oral Susceptibility to Yellow Fever Virus of *Aedes aegypti* from Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 3, p. 437–439, abr. 2002.

MACIEL-DE-FREITAS, R.; KOELLA, J. C.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. Lower survival rate, longevity and fecundity of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) females orally challenged with dengue virus serotype 2. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 105, n. 8, p. 452–458, ago. 2011.

MARCHETTE, N. J.; GARCIA, R.; RUDNICKIC, A. Isolation of Zika Virus From *Aedes* Mosquitoes in Malaysia p. 411–415, 1969.

MARCONDES, C. B.; XIMENES, M. F. F. M. Zika virus in Brazil and the danger of infestation by aedes (*Stegomyia*) mosquitoes. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 49, n. 1, p. 4–10, 2015.

MARTINS, V. E. P.; ALENCAR, C. H.; KAMIMURA, M. T.; ARAÚJO, F. M. C.; DE SIMONE, S. G.; DUTRA, E. F.; GUEDES, M. I. F. Occurrence of Natural Vertical Transmission of Dengue-2 and Dengue-3 Viruses in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Fortaleza, Ceará, Brazil. **PLoS ONE**, v. 7, n. 7, p. e41386, 25 jul. 2012.

MCCARTHY, M. Zika virus was transmitted by sexual contact in Texas, health officials report. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 352, n. February, p. i720, 2016.

MCPHEE, C. K.; BAEHRECKE, E. H. Autophagy in *Drosophila melanogaster*. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1793, n. 9, p. 1452–1460, 2009.

MENDOZA, M. Y.; SALAS-BENITO, J. S.; LANZ-MENDOZA, H.; HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, S.; ANGEL, R. M. D. A putative receptor for dengue virus in mosquito tissues: Localization of a 45-KDA glycoprotein. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 67, n. 1, p. 76–84, 1 jul. 2002.

MINISTÉRIO DA SAÚDE - BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO 53. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/novembro/29/BE-2018-58-SE-45.pdf>. Último acesso em: 01/12/2018.

MOURA, A. J. F.; SANTOS, M. A. V. M.; OLIVEIRA, C. M. F.; GUEDES, D. R. D.; CARVALHO-LEANDRO, D.; BRITO, M. L. C.; ROCHA, H. D. R.; GOMÉZ, L. F.; AYRES, C. F. J. Vector competence of the *Aedes aegypti* population from Santiago island, Cape Verde, to different serotypes of dengue virus. **Parasites and Vectors**, v. 8, n. 1, p. 1–9, 2015.

OCAMPO, C. B.; CAICEDO, P. A.; JARAMILLO, G.; BEDOYA, R. U.; BARON, O.; CERRATO, I. M.; COOPER, D. M.; LOWENBERGER, C. Differential Expression of Apoptosis Related Genes in Selected Strains of *Aedes aegypti* with Different Susceptibilities to Dengue Virus. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, 2013.

PEREIRA-SILVA, J. W.; NASCIMENTO, V. A.; BELCHIOR, H. C. M.; ALMEIDA, J. F.; PESSOA, F. A. C.; NAVECA, F. G.; RÍOS-VELÁSQUEZ, C. M. First evidence of zika virus venereal transmission in *aedes aegypti* mosquitoes. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, n. 1, p. 56–61, 2017.

PETERSEN, M. T.; SILVEIRA, I. D.; FERREIRA, A. T.; DAVID, M. R.; CHOUIN-CARNEIRO, T.; WOUWER, L. V.; MAES, L.; MACIEL-DE-FREITAS, R. The impact of the age of first blood meal and Zika virus infection on *Aedes aegypti* egg production and longevity. **PLOS ONE**, v. 13, n. 7, p. e0200766, 26 jul. 2018.

POMPON, J.; MORALES-VARGAS, R.; MANUEL, M.; TAN, C. H.; VIAL, T.; TAN, J. H.; SESSIONS, O. M.; VASCONCELOS, P. C.; NG, L. C.; MISSÉ, D. A Zika virus from America is more efficiently transmitted than an Asian virus by *Aedes aegypti* mosquitoes from Asia. n. March, p. 1–8, 2017.

RAIKHEL, A. S.; KOKOZA, V. A.; ZHU, J.; MARTIN, D.; WANG, S. F.; LI, C.; SUN, G.; AHMED, A.; DITTMER, N.; ATTARDO, G. Molecular biology of mosquito vitellogenesis: from basic studies to genetic engineering of antipathogen immunity. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 32, n. 10, p. 1275–1286, out. 2002.

RAIKHEL, A. S.; DHADIALLA, T. S. Accumulation of Yolk Proteins in Insect Oocytes. **Annual Review of Entomology**, v. 37, n. 1, p. 217–251, 1992.

REITER, P. *Climate Change*. v. 109, n. July 2000, p. 141–161, 2001.

RICHARDSON, H.; KUMAR, S. Death to flies: *Drosophila* as a model system to study programmed cell death. **Journal of Immunological Methods**, v. 265, n.

1–2, p. 21–28, 2002.

ROMANO, C. M.; MATOS, A. M.; ARAÚJO, E. S.; CILLAS-BOAS, L. S.; SILVA, W. C.; OLIVEIRA, O. M. N. P. F.; CARVALHO, K. I.; DE DOUZA, A. C. M.; RODRIGUES, C. L.; LEVI, J. E.; KALLAS, E. G.; PANNUTI, C. S. Characterization of Dengue Virus Type 2: New Insights on the 2010 Brazilian Epidemic. **PLoS ONE**, v. 5, n. 7, p. e11811, 28 jul. 2010.

ROMANO, C. M.; LAUCK, M.; SALVADOR, F. S.; LIMA, C. R.; VILLAS-BOAS, L. S.; ARAÚJO, E. S. A.; LEVI, J. E.; PANNUTI, C. S.; O'CONNOR, A.; KALLAS, E. G. Inter- and Intra-Host Viral Diversity in a Large Seasonal DENV2 Outbreak. **PLoS ONE**, v. 8, n. 8, 2013.

ROUNDY, C. M.; AZAR, S. R.; ROSSI, S. L.; HUANG, J. H.; LEAL, G.; YUN, R.; FERNANDEZ-SALAS, I.; VITEK, C. J.; PAPLOSKI, I. A. D.; KITRON, U.; RIBEIRO, G. S.; HANLEY, K. A.; WEAVER, S. C.; VASILAKIS, N. Variation in *Aedes aegypti* Mosquito Competence for Zika Virus Transmission. **Emerging Infectious Diseases**, v. 23, n. 4, p. 625–632, abr. 2017.

ROWLAND, A.; WASHINGTON, C. I.; SHEFFIELD, J. S.; PARDO-VILLAMIZAR, C. A.; DEGARS, J. H. Zika virus infection in semen: a call to action and research. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 33, n. 4, p. 435–437, 5 abr. 2016.

SALAZAR, M. I.; RICHARDSON, J. H.; SANCHEZ-VARGAS, I.; OLSON, K. E.; BEATY, B. J. Dengue virus type 2: replication and tropisms in orally infected *Aedes aegypti* mosquitoes. **BMC microbiology**, v. 7, p. 9, 2007.

SAMY, A. M.; ELAAGIP, A. H.; KENAWY, M. A.; AYRES, C. F. J.; PETERSON, T.; SOLIMAN, D. E. Climate change influences on the global potential distribution of the mosquito *Culex quinquefasciatus*, vector of West Nile virus and lymphatic filariasis. **PLoS ONE**, v. 11, n. 10, 2016.

SOUZA-NETO, J. A.; POWELL, J. R.; BONIZZONI, M. *Aedes aegypti* vector competence studies: A review. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 67, n. September 2018, p. 191–209, jan. 2018.

SOUZA-NETO, J. A.; SIM, S.; DIMOPOULOS, G. An evolutionary conserved function of the JAK-STAT pathway in anti-dengue defense. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 42, p. 17841–17846, 20 out. 2009.

SYLVESTRE, G.; GANDINI, M.; MACIEL-DE-FREITAS, R. Age-dependent effects of oral infection with dengue virus on *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) feeding behavior, survival, oviposition success and fecundity. **PloS one**, v. 8, n.

3, p. e59933, 29 jan. 2013.

THATHY, V.; SEVERSON, D. W.; CHRISTENSEN, B. M. Reinterpretation of the Genetics of Susceptibility of *Aedes aegypti* to *Plasmodium gallinaceum*. **The Journal of Parasitology**, v. 80, n. 5, p. 705, out. 1994.

TURELL, M.J; BEAMAN J.R; TAMMARIELLO, R. . **Susceptibility of selected strains of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* to Chikungunya Virus**, 1992.

VECTORBASE. Image Gallery. Disponível em: <https://www.vectorbase.org/image-gallery>. Último acesso em: 02/12/2018.

VILLABONA-ARENAS, C. J.; DE OLIVEIRA, J. L.; CAPRA, C. S.; BALARINI, K.; LOUREIRO, M.; FONSECA, C. R. T. P.; PASSOS, S. D.; ZANOTTO, P. M. A. Detection Of Four Dengue Serotypes Suggests Rise In Hyperendemicity In Urban Centers Of Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 2, p. 3–5, 2014.

WANG, H.; CLEM, R. J. The role of IAP antagonist proteins in the core apoptosis pathway of the mosquito disease vector *Aedes aegypti*. **Apoptosis**, v. 16, n. 3, p. 235–248, 28 mar. 2011.

WICKRAMASINGHE, M. B.; COSTA, H. H. Mosquito control with larvivorous fish. **Parasitology Today**, v. 2, n. 8, p. 228–230, ago. 1986.

XI, Z.; RAMIREZ, J. L.; DIMOPOULOS, G. The *Aedes aegypti* Toll Pathway Controls Dengue Virus Infection. **PLoS Pathogens**, v. 4, n. 7, p. e1000098, 4 jul. 2008.

YORIMITSU, T.; KLIONSKY, D. J. Autophagy: molecular machinery for self-eating. **Cell Death and Differentiation**, v. 12, p. 1542–1552, nov. 2005.

ZANLUCA, C.; MELO, V. C. A.; MOSIMANN, A. L. P.; DOS SANTOS, G. I. C.; DOS SANTOS, C. N. D.; LUZ, K. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 4, p. 569–572, 9 jun. 2015.

ZHOU, J.; HE, X.; PICKETT, J. A.; FIELD, L. M. Identification of odorant-binding proteins of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*: genome annotation and comparative analyses. **Insect Molecular Biology**, v. 17, n. 2, p. 147 – 163,abr.2008.

8 Material Complementar

Tabelas Suplementar

S1: Tabela com os valores do Ct de cada amostra para o gene endógeno **RPS7** nos ovários de fêmeas sadias e infectadas por ZIKV^{BR} e DENV-2.

1º Experimento Biológico			2º Experimento Biológico		3º Experimento Biológico	
TEMPO	GRUPO	Ct Time	GRUPO	Ct Time	GRUPO	Ct Time
12 horas 1º CG	CONTROLE	15,12	CONTROLE	13,88	CONTROLE	13,31
	CONTROLE	15,09	CONTROLE	13,67	CONTROLE	13,41
	CONTROLE	15,16	CONTROLE	13,74	CONTROLE	13,43
	ZIKV	14,86	ZIKV	13,56	ZIKV	13,27
	ZIKV	14,85	ZIKV	13,68	ZIKV	13,42
	ZIKV	15,04	ZIKV	13,53	ZIKV	13,42
	DENV	14,7	DENV	13,98	DENV	13,58
	DENV	14,77	DENV	13,89	DENV	13,16
	DENV	14,74	DENV	13,95	DENV	13,34
24 horas 1º CG	CONTROLE	15,33	CONTROLE	14,05	CONTROLE	13,47
	CONTROLE	15,45	CONTROLE	14,19	CONTROLE	13,52
	CONTROLE	15,39	CONTROLE	14,12	CONTROLE	13,56
	ZIKV	15,11	ZIKV	13,74	ZIKV	13,36
	ZIKV	15,16	ZIKV	13,77	ZIKV	13,37
	ZIKV	15,18	ZIKV	13,88	ZIKV	13,25
	DENV	15,16	DENV	13,97	DENV	13,74
	DENV	15	DENV	13,91	DENV	13,57
	DENV	15,13	DENV	13,95	DENV	13,5
12 horas 2º CG	CONTROLE	15,02	CONTROLE	14,02	CONTROLE	13,57
	CONTROLE	14,96	CONTROLE	14,02	CONTROLE	13,67
	CONTROLE	15,1	CONTROLE	14,03	CONTROLE	13,83
	ZIKV	15,02	ZIKV	13,97	ZIKV	13,91
	ZIKV	15,16	ZIKV	14,61	ZIKV	14,04
	ZIKV	15,01	ZIKV	14,43	ZIKV	13,83
	DENV	15,05	DENV	14,37	DENV	13,76
	DENV	15,17	DENV	14,2	DENV	13,93
	DENV	15,54	DENV	14,38	DENV	13,84
24 horas 2º CG	CONTROLE	15,86	CONTROLE	14,74	CONTROLE	14,33
	CONTROLE	15,7	CONTROLE	14,69	CONTROLE	14,37
	CONTROLE	15,82	CONTROLE	14,65	CONTROLE	14,36
	ZIKV	15,34	ZIKV	14,81	ZIKV	14,44
	ZIKV	15,28	ZIKV	14,9	ZIKV	14,52
	ZIKV	15,51	ZIKV	14,84	ZIKV	14,59
	DENV	15,8	DENV	14,81	DENV	14,43
	DENV	15,94	DENV	14,85	DENV	14,58
	DENV	15,9	DENV	14,75	DENV	14,96
12 horas 3º CG	CONTROLE	*	CONTROLE	13,69	CONTROLE	13,85
	CONTROLE	*	CONTROLE	13,71	CONTROLE	13,92
	CONTROLE	*	CONTROLE	13,85	CONTROLE	13,79
	ZIKV	*	ZIKV	13,53	ZIKV	13,5
	ZIKV	*	ZIKV	13,7	ZIKV	13,53
	ZIKV	*	ZIKV	13,55	ZIKV	13,51
	DENV	*	DENV	13,77	DENV	13,84
	DENV	*	DENV	13,66	DENV	13,43
	DENV	*	DENV	13,8	DENV	13,72
24 horas 3º CG	CONTROLE	*	CONTROLE	14,6	CONTROLE	14,49
	CONTROLE	*	CONTROLE	14,76	CONTROLE	14,55
	CONTROLE	*	CONTROLE	14,73	CONTROLE	14,62
	ZIKV	*	ZIKV	14,13	ZIKV	14,12
	ZIKV	*	ZIKV	14,23	ZIKV	14,08
	ZIKV	*	ZIKV	14,32	ZIKV	14,23
	DENV	*	DENV	14,24	DENV	14,22
	DENV	*	DENV	14,17	DENV	14,03
	DENV	*	DENV	14,2	DENV	14,06

S2: Tabela com os valores do Ct de cada amostra em 3 replicatas experimentais para o gene **IAP1** nos ovários de fêmeas sadias e infectadas por ZIKV^{BR} e DENV-2

1º Experimento Biológico			2º Experimento Biológico		3º Experimento Biológico	
TEMPO	GRUPO	Ct Time	GRUPO	Ct Time	GRUPO	Ct Time
12 horas 1º CG	CONTROLE	18,4	CONTROLE	17,67	CONTROLE	17,14
	CONTROLE	18,45	CONTROLE	17,75	CONTROLE	17,34
	CONTROLE	18,3	CONTROLE	17,68	CONTROLE	17,03
	ZIKV	18,7	ZIKV	17,64	ZIKV	17,09
	ZIKV	18,53	ZIKV	17,45	ZIKV	17,14
	ZIKV	18,44	ZIKV	17,53	ZIKV	17,2
	DENV	18,61	DENV	17,53	DENV	17,45
	DENV	18,19	DENV	17,57	DENV	17,65
	DENV	18,27	DENV	17,51	DENV	17,45
24 horas 1º CG	CONTROLE	18,78	CONTROLE	18,43	CONTROLE	17,57
	CONTROLE	18,93	CONTROLE	18,26	CONTROLE	17,86
	CONTROLE	18,96	CONTROLE	18,14	CONTROLE	17,78
	ZIKV	18,98	ZIKV	17,48	ZIKV	17,64
	ZIKV	18,78	ZIKV	17,46	ZIKV	17,53
	ZIKV	18,65	ZIKV	17,71	ZIKV	17,66
	DENV	18,37	DENV	17,6	DENV	18,03
	DENV	18,5	DENV	17,57	DENV	18,01
	DENV	18,48	DENV	17,99	DENV	18,18
12 horas 2º CG	CONTROLE	18,98	CONTROLE	18,75	CONTROLE	17,97
	CONTROLE	18,96	CONTROLE	18,66	CONTROLE	18,18
	CONTROLE	18,96	CONTROLE	18,93	CONTROLE	18,07
	ZIKV	18,69	ZIKV	18,04	ZIKV	18,58
	ZIKV	18,63	ZIKV	18,08	ZIKV	18,49
	ZIKV	18,66	ZIKV	18,04	ZIKV	18,6
	DENV	18,94	DENV	18,25	DENV	18,29
	DENV	19,09	DENV	18,41	DENV	18,34
	DENV	18,83	DENV	18,44	DENV	18,41
24 horas 2º CG	CONTROLE	19,81	CONTROLE	18,79	CONTROLE	18,29
	CONTROLE	19,85	CONTROLE	18,85	CONTROLE	18,41
	CONTROLE	19,72	CONTROLE	18,83	CONTROLE	18,52
	ZIKV	19,1	ZIKV	18,54	ZIKV	18,66
	ZIKV	19,17	ZIKV	18,58	ZIKV	18,84
	ZIKV	19,19	ZIKV	18,62	ZIKV	18,83
	DENV	19,12	DENV	19,12	DENV	18,93
	DENV	19,22	DENV	19,05	DENV	18,79
	DENV	19,25	DENV	18,97	DENV	18,8
12 horas 3º CG	CONTROLE	*	CONTROLE	18,15	CONTROLE	18,6
	CONTROLE	*	CONTROLE	18,09	CONTROLE	18,58
	CONTROLE	*	CONTROLE	18,17	CONTROLE	18,44
	ZIKV	*	ZIKV	18,09	ZIKV	18,19
	ZIKV	*	ZIKV	17,99	ZIKV	18,09
	ZIKV	*	ZIKV	17,97	ZIKV	18,17
	DENV	*	DENV	17,99	DENV	18,58
	DENV	*	DENV	17,9	DENV	18,62
	DENV	*	DENV	17,82	DENV	18,51
24 horas 3º CG	CONTROLE	*	CONTROLE	18,66	CONTROLE	18,85
	CONTROLE	*	CONTROLE	18,61	CONTROLE	18,89
	CONTROLE	*	CONTROLE	18,32	CONTROLE	18,82
	ZIKV	*	ZIKV	18,4	ZIKV	18,81
	ZIKV	*	ZIKV	18,58	ZIKV	18,82
	ZIKV	*	ZIKV	18,57	ZIKV	18,78
	DENV	*	DENV	18,45	DENV	18,5
	DENV	*	DENV	18,53	DENV	18,49
	DENV	*	DENV	18,51	DENV	18,44

S3: Tabela com os valores do Ct de cada amostra em 3 replicatas experimentais para o gene **DRONC** nos ovários de fêmeas sadias e infectadas por ZIKV^{BR} e DENV-2

1º Experimento Biológico			2º Experimento Biológico		3º Experimento Biológico	
TEMPO	GRUPO	Ct Time	GRUPO	Ct Time	GRUPO	Ct Time
12 horas 1º CG	CONTROLE	21,41	CONTROLE	19,9	CONTROLE	20,17
	CONTROLE	21,19	CONTROLE	19,83	CONTROLE	20,36
	CONTROLE	21,23	CONTROLE	19,73	CONTROLE	20,24
	ZIKV	21,69	ZIKV	19,64	ZIKV	19,89
	ZIKV	21,78	ZIKV	19,66	ZIKV	19,83
	ZIKV	21,49	ZIKV	19,82	ZIKV	19,94
	DENV	21,31	DENV	19,74	DENV	19,81
	DENV	20,99	DENV	19,72	DENV	19,8
24 horas 1º CG	DENV	21,01	DENV	19,82	DENV	19,82
	CONTROLE	21,25	CONTROLE	19,64	CONTROLE	20,23
	CONTROLE	21,39	CONTROLE	19,52	CONTROLE	20,02
	CONTROLE	21,41	CONTROLE	19,83	CONTROLE	20,45
	ZIKV	21,53	ZIKV	19,32	ZIKV	19,67
	ZIKV	21,34	ZIKV	19,21	ZIKV	19,58
	ZIKV	21,25	ZIKV	19,39	ZIKV	19,66
	DENV	21,1	DENV	19,64	DENV	20,03
DENV	21,25	DENV	19,4	DENV	20,08	
DENV	21,19	DENV	19,65	DENV	20,14	

TEMPO	GRUPO	Ct Time	GRUPO	Ct Time	GRUPO	Ct Time
12 horas 2º CG	CONTROLE	21,74	CONTROLE	21,12	CONTROLE	20,49
	CONTROLE	21,93	CONTROLE	21,15	CONTROLE	20,66
	CONTROLE	21,86	CONTROLE	21,13	CONTROLE	20,53
	ZIKV	21,75	ZIKV	20,87	ZIKV	20,68
	ZIKV	21,81	ZIKV	20,81	ZIKV	20,58
	ZIKV	21,68	ZIKV	20,89	ZIKV	20,7
	DENV	23,15	DENV	20,88	DENV	20,74
	DENV	23,23	DENV	21,04	DENV	20,71
24 horas 2º CG	DENV	23,19	DENV	21,26	DENV	20,72
	CONTROLE	21,9	CONTROLE	21,14	CONTROLE	20,8
	CONTROLE	21,95	CONTROLE	21,05	CONTROLE	20,71
	CONTROLE	21,95	CONTROLE	21,18	CONTROLE	20,8
	ZIKV	22,1	ZIKV	20,87	ZIKV	21,1
	ZIKV	22,09	ZIKV	20,81	ZIKV	21,09
	ZIKV	21,9	ZIKV	20,89	ZIKV	21,24
	DENV	21,87	DENV	20,88	DENV	21,16
DENV	21,89	DENV	21,04	DENV	21,08	
DENV	21,86	DENV	21,26	DENV	21,08	

TEMPO	GRUPO	Ct Time	GRUPO	Ct Time	GRUPO	Ct Time
12 horas 3º CG	CONTROLE	*	CONTROLE	20,25	CONTROLE	21,44
	CONTROLE	*	CONTROLE	20,35	CONTROLE	21,46
	CONTROLE	*	CONTROLE	20,12	CONTROLE	21,42
	ZIKV	*	ZIKV	19,8	ZIKV	20,4
	ZIKV	*	ZIKV	19,78	ZIKV	20,55
	ZIKV	*	ZIKV	19,65	ZIKV	20,48
	DENV	*	DENV	20,54	DENV	20,91
	DENV	*	DENV	20,3	DENV	20,57
24 horas 3º CG	DENV	*	DENV	20,13	DENV	20,47
	CONTROLE	*	CONTROLE	21,04	CONTROLE	21,42
	CONTROLE	*	CONTROLE	21,08	CONTROLE	21,5
	CONTROLE	*	CONTROLE	21,13	CONTROLE	21,57
	ZIKV	*	ZIKV	20,58	ZIKV	20,39
	ZIKV	*	ZIKV	20,39	ZIKV	20,6
	ZIKV	*	ZIKV	20,44	ZIKV	20,8
	DENV	*	DENV	20,8	DENV	21,23
DENV	*	DENV	20,77	DENV	21,02	
DENV	*	DENV	20,64	DENV	21,12	

S4: Tabela com os valores do Ct de cada amostra em 3 replicatas experimentais para o gene **CASP7** nos ovários de fêmeas saudas e infectadas por ZIKV^{BR} e DENV-2

1º Experimento Biológico			2º Experimento Biológico		3º Experimento Biológico	
TEMPO	GRUPO	Ct Time	GRUPO	Ct Time	GRUPO	Ct Time
12 horas 1º CG	CONTROLE	20,5	CONTROLE	19,32	CONTROLE	19,26
	CONTROLE	20,64	CONTROLE	19,34	CONTROLE	19,46
	CONTROLE	20,67	CONTROLE	19,3	CONTROLE	19,45
	ZIKV	20,5	ZIKV	19,13	ZIKV	19,33
	ZIKV	20,58	ZIKV	19,4	ZIKV	19,76
	ZIKV	20,65	ZIKV	19,07	ZIKV	19,49
	DENV	20,31	DENV	19,54	DENV	19,37
	DENV	20,19	DENV	19,39	DENV	19,16
	DENV	20,33	DENV	19,44	DENV	19,2
24 horas 1º CG	CONTROLE	20,54	CONTROLE	20,62	CONTROLE	19,29
	CONTROLE	20,72	CONTROLE	20,21	CONTROLE	19,28
	CONTROLE	20,8	CONTROLE	19,8	CONTROLE	19,42
	ZIKV	20,47	ZIKV	19,15	ZIKV	19
	ZIKV	20,61	ZIKV	19,04	ZIKV	18,92
	ZIKV	20,79	ZIKV	19,3	ZIKV	19,12
	DENV	20,4	DENV	19,26	DENV	19,4
	DENV	20,37	DENV	19,31	DENV	19,55
	DENV	20,52	DENV	19,22	DENV	19,53
12 horas 2º CG	CONTROLE	21,39	CONTROLE	20,63	CONTROLE	19,75
	CONTROLE	21,11	CONTROLE	20,47	CONTROLE	19,98
	CONTROLE	20,95	CONTROLE	20,5	CONTROLE	19,74
	ZIKV	20,75	ZIKV	19,99	ZIKV	20,03
	ZIKV	20,9	ZIKV	20,05	ZIKV	20,17
	ZIKV	20,91	ZIKV	20	ZIKV	20,07
	DENV	21,26	DENV	20,25	DENV	19,96
	DENV	21,13	DENV	20,38	DENV	19,84
	DENV	21	DENV	20,05	DENV	19,89
24 horas 2º CG	CONTROLE	21,22	CONTROLE	20,22	CONTROLE	19,98
	CONTROLE	21,35	CONTROLE	20,25	CONTROLE	20,05
	CONTROLE	21,27	CONTROLE	20,1	CONTROLE	20,02
	ZIKV	20,86	ZIKV	20,2	ZIKV	20,16
	ZIKV	20,88	ZIKV	20,22	ZIKV	20,29
	ZIKV	21	ZIKV	20,23	ZIKV	20,33
	DENV	21,12	DENV	20,28	DENV	19,86
	DENV	21,14	DENV	20,51	DENV	20,37
	DENV	21	DENV	20,26	DENV	20,08
12 horas 3º CG	CONTROLE	*	CONTROLE	19,65	CONTROLE	20,05
	CONTROLE	*	CONTROLE	19,98	CONTROLE	20,11
	CONTROLE	*	CONTROLE	19,72	CONTROLE	20,17
	ZIKV	*	ZIKV	19,56	ZIKV	19,49
	ZIKV	*	ZIKV	19,79	ZIKV	19,82
	ZIKV	*	ZIKV	19,54	ZIKV	19,64
	DENV	*	DENV	19,58	DENV	19,98
	DENV	*	DENV	19,75	DENV	19,93
	DENV	*	DENV	19,83	DENV	19,95
24 horas 3º CG	CONTROLE	*	CONTROLE	20,3	CONTROLE	20,31
	CONTROLE	*	CONTROLE	20,29	CONTROLE	20,14
	CONTROLE	*	CONTROLE	20,35	CONTROLE	20,49
	ZIKV	*	ZIKV	19,75	ZIKV	19,74
	ZIKV	*	ZIKV	19,87	ZIKV	19,99
	ZIKV	*	ZIKV	19,83	ZIKV	19,79
	DENV	*	DENV	19,74	DENV	19,98
	DENV	*	DENV	19,97	DENV	19,84
	DENV	*	DENV	19,81	DENV	19,95

S5: Tabela com os valores do Ct de cada amostra em 3 replicatas experimentais para o gene **CASP16** nos ovários de fêmeas saudáveis e infectadas por ZIKV^{BR} e DENV-2

1º Experimento Biológico			2º Experimento Biológico		3º Experimento Biológico	
TEMPO	GRUPO	Ct Time	GRUPO	Ct Time	GRUPO	Ct Time
12 horas 1º CG	CONTROLE	20,91	CONTROLE	18,37	CONTROLE	18,22
	CONTROLE	21,09	CONTROLE	18,49	CONTROLE	18,05
	CONTROLE	20,85	CONTROLE	18,34	CONTROLE	18,07
	ZIKV	20,8	ZIKV	18,49	ZIKV	18,87
	ZIKV	20,85	ZIKV	18,17	ZIKV	18,56
	ZIKV	21,33	ZIKV	18,25	ZIKV	18,61
	DENV	20,36	DENV	18,29	DENV	17,69
	DENV	20,28	DENV	18,49	DENV	17,83
	DENV	20,45	DENV	18,4	DENV	17,73
24 horas 1º CG	CONTROLE	21,4	CONTROLE	18,54	CONTROLE	17,85
	CONTROLE	22,33	CONTROLE	18,69	CONTROLE	17,81
	CONTROLE	21,86	CONTROLE	18,85	CONTROLE	17,92
	ZIKV	20,91	ZIKV	17,65	ZIKV	17,74
	ZIKV	20,79	ZIKV	17,86	ZIKV	17,58
	ZIKV	20,82	ZIKV	17,95	ZIKV	17,79
	DENV	20,63	DENV	18,65	DENV	18,49
	DENV	20,47	DENV	18,66	DENV	18,19
	DENV	20,91	DENV	18,79	DENV	18,32
12 horas 2º CG	CONTROLE	20,52	CONTROLE	18,92	CONTROLE	17,83
	CONTROLE	20,14	CONTROLE	18,98	CONTROLE	18,03
	CONTROLE	20,33	CONTROLE	18,95	CONTROLE	18,16
	ZIKV	20,11	ZIKV	18,07	ZIKV	18,74
	ZIKV	20,04	ZIKV	18,26	ZIKV	18,63
	ZIKV	20,51	ZIKV	18,58	ZIKV	18,7
	DENV	20,84	DENV	18,93	DENV	18,12
	DENV	21,48	DENV	19,12	DENV	18,55
	DENV	21,16	DENV	19,32	DENV	18,34
24 horas 2º CG	CONTROLE	20,96	CONTROLE	18,59	CONTROLE	18,67
	CONTROLE	20,91	CONTROLE	18,53	CONTROLE	18,6
	CONTROLE	21,05	CONTROLE	18,72	CONTROLE	18,51
	ZIKV	20,56	ZIKV	18,7	ZIKV	18,6
	ZIKV	20,35	ZIKV	18,56	ZIKV	18,52
	ZIKV	20,72	ZIKV	18,74	ZIKV	18,65
	DENV	21,37	DENV	18,69	DENV	18,81
	DENV	21,48	DENV	18,57	DENV	18,88
	DENV	21,43	DENV	18,57	DENV	18,9
12 horas 3º CG	CONTROLE	*	CONTROLE	18,11	CONTROLE	18,69
	CONTROLE	*	CONTROLE	18,29	CONTROLE	18,68
	CONTROLE	*	CONTROLE	18,2	CONTROLE	18,68
	ZIKV	*	ZIKV	18,5	ZIKV	18,24
	ZIKV	*	ZIKV	17,82	ZIKV	18,01
	ZIKV	*	ZIKV	18,05	ZIKV	18,71
	DENV	*	DENV	18,21	DENV	18,63
	DENV	*	DENV	18,49	DENV	18,93
	DENV	*	DENV	18,77	DENV	19,24
24 horas 3º CG	CONTROLE	*	CONTROLE	18,63	CONTROLE	18,74
	CONTROLE	*	CONTROLE	18,6	CONTROLE	18,61
	CONTROLE	*	CONTROLE	18,71	CONTROLE	18,67
	ZIKV	*	ZIKV	18,61	ZIKV	18,39
	ZIKV	*	ZIKV	18,54	ZIKV	18,57
	ZIKV	*	ZIKV	18,73	ZIKV	18,59
	DENV	*	DENV	18,54	DENV	19,15
	DENV	*	DENV	18,6	DENV	19,29
	DENV	*	DENV	18,52	DENV	19,22

S6: Tabela com os valores do Ct de cada amostra em 3 replicatas experimentais para o gene **ATG4A** nos ovários de fêmeas saudáveis e infectadas por ZIKV^{BR} e DENV-2

1º Experimento Biológico			2º Experimento Biológico		3º Experimento Biológico	
TEMPO	GRUPO	Ct Time	GRUPO	Ct Time	GRUPO	Ct Time
12 horas 1º CG	CONTROLE	21,21	CONTROLE	20,75	CONTROLE	20,46
	CONTROLE	21,29	CONTROLE	20,81	CONTROLE	20,48
	CONTROLE	21,11	CONTROLE	20,66	CONTROLE	20,14
	ZIKV	21,95	ZIKV	20,65	ZIKV	20,32
	ZIKV	22,17	ZIKV	20,68	ZIKV	20,34
	ZIKV	21,97	ZIKV	20,77	ZIKV	20,33
	DENV	22,4	DENV	20,81	DENV	20,93
	DENV	22,43	DENV	20,72	DENV	20,62
	DENV	22,35	DENV	20,66	DENV	20,71
24 horas 1º CG	CONTROLE	21,91	CONTROLE	20,56	CONTROLE	20,44
	CONTROLE	21,99	CONTROLE	20,6	CONTROLE	20,69
	CONTROLE	21,87	CONTROLE	20,63	CONTROLE	20,54
	ZIKV	22,05	ZIKV	20,37	ZIKV	20,5
	ZIKV	22,06	ZIKV	20,13	ZIKV	20,78
	ZIKV	21,99	ZIKV	20,32	ZIKV	20,68
	DENV	22,86	DENV	20,56	DENV	21,49
	DENV	22,82	DENV	20,59	DENV	21,48
	DENV	22,8	DENV	20,54	DENV	21,43
12 horas 2º CG	CONTROLE	21,98	CONTROLE	22,28	CONTROLE	21,35
	CONTROLE	22	CONTROLE	22,16	CONTROLE	21,11
	CONTROLE	22,03	CONTROLE	22,32	CONTROLE	21,3
	ZIKV	22,9	ZIKV	21,92	ZIKV	21,41
	ZIKV	22,83	ZIKV	21,98	ZIKV	21,46
	ZIKV	22,87	ZIKV	21,81	ZIKV	21,69
	DENV	22,78	DENV	22,18	DENV	21,55
	DENV	22,78	DENV	21,77	DENV	21,37
	DENV	22,7	DENV	21,7	DENV	21,32
24 horas 2º CG	CONTROLE	22,93	CONTROLE	22,84	CONTROLE	21,46
	CONTROLE	22,97	CONTROLE	22,88	CONTROLE	21,52
	CONTROLE	23,09	CONTROLE	22,91	CONTROLE	21,37
	ZIKV	22,51	ZIKV	21,68	ZIKV	21,88
	ZIKV	22,59	ZIKV	21,65	ZIKV	21,92
	ZIKV	22,6	ZIKV	21,79	ZIKV	21,9
	DENV	22,38	DENV	22,03	DENV	21,94
	DENV	22,48	DENV	22,07	DENV	21,88
	DENV	22,39	DENV	22	DENV	21,99
12 horas 3º CG	CONTROLE	*	CONTROLE	21,1	CONTROLE	21,93
	CONTROLE	*	CONTROLE	21,19	CONTROLE	21,72
	CONTROLE	*	CONTROLE	21,15	CONTROLE	21,82
	ZIKV	*	ZIKV	22,06	ZIKV	21,63
	ZIKV	*	ZIKV	22,27	ZIKV	21,57
	ZIKV	*	ZIKV	22,17	ZIKV	21,43
	DENV	*	DENV	21,98	DENV	21,8
	DENV	*	DENV	21,77	DENV	21,58
	DENV	*	DENV	21,83	DENV	21,53
24 horas 3º CG	CONTROLE	*	CONTROLE	21,43	CONTROLE	21,7
	CONTROLE	*	CONTROLE	21,55	CONTROLE	21,81
	CONTROLE	*	CONTROLE	21,45	CONTROLE	21,68
	ZIKV	*	ZIKV	21,8	ZIKV	21,62
	ZIKV	*	ZIKV	21,92	ZIKV	21,82
	ZIKV	*	ZIKV	21,86	ZIKV	21,64
	DENV	*	DENV	22	DENV	22,03
	DENV	*	DENV	22,07	DENV	22
	DENV	*	DENV	22,11	DENV	22,06

S7: Tabela com os valores do Ct de cada amostra em 3 replicatas experimentais para o gene **ATG8** nos ovários de fêmeas sadias e infectadas por ZIKV^{BR} e DENV-2

2º Experimento Biológico			3º Experimento Biológico	
TEMPO	GRUPO	Ct Time	GRUPO	Ct Time
12 horas 1º CG	CONTROLE	25,65	CONTROLE	26,72
	CONTROLE	25,98	CONTROLE	26,6
	CONTROLE	25,81	CONTROLE	26,55
	ZIKV	26,07	ZIKV	26,76
	ZIKV	26,06	ZIKV	26,56
	ZIKV	25,95	ZIKV	26,97
	DENV	26,02	DENV	26,59
	DENV	25,89	DENV	26,3
24 horas 1º CG	DENV	26,4	DENV	26,44
	CONTROLE	26,3	CONTROLE	26,92
	CONTROLE	26,7	CONTROLE	26,68
	CONTROLE	27,09	CONTROLE	27,03
	ZIKV	25,94	ZIKV	26,7
	ZIKV	25,71	ZIKV	26,81
	ZIKV	25,76	ZIKV	26,91
	DENV	26,44	DENV	26,77
DENV	26,19	DENV	26,53	
DENV	26,27	DENV	26,65	

TEMPO	GRUPO	Ct Time	GRUPO	Ct Time
12 horas 2º CG	CONTROLE	27,28	CONTROLE	27,02
	CONTROLE	27,36	CONTROLE	26,9
	CONTROLE	27,61	CONTROLE	26,96
	ZIKV	26,55	ZIKV	27,81
	ZIKV	26,64	ZIKV	27,74
	ZIKV	26,48	ZIKV	27,74
	DENV	27	DENV	26,71
	DENV	26,95	DENV	26,95
24 horas 2º CG	DENV	27,06	DENV	26,83
	CONTROLE	26,88	CONTROLE	26,96
	CONTROLE	26,8	CONTROLE	27,07
	CONTROLE	26,97	CONTROLE	27,01
	ZIKV	26,71	ZIKV	27,96
	ZIKV	26,63	ZIKV	27,74
	ZIKV	26,67	ZIKV	27,94
	DENV	26,45	DENV	27,59
DENV	26,54	DENV	27,7	
DENV	26,76	DENV	27,47	

TEMPO	GRUPO	Ct Time	GRUPO	Ct Time
12 horas 3º CG	CONTROLE	26,71	CONTROLE	27,83
	CONTROLE	26,71	CONTROLE	27,54
	CONTROLE	26,51	CONTROLE	27,64
	ZIKV	27,12	ZIKV	29,07
	ZIKV	27,06	ZIKV	29,05
	ZIKV	27,19	ZIKV	29,04
	DENV	26,06	DENV	26,39
	DENV	26,09	DENV	26,39
24 horas 3º CG	DENV	26,12	DENV	26,39
	CONTROLE	26,23	CONTROLE	27,27
	CONTROLE	26,13	CONTROLE	27,18
	CONTROLE	26,59	CONTROLE	27,58
	ZIKV	26,12	ZIKV	26,54
	ZIKV	26,52	ZIKV	26,93
	ZIKV	26	ZIKV	26,87
	DENV	25,8	DENV	27,58
DENV	25,68	DENV	27,35	
DENV	25,95	DENV	27,13	

S8: Tabela com os valores do Ct de cada amostra em 3 replicatas experimentais para o gene **ATG12** nos ovários de fêmeas sadias e infectadas por ZIKV^{BR} e DENV-2

2º Experimento Biológico			3º Experimento Biológico	
TEMPO	GRUPO	Ct Time	GRUPO	Ct Time
12 horas 1º CG	CONTROLE	19,86	CONTROLE	20,62
	CONTROLE	19,9	CONTROLE	20,45
	CONTROLE	19,95	CONTROLE	20,39
	ZIKV	19,96	ZIKV	19,87
	ZIKV	19,91	ZIKV	20,21
	ZIKV	19,77	ZIKV	19,89
	DENV	20,4	DENV	20,32
	DENV	20,25	DENV	20,2
	DENV	20,1	DENV	20,24
24 horas 1º CG	CONTROLE	20,35	CONTROLE	20,27
	CONTROLE	20,48	CONTROLE	20,33
	CONTROLE	20,6	CONTROLE	20,39
	ZIKV	19,67	ZIKV	19,87
	ZIKV	19,66	ZIKV	19,85
	ZIKV	19,9	ZIKV	19,99
	DENV	20,02	DENV	20,87
	DENV	20,02	DENV	20,6
	DENV	20,21	DENV	20,73
TEMPO	GRUPO	Ct Time	GRUPO	Ct Time
12 horas 2º CG	CONTROLE	20,54	CONTROLE	20,73
	CONTROLE	20,85	CONTROLE	20,6
	CONTROLE	20,62	CONTROLE	20,84
	ZIKV	20,58	ZIKV	21,34
	ZIKV	20,74	ZIKV	21,33
	ZIKV	20,63	ZIKV	21,43
	DENV	20,92	DENV	21,37
	DENV	20,96	DENV	21,31
	DENV	20,88	DENV	21,19
24 horas 2º CG	CONTROLE	20,69	CONTROLE	20,4
	CONTROLE	20,85	CONTROLE	20,52
	CONTROLE	20,81	CONTROLE	20,72
	ZIKV	20,86	ZIKV	20,6
	ZIKV	20,86	ZIKV	20,7
	ZIKV	20,86	ZIKV	20,67
	DENV	20,59	DENV	20,9
	DENV	20,75	DENV	20,87
	DENV	20,8	DENV	20,88
TEMPO	GRUPO	Ct Time	GRUPO	Ct Time
12 horas 3º CG	CONTROLE	20,26	CONTROLE	21,23
	CONTROLE	20,43	CONTROLE	21,28
	CONTROLE	20,42	CONTROLE	21,33
	ZIKV	20,39	ZIKV	21,01
	ZIKV	20,43	ZIKV	20,82
	ZIKV	20,8	ZIKV	20,8
	DENV	20,6	DENV	21,09
	DENV	20,67	DENV	22,04
	DENV	20,39	DENV	21,88
24 horas 3º CG	CONTROLE	20,46	CONTROLE	20,96
	CONTROLE	20,57	CONTROLE	20,89
	CONTROLE	20,82	CONTROLE	20,92
	ZIKV	20,9	ZIKV	20,06
	ZIKV	20,96	ZIKV	20,32
	ZIKV	20,77	ZIKV	20,48
	DENV	20,8	DENV	20,95
	DENV	20,71	DENV	21,02
	DENV	20,63	DENV	21,16

9 Anexos

9.1 *Aedes aegypti* Control Strategies in Brazil: Incorporation of New Technologies to Overcome the Persistence of Dengue Epidemics

Insects **2015**, *6*, 576–594; doi:10.3390/insects6020576

OPEN ACCESS

insects

ISSN 2075-4450

www.mdpi.com/journal/insects/

Review

Aedes aegypti Control Strategies in Brazil: Incorporation of New Technologies to Overcome the Persistence of Dengue Epidemics

Helena R. C. Araújo, Danilo O. Carvalho, Rafaella S. Ioshino, André L. Costa-da-Silva and Margareth L. Capurro *

Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo SP 05508-000, Brazil; E-Mails: helenarca@gmail.com (H.R.C.A.); cdanilo@usp.br (D.O.C.); myxelia@gmail.com (R.S.I.); alcosta@icb.usp.br (A.L.C.S.)

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: mcapurro@icb.usp.br; Tel.: +55-11-30917336; Fax: +55-11-30917417.

Academic Editor: Brian T. Forschler

Received: 19 February 2015 / Accepted: 2 June 2015 / Published: 11 June 2015

Abstract: Dengue is considered to be the most important mosquito-borne viral disease in the world. The *Aedes aegypti* mosquito, its vector, is highly anthropophilic and is very well adapted to urban environments. Although several vaccine candidates are in advanced stages of development no licensed dengue vaccine is yet available. As a result, controlling the spread of dengue still requires that mosquitoes be targeted directly. We review the current methods of dengue vector control focusing on recent technical advances. We first examine the history of Brazil's National Dengue Control Plan in effect since 2002, and we describe its establishment and operation. With the persistent recurrence of dengue epidemics, current strategies should be reassessed to bring to the forefront a discussion of the possible implementation of new technologies in Brazil's mosquito control program.

Keywords: vector control; Brazil; PNCD; integrated mosquito management

1. Introduction

Mosquito-borne diseases are among the leading causes of mortality and morbidity in humans. Globalization of travel and trade, unplanned urbanization and environmental changes have all had a

9.2 Glytube: A Conical Tube and Parafilm M-Based Method as a Simplified Device to Artificially Blood-Feed the Dengue Vector Mosquito, *Aedes aegypti*

OPEN ACCESS [Freely available online](#)



Glytube: A Conical Tube and Parafilm M-Based Method as a Simplified Device to Artificially Blood-Feed the Dengue Vector Mosquito, *Aedes aegypti*

André Luis Costa-da-Silva^{1*}, Flávia Rosa Navarrete¹, Felipe Scassi Salvador², Maria Karina-Costa¹, Rafaella Sayuri Ioshino¹, Diego Soares Azevedo¹, Desirée Rafaela Rocha¹, Camila Malta Romano², Margareth Lara Capurro¹

1 Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brazil, **2** Laboratório de Virologia, Instituto de Medicina Tropical, Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brazil

Abstract

Aedes aegypti, the main vector of dengue virus, requires a blood meal to produce eggs. Although live animals are still the main blood source for laboratory colonies, many artificial feeders are available. These feeders are also the best method for experimental oral infection of *Ae. aegypti* with Dengue viruses. However, most of them are expensive or laborious to construct. Based on principle of Rutledge-type feeder, a conventional conical tube, glycerol and Parafilm-M were used to develop a simple in-house feeder device. The blood feeding efficiency of this apparatus was compared to a live blood source, mice, and no significant differences ($p=0.1189$) were observed between artificial-fed (51.3% of engorgement) and mice-fed groups (40.6%). Thus, an easy to assemble and cost-effective artificial feeder, designated "Glytube" was developed in this report. This simple and efficient feeding device can be built with common laboratory materials for research on *Ae. aegypti*.

Citation: Costa-da-Silva AL, Navarrete FR, Salvador FS, Karina-Costa M, Ioshino RS, et al. (2013) Glytube: A Conical Tube and Parafilm M-Based Method as a Simplified Device to Artificially Blood-Feed the Dengue Vector Mosquito, *Aedes aegypti*. PLoS ONE 8(1): e53816. doi:10.1371/journal.pone.0053816

Editor: Pedro Lagerblad Oliveira, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brazil

Received: October 18, 2012; **Accepted:** December 3, 2012; **Published:** January 14, 2013

Copyright: © 2013 Costa-da-Silva et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (#2008/10254-1; #2009/53637-0) - www.fapesp.br, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq/Departamento de Ciência e Tecnologia – DECT (#555648/2009-5) - www.cnpq.br, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES - www.capes.gov.br, Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular – INCT-EM - www.inct.em.bio.med.ufrj.br. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: alcosta@ib.usp.br

Introduction

Blood feeding of *Aedes aegypti*, the major dengue viruses' vector, is a fundamental part of routine protocols to maintain mosquito colonies in insectary facilities since a blood meal is required for egg production by females [1]. After bioethical certification by animal-care committees [2,3], anesthetized or immobilized live animals are used frequently as a source of blood for mosquitoes [4]. However, use of live animals is not possible in many circumstances. For example, the lack of animal facilities or an animal-use regulatory or permitting structure can limit blood provision. Furthermore, the "3 Rs" principles (reduction, refinement and replacement) in the scientific use of live animals [5] also need to be considered when feeding anautogenous mosquito species. Artificial feeders can be applied to replace live animals as blood sources [4]. Dengue virus infection of *Ae. aegypti* for experimental purposes is usually done with a titrated viremic blood meal and requires an artificial blood-feeder system [6,7].

There are numerous reports showing successful development and use of different devices to artificially feed blood-sucking invertebrate vectors of human pathogens [8–10]. Artificial feeding apparatus for *Ae. aegypti* also are represented extensively in the literature [11–17]. These approaches share common features.

Blood is placed between a heating element (used to mimic vertebrate blood temperature) and a thin membrane, which females penetrate with their proboscis to access and imbibe the blood. One of the most popular devices is Rutledge-type feeder with Parafilm-M® simulating the skin [11]. Several based versions are available, but a few number of these devices is easy to assemble with common materials available in research laboratories and cost-effective [15].

We developed a simple artificial membrane-feeding method using a standard conical tube and Parafilm M as a simplified and convenient apparatus to facilitate the *Ae. aegypti* artificial blood-feeding.

Materials and Methods

Ethics Statement

All experiments with mice were carried out in accordance with the guidelines of the Ethical Principles for Experiment on Animals adopted by Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de laboratório (SBCAL) and approved by the Institucional Ethics Review Committee (Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA)-Universidade de São Paulo, protocol #014.

9.3 Laboratory strains of *Aedes aegypti* are competent to Brazilian Zika virus



RESEARCH ARTICLE

Laboratory strains of *Aedes aegypti* are competent to Brazilian Zika virus

André Luis Costa-da-Silva^{1,2*}, Rafaela Sayuri Ioshino^{1,2}, Helena Rocha Corrêa de Araújo^{1,2}, Bianca Burini Kojin^{1,2}, Paulo Marinho de Andrade Zanotto³, Danielle Bruna Leal Oliveira⁴, Stella Rezende Melo⁴, Edison Luiz Durligon⁴, Margareth Lara Capurro^{1,2*}

1 Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brasil, **2** Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular, INCT-EM, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, **3** Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brasil, **4** Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil

* alicosta@icb.usp.br (ALCS); mcapurro@icb.usp.br (MLC)



OPEN ACCESS

Citation: Costa-da-Silva AL, Ioshino RS, Araújo HRCd, Kojin BB, Zanotto PMdA, Oliveira DBL, et al. (2017) Laboratory strains of *Aedes aegypti* are competent to Brazilian Zika virus. PLoS ONE 12(2): e0171951. doi:10.1371/journal.pone.0171951

Editor: Ole Terenius, Swedish University of Agricultural Sciences, SWEDEN

Received: August 20, 2016

Accepted: January 28, 2017

Published: February 10, 2017

Copyright: © 2017 Costa-da-Silva et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

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

Funding: This work was funded by grants #2013/19921-9 and #2014/17766-9 from São Paulo Research Foundation, www.fapesp.br, grant 003/16 from Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel, www.capes.gov.br, and National Institute of Science and Technology, Molecular Entomology, www.inctem.biomed.usp.br. ALCS and BBK were supported by fellowships #1252482 and #1497027 from Postdoctoral

Abstract

The Zika virus outbreaks are unprecedented human threat in relation to congenital malformations and neurological/autoimmune complications. Since this virus has high potential to spread in regions presenting the vectors, improvement in mosquito control is a top priority. Thus, *Aedes aegypti* laboratory strains will be fundamental to support studies in different research fields implicated on Zika-mosquito interactions which are the basis for the development of innovative control methods. In this sense, our aim was to determine the main infection aspects of a Brazilian Zika strain in reference *Aedes aegypti* laboratory mosquitoes. We orally exposed Rockefeller, Higgs and Rexville mosquitoes to the Brazilian ZIKV (ZIKV^{BR}) and qRT-PCR was applied to determine the infection, dissemination and detection rates of ZIKV in the collected saliva as well as viral levels in mosquito tissues. The three strains sustain the virus development but Higgs showed significantly lower viral loads in bodies at 14 days post-infection (dpi) and the lowest prevalences in bodies and heads. The Rockefeller strain was the most susceptible at 7 dpi but similar dissemination rates were observed at 14 dpi. Although variations exist, the ZIKV^{BR} RNA shows detectable levels in saliva of the three strains at 14 dpi but is only detected in Rockefeller at 7 dpi. Moreover, saliva samples from the three strains were confirmed to be infectious when intrathoracically injected into mosquitoes. The ZIKV^{BR} kinetics was monitored in Rockefeller mosquitoes and virus could be identified in the heads at 4 dpi but was more consistently detected late in infection. Our study presents the first evaluation on how Brazilian Zika virus behaves in reference *Aedes aegypti* strains and shed light on how the infection evolves over time. Vector competence and hallmarks of the ZIKV^{BR} development were revealed in laboratory mosquitoes, providing additional information to accelerate studies focused on ZIKV-mosquito interactions.

9.4 Oviplate: A Convenient and Space-Saving Method to Perform Individual Oviposition Assays in *Aedes aegypti*



Article

Oviplate: A Convenient and Space-Saving Method to Perform Individual Oviposition Assays in *Aedes aegypti*

Rafaella Sayuri Ioshino *, Danilo Oliveira Carvalho, Isabel Cristina Santos Marques, Ediane Saraiva Fernandes, Margareth Lara Capurro and André Luis Costa-da-Silva *

Laboratório de Mosquitos Geneticamente Modificados, Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo 05508-000, Brazil; carvalhodanilo85@gmail.com (D.O.C.); belmarquesusp@gmail.com (L.C.S.M.); edi.sfernandes@gmail.com (E.S.F.); mcapurro@icb.usp.br (M.L.C.)

* Correspondence: myxelia@gmail.com (R.S.I.); costadasilva.andreluis@gmail.com (A.L.C.-d.-S.);
Tel: +55-11-3091-7336

Received: 3 July 2018; Accepted: 9 August 2018; Published: 15 August 2018



Abstract: *Aedes aegypti* is the principal vector of the urban arboviruses and the blood ingestion is important to produce the eggs in this species. To analyze the egg production in *Ae. aegypti*, researchers frequently use small cages or *Drosophila* vials to collect eggs from gravid females. Although it is affordable, the setup is time- and space-consuming, mainly when many mosquitoes need to be individually analyzed. This study presents an easy, cheap, and space-saving method to perform individual oviposition assays in *Ae. aegypti* using cell culture plates. This new method to access fecundity rate was named “oviplate”. The oviplates are setup with 12- or 24-well plates, distilled water and filter paper and they are 78 to 88% cheaper than the traditional *Drosophila* vial assay, respectively. Furthermore, to allocate 72 vitellogenic females in an insectary using *Drosophila* vial is necessary 4100 cm³ against 1400 cm³ and 700 cm³ when using 12- and 24-well plates, respectively. No statistical differences were found between the number of eggs laid in *Drosophila* vials and the oviplates, validating the method. The oviplate method is an affordable, and time- and space-efficient device, and it is simpler to perform individual fecundity analyses in *Ae. aegypti*.

Keywords: *Aedes aegypti*; oviposition; oviplate; fecundity assay; eggs; mosquito

1. Introduction

The importance of *Aedes aegypti* in spreading and sustainment of epidemics caused by Yellow fever (YFV) and Dengue (DENV) viruses in urbanized/anthropized environments is well described. Moreover, this species has also achieved a dramatic status as the main vector for emerging arthropod-borne viruses such as Zika (ZIKV) and Chikungunya (CHIKV) viruses in many tropical and subtropical regions worldwide, confirmed by laboratory and field studies [1–6].

Hematophagy is a relevant behavior in a mosquito vector’s life cycle. The blood meal is intrinsically associated with the pathogen transmission between invertebrate and vertebrate hosts [7]. Furthermore, it is also fundamental to trigger molecular and physiological processes as vitellogenesis and oogenesis, culminating in egg production by the ovaries [8–11].

In *Aedes* genus, the vitellogenesis lasts for 72 h post-blood meal. After this time, females can lay their eggs on wet surfaces to complete the species’ life cycle [11]. The reproduction process in *Ae. aegypti* is one of the critical characteristics for its adaptation in the modified environments and the evolutionary development of desiccation-resistant eggshell is a trait providing species advantage over other mosquito species. This characteristic protects the embryonic development and keeps the embryo viable for several months (up to 12 months) under dry conditions [12,13].

