

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**Departamento de Zoologia**  
**Programa de Pós-graduação em Biologia Animal**  
**Doutorado acadêmico**

**DANILO DE CARVALHO LEANDRO**

**TRANSMISSÃO TRANSOVARIANA DO VÍRUS DENGUE SOROTIPO 2**  
**EM *Aedes Aegypti* (DIPTERA: CULICIDAE) E SUAS**  
**IMPLICAÇÕES NA BIOLOGIA REPRODUTIVA DO MOSQUITO.**

**RECIFE**  
**2015**

**DANILO DE CARVALHO LEANDRO**

**TRANSMISSÃO TRANSOVARIANA DO VÍRUS DENGUE SOROTIPO 2  
EM *Aedes Aegypti* (DIPTERA: CULICIDAE) E SUAS  
IMPLICAÇÕES NA BIOLOGIA REPRODUTIVA DO MOSQUITO.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Animal, modalidade Doutorado, do Departamento de Zoologia da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Zoologia, na área de concentração de Zoologia Aplicada à Saúde Pública.

Orientadora: Dra. Constância Flávia Junqueira Ayres

**RECIFE  
2015**

Catálogo na fonte  
Elaine Barroso  
CRB 1728

**Leandro, Danilo de Carvalho**

**Transmissão transovariana do vírus dengue soropositivo 2 em *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) e suas implicações na biologia reprodutiva do mosquito/ Danilo de Carvalho Leandro– Recife: O Autor, 2015.**

**133 folhas : il., fig., tab.**

**Orientadora: Constância Flávia Junqueira Ayres**

**Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Ciências Biológicas. Biologia Animal, 2015.**

**Inclui bibliografia e anexos**

- 1. Dengue 2. *Aedes aegypti* I. Ayres, Constância Flávia Junqueira (orientadora) II. Título**

**616.91852**

**CDD (22.ed.)**

**UFPE/CCB-2015-131**

**DANILO DE CARVALHO LEANDRO**

**TRANSMISSÃO TRANSOVARIANA DO VÍRUS DENGUE SOROTIPO 2 EM *Aedes Aegypti* (DIPTERA: CULICIDAE) E SUAS IMPLICAÇÕES NA BIOLOGIA REPRODUTIVA DO MOSQUITO.**

Aprovada em: 27/03/2015

BANCA EXAMINADORA

---

Dra. Constância Flávia Junqueira Ayres (Orientadora)  
Departamento de Entomologia do Centro de Pesquisas  
Aggeu Magalhães – CPqAM/FIOCRUZ-PE

---

Dra. Cleide Maria Ribeiro de Albuquerque (1ª Titular)  
Departamento de Zoologia da Universidade Federal de  
Pernambuco – PPGBA/ICB

---

Dra. Maria Alice Varjal de Melo-Santos (2ª Titular)  
Departamento de Entomologia do Centro de Pesquisas  
Aggeu Magalhães – CPqAM/FIOCRUZ-PE

---

Gustavo Lazzaro Rezende (3ª Titular)  
Laboratório de Química e Função de Proteínas e Peptídeos  
da Universidade Estadual do Norte Fluminense – CBB/LQFPP

---

Dra. Janaína Viana de Melo (4ª Titular)  
Departamento de Microscopia do Centro de Tecnologias  
Estratégicas do Nordeste – CETENE/MCTI

---

Dra. Cláudia Maria Fontes de Oliveira (5ª Titular)  
Departamento de Entomologia do Centro de Pesquisas  
Aggeu Magalhães – CPqAM/FIOCRUZ-PE

---

Dra. Tatiany Romão Pompílio de Melo (Suplente Externo)  
Departamento de Entomologia do Centro de Pesquisas  
Aggeu Magalhães – CPqAM/FIOCRUZ-PE

---

Dr. Arthur Campos Dália Maia (Suplente Interno)  
Departamento de Química Fundamental da Universidade  
Federal de Pernambuco – PPGBA/ICB

**Dedico esse trabalho à:**

Sávia Cristina Teixeira de Carvalho:  
minha melhor amiga,  
minha maior fortaleza,  
minha mãe.

## AGRADECIMENTOS

Inicialmente agradeço a Deus, por ter me proporcionado todos os importantes momentos vividos em minha trajetória acadêmica. Momentos de muito aprendizado e de grandes oportunidades na formação profissional e pessoal.

À Constância Flávia Junqueira Ayres, por ter aceitado me orientar e por ter confiado no trabalho por mim desenvolvido. Agradeço às oportunidades diversas proporcionadas durante esses anos. Oportunidades que vão desde a minha participação em cursos de aperfeiçoamento a apresentação de trabalhos em congressos, grupos de estudo, dentre outras.

Ao Núcleo Integrado de Tecnologias (NIT), do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães e à Plataforma de Desenvolvimento Tecnológico e Insumos para a Saúde (PDTIS), pelo suporte tecnológico a partir da utilização da plataforma tecnológica de PCR em tempo real.

À Fundação de Amparo a Ciência do Estado de Pernambuco (FACEPE), pela bolsa de estudos durante todo o período do mestrado.

À banca avaliadora da qualificação, pelas valiosas contribuições.

Ao Prof. André Morgado, pelo apoio como Coordenador do Programa de Pós-graduação em Biologia Animal durante o período do doutorado, sempre oportunizando meios de me apoiar enquanto aluno.

Às Dra. Maria Alice Varjal de Melo-Santos, que sempre teve um tempinho para discutir algum resultado interessante, ou mesmo algum desenho experimental. Alice, suas dicas e atenção foram fundamentais em diversos momentos. Meu especial muito obrigado!

À Janaína Melo, pelo apoio durante vários meses com as amostras de microscopia eletrônica. Sua ajuda foi fundamental! Agradeço também à equipe técnica do Departamento de Microscopia do CETENE, pelo apoio com o processamento das amostras. Agradeço em especial à Fábiana Cristiane, Gabi e Ceça pela ajuda e amizade, nos momentos mais difíceis.

À Elisângela Dias, pelo apoio incondicional em diversos momentos. A você tem o meu mais sincero agradecimento. Seu apoio, que inicialmente foi na histologia, se tornou muito mais amplo e se estendeu para ajuda, inclusive, em momentos diversos no infectório. Nossa amizade construída na luta da bancada será para sempre!

À querida Verônica Gomes, por ter dado apoio inúmeras vezes a esse trabalho. Sua ajuda foi fundamental em vários momentos! Agradeço também à Dra. Marli Tenório, pelas importantes contribuições na parte de virologia molecular, e por ter concedido o uso de diversos equipamentos e as instalações do laboratório de Virologia e Terapia Experimental (Lavite), para a realização de todos os procedimentos relacionados à virologia.

Aos amigos do Departamento de Entomologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – FIOCRUZ, que sempre estiveram ao meu lado, apoiando e estendendo a mão sempre.

À minha mãe, Sávila Carvalho, minha maior apoiadora, torcedora e incentivadora da minha caminhada. O final desse trabalho é o final de um ciclo de formação que sem a senhora, certamente, ele não teria nem iniciado. Obrigado por tudo e por ser tão maravilhosa, sempre! Agradeço ao meu pai, que ao seu modo, sempre esteve ao meu lado, me apoiando e torcendo por mim. Agradeço à minha avó, Edna Carvalho, por estar sempre ao meu lado. Agradeço à Geovanna Carvalho, Rejane Carvalho e Murillo Carvalho, por cada palavra de apoio e pelo amor incondicional em vários momentos.

À minha mãe adotiva da cidade do Recife, Amizadae Leal, e às minhas amigas-irmã Rayana Leal e Amizadae Leal Filha, pelo constante apoio.

Aos amigos especialíssimos que conquistei na minha caminhada durante o doutorado. Não posso deixar de agradecer à Daiane Anzolin, Camila Bione, Cecília Mayer e Fernanda Maria, por serem minha referência enquanto companheirismo na Biologia Animal. Aos meus amigos de todos os dias, Valternandes Carvalho, Fernanda Ribeiro e Patrícia Amazonas, pelos conselhos e apoio sempre. Aos amigos de longa data, Paulo Valfredo, Júlia Nobre, Clarissa Moesh, Gracyano Vivan, Jordão Vivan e Carla Velásquez, pela constante torcida e boas energias.

À Diego Fillipe de Souza, a quem certamente, devo parte dessa caminhada. A você, meu carinho do fundo do coração. Além do meu carinho, o meu amor. Serei sempre grato por ter estado ao meu lado nessa jornada. Obrigado por tudo sempre!

*Que os nossos esforços desafiem as impossibilidades.  
Lembra-vos que as grandes proezas da história  
foram conquistas daquilo que parecia impossível.  
(Charles Chaplin)*

CARVALHO-LEANDRO, D. **Transmissão viral transovariana do vírus Dengue 2 em *Aedes aegypti* (DIPTERA: CULICIDAE) e suas implicações na biologia reprodutiva e do mosquito.** Tese (Doutorado em Biologia Animal). Departamento de Zoologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2015.

## RESUMO

O mosquito *Aedes aegypti*, devido à sua importância na transmissão do vírus dengue, vem sendo estudado para compreensão de aspectos relacionados à competência vetorial. Os ovários, importante órgão envolvido na reprodução do vetor e implicado na transmissão viral transovariana, tem sido negligenciados nas análises de infecção viral. Diante disso, o presente trabalho analisou diversos aspectos da transmissão transovariana, como a cinética de infecção dos ovários pelo vírus Dengue, as taxas de transmissão transovariana na primeira geração filial (F<sub>1</sub>), a influência viral na fertilidade e fecundidade vetorial, os aspectos citopatológicos e ultraestruturais provocados pelo vírus no tecido ovariano, bem como a expressão diferencial de genes de resposta imune e pró-apoptóticos em ovários de *A. aegypti*. Experimentos de infecção artificial com vírus Dengue sorotipo 2 (DENV-2) foram conduzidos em laboratório, utilizando a população de *A. aegypti* proveniente de campo (Petrolina). Para as análises de cinética de infecção ovariana ao 7º, 14º, 21º e 28º dia após a infecção (dpi), dois grupos experimentais foram analisados: grupo alimentação única (AU) e grupo múltiplas alimentações (MA). Investigações das taxas de transmissão viral transovariana foram conduzidas a partir da detecção viral em mosquitos machos e fêmeas, oriundos de ovos de insetos que receberam alimentação sanguínea infectada. Experimentos de fertilidade e fecundidade foram conduzidos em fêmeas que realizaram o repasto sanguíneo infectado, e posteriormente foram individualizadas para coleta de ovos. Ovários foram coletados ao 14º dpi e submetidos a processamento e análise histopatológica e ultraestrutural. Análises da expressão diferencial dos genes *Relish-1* (via Toll), *Hop* (Via JAK-STAT), *Argonaute 2* (mecanismo de RNA de interferência), e dos genes envolvidos na via apoptótica *Caspase 16*, *AeDronc*, *Ae IAP1*, foram conduzidas em ovários de fêmeas do grupo infectado positivas para o DENV-2, no grupo infectado negativo para o DENV-2, no grupo controle, e posteriormente comparadas pelo método  $\Delta\Delta Ct$ . A positividade para o DENV-2 no tecido ovariano foi registrada ao 14º, 21º e 28º dpi nos dois grupos (AU e MA). A quantificação viral das amostras positivas para DENV-2 apresentou resultados muito similares, com exceção do 28º dpi do grupo MA. A transmissão transovariana na F<sub>1</sub> foi registrada apenas em machos ao 14º e 21º dia após a emergência, com 13,3% e 20% de positividade, respectivamente. Nenhuma diferença significativa foi observada nos padrões reprodutivos (fecundidade e fertilidade) nas fêmeas infectadas. Nas análises histopatológicas, observou-se uma invaginação do epitélio folicular dos oócitos do grupo infectado. Nenhuma alteração a nível ultraestrutural foi observada. A expressão de todos os genes avaliados foi maior nos ovários do grupo infectado positivo para o DENV-2, quando comparado a ovários do grupo infectado negativo e controle. A infecção ovariana e a transmissão transovariana ocorrem a níveis muito reduzidos, porém, quando o vírus está presente no tecido ovariano, os títulos virais são muito similares a outros órgãos relatados na literatura. A expressão de genes envolvidos na resposta imune do hospedeiro ao vírus justifica a baixa infectividade, uma vez que se observa no ovário do grupo infectado, a expressão aumentada de todos os genes avaliados. Diante disso, concluímos que a transmissão transovariana é um evento raro e que não causa alterações importantes na biologia reprodutiva do vetor, porém, não deve ser negligenciada, uma vez que é a principal forma da permanência viral nas populações de mosquitos.

**Palavras-chave:** Infecção ovariana. Fertilidade e Fecundidade. Expressão diferencial.

CARVALHO-LEANDRO, D. **Transovarial transmission of Dengue 2 in *Aedes aegypti* (DIPTERA: CULICIDAE) and its implications in the reproductive biology of the mosquito.** Thesis (Doctorate in Animal Biology). Zoology Department. Biological Science Center, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2015.

## ABSTRACT

The mosquito *Aedes aegypti*, due to its importance in the transmission of the dengue virus, has been studied for the comprehension of aspects related to vector competence. The ovaries, important organ involved in the reproduction of the vector and implied in the viral transovarian transmission, have been neglected in the analysis of viral infection. Accordingly, the present study analyzed several aspects of the transovarian transmission as the kinetics of the ovaries infection by the dengue virus, the taxes of the transovarian transmission in the first filial generation ( $F_1$ ), the viral influence in the vector fertility and fecundity, the cytopathological and ultrastructural aspects motivated by the virus in the ovarian tissue, as well as the differential expression of the genes of immune response and pro-apoptotic in *A. aegypti* ovaries. Experiments of the artificial infection with the Dengue virus serotype 2 (DENV-2) were performed in laboratory by *A. aegypti* population derived from the field (Petrolina). For the analysis of the kinetics of ovarian infection to the 7<sup>th</sup>, 14<sup>th</sup>, 21<sup>st</sup> and 28<sup>th</sup> day post the infection (dpi), two experimental groups were analyzed: unique alimentation group (UA) and multiple alimentations group (MA). Investigations of the taxes of transovarian transmission were conducted starting from the viral detection in male and female mosquitoes coming from the eggs of insects which received infected blood alimentation. Fertility and fecundity experiments were directed in females which reached the infected blood repast and subsequently were individualized for the eggs collection. Ovaries have been collected to the 14<sup>th</sup> dpi and submitted to the process and histopathology and ultra-structural analysis. Analysis of differential gene process *Relish-1* (Toll pathway), *Hop* (JAK-STAT pathway), *Argonaute 2* (mechanism of the RNA interference), and of the genes involved in the via apoptotic *Caspase 16*, *AeDronc*, *Ae IAP1* were conducted to the ovaries of females in the infected group positive for DENV-2 in the group infected negative for the DENV-2 and in the control group and afterwards compared by the method  $\Delta\Delta Ct$ . The positivity for the DENV-2 in the ovarian tissue was registered to the 14<sup>th</sup>, 21<sup>st</sup> and 28<sup>th</sup> dpi in the two groups (UA and MA). The viral quantification of the positive samples for DENV-2 presented similar results, with the exception of 28<sup>th</sup> dpi from the group MA. The transovarian transmission in the  $F_1$  was registered only in males in their 14<sup>th</sup> and 21<sup>st</sup> after the emergency, with 13,3% and 20% of positivity respectively. No significant difference was observed in the reproductive standards (fertility and fecundity) in the infected females. In the histopathology analysis, it was observed an invagination of the follicular epithelium of the oocytes of the infected group. No alteration to the level ultrastructural was observed. The expression of all evaluated genes was bigger in the ovaries from the infected group positive for the DENV-2, when compared to the ovaries of the infected group negative and control. The ovarian infection and the transovarian transmission happen in vey reduced levels, but if the virus is present in the ovarian tissue, the viral titles are very similar to the other organs related to the literature. The expression of the genes involved in the immune response of the host to the virus justifies the low infectivity, once it was observed in the ovary of the group infected, the expanded expression of all evaluated genes. Faced with this, we may conclude that the transovarian transmission is a rare event and that cannot cause important alterations in the vector reproductive biology, but it should not be neglected, once it is the main way of the viral permanence in the mosquitoes' populations.

**Key-words:** Ovarian infection. Fertility and Fecundity. Differential expression.

## LISTA DE FIGURAS

		<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b>	<i>Aedes aegypti</i> : A) Adulto; B) Ciclo de desenvolvimento do mosquito, com as diferentes fases: ovo, larva (L1-L4), pupa e adulto.	<b>25</b>
<b>Figura 2.</b>	Representação esquemática da transmissão vertical e horizontal de arbovírus. A - Transmissão vertical do tipo transovariana, B- Transmissão horizontal que ocorre quando uma fêmea A, infectada, contamina um hospedeiro vertebrado e posteriormente, uma fêmea B, não infectada, alimenta-se no hospedeiro infectado, infectando-se. C- Transmissão horizontal venérea via fluido seminal de macho infectando transovarianamente, infectando a fêmea durante a cópula.	<b>29</b>
<b>Figura 3.</b>	Representação esquemática das diferentes barreiras de infecção em mosquitos.	<b>31</b>
<b>Figura 4.</b>	Vias Toll (A) e Imd (B) em <i>Drosophila</i> , no controle da expressão de peptídeos antimicrobianos. Em <i>Aedes aegypti</i> , REL1 e REL2, foram identificadas como homólogos a Dif/Dorsal e Relish de <i>Drosophila</i> , respectivamente.	<b>36</b>
<b>Figura 5.</b>	Via de sinalização JAK-STAT, em representação esquemática.	<b>38</b>
<b>Figura 6.</b>	Mecanismo de RNA de interferência em representação esquemática. Em <i>Drosophila</i> . dsRNA são reconhecidos por Dicer e clivados em pequenos fragmentos de 21-25nt de tamanho (1), formando o complexo siRNA-proteína (2). Dicer-2 (helicase) desenrola os siRNA fita dupla e as enzimas do complexo RISC se ligam aos siRNAs (3). Os siRNAs ligados com RISC paream-se com a sequência homóloga ao RNA mensageiro (4), e RISC cliva o RNA mensageiro para que este seja degradado por RNAses (5).	<b>40</b>
<b>Figura 7.</b>	Representação esquemática da via apoptótica em <i>Aedes</i>	

- aegypti*. 42
- Figura 8.** Sistema de alimentação sanguínea de fêmeas de *Aedes aegypti* em alimentador artificial, baseado em banho-maria circulante aquecido a 40°C, com recipientes de vidro contendo sangue cobertos com membrana colágena comercial. 49
- Figura 9.** Esquema de análise individual do número de ovos de fêmeas de *Aedes aegypti* dos grupos infectado e controle. 52
- Figura 10.** Esquema de realimentação de fêmeas de *Aedes aegypti* dos grupos infectados e controle em camundongos (*Mus musculus*) anestesiados. A: Visão geral da organização do processo de alimentação. B: Visão aproximada do momento em que uma fêmea de *Aedes aegypti* se alimenta no camundongo (seta). 53
- Figura 11.** Histopatologia de amostras de ovários de fêmeas de *Aedes aegypti*. **A, B e C:** grupo infectado com invaginações no epitélio folicular (seta). **D, E e F:** grupo controle com epitélio ovariolar sem apresentar invaginações (seta). 63
- Figura 12.** Análises ultraestruturais de ovários de fêmeas de *Aedes aegypti* alimentadas artificialmente. **A:** Grupo infectado e **B:** grupo controle. 64

## LISTA DE GRÁFICOS

	<b>Página</b>
<b>Gráfico 1.</b> A: Taxa de infecção transovariana (%) do grupo Alimentação Única (AU) em diferentes dias após a infecção. B: Quantificação viral por PCR quantitativo em tempo real (qPCR) das amostras positivas do grupo AU a partir do número de cópias do gene <i>NS5</i> nas amostras nos diferentes dias após a infecção.	<b>58</b>
<b>Gráfico 2.</b> A: Taxa de infecção transovariana (%) do grupo Múltiplas Alimentações (MA) em diferentes dias após a infecção. B: Quantificação viral por PCR quantitativo em tempo real (qPCR) das amostras positivas do grupo MA a partir do número de cópias do gene <i>NS5</i> nas amostras nos diferentes dias após a infecção.	<b>59</b>
<b>Gráfico 3.</b> A: Número de ovos ovipositados por cada fêmea analisada nos grupos controle e infectado em três diferentes ciclos gonadotróficos. B: Número de larvas em primeiro estágio (L1) resultantes da eclosão dos ovos das fêmeas do grupo controle e infectado em três diferentes ciclos gonadotróficos.	<b>62</b>
<b>Gráfico 4.</b> Expressão diferencial de <i>Argonaute-2</i> , <i>Relish-1</i> , <i>Hop</i> , <i>Caspase-16</i> , <i>AeDronc</i> e <i>AeIAP</i> em ovários de <i>Aedes aegypti</i> do grupo infectado com positividade para DENV-2 em comparação aos ovários de <i>Aedes aegypti</i> do grupo infectado com ovários negativo para DENV-2.	<b>66</b>
<b>Gráfico 5.</b> Expressão diferencial de <i>Argonaute-2</i> , <i>Relish-1</i> , <i>Hop</i> , <i>Caspase-16</i> , <i>AeDronc</i> e <i>AeIAP</i> em ovários de <i>Aedes aegypti</i> do grupo infectado com positividade para DENV-2 em comparação aos ovários de <i>Aedes aegypti</i> do grupo controle (alimentação realizada com sangue não infectado).	<b>67</b>

## LISTA DE TABELAS

	<b>Página</b>
<b>Tabela 1.</b> Sequência dos primers utilizados nas reações de PCR quantitativo em tempo real para determinar a expressão diferencial de diversos genes em ovários de fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> , em diferentes momentos após a alimentação sanguínea infectada com DENV-2.	<b>56</b>
<b>Tabela 2.</b> Titulação viral das alíquotas de sangue humano com DENV-2 coletadas no processo de alimentação sanguínea infectada, em diferentes momentos, para diversas análises.	<b>57</b>
<b>Tabela 3.</b> Número de pools de mosquitos machos e fêmeas da primeira geração filial (F <sub>1</sub> ) analisados para a presença viral ao 3°, 7°, 14°, 21°, 28° e 35° dia após a emergência. Nas fêmeas, as observações foram feitas em pools de corpo e cabeça. Nos machos, as análises foram realizadas a partir de pools de corpo inteiro. Em parênteses observa-se o número de pools positivos para DENV-2. Análises referentes a três experimentos independentes, com variação de título viral.	<b>61</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

<b>A.</b>	Gênero <i>Aedes</i>
<b>An.</b>	Gênero <i>Anopheles</i>
<b>ANOVA</b>	Análise de variância
<b>AU</b>	Alimentação única
<b>Bti</b>	<i>Bacillus thuringiensis israelensis</i>
<b>C</b>	Capsídeo viral
<b>CEUA</b>	Comissão de Ética no Uso de Animais
<b>CPqAM</b>	Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães
<b>Ct</b>	<i>Cycle threshold</i>
<b>Cont.</b>	Controle
<b>D.</b>	Gênero <i>Drosophila</i>
<b>DC</b>	Dengue Clássica
<b>DCR-2</b>	Dicer-2
<b>DENV</b>	Dengue Vírus
<b>DENV-1</b>	Dengue Vírus sorotipo 1
<b>DENV-2</b>	Dengue Vírus sorotipo 2
<b>DENV-3</b>	Dengue Vírus sorotipo 3
<b>DENV-4</b>	Dengue Vírus sorotipo 4
<b>Dif</b>	<i>Dorsal-related immunity factor</i>
<b>DNA</b>	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
<b>Dome</b>	Domeless
<b>dsRNA</b>	<i>double- stranded RNA</i>
<b>dpe</b>	Dias após a emergência
<b>dpi</b>	Dias após a infecção
<b>E</b>	Envelope viral
<b>Fw</b>	<i>Forward</i> (Primer)
<b>FFU</b>	<i>Fluorescent Focus Units</i>
<b>FHD</b>	Febre Hemorrágica da Dengue
<b>h</b>	horas
<b>Hop</b>	<i>Hopschotch</i>
<b>IB</b>	Índice de Breteau
<b>Imd</b>	<i>Immune Deficiency</i>
<b>Infect.</b>	Infectado
<b>IIP</b>	Índice de Infestação Predial
<b>JAK-STAT</b>	<i>Janus kinase signal transducer and activation of transcription</i>
<b>kb</b>	kilobases

<b>kD</b>	kilodalton
<b>μL</b>	Microlitros
<b>μM</b>	Micromolar
<b>M</b>	Molar
<b>MA</b>	Múltiplas alimentações
<b>MEB</b>	<i>Midgut Escape Barrier</i>
<b>MIB</b>	<i>Midgut Infection Barrier</i>
<b>m</b>	metros
<b>mRNA</b>	RNA mensageiro
<b>nm</b>	nanômetro
<b>ng</b>	nanograma
<b>NS1</b>	<i>Non-structural protein 1</i>
<b>NS2A</b>	<i>Non-structural protein 2A</i>
<b>NS2B</b>	<i>Non-structural protein 2B</i>
<b>NS3</b>	<i>Non-structural protein 3</i>
<b>NS4A</b>	<i>Non-structural protein 4A</i>
<b>NS4B</b>	<i>Non-structural protein 4B</i>
<b>NS5</b>	<i>Non-structural protein 5</i>
<b>ORF</b>	<i>Open reading frame</i>
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>PA</b>	<i>Pro analyse</i>
<b>PAMPs</b>	<i>Pathogen Associated Molecular Patterns</i>
<b>PBS</b>	Phosphate-Buffered Saline
<b>PCR</b>	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
<b>PIE</b>	Período de Incubação Extrínseco
<b>PIAS</b>	<i>Protein Inhibitor of Activated STAT</i>
<b>PGRPs</b>	<i>Peptidoglycan Recognition Proteins</i>
<b>pH</b>	Potencial hidrogeniônico
<b>PNCD</b>	Programa Nacional de Controle da Dengue
<b>prM/M</b>	Membrana viral
<b>PRRs</b>	<i>Pattern Recognition Receptors</i>
<b>qPCR</b>	<i>Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction</i>
<b>Rev</b>	<i>Reverse (Primer)</i>
<b>RISC</b>	<i>RNA-induced silencing complex</i>
<b>RNA</b>	<i>Ribonucleic Acid</i>
<b>RNAi</b>	<i>RNA interference</i>
<b>RNC</b>	Regiões não codificadoras
<b>rpm</b>	Rotações por minutos

<b>siRNAs</b>	<i>small interfering RNAs</i>
<b>SINV</b>	Virus Sindbis
<b>SOCS</b>	<i>Supressor of Cytocine Signaling</i>
<b>TB</b>	<i>Transmission Barrier</i>
<b>TLRs</b>	<i>Toll-like receptors</i>
<b>Upd</b>	<i>Unpaired</i>

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	19
<b>2. REFERENCIAL TEÓRICO CONCEITUAL</b> .....	21
<b>2.1 Arboviroses</b> .....	21
<b>2.2.1 Dengue</b> .....	21
<b>2.2 Aedes aegypti, o mosquito vetor</b> .....	23
<b>2.3 Vírus Dengue, o patógeno</b> .....	26
<b>2.4 Interação vetor-patógeno</b> .....	27
<b>2.4.1 Tipos de transmissão e sua importância epidemiológica</b> .....	27
<b>2.4.2 Competência Vetorial e Capacidade Vetorial</b> .....	29
<b>2.5 Sistema imune de insetos</b> .....	31
<b>2.5.1 Respostas celulares e humorais</b> .....	32
<b>2.5.1.1 Vias de sinalização</b> .....	34
<b>2.5.1.1.1 Via Toll</b> .....	34
<b>2.5.1.1.2 Via Imd</b> .....	36
<b>2.5.1.1.3 Via JAK-STAT</b> .....	37
<b>2.5.2 RNA de interferência</b> .....	38
<b>2.5.3 Apoptose</b> .....	40
<b>2.6 Interação Aedes aegypti-DENV</b> .....	42
<b>3. JUSTIFICATIVA</b> .....	45
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	46
<b>4.1 Objetivo Geral</b> .....	46
<b>4.2 Objetivos Específicos</b> .....	46
<b>5 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS</b> .....	47
<b>5.1 Estabelecimento da colônia de mosquitos Aedes aegypti</b> .....	47
<b>5.2 Infecção artificial</b> .....	47
<b>5.3 Cinética de infecção ovariana</b> .....	49
<b>5.4 Extração de RNA</b> .....	50
<b>5.5 Quantificação de DENV-2 por PCR quantitativo em tempo real (qPCR)</b> .....	50
<b>5.6 Detecção viral na primeira geração filial</b> .....	51

<b>5.7</b>	<b>Análise do efeito da infecção viral nos padrões reprodutivos das fêmeas.....</b>	<b>52</b>
<b>5.8</b>	<b>Histopatologia e ultraestrutura.....</b>	<b>54</b>
<b>5.9</b>	<b>Quantificação de transcritos de resposta imune e apoptóticos por PCR quantitativo em tempo real (qPCR).....</b>	<b>55</b>
<b>6</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>57</b>
<b>6.1</b>	<b>Cinética de infecção ovariana e quantificação viral.....</b>	<b>57</b>
<b>6.2</b>	<b>Detecção viral na primeira geração filial.....</b>	<b>59</b>
<b>6.3</b>	<b>Análise do efeito da infecção viral nos padrões reprodutivos das fêmeas.....</b>	<b>60</b>
<b>6.4</b>	<b>Histopatologia e ultraestutura.....</b>	<b>62</b>
<b>6.5</b>	<b>Análise da expressão de genes de resposta imune e apoptóticos.....</b>	<b>65</b>
<b>7</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>68</b>
<b>8</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>75</b>
<b>9</b>	<b>RECOMENDAÇÕES.....</b>	<b>75</b>
<b>10</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>76</b>
<b>11</b>	<b>APÊNDICES.....</b>	<b>89</b>
<b>11.1</b>	<b>Artigo publicado na Revista <i>Acta Tropica</i>.....</b>	<b>89</b>
<b>11.2</b>	<b>Artigo a ser submetido à Revista <i>Parasites &amp; Vectors</i>.....</b>	<b>96</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Doenças que possuem em seu ciclo de transmissão insetos como vetores, têm apresentado taxas de mortalidade e morbidade preocupantes em diversas regiões do mundo. Destacam-se especialmente doenças como malária, leishmaniose, febre amarela e dengue, as quais possuem culicídeos ou flebotomíneos, como vetores no ciclo de transmissão. A Organização Mundial de Saúde (OMS) tem mostrado que o número de casos de dengue aumentou drasticamente nos últimos 50 anos, sendo atualmente considerada como a doença viral transmitida por mosquitos de maior importância no mundo (WHO, 2012). Possuindo como principal vetor o mosquito *Aedes aegypti*, os quatro sorotipos do vírus dengue (DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4) são amplamente disseminados nas regiões tropicais e subtropicais do globo, acometendo anualmente cerca de 100 milhões de pessoas, podendo atingir cerca de 20% de casos clínicos severos da doença (BRADY *et al.*, 2012; MURRAY *et al.*, 2013; SIMMONS *et al.*, 2012).

O principal modo de prevenção e contenção da doença tem sido através de programas de controle dos mosquitos vetores, visto que não existe vacina disponível (GUZMAN *et al.*, 2004; MURRAY *et al.*, 2013). No entanto, esses programas têm eficiência limitada devido à complexidade dos ambientes urbanos onde a doença ocorre, a grande resistência das populações de insetos a diversos inseticidas, além da excepcional adaptação do *A. aegypti* às condições de vida das populações humanas (HALSTEAD, 2008; HEINTZE *et al.*, 2007; MELO-SANTOS *et al.*, 2010; REGIS; MONTEIRO; MELO-SANTOS; SILVEIRA; *et al.*, 2008; STRODE *et al.*, 2012).

Os tipos de transmissão viral em mosquitos vetores ocorrem por processos de transmissão horizontal e vertical. No primeiro, uma fêmea não infectada pode se infectar a partir da alimentação sanguínea em um hospedeiro previamente infectado por outra fêmea infectada pelo vírus (HIGGS; BEATY, 2004). Já na transmissão vertical, o patógeno é transmitido da fêmea do mosquito infectada para sua prole, podendo ser do tipo transovariana (vírus dentro do ovo) ou transovo (vírus na superfície do ovo) (HIGGS; BEATY, 2004; LAMBRECHTS; SCOTT, 2009).

A transmissão vertical do tipo transovariana, pode ocorrer quando o vírus invade o folículo embrionário infectando o embrião, ou também durante a oviposição, onde o vírus é transmitido para dentro dos ovos a partir da micrópila (abertura do ovo) no momento em que os ovos passam pelo oviduto. A transmissão do tipo transovo, ocorre a

partir da infecção dos ovos com o vírus no momento da oviposição, ficando depositado na superfície do ovo (HIGGS; BEATY, 2004).

Trabalhos prévios mostram os diversos aspectos biológicos e epidemiológicos da transmissão viral do tipo horizontal em mosquitos vetores (BENNETT *et al.*, 2005; BENNETT *et al.*, 2002; BLACK *et al.*, 2002; CARVALHO-LEANDRO *et al.*, 2012; GUBLER *et al.*, 1979; LAMBRECHTS *et al.*, 2009; SALAZAR *et al.*, 2007; SYLLA *et al.*, 2009). A transmissão viral do tipo transovariana tem sido negligenciada nos estudos que envolvem aspectos referentes à manutenção do vírus dengue nas populações de mosquitos. Pouco se sabe sobre a importância epidemiológica desse tipo de transmissão e os estudos existentes sobre a temática, são direcionados unicamente em análises de detecção viral em mosquitos resultantes de coleta de ovos em campo (ANGEL; JOSHI, 2008; CASTRO *et al.*, 2004; GUEDES *et al.*, 2010; GUNTHER *et al.*, 2007; WASINPIYAMONGKOL *et al.*, 2003).

Uma vez que não se conhece a importância epidemiológica da transmissão transovariana, a maioria dos programas de controle de mosquitos vetores preconizam suas ações ao combate às larvas e aos adultos do mosquito. Pouca atenção é direcionada aos ovos quiescentes no ambiente, bem como o efeito da infecção viral no tecido ovariano e o impacto dessa infecção na biologia reprodutiva do vetor permanece desconhecido.

Diante disso, o presente trabalho teve por objetivo analisar os aspectos envolvidos na transmissão transovariana em uma população de campo de mosquitos *A. aegypti* infectados com o vírus dengue sorotipo 2, investigando diversos aspectos, tais como: 1) análise da cinética de infecção de ovários de fêmeas de mosquitos *A. aegypti* após infecção oral com alimentação sanguínea contendo o vírus dengue; 2) identificação das taxas de infecção filial do vírus dengue proveniente de fêmeas competentes vetorialmente para o vírus dengue; 3) caracterização da competência vetorial das fêmeas infectadas via transmissão transovariana; 4) análise de possíveis diferenças nos padrões de fecundidade de fertilidade das fêmeas infectadas pelo vírus dengue; 5) busca de possíveis alterações morfológicas nos ovários das fêmeas infectadas em comparação às fêmeas não infectadas; 6) avaliação do nível de expressão de genes potencialmente envolvidos na permanência do vírus nos ovários do mosquito vetor.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO CONCEITUAL

### 2.1 Arboviroses

Arboviroses são doenças virais infecciosas causadas por um arbovírus. A palavra arbovírus é resultante da expressão *arthropod-borne virus*, a qual se refere aos vírus que se mantêm na natureza, devido à sua propagação biológica entre um hospedeiro vertebrado e um artrópode que possui hábito hematofágico (HIGGS; BEATY, 2004). Atualmente, são conhecidos mais de 550 arbovírus, os quais causam infecções, principalmente em mamíferos e aves (GOULD *et al.*, 2006).

Os arbovírus estão distribuídos pelas regiões tropicais e subtropicais do globo e acometem milhões de pessoas anualmente, sendo o vírus Dengue, vírus da Febre Amarela, vírus Chikungunya, vírus do Oeste do Nilo e vírus Usutu, os arbovírus de maior importância para o contexto de saúde pública atual (GOULD *et al.*, 2006; GUBLER; MARKOFF, 2007; KNIPE; HOWLEY, 2007).

#### 2.1.1 Dengue

A Organização Mundial de Saúde considera a dengue como a mais importante arbovirose que afeta o homem, uma vez que apresenta alta taxa de morbidade e uma pequena parcela dos casos clínicos severos pode ser fatal (HALSTEAD, 2007). Assim como outras arboviroses, as regiões de maior ocorrência da doença são, principalmente, em áreas localizadas nas regiões tropicais e subtropicais do mundo (BEATY; MARQUARDT, 1996a; GUZMAN; KOURI, 2003).

A doença tem como agente etiológico o vírus Dengue (DENV), o qual apresenta quatro sorotipos antigenicamente distintos (DENV-1 à DENV-4) que podem causar a doença (KNIPE; HOWLEY, 2007). Foi reportado recentemente por pesquisadores da Universidade do Texas, no *Third International Conference on Dengue and Dengue Haemorrhagic Fever*, evento que aconteceu em Bangkok - Tailândia (outubro/2013), a existência de um quinto sorotipo do vírus Dengue. Segundo os pesquisadores, esse novo sorotipo foi identificado em amostras de sangue de paciente da Malásia, colhidas durante uma epidemia em 2007. Como não há publicações em artigos, não se sabe detalhes sobre quadro clínico do paciente, ou mesmo questões genéticas do novo sorotipo (SCIENCE, 2013).

A expansão da navegação industrial e comercial favoreceu a disseminação do *A. aegypti*, o principal mosquito vetor do DENV, para diversas regiões do mundo, e conseqüentemente, a expansão da doença (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994; GRATZ, 2004; GUBLER, 2002). A dengue é uma doença antiga, uma vez que foi disseminada mundialmente nos trópicos durante os séculos XVIII e XIX devido à navegação (GUBLER, 2002). Os primeiros relatos de epidemias com quadros clínicos compatíveis com dengue clássica (DC) foram registrados na Filadélfia em 1780 (GUZMAN; KOURI, 2003). Tempos depois, em 1953-1954, em Manila (Filipinas), registram-se os primeiros casos de febre hemorrágica da dengue (FHD), seguido por casos em Bangkok (Tailândia) e Malásia em 1958, e Vietnã em 1960 (GUBLER, 2002).

Diversos fatores podem ser identificados como razões para a emergência global da dengue como problema de Saúde Pública. Dentre eles podemos citar a reinfestação dos trópicos das Américas pelo mosquito *A. aegypti* (GUZMAN; KOURI, 2003), a circulação intensa de pessoas entre os diversos continentes, o aumento demográfico com o crescimento descontrolado da população mundial (GUBLER, 1997), a falta de medidas eficazes para controle do mosquito (NEWTON; REITER, 1992; REGIS; MONTEIRO; MELO-SANTOS; SILVEIRAJR; *et al.*, 2008), o uso inadequado de reservatórios com água para consumo humano, o acúmulo de materiais descartáveis servindo como criadouros artificiais para larvas de mosquitos, e a ausência de uma vacina tetravalente que confira imunidade aos quatro sorotipos virais (GUBLER, 1997; SILVA *et al.*, 2006).

Os primeiros casos de dengue confirmados laboratorialmente no Brasil ocorreram em Boa Vista (Roraima) em 1981-1982, com o isolamento do DENV-1 e DENV-4. Nessa ocasião, não houve registros significativos envolvendo o DENV-4 na transmissão viral pelo país (OSANAI *et al.*, 1983). Porém, há registros de que, os primeiros relatos de casos de dengue em território brasileiro, datam-se do ano de 1846, porém, foi somente na segunda metade do século XX que a dengue realmente adquiriu uma grande importância epidemiológica (BRAGA; VALLE, 2007a).

Os sorotipos virais DENV-1, DENV-2 e DENV-3 circulam no Brasil desde o ano de 2003 (BRASIL, 2010) e atualmente, os quatro sorotipos podem ser registrados circulantes no país, desde a reemergência do DENV-4 em junho de 2010, com os primeiros casos isolados no estado de Roraima, nas cidades de Boa Vista e Cantá (TEMPORAO *et al.*, 2011).

No que se refere às ações de controle da dengue no Brasil, estas são parte do Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD), que preconiza atividades de vigilância entomológica e epidemiológica (BRASIL, 2002). A vigilância entomológica pelo programa é realizada pela pesquisa larvária para o levantamento de índices de infestação predial (IIP) e índice de Breteau (IB) em residências, apesar de alguns estudos mostrarem que outras metodologias de vigilância entomológica podem ser significativamente mais sensíveis em relação à presença do vetor, como a coleta de ovos do mosquito por armadilha de oviposição (ovitampa) (MEDEIROS *et al.*, 2011; REGIS; MONTEIRO; MELO-SANTOS; SILVEIRAJR; *et al.*, 2008).

As metodologias de controle são calcadas primariamente no uso de inseticidas químicos (temefós, cipermetrina, deltametrina e malation) e alternativamente, inseticidas biológicos (*Bacillus thuringiensis israelensis* – Bti). Através de um sistema de monitoramento da resistência de mosquitos de campo aos inseticidas químicos (Rede Nacional de Monitoramento da Resistência do *Aedes aegypti* – Rede MoReNAa), tem sido demonstrado que a maioria das populações de *A. aegypti* monitoradas está resistente, sobretudo ao temefós (ARAUJO *et al.*, 2013; BRAGA; VALLE, 2007b; LIMA *et al.*, 2011; MELO-SANTOS *et al.*, 2010), o que representa um grave problema para o controle do vetor baseado no uso de compostos químicos. Como alternativa, o uso de inseticidas químicos foi substituído pelo uso de inseticidas biológicos à base de Bti em alguns locais onde a resistência aos químicos foi detectada (BRAGA; VALLE, 2007b; MELO-SANTOS *et al.*, 2010). Nos anos de 2009/2010, o diflubenzuron e o novaluron, drogas inibidoras de síntese de quitina pertencentes ao grupo das benzoil-fenil-uréias, foram adotados pelo Ministério da Saúde para controle de larvas de *A. aegypti* no país, devido à alta resistência do mosquito ao temefós, bem como o alto custo do Bti (BRASIL, 2009).

Em relação ao desenvolvimento de uma vacina para a dengue, vários estudos estão em andamento usando diferentes estratégias e tecnologias, tais como vacinas baseadas em vírus atenuados, inativados ou quiméricos e vacinas de DNA. Apesar de algumas vacinas estarem em testes clínicos, diversos estudos e testes ainda precisam ser realizados (MCARTHUR *et al.*, 2013).

## **2.2 *Aedes aegypti*, o mosquito vetor**

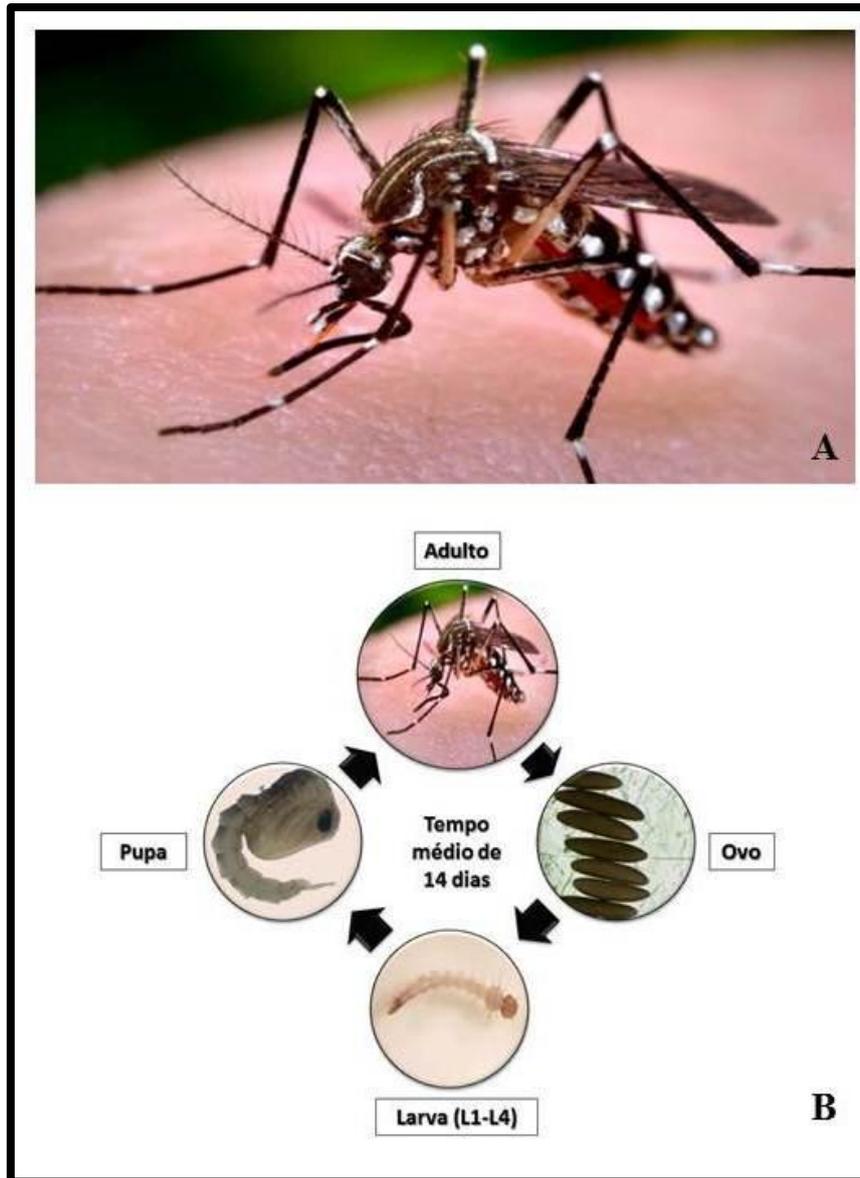
O mosquito *Aedes (Stegomyia) aegypti* Linnaeus, 1762 (Figura 1-A), é um díptero pertencente à família Culicidae e sub-família Culicinae (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994). É a espécie mais importante nos registros epidemiológicos da febre amarela urbana e dos quatro sorotipos do vírus da dengue (FORATTINI, 2002; LOZOVEL, 2001). A espécie é encontrada nas regiões tropicais e sub-tropicais do globo (CLEMENTS, 1992; FORATTINI, 1962), e possui um ciclo de desenvolvimento com duração média de 14 dias, com quatro estágios bem definidos: ovo, larva com 4 estádios (L1, L2, L3 e L4), pupa e adulto (Figura 1-B).

A característica de quiescência, presente em seus ovos (Figura 1-B), a qual é caracterizada pela interrupção do processo de maturação embrionária devido à redução drástica da umidade relativa, permite que estes possam resistir a importantes momentos de seca nos ambientes, apresentando importantes implicações na dispersão de mosquitos (BICOUT *et al.*, 2002; WOODRING *et al.*, 1998). Isso possibilita a ressurgência do vetor em áreas previamente tratadas (CARDOSO JR, 1997).

A capacidade de dispersão do mosquito *A. aegypti* pelo vôo pode atingir até 800 m, em momentos que a fêmea faz a busca por locais para deposição dos ovos (HONORIO *et al.*, 2003; MUIR; KAY, 1998; TRPIS *et al.*, 1995; TSUDA *et al.*, 2001), sendo isso, um importante parâmetro em epidemiologia e programas de controle do vetor, podendo definir áreas de risco para a transmissão viral (ORDONEZ-GONZALEZ *et al.*, 2001) e direcionamento para intensificação das ações de controle e bloqueio da transmissão. No entanto, há evidências de que, havendo fonte de alimentação e locais para realizar a oviposição suficientes, as fêmeas de *A. aegypti* se deslocam por pequenas distâncias, que podem variar entre 50 a 100 m, mantendo-se restritas às casas onde emergiram ou deslocando-se apenas para casas vizinhas (HARRINGTON; *et al.*, 2005; RUSSELL *et al.*, 2005).

Fatores genéticos são os responsáveis por conferir características adaptativas ao mosquito, proporcionando-lhe grande plasticidade fenotípica aos diversos ambientes urbanos (BLACK IV; SEVERSON, 2005). Além disso, variações no *background* genético das populações estão potencialmente relacionadas com diferentes padrões de susceptibilidade aos patógenos (competência vetorial) (BENNETT *et al.*, 2002; BLACK *et al.*, 2002; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA *et al.*, 2004; URDANETA-MARQUEZ; *et al.*, 2008), capacidade vetorial, resistência aos inseticidas (MELO-SANTOS *et al.*, 2010), dentre outros.

**Figura 1** - *Aedes aegypti*: A) Adulto; B) Ciclo de desenvolvimento do mosquito, com as diferentes fases: ovo, larva (L1-L4), pupa e adulto.



Fonte: A e B. *Centers for Diseases Prevention and Control*, (2014). B. CDC, 2014; Ovo: Oxytec, 2014; Larva e Pupa: DengueVirusNet, 2014.

No Brasil, estudos demonstraram grande variação genética nas populações analisadas indicando variações em nível local e regional (AYRES *et al.*, 2004; AYRES *et al.*, 2003). No que se refere às variações genéticas com importância na competência vetorial, alguns estudos revelam que as diferenças genéticas existentes entre as populações fazem com que as taxas de infecção por arbovírus variem entre elas. Esse tipo de variação foi observado em infecções por vírus dengue e/ou vírus da febre amarela em mosquitos de populações brasileiras (CARVALHO-LEANDRO *et al.*,

2012; LOURENCO-DE-OLIVEIRA *et al.*, 2004), venezuelanas (URDANETA-MARQUEZ; *et al.*, 2008) e mexicanas (BENNETT *et al.*, 2002).

Outra espécie do gênero *Aedes* é importante epidemiologicamente na transmissão do vírus Dengue, o mosquito *Aedes albopictus*. Vários estudos comprovam a susceptibilidade de *A. albopictus* a diferentes arbovírus, entre eles o DENV, vírus da Febre amarela e vírus Chikungunya (LOURENCO DE OLIVEIRA *et al.*, 2003; VAZEILLE *et al.*, 2010; VEGA-RUA *et al.*, 2014). Surtos de transmissão de DENV atribuídos a essa espécie foram registrados apenas em regiões do continente asiático (GRATZ, 2004). No entanto, até o momento essa espécie não representa grande importância epidemiológica no Brasil em relação à dengue, uma vez que seu envolvimento na transmissão do vírus no país ainda não foi relatada (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994).

### 2.3 Vírus Dengue, o patógeno

Vírus Dengue, pertence ao gênero *Flavivirus*, e à família Flaviviridae, é o patógeno causador de todas as formas em que a dengue pode se apresentar (GUBLER; KUNO, 1997; KINEPE, 2007). Ao considerarmos a morfologia viral, organização genômica, variações nas sequências de nucleotídeos, ecologia viral e outras diversas variações dentro do gênero *Flavivirus*, esse gênero é composto por aproximadamente 53 tipos virais, sendo 27 transmitidos por mosquitos, 12 por carrapatos e os outros 14, por vetores animais ainda não conhecidos (GUBLER, 2007).

Estudos evolutivos dentro desse grupo são extremamente complicados devido às grandes divergências nas sequências de aminoácidos, requerendo estudos a partir de análises multigênicas. Alguns destes teorizam que a evolução em *Flavivirus* está ligada às suas adaptações aos hospedeiros invertebrados, diferentemente de outros gêneros, como *Alphavirus*, onde a evolução parece estar mais relacionada às adaptações ao hospedeiro vertebrado (CHEVILLON *et al.*, 2008; COOK; HOLMES, 2006).

Os membros desse gênero são altamente diversos geneticamente, e por serem vírus de RNA, exibem uma grande taxa de mutação (GUBLER; MARKOFF, 2007). Devido às diversas mutações que ocorrem nos vírus de RNA, estes, na maioria das vezes, não constituem um genótipo único e sim um grupo de genótipos com relação muito próxima, denominado por alguns autores como *quasispecies* (HOLLAND *et al.*, 1982; KINEPE, 2007). Devido à ausência de atividade de *proofreading* da RNA

polimerase viral, atividade esta que tem por função corrigir os erros cometidos pela RNA polimerase, diversas mutações podem ser registradas (HOLMES *et al.*, 1999; TWIDDY; HOLMES, 2003). Em vírus Dengue, além de a variabilidade genética ser decorrente das diversas mutações, ela pode ser amplificada/aumentada por recombinação gênica, tornando-se outro fator importante e fundamental na diversidade e variabilidade genética desse vírus (HOLMES, 1999; TWIDDY; HOLMES, 2003).

Os quatro sorotipos antigenicamente distintos (DENV-1; DENV-2; DENV-3; DENV-4) do vírus Dengue são partículas circulares esféricas, com 50 a 55 nm de diâmetro, constituídas por um *core* de ribonucleoproteínas e por um envelope de lipoproteínas. O genoma consiste em uma fita simples de RNA positiva, com aproximadamente 11 kilobases (kb). O RNA viral possui uma única fase de leitura (ORF - *Open reading frame*), a qual codifica uma poliproteína, que é posteriormente clivada por proteases celulares e serina proteases, codificada pelo vírus em 3 proteínas estruturais (C – capsídeo; prM/M – membrana; E - envelope) e 7 não estruturais (NS1; NS2A; NS2B; NS3; NS4A; NS4B; NS5) (KUHN *et al.*, 2002). As proteínas não estruturais têm funções diversas, desde processos de replicação à montagem viral (GUBLER, 2007). As extremidades 5' e 3' da fita de RNA são compostas por regiões não codificadoras (RNC5' e RNC3'), com aproximadamente 100 a 400 nt, respectivamente. Sequências conservadas e estruturas secundárias de RNA estão contidas nessas regiões, visando o direcionamento de processos de amplificação genômica, tradução e empacotamento viral (GUBLER, 2007).

## **2.4 Interação vetor-patógeno**

### **2.4.1 Tipos de transmissão e sua importância epidemiológica**

Um grande número de patógenos é mantido na natureza por ciclos de desenvolvimento que envolvem um hospedeiro vertebrado e um hospedeiro invertebrado atuando como vetor (BEATY; MARQUARDT, 1996b). A transmissão de patógenos por artrópodes vetores se dá por duas formas principais, a mecânica e a biológica (HIGGS; BEATY, 2004). Na transmissão mecânica, os artrópodes podem carregar os microrganismos em suas patas, e posteriormente transmiti-los a um hospedeiro vertebrado. Já na transmissão biológica, o patógeno infecta o hospedeiro invertebrado e pode reproduzir-se e/ou desenvolver-se em diferentes estágios, para

subsequentemente ser transmitido para o hospedeiro vertebrado (HIGGS; BEATY, 2004). No caso de culicídeos vetores, o processo de transmissão biológica de patógenos ocorre via alimentação sanguínea realizada exclusivamente pelas fêmeas (CLEMENTS, 1999; CONSOLI; OLIVEIRA, 1994).

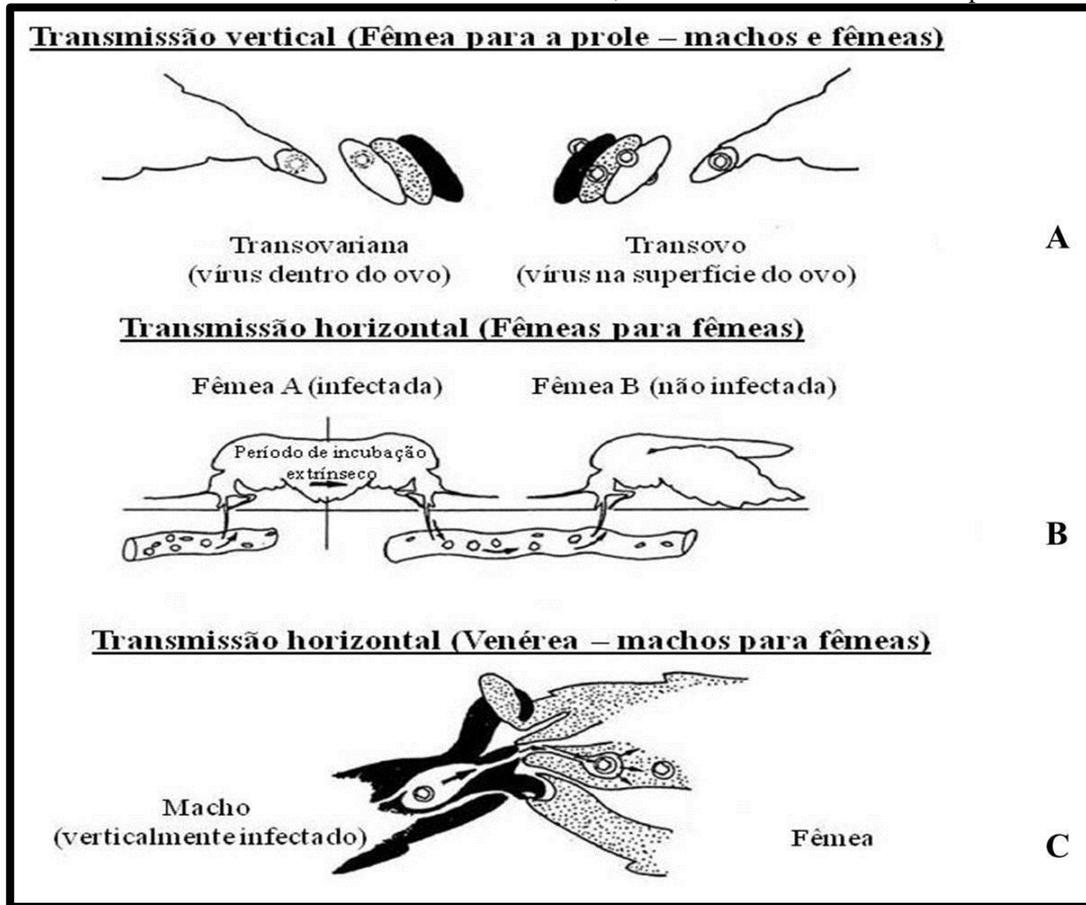
O período compreendido entre a ingestão do sangue contaminado com o patógeno e sua transmissão para outro hospedeiro a partir de uma nova alimentação sanguínea é conhecido por período de incubação extrínseca (PIE). No caso dos arbovírus, durante esse período o vírus infecta as células intestinais do vetor, replica-se e migra para outros órgãos alvos para que a transmissão ocorra (HALSTEAD, 2008; HIGGS; BEATY, 2004). Dois principais tipos de transmissão são descritos para os ciclos de infecção em culicídeos vetores, a transmissão vertical e a horizontal (HIGGS; BEATY, 2004).

A transmissão viral do tipo vertical ocorre quando o patógeno é passado da fêmea infectada para sua prole, podendo ser de dois tipos: transovariana (vírus dentro do ovo) ou transovo (vírus na superfície do ovo) (FLORES *et al.*, 2010; HIGGS; BEATY, 2004; LAMBRECHTS; SCOTT, 2009) (Figura 2-A). A transmissão vertical do tipo transovariana pode ocorrer quando o vírus invade o folículo embrionário infectando o embrião, ou podendo ocorrer também durante a oviposição, onde o vírus é transmitido para dentro dos ovos a partir da micrópila (abertura do ovo) no momento em que os ovos passam pelo oviduto. A transmissão do tipo transovo, ocorre a partir da infecção dos ovos com o vírus no momento da oviposição, ficando depositado na superfície do ovo (HIGGS; BEATY, 2004).

Na transmissão viral do tipo horizontal, uma fêmea não infectada se infecta em um hospedeiro previamente infectado por outra fêmea infectada pelo vírus (Figura 2-B). Outra forma de transmissão horizontal é a venérea, quando machos infectados transmitem o vírus para a fêmea através de fluídos seminais contaminados (HIGGS; BEATY, 2004) (Figura 2-C).

Vários estudos tem demonstrado os diversos aspectos biológicos e epidemiológicos da transmissão viral do tipo horizontal em mosquitos vetores (BENNETT *et al.*, 2005; BENNETT *et al.*, 2002; BLACK *et al.*, 2002; GUBLER *et al.*, 1979; LAMBRECHTS *et al.*, 2009; SALAZAR *et al.*, 2007; SYLLA *et al.*, 2009). Esse grande interesse nos estudos da transmissão horizontal é justificado, pois é a partir desse tipo de transmissão, que o vírus é transmitido para a população humana através da picada de fêmeas previamente infectadas com o vírus.

**Figura 2** - Representação esquemática da transmissão vertical e horizontal de arbovírus. A - Transmissão vertical do tipo transovariana, B- Transmissão horizontal que ocorre quando uma fêmea A, infectada, contamina um hospedeiro vertebrado e posteriormente, uma fêmea B, não infectada, alimenta-se no hospedeiro infectado, infectando-se. C- Transmissão horizontal venérea via fluido seminal de macho infectando transovarianamente, infectando a fêmea durante a cópula.



Fonte: Adaptado de Higgs & Beaty, 2004.

Por outro lado, a transmissão viral do tipo transovariana, tem sido negligenciada nos estudos que envolvem aspectos referentes à manutenção de DENV nas populações de mosquitos. Pouco se sabe sobre a importância epidemiológica da transmissão transovariana e os poucos estudos existentes sobre a temática, são calcados unicamente em análises de detecção viral em mosquitos resultantes de coleta de ovos em campo (ANGEL; JOSHI, 2008; CASTRO *et al.*, 2004; GUEDES *et al.*, 2010; GUNTHER *et al.*, 2007; WASINPIYAMONGKOL *et al.*, 2003).

#### 2.4.2 Competência Vetorial e Capacidade Vetorial

A competência vetorial é definida como a capacidade biológica inata do inseto vetor em transmitir determinado patógeno, sendo, portanto, controlada geneticamente

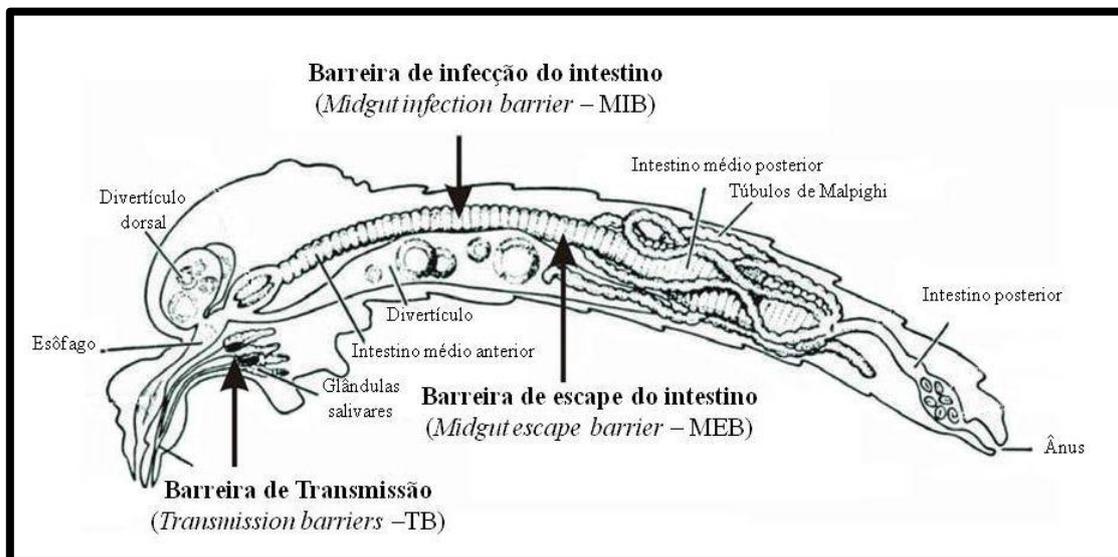
(BEERNTSEN *et al.*, 2000a). Um vetor, quando competente, após ingerir o patógeno durante a alimentação sanguínea em um hospedeiro infectado permite o completo desenvolvimento do patógeno e, após alguns dias, é capaz de transmiti-lo para outro hospedeiro (BEATY; MARQUARDT, 1996b). No caso de vetores incapazes de transmitir o patógeno após ingestão de sangue infectado, há uma incompatibilidade entre os dois organismos e o desenvolvimento do patógeno é bloqueado em alguma fase da infecção (MARQUARDT, 2004).

Diversos estudos em mosquitos *A. aegypti* mostram que diferentes linhagens ou populações desse vetor respondem diferentemente às infecções virais, apresentando, portanto, competência vetorial diferenciada devido às variações no *background* genético (BENNETT *et al.*, 2005; BENNETT *et al.*, 2002; BLACK *et al.*, 2002; SALAZAR *et al.*, 2007). O ciclo do DENV dentro de um mosquito competente envolve uma série de eventos entre o vírus e o vetor, e diversas barreiras anatômicas, fisiológicas e moleculares precisam ser vencidas pelo vírus para que este infecte os órgãos do mosquito parasitado, sendo o aparelho digestivo a primeira barreira física a ser enfrentada quando o patógeno é ingerido na alimentação sanguínea (ROSOMER, 1996).

Durante o ciclo de replicação do arbovírus nos mosquitos, três importantes barreiras para o estabelecimento da infecção são descritas: a barreira de infecção do intestino médio (Midgut Infection Barrier - MIB), a barreira de escape do intestino médio (Midgut Escape Barrier - MEB) e a barreira de transmissão (Transmission Barrier - TB) (Figura 3). A barreira de infecção do intestino médio (MIB) é caracterizada como todo e qualquer evento que possa impedir o vírus de invadir, colonizar e replicar-se dentro das células do epitélio intestinal. Esses eventos são imprescindíveis para o sucesso na infecção (BLACK IV; SEVERSON, 2005). Caso o vírus consiga realizar os processos de invasão, colonização e replicação, porém fica retido nas células intestinais, caracteriza-se outra barreira, chamada de barreira de escape do intestino médio (MEB). Para que a transmissão viral ocorra do mosquito para o hospedeiro vertebrado, o vírus tem que infectar as células das glândulas salivares e sair juntamente com a saliva no momento da alimentação sanguínea. Se houver bloqueio nessa fase de infecção, caracteriza-se então uma barreira de transmissão (TB), bem mais rara de acontecer do que as barreiras do intestino (BEATY; MARQUARDT, 1996b; BLACK IV; SEVERSON, 2005). Em mosquitos competentes vetorialmente, as barreiras de infecção são vencidas e a transmissão viral ocorre com eficiência. Em

mosquitos não competentes, a infecção viral é bloqueada em algum momento do ciclo de infecção/disseminação dentro do mosquito, não havendo a transmissão viral.

**Figura 3** - Representação esquemática das diferentes barreiras de infecção em mosquitos.



Fonte: Marquardt (2004), adaptado.

Ressalva-se que a competência vetorial é um componente essencial na capacidade vetorial de um vetor, que é definida pela taxa de eficiência da transmissão do patógeno pela população local de vetores. A capacidade vetorial engloba aspectos comportamentais do inseto (preferência alimentar), morfo-fisiológicas (tamanho, longevidade, duração do ciclo gonadotrófico, etc.) e fatores ecológicos (temperatura e umidade) (ANDERSON; RICO-HESSE, 2006; MARQUARDT, 2004).

## 2.5 Sistema imune de insetos

Os insetos estão expostos a uma imensa variedade de microrganismos, que podem ser encontrados tanto em seu habitat natural, como podem surgir a partir de infecções oriundas do processo de alimentação em plantas, ou mesmo em hospedeiros vertebrados (DIMOPOULOS, 2003; LEMAITRE; HOFFMANN, 2007; MARQUARDT, 2004). Com o objetivo de neutralizar as infecções causadas pelos microrganismos como bactérias, fungos, protozoários e vírus, os insetos desenvolveram diversos mecanismos de defesa contra esses invasores. Esses mecanismos vão desde barreiras morfológicas (cutícula, morfologia do aparelho digestivo, matriz peritrófica) a respostas por componentes celulares (fagocitose, encapsulação) e humorais

(melanização e produção de moléculas efetoras, como peptídeos antimicrobianos) (LEMAITRE; HOFFMANN, 2007; MARQUARDT, 2004).

Diferentemente dos vertebrados, os invertebrados não possuem uma resposta imune adaptativa, uma vez que não há células com função de memória imunológica (linfócitos T e B). Nesses organismos, a resposta imune é inata, sendo esta definida por uma resposta rápida aos patógenos, porém de curta duração, não conferindo memória imunológica (LEMAITRE; HOFFMANN, 2007). Um estudo realizado com *Anopheles gambiae* demonstrou a diferenciação de hemócitos em mosquitos previamente infectados com *Plasmodium falciparum*, em resposta a infecções secundárias com bactérias, sugerindo uma forma de memória imune inata nesses insetos (RODRIGUES *et al.*, 2010).

A resposta imune do hospedeiro a microrganismos invasores em insetos ocorre em três etapas distintas: o reconhecimento do corpo estranho invasor, a rede regulatória de sinalização celular e, por fim, os mecanismos efetores. A detecção dos microrganismos pelo sistema imune inato depende diretamente de um sistema conservado de receptores de reconhecimento de patógenos, chamados de *Pattern Recognition Receptors* (PRRs). Essas moléculas, quando ativadas, desencadeiam uma série de eventos celulares que poderão culminar com a produção de moléculas antimicrobianas efetoras e resposta celular, que atuarão sobre os microrganismos após sua detecção, na tentativa de neutralizá-los. A ligação desses receptores aos patógenos se dá a partir do reconhecimento de moléculas conservadas próprias de agentes microbianos, chamadas de *Pathogen Associated Molecular Patterns* (PAMPs) (BULET *et al.*, 1999; CIRIMOTICH *et al.*, 2010; SIM; DIMOPOULOS, 2010).

### **2.5.1 Respostas celulares e humorais**

Dentre as respostas imunes mediadas por células, a fagocitose foi o primeiro evento descoberto em invertebrados, sendo um mecanismo de defesa celular fortemente conservado em muitos organismos (LAVINE; STRAND, 2002). Esse mecanismo de defesa é caracterizado por um processo de resposta celular, no qual os hemócitos englobam os microorganismos, sendo uma resposta inicial a bactérias, protozoários e outros agentes invasores (BARILLAS-MURY *et al.*, 2004).

Os insetos produzem muitos tipos de hemócitos (pro-hemócitos, granulócitos, plasmócitos e esferulócitos), com características morfológicas, histoquímicas e

funcionais distintas (LAVINE; STRAND, 2002). Os plasmócitos e granulócitos são os tipos celulares que primariamente realizam esse processo a partir da ligação da superfície do hemócito às proteínas de membrana do microrganismo invasor (BLANDIN; LEVASHINA, 2007). Os granulócitos podem ainda associar-se de forma fraca formando um aglomerado de células sobre o patógeno invasor, caracterizando assim outro processo de resposta imune mediada por células, conhecido por nodulação (CHAPMAN, 1999). Estudos em espécies de culicídeos como *A. aegypti* e *Anopheles* spp tem demonstrado a importância dessa resposta imune a infecções por protozoários do gênero *Plasmodium*, fungos e bactérias (BLANDIN; LEVASHINA, 2007; CASTILLO *et al.*, 2006; MOITA *et al.*, 2005).

Outro processo de resposta imune mediada por hemócitos é conhecido por encapsulação, que consiste em uma resposta celular/humoral a partir do acúmulo de plasmócitos sobre o patógeno, formando uma cápsula composta por camadas de células. O processo de encapsulação pode ocorrer contra alguns organismos invasores, tais como bactérias, *Brugia*, *Plasmodium*, *Wuchereria* e *Trypanosoma*, quando o processo de fagocitose não consegue neutralizá-los (BARILLAS-MURY *et al.*, 2004; BEERNTSEN *et al.*, 2007; HILLYER *et al.*, 2003). Nesse processo, o sistema de pró-fenoxidases é ativado, ocorrendo à formação de melanina sobre as células. O depósito de melanina sobre o patógeno, ou melanização, pode ocorrer sem a formação da camada celular, envolvendo somente hemócitos circulantes. Isso não é comum entre os insetos, ocorrendo apenas em dípteros nematóceros como *Drosophila* e mosquitos. Esse processo é conhecido por encapsulação humoral ou melanização humoral (BARILLAS-MURY *et al.*, 2004; HILLYER; CHRISTENSEN, 2005; HILLYER *et al.*, 2003).

Em relação às respostas humorais, podemos destacar os importantes eventos de produção de peptídeos antimicrobianos. Os peptídeos antimicrobianos desempenham um papel fundamental na resposta humoral, com o objetivo de eliminar organismos invasores. Essas moléculas efetoras são intensamente produzidas pelo corpo gorduroso (órgão análogo ao fígado dos mamíferos), hemócitos e órgãos como intestino, glândulas salivares, espermateca e traquéia (LEMAITRE; HOFFMANN, 2007).

*Drosophila melanogaster*, atualmente, é o inseto que possui o sistema imune mais bem caracterizado, com diversos estudos mostrando que a produção de moléculas efetoras é regulada, principalmente, por três vias: a via Imd (*Immune Deficiency*), a via Toll e a via JAK-STAT (*Janus kinase signal transducer and activation of transcription*) (HOFFMANN; REICHHART, 2002; LEMAITRE; HOFFMANN, 2007; TZOU *et al.*,

2002). Essas vias de sinalização intracelular estão envolvidas na produção de peptídeos antimicrobianos em repostas a diferentes patógenos, tais como fungos, vírus e bactérias gram-positivas e gram-negativas (LEMAITRE; HOFFMANN, 2007). Em mosquitos, estudos sobre as vias Toll, Imd e JAK-STAT mostram que essas vias estão envolvidas na produção de peptídeos antimicrobianos conferindo proteção contra fungos (SHIN *et al.*, 2005), bactérias (ANTONOVA *et al.*, 2009; MAGALHAES *et al.*, 2010; MEISTER *et al.*, 2005), vírus (CARVALHO-LEANDRO *et al.*, 2012; SIM; DIMOPOULOS, 2010; SOUZA-NETO *et al.*, 2009) e protozoários (GARVER *et al.*, 2009).

### 2.5.1.1 Vias de sinalização

#### 2.5.1.1.1 Via Toll

A via Toll é caracterizada como uma cascata de sinalização evolutivamente conservada, envolvida na resposta imune inata a infecções causadas por fungos e bactérias gram-positivas, já identificada em mamíferos e em insetos como *Drosophila*, *A. aegypti* e *An. gambiae* (LEMAITRE *et al.*, 1996; LEMAITRE *et al.*, 1997; MEISTER *et al.*, 2005; SHIN *et al.*, 2005). Inicialmente, os receptores Toll de insetos foram descritos em *Drosophila*, apresentando um papel fundamental no desenvolvimento dorso-ventral do embrião durante o período embrionário, bem como em outros processos de desenvolvimento. Em mamíferos, os receptores da via Toll são conhecidos como *Toll-like receptors* (TLRs) e *IL-1 receptors* (ANTONOVA *et al.*, 2009; LEMAITRE; HOFFMANN, 2007). Essa via possui como componentes a citocina extracelular chamada de *Spatzle*, o receptor de membrana Toll, os adaptadores Tube e MyD88, a quinase Pelle, o inibidor Cactus (homólogo ao inibidor de NK-kB – IκB) e os fatores de transcrição Dorsal e Dif (*Dorsal-related immunity factor*) (HOFFMANN, 2003; LEMAITRE; HOFFMANN, 2007). Toda a cascata de sinalização tem como ponto de partida a ligação dos PAMPs aos receptores de membrana dos microrganismos, como exemplo, peptideoglicanos (PGRPs – *Peptidoglycan Recognition Proteins*) presentes em bactérias (HOFFMANN, 2003; LEMAITRE; HOFFMANN, 2007) (Figura 4A).

Dorsal e Dif são homólogos ao fator de transcrição NF-kB/Rel, e sua ativação tem efeito sobre a expressão de diversos genes de resposta imune, especialmente os envolvidos na produção de importantes peptídeos antimicrobianos, como drosomicina,

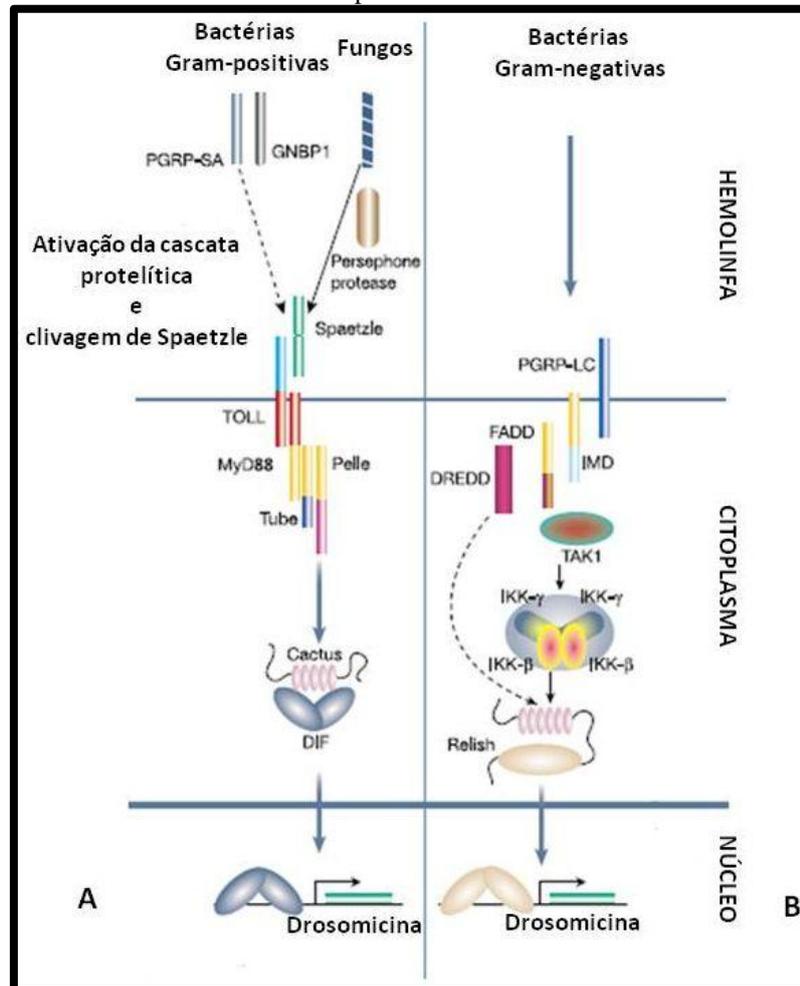
defensina e cecropina (HOFFMANN, 2003). Em *Drosophila*, Relish tem sido apresentado como o maior regulador de peptídeos antimicrobianos (LEMAITRE; HOFFMANN, 2007).

Com o sequenciamento e anotação dos genomas de *An. gambiae* (HOLT *et al.*, 2002) e *A. aegypti* (NENE *et al.*, 2007), análises comparativas com *Drosophila melanogaster* revelaram que mosquitos não possuem o fator de transcrição NF- $\kappa$ B Dif. Nesses mosquitos, dois fatores de transcrição REL1 e REL2, foram identificadas como homólogos a Dorsal e Relish de *Drosophila*, respectivamente.

Diversos estudos vêm mostrando que o fator de transcrição REL em mosquitos tem importantes implicações no sistema imune, sinalizando seja por REL1 ou REL2, a produção de peptídeos antimicrobianos, como por exemplo cecropinas e defensinas. (ANTONOVA *et al.*, 2009; MAGALHAES *et al.*, 2010; MEISTER *et al.*, 2005; SHIN *et al.*, 2005; XI *et al.*, 2008).

Xi e colaboradores (2008) demonstraram que a via Toll está bastante envolvida na resposta de *A. aegypti* ao DENV, a partir de análises baseadas em mosquitos com o gene *cactus* (inibidor da via) silenciado. Nesses mosquitos com a via superativada devido à ausência do inibidor, o título viral nos intestinos foi quatro vezes menor ao se comparar com o controle. Ramirez e Dimopoulos (2010) em estudo similar, silenciaram dois grupos distintos de mosquitos, um grupo com *cactus* silenciado (superativando a via) e MyD88 silenciado (suprimindo a via). Os autores registraram uma diminuição viral em *cactus* silenciado e um aumento viral em MyD88 silenciado.

**Figura 4** - Vias Toll (A) e Imd (B) em *Drosophila*, no controle da expressão de peptídeos antimicrobianos. Em *Aedes aegypti*, REL1 e REL2, foram identificadas como homólogos a Dif/Dorsal e Relish de *Drosophila*, respectivamente.



Fonte: Hoffmann (2003), adaptado.

### 2.5.1.1.2 Via Imd

A via Imd, conhecida por *Immune Deficiency Pathway*, foi inicialmente descrita com a identificação de uma mutação recessiva em *Drosophila* que comprometia a expressão de diversos genes envolvidos na produção de peptídeos antimicrobianos (LEMAITRE *et al.*, 1995). Os componentes dessa via são as proteínas de reconhecimento de peptídeos glicanos (PGRP-LC receptor – *Peptidoglycan Recognition Proteins*), a proteína adaptadora IMD (proteína com aproximadamente 25 kD), uma molécula adaptadora para o domínio *death* de IMD chamada de dFADD (*Fas-Associated protein with Death Domain*), uma caspase Dredd e o fator de transcrição Relish (HOFFMANN, 2003; LEMAITRE; HOFFMANN, 2007) (Figura 4B). Em

*Drosophila*, estudos tem mostrado que Relish é o fator de transcrição que regula a maior parte da expressão dos peptídeos antimicrobianos, resultando em uma grande importância na resposta imune a bactérias, especialmente em bactérias gram-negativas (KIM; KIM, 2005; LEMAITRE; HOFFMANN, 2007). Em *A. aegypti*, o fator de transcrição REL2 é um análogo a Relish de *Drosophila*, e tem sido empregado como grande responsável pela produção de diversos e importantes peptídeos antimicrobianos em mosquitos, desempenhando um papel fundamental na resposta imune de mosquitos a bactérias gram-negativas, assim como ocorre em *Drosophila* (ANTONOVA *et al.*, 2009; MAGALHAES *et al.*, 2010).

### 2.5.1.1.3 Via JAK-STAT

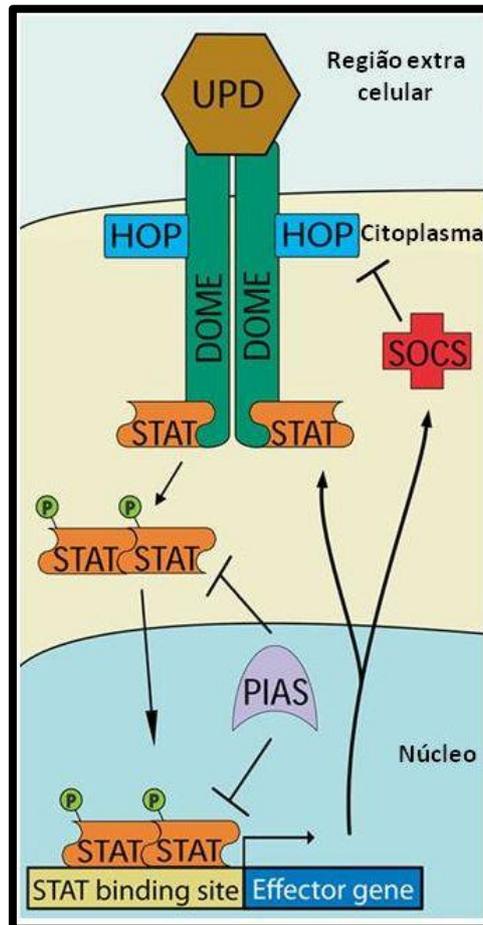
A via JAK-STAT – *Janus kinase signal transducer and activation of transcription* – é uma cascata de sinalização que foi originalmente identificada em mamíferos, estando envolvida principalmente na resposta imune contra vírus. Em artrópodes, a primeira identificação da via foi em *D. melanogaster*, onde foi descrito seu papel na segmentação embrionária (AGAISSE; PERRIMON, 2004). A JAK-STAT é evolutivamente conservada em nível estrutural e funcional, desde insetos como *Drosophila* (ARBOUZOVA; ZEIDLER, 2006) e *A. aegypti* (SOUZA-NETO *et al.*, 2009) a vertebrados, como mamíferos (AGAISSE; PERRIMON, 2004).

Em *D. melanogaster*, quatro componentes principais foram identificados envolvidos nessa cascata de sinalização, sendo eles a proteína ligante Upd (*Unpaired*), o receptor domeless (Dome – homólogo distante dos receptores do tipo citocina I em vertebrados), a janus quinase (JAK), Hopschotch (Hop), e o ativador de transcrição STAT. A regulação negativa dessa via ocorre a partir de uma proteína inibidora da ativação de STAT (PIAS – *protein inhibitor of activated STAT*) e um supressor de sinalização de citocinas (SOCS – *Suppressor of cytokine signaling*) (Figura 5) (ARBOUZOVA; ZEIDLER, 2006; SOUZA-NETO *et al.*, 2009).

Dostert *at al.* (2005), em estudo com moscas mutantes para a via JAK-STAT, registraram uma maior sensibilidade dos insetos mutantes em resposta ao vírus C de *Drosophila*, quando comparados aos insetos selvagens. Os autores observaram ainda que a produção de peptídeos antimicrobianos nos dois grupos (selvagem e JAK-STAT mutante) não foi alterada, assim como a resistência contra fungos e bactérias se manteve igual nos dois grupos, mostrando um papel talvez exclusivo da via JAK-STAT na

resposta imune de *Drosophila* contra vírus. Souza-Neto *et al.* (2009), mostraram que a via JAK-STAT exerce uma importante atividade de defesa antiviral contra o vírus da dengue em *A. aegypti*, após silenciarem genes envolvidos nessa via de sinalização.

**Figura 5** - Via de sinalização JAK-STAT, em representação esquemática.



Fonte: Souza-Neto *et al.* (2009), adaptado.

### 2.5.2 RNA de interferência

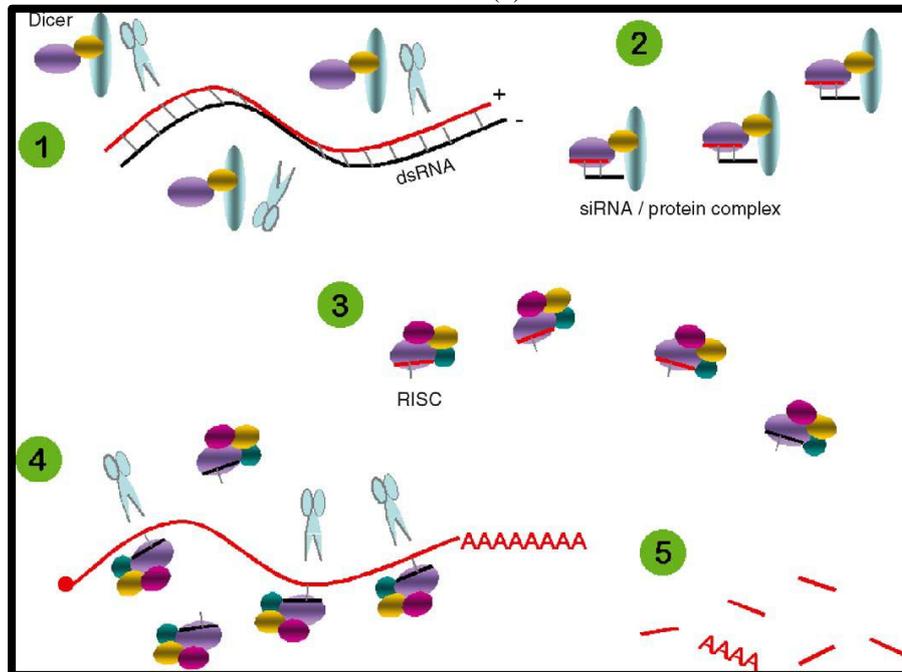
RNA de interferência, ou RNAi (*RNA interference*) é um mecanismo molecular endógeno de silenciamento gênico, altamente conservado e encontrado em diversos organismos (MELLO; CONTE, 2004). Esse mecanismo foi descrito inicialmente em flores (petúnias), chamado na ocasião, de co-supressão gênica (NAPOLI *et al.*, 1990). De modo geral, o mecanismo consiste na identificação de RNAs fita dupla (dsRNA, *double stranded RNA*) pela enzima Dicer-2, que cliva os dsRNAs em fragmentos de RNA fita dupla pequenos (siRNA, *small interfering RNAs*) de aproximadamente 21-25

nucleotídeos. Além de clivar os dsRNAs, Dicer-2 atua também como helicase, desenrolando os siRNA que estão em fita dupla tornando-os fita simples, para que se liguem ao complexo de enzimas endonucleases (membros da família Argonaute) chamado de complexo RISC (*RNA-induced silencing complex*). Após essa ligação ao RISC, este conjunto de moléculas se ligará à região complementar do siRNA no RNA mensageiro (mRNA). Após a ligação dos siRNA ao mRNA complementar, há clivagem do mRNA por enzimas do RISC (Figura 6) (MELLO; CONTE, 2004; SANCHEZ-VARGAS *et al.*, 2004).

A maquinaria de RNAi desempenha um papel importante na regulação da expressão de genes endógenos, para corrigir sequências truncadas do próprio organismo que se formam nos processos de replicação e/ou transcrição, como por exemplo, quando formam-se pequenos grampos ou bolhas no RNA, mais conhecidas por *hairpins* (SANCHEZ-VARGAS *et al.*, 2004). Além de ser um mecanismo endógeno de silenciamento gênico, a maquinaria de RNA de interferência tornou-se uma técnica, e tem sido amplamente usada em diversos estudos baseando-se nos princípios da genética reversa (identificação de função gênica através da observação de um fenótipo gerado pelo silenciamento do gene em estudo). dsRNA sintéticos podem ser transfectados por diversas técnicas já descritas e otimizadas para diversos organismos tais como microinjeções, eletroporação, alimentação, mergulho e injeção em veia caudal, dentre outras, visando o silenciamento do gene estudado (BRUMMELKAMP *et al.*, 2002; CALEGARI *et al.*, 2002; FIRE *et al.*, 1998; MAGALHAES *et al.*, 2010; NUNES; SIMOES, 2009; SOUZA-NETO *et al.*, 2009; TIMMONS; FIRE, 1998).

Em insetos, o mecanismo de RNAi é uma das vias de maior importância na resposta às infecções por arbovírus. Em *Drosophila*, estudos têm demonstrado que em insetos adultos mutantes para os genes envolvidos na via de RNAi são mais susceptíveis às infecções virais (GALIANA-ARNOUX *et al.*, 2006; ZAMBON *et al.*, 2006). Keene *et al.* (2004) a partir da metodologia de injeção intratorácica de dsRNA, silenciaram Argonaute-2 em *An. gambiae* e demonstraram que com a redução do nível de expressão dessa molécula, o título do vírus O'nyong-nyong aumentou nos mosquitos, mostrando assim, o importante papel desse mecanismo em resposta à infecção viral. Campbell *et al.* (2008) apresentaram resultados similares quando analisaram a resposta de *A. aegypti* contra infecções causadas pelo vírus Sindbis (SINV). Nesse estudo, foi demonstrado que o silenciamento de Dicer-2 e Argonaute-2 provocou aumento nos títulos de SINV.

**Figura 6** - Mecanismo de RNA de interferência em representação esquemática. Em *Drosophila*, dsRNA são reconhecidos por Dicer e clivados em pequenos fragmentos de 21-25nt de tamanho (1), formando o complexo siRNA-proteína (2). Dicer-2 (helicase) desenrola os siRNA fita dupla e as enzimas do complexo RISC se ligam aos siRNAs (3). Os siRNAs ligados com RISC paream-se com a sequência homóloga ao RNA mensageiro (4), e RISC cliva o RNA mensageiro para que este seja degradado por RNAses (5).



Fonte: Sanchez-Vargas *et al.* (2004), adaptado.

Em outro estudo, desenvolvido por Khoo *at al.* (2010), os autores investigaram as barreiras de infecção e escape do intestino em mosquitos infectados com SINV, demonstrando que, nos grupos de mosquitos que tiveram Dicer-2 silenciada, as barreiras tornaram-se menos eficientes. Com isso, houve uma diminuição do período de incubação extrínseca, e a sua consequente disseminação em menor tempo para os órgãos secundários. Sánchez-Vargas *at al.* (2009), estudando a modulação do DENV2 em *A. aegypti*, mostraram que uma via de RNAi defeituosa (devido ao silenciamento de Dicer2 e Argonaute2), causou um aumento dos títulos virais nas infecções por DENV no mosquito, levando consequentemente a uma diminuição no período de incubação extrínseca, o que poderia aumentar a eficiência na transmissão viral.

### 2.5.3 Apoptose

Apoptose, ou morte celular programada, é um processo geneticamente controlado que resulta na fragmentação do DNA e consequente morte celular. Observam-se eventos apoptóticos desde a fase embrionária de diversos organismos

metazoários, envolvendo-se em processos diversos que estão relacionados a várias funções fisiológicas, como por exemplo, a modelagem de tecidos e manutenção do sistema imune. Desregulações na via apoptótica podem ocasionar sérios danos, como o aparecimento de doenças, malformações, cânceres e problemas imunes (RAFF, 1998). Eventos enzimáticos ocorrem na cascata de sinalização apoptótica, sempre regulada por sinalizações intracelulares e/ou extracelulares (VAUX; KORSMEYER, 1999).

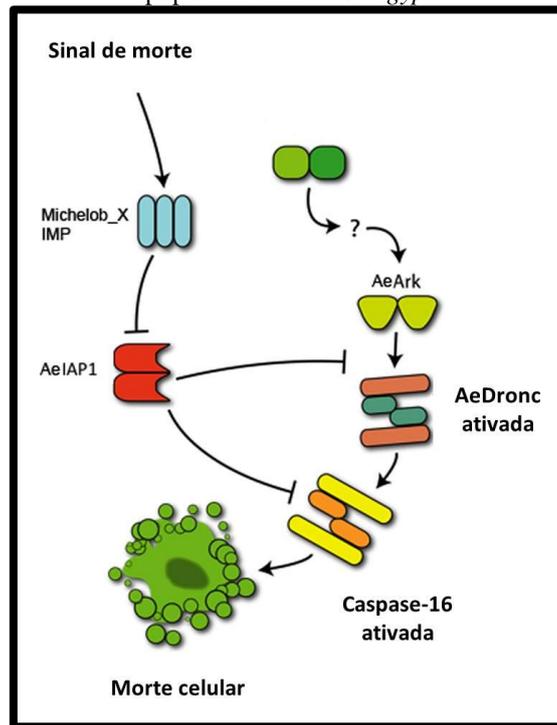
O processo apoptótico é realizado por uma ampla família de cisteíno-proteases chamada caspases, cujo nome é oriundo da expressão *cysteine-aspartic-acid-proteases* (BEST, 2008), as quais podem ser classificadas em dois diferentes tipos: as iniciadoras e as efetoras. A primeira desempenha o papel de induzir o processo apoptótico e a segunda o executa (HENGARTNER, 2000). Todo processo é rigorosamente controlado por reguladores apoptóticos e inibidores de apoptose, que ao fazer a regulação, podem promover a sobrevivência ou morte celular (RAFF, 1998; THORNBERRY, 1998).

Foi descrito por diversos autores o envolvimento da via apoptótica na defesa contra vírus e outros patógenos (CLARKE; CLEM, 2003; ZHOU *et al.*, 2005), inclusive em processos apoptóticos desempenhando resposta a infecções virais em mosquitos (BOWERS *et al.*, 2003; GIRARD *et al.*, 2005; OCAMPO *et al.*, 2013; VAIDYANATHAN; SCOTT, 2006).

Em *A. aegypti*, a caspase apoptótica primária é AeDronc, é um homólogo da caspase-9, com um domínio CARD N-terminal para interações com a molécula adaptadora de caspase, a AeARK. A ativação de AeDronc é regulada principalmente pelas proteínas antagonistas IAP, Michelob\_X e IMP. Juntos, os antagonistas de IAP promovem a morte celular através da ligação à proteína inibidora de apoptose, AeIAP1. Uma vez ativado, AeDronc clivará e ativará a caspase-16 (caspase efetora), levando à morte celular (Figura 7).

Em estudo desenvolvido por Ocampo *at al.* (2013), os autores demonstraram que em uma linhagem de mosquitos refratários ao DENV-2, houve um aumento significativo da expressão de genes de caspases no intestino e no corpo gorduroso dos mosquitos, quando comparado aos mosquitos que receberam apenas alimentação sanguínea não infectada. Adicionalmente, os autores observaram ainda uma maior expressão das caspases na linhagem de mosquitos refratária à infecção em comparação à linhagem susceptível, mostrando dessa forma, o importante papel da via apoptótica na competência vetorial em *A. aegypti*.

**Figura 7** - Representação esquemática da via apoptótica em *Aedes aegypti*.



Fonte: Ocampo *et al.* (2013), adaptado.

## 2.6 Interação *Aedes aegypti*-DENV

Um conhecimento mais profundo dos determinantes do ciclo de transmissão da dengue, cada dia mais, torna-se crucial para o melhoramento das estratégias de controle dessa doença. Um desses determinantes é o nível de susceptibilidade do mosquito ao DENV, que varia entre as populações de *A. aegypti*. Vários estudos mostram que diferentes populações desta espécie respondem de forma diferenciada às infecções por vírus, apresentando, portanto, variações no nível de competência vetorial (ANDERSON; RICO-HESSE, 2006; GUBLER *et al.*, 1979; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA *et al.*, 2004; MOURA *et al.*, 2015; OCAMPO *et al.*, 2013; TABACHNICK *et al.*, 1985; VAZEILLE-FALCOZ *et al.*, 1999).

Dentre os diversos estudos para conhecer e determinar o nível de competência vetorial nas populações de mosquitos a arbovírus, há o desenvolvido por Gubler *et al.* (1979), onde os autores verificaram variação na susceptibilidade de 13 populações do mosquito analisadas em relação às infecções pelos quatro sorotipos do DENV. Além disso, o título viral requerido para infectar os mosquitos variou inversamente com a susceptibilidade das populações estudadas. Em outro estudo, Vazeille-Falcoz *et al.*

(1999), buscaram investigar a diferença na susceptibilidade das populações de *A. aegypti* de duas diferentes ilhas da Polinésia Francesa (Tahiti e Moorea) em resposta ao DENV-2. Os autores analisaram 23 populações dessas localidades e verificaram que no Taiti, duas distintas regiões geográficas da ilha (leste e oeste) podem ser definidas de acordo com a homogeneidade/heterogeneidade das taxas de infecção, diferentemente de Moorea, onde não houve diferenças significativas em relação às regiões geográficas e ao perfil de infecção. Populações de mosquito dos Estados Unidos e México foram analisadas quanto a competência vetorial em outro estudo, desenvolvido por Bennet *et al.* (2002), onde 24 populações de *A. aegypti* foram infectadas com DENV-2 e as taxas de competência vetorial variaram de 24 a 83% nas diferentes populações.

A cinética da infecção do DENV em *A. aegypti*, bem como o tropismo do vírus por determinados tecidos e órgãos do mosquito e o período que o vírus leva para infectar as glândulas salivares são outros importantes fatores a serem analisados quando se refere à interação mosquito-vírus. Salazar *et al.* (2007) avaliaram esses aspectos da interação mosquito-vírus em insetos alimentados artificialmente com DENV-2 e registraram a presença viral em diferentes dias após a infecção em órgãos/tecidos como traquéia, intestino, abdômen, glândulas salivares, cabeça e túbulos de Malpighi. No segundo dia após a infecção, órgãos como traquéia, intestino e abdômen já estavam infectados com DENV-2, seguindo para glândulas salivares, que apresentaram positividade, mesmo que em pequena proporção, já no terceiro dia após a infecção. Isso mostra a rápida disseminação do vírus para órgãos secundários, como glândulas salivares. Um grande número de mosquitos (76-95% dos analisados) com glândulas salivares infectadas foi registrado a partir do 10º dia, seguindo positivos até o 21º dia após a infecção. Recentemente, Moura e colaboradores (2015), publicaram estudo que avaliou a competência vetorial de mosquitos *A. aegypti* oriundos de Cabo Verde, na África, aos quatro sorotipos do DENV e evidenciaram diferenças importantes na resposta do vetor aos diferentes sorotipos. Altas taxas de infecção de glândulas salivares foram registradas para o DENV-2 e DENV-3, enquanto para o DENV-1, observou-se infecção apenas para intestino e cabeça. Por outro lado, o DENV-4, registrou infecção apenas no intestino (MOURA *et al.*, 2015). Todos os isolados virais utilizados nesse estudo de Moura e colaboradores (2015) foram coletados na cidade do Recife, Pernambuco, Brasil.

Outro importante aspecto na interação mosquito-vírus está relacionado ao processo de co-evolução entre as populações de mosquito e o vírus Dengue. Como a

competência vetorial das diversas populações de *A. aegypti* para DENV é determinada geneticamente, hipotetiza-se que a estrutura do DENV pode estar adaptando-se aos diferentes genótipos das diferentes populações de mosquito (BLACK *et al.*, 2002). Diante disso, a transmissão viral pode ocorrer de forma mais eficiente em vetores (com genótipos específicos) que sejam simpátricos aos vírus, do que em mosquitos que apresentam outros genótipos, alopátricos ao vírus, ou seja, de outras localidades (ANDERSON; RICO-HESSE, 2006; LAMBRECHTS *et al.*, 2009). Em *Flavivirus*, estudos filogenéticos mostram que sua evolução está mais relacionada a processos adaptativos do vírus com o vetor, do que com o hospedeiro vertebrado, diferentemente dos *Alphavirus* (Chikungunya), onde as adaptações evolutivas parecem estar mais relacionadas ao hospedeiro vertebrado (CHEVILLON *et al.*, 2008; COLOGNA *et al.*, 2005; WEAVER; VASILAKIS, 2009). Esse tipo de co-evolução entre patógeno e vetor, pode ser observada em outros organismos, como por exemplo, na evolução de parasitas da malária com as espécies de *Anopheles* (JOY *et al.*, 2008).

Apesar de se conhecer as barreiras envolvidas na competência vetorial desse mosquito ao DENV, pouco se sabe dos mecanismos moleculares que as modulam. Não obstante, o sequenciamento dos genomas de *Drosophila* (ADAMS *et al.*, 2000), *An. gambiae* (HOLT *et al.*, 2002) e *A. aegypti* (NENE *et al.*, 2007) fez com que esses estudos avançassem bastante nos últimos anos e várias moléculas e vias envolvidas na defesa anti-DENV no *A. aegypti* já foram identificadas, dentre elas as das vias Toll e JAK-STAT, do mecanismo de RNAi e da apoptose. Esses estudos trazem mais perguntas sobre a complexa interação *A. aegypti*-DENV e abrem portas para diversos tipos de análises.

### 3 JUSTIFICATIVA

Uma das razões pelas quais os programas de controle da dengue apresentam inúmeras falhas é a lenta evolução no conhecimento dos determinantes envolvidos na transmissão da doença. A dengue, por ser uma arbovirose, é transmitida unicamente via alimentação sanguínea por fêmeas de mosquito competentes infectadas pelo vírus da Dengue, o que caracteriza a transmissão do tipo horizontal. Porém, o vírus pode ser mantido nas populações de mosquitos a partir de outros tipos de transmissão, como por exemplo, a transmissão vertical do tipo transovariana e a horizontal do tipo venérea, o que representa um importante aspecto a ser investigado na epidemiologia da transmissão desta doença para humanos.

Praticamente nada se sabe sobre os aspectos envolvidos na transmissão transovariana e na transmissão venérea. A literatura traz dados muito básicos sobre a detecção viral em mosquitos oriundos de ovos coletados por armadilha de oviposição em campo, não abordando os aspectos envolvidos nesse tipo de transmissão viral, o que faz necessário o desenvolvimento de estudos mais aprofundados evidenciando esses eventos.

Entender as implicações da infecção viral na biologia reprodutiva de *A. aegypti*, conhecer o nível de competência vetorial dos mosquitos infectados com o vírus dengue a partir da transmissão transovariana, e compreender o nível de expressão de diversos genes a nível ovariano, é extremamente relevante para a pesquisa sobre a interação vetor-vírus. Com esse estudo, importantes informações serão incorporadas para se entender melhor a epidemiologia da transmissão da dengue, contribuindo para o aprimoramento das estratégias de controle de vetor, visando à prevenção da infecção e/ou disseminação do vírus na população humana.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo Geral

Analisar os aspectos envolvidos na transmissão transovariana em uma população de campo de mosquitos *Aedes aegypti* infectados com o vírus dengue sorotipo 2.

### 4.2 Objetivos Específicos

- 1- Verificar a cinética de infecção em ovários de fêmeas de mosquitos *Aedes aegypti* após infecção oral com alimentação sanguínea contendo DENV-2.
- 2- Estimar as taxas de infecção filial por DENV na prole proveniente de fêmeas competentes vetorialmente para o vírus.
- 3- Caracterizar a competência vetorial das fêmeas infectadas via transmissão transovariana.
- 4- Verificar o efeito da infecção pelo DENV sobre a fecundidade e fertilidade das fêmeas.
- 5- Caracterizar o efeito da infecção pelo DENV sobre a morfologia dos ovários das fêmeas infectadas em comparação às fêmeas não infectadas.
- 6- Avaliar o nível de expressão de genes das vias Toll, JAK-STAT, mecanismo de RNA de interferência e via apoptótica em ovários de *A. aegypti*.

## 5 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

### 5.1 Estabelecimento da colônia de mosquitos *Aedes aegypti*

Ovos de mosquito *Aedes aegypti* foram coletados a partir do uso de armadilha de oviposição na cidade de Petrolina (9°23'55"S 40°30'03"W), localizada no interior do Estado de Pernambuco, Brasil. Petrolina está localizada a 700 km de distância da capital do Estado de Pernambuco, Recife, possuindo baixa densidade demográfica, com 65 habitantes/km<sup>2</sup>. A metodologia de amostragem seguiu critérios previamente estabelecidos (MINISTÉRIO-DA-SAÚDE, 2008) para amostragem de populações de mosquitos pelo Serviço Nacional de Referência em Controle de Culicídeos Vetores. A escolha dessa população foi devido à elevada competência vetorial registrada em estudo anterior desenvolvido por Carvalho-Leandro e colaboradores (2012). Taxas elevadas de disseminação viral na população de Petrolina foram registradas nesse estudo, apresentando 100% de positividade para a presença do vírus dengue em glândulas salivares e corpo gorduroso das fêmeas de *A. aegypti* aos 21 dias após a alimentação sanguínea infectada.

### 5.2 Infecção artificial

Ovos de mosquito *A. aegypti* da população de Petrolina (F<sub>3</sub>), foram imersos em água para a eclosão das larvas. As larvas foram crescidas em condições padronizadas de criação (300 larvas L1 por cuba contendo 2 litros de água e 2g de ração de gato Friskies - Purina®, esterilizada e liofilizada) até a emergência dos adultos. Os adultos foram mantidos em gaiola de criação por cinco dias, para permitir a cópula *ad libitum*. Fêmeas com seis dias de idade foram separadas em gaiolas plásticas menores, contendo 300 fêmeas cada. No terceiro dia após a separação, as fêmeas foram submetidas à alimentação artificial.

Para as alimentações, utilizou-se vírus Dengue sorotipo 2 (DENV-2) linhagem 3808 (GenBank ID: EU259569), isolado de paciente durante um surto de dengue na

cidade do Recife em 1995. Alíquotas de 300  $\mu\text{L}$  do estoque viral foram usadas para infectar células de *Aedes albopictus* (C6/36) a 80% de confluência em frascos de 25  $\text{mm}^3$ . Após visualização do efeito citopático provocado pelo vírus nas células (6º dia após a inoculação), o sobrenadante foi coletado e separado em um tubo de 15 mL estéril. As células infectadas aderidas nos frascos foram lisadas para a liberação das partículas virais a partir de três séries consecutivas de congelamento/descongelamento. O sobrenadante foi misturado às células lisadas e essa suspensão viral foi misturada numa razão 1:1 com sangue humano de doadores voluntários coletado em tubo heparinizado coletados minutos antes da alimentação artificial. Para o controle negativo, suspensão de células C6/36 não infectadas foram misturadas da mesma forma com o sangue humano heparinizado. Para aumentar o sucesso na alimentação artificial, as fêmeas submetidas ao processo de alimentação artificial tiveram a alimentação açucarada retirada 48 horas antes da alimentação sanguínea. A alimentação foi feita através de um alimentador artificial conectado a um banho-maria circulante a 40°C (Figura 8). O sangue foi colocado em recipientes de vidro cobertos com membrana colágena artificial (HEMOTEK®), hidratada em solução salina (PBS 1X – Phosphate-buffered saline) por 15 minutos antes do experimento. Alíquotas de 1 mL do sangue misturado com vírus foram coletadas para posterior titulação viral. Após 1 hora de alimentação, os mosquitos foram anestesiados a 4°C e colocados em placa de Petri sobre gelo para a remoção das fêmeas que não se alimentaram. As fêmeas alimentadas foram transferidas para as gaiolas de contenção e mantidas em laboratório com condições de umidade, fotoperíodo e temperatura controladas (70–80% de umidade e 12h:12h claro:escuro, 26  $\pm$  2°C). Esse procedimento de infecção artificial foi conduzido em triplicata para cada análise realizada. A titulação viral foi realizada a partir de ensaio de titulação com revelação por peroxidase em células C6/36 (DAS *et al.*, 2007; SANTOS *et al.*, 2013).

**Figura 8** - Sistema de alimentação sanguínea de fêmeas de *Aedes aegypti* em alimentador artificial, baseado em banho-maria circulante aquecido a 40°C, com recipientes de vidro contendo sangue cobertos com membrana colágena comercial.



Fonte: O autor.

### 5.3 Cinética de infecção ovariana

Ovários foram extraídos das fêmeas ao 3°, 7°, 15°, 21° e 28° dias após a infecção (dpi) para análise da cinética da infecção ovariana. Para tanto, dois grupos experimentais foram analisados: alimentação única (AU) e múltiplas alimentações (MA). Esses grupos experimentais foram conduzidos para simular situações naturais de alimentação em campo. O grupo AU, simula uma fêmea que realiza apenas um repasto sanguíneo em hospedeiro infectado e depois não realiza nenhuma outra alimentação sanguínea por no mínimo 21 dias, e o grupo MA, simula uma fêmea com diversos repastos sanguíneos, sendo apenas um em hospedeiro infectado e outros subsequentes em hospedeiros não infectados. Dessa forma, o grupo AU realizou apenas uma alimentação sanguínea infectada em laboratório e o grupo MA alimentou-se a primeira vez com sangue infectado e outras duas vezes em camundongos (*Mus musculus*) anestesiados com injeção intraperitoneal de cloridrato de cetamina (10%) e cloridrato de xilasina (2%). O procedimento de anestesia foi realizado de acordo com o protocolo preconizado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA - Centro de Pesquisas

Aggeu Magalhaes). As alimentações adicionais em camundongos do grupo MA foram realizadas ao 8° e 15° dpi.

Foram coletados aproximadamente 15 fêmeas por momento em cada uma das três replicatas/grupo. Os órgãos foram dissecados em PBS, sob microscópio estereoscópio, em placa de Petri devidamente limpa com etanol 70% e RNase away® (Invitrogen). Cada órgão foi lavado em três gotas de PBS 1X, para evitar contaminação com a hemolinfa e/ou corpo gorduroso do inseto, evitando dessa forma falsos-positivos. As amostras coletadas foram individualizadas em microtubos contendo 300 µL de PBS 1X estéril, e armazenadas a -80°C para posterior extração de RNA e quantificação viral por PCR quantitativa em tempo real (qPCR).

#### 5.4 Extração de RNA

Os ovários coletados foram homogeneizados com pistilo e aparelho automático (Pellet Pestle® Motor). 150 µL da amostra foram utilizados para extração de RNA total com o uso do reagente Trizol® (Invitrogen). Após extração, o RNA foi ressuspendido em 50 µL de água ultra pura, e posteriormente submetido a tratamento com TURBO DNase® (Ambion), a partir de protocolo do fabricante.

#### 5.5 Quantificação de DENV-2 por PCR quantitativo em tempo real (qPCR)

O número de cópias virais em cada amostra de ovário dos mosquitos coletados foi determinado por qPCR. Os órgãos analisados foram das amostras de ovário dos grupos infectado AU e MA resultantes das coletadas nos diferentes dias após a infecção (3°, 7°, 15°, 21° e 28° dpi). O gene escolhido para a quantificação viral foi o NS5, referente à proteína não estrutural 5 do vírus. Em cada placa de reação de qPCR absoluta, uma curva padrão foi utilizada com diluições seriadas do transcrito de NS5 amplificado e purificado *in vitro*. QuantiTect® SYBR Green RT-PCR® (Qiagen) foi utilizado para as reações de qPCR *one-step*, com a primeira etapa referente à uma reação de transcrição reversa, e a segunda de PCR em tempo real. Os *primers* correspondentes ao gene NS5 utilizados foram: *Fw*: 5`-GGAAGGAGAAGGACTGCACA-3` e *Rev*: 5`-ATTCTTGTGTCCCATCCTGCT-3` (KONG *et al.*, 2006). O número de cópias virais foi determinado pela fórmula usada no trabalho desenvolvido por Kong *et al.* (2006).

A variação do número de cópias virais dos dpi positivos nos grupos AU e MA foi comparada através do teste ANOVA (Kruskal-Wallis *a posteriori*), com intervalo de confiança de 95%. Analisou-se também, pelo mesmo teste e significância, a variação da quantificação viral entre as amostras de todos os dpi positivos.

### 5.6 Detecção viral na primeira geração filial

Mosquitos do grupo infectado, após alimentação sanguínea artificial contendo o DENV-2, foram armazenados em gaiolas de criação contendo dois sítios de oviposição em cada uma, para coleta de ovos referentes à primeira geração filial. Os sítios de oviposição foram constituídos de dois recipientes plásticos de 50 mL, contendo 20 mL de infusão de gramíneas a 30% cada um. Como substrato de oviposição, utilizou-se papel filtro absorvente. A cada 5 dias, as fêmeas foram realimentadas em camundongos (*Mus musculus*) anestesiados conforme procedimento previamente descrito. Os sítios de oviposição foram trocados ao 7°, 14°, 21° e 28° dpi, totalizando quatro momentos de coletas de ovos. Ovos correspondentes ao 21° dpi foram imersos em água para eclosão dos ovos e liberação das larvas.

As larvas foram criadas em insetário e os mosquitos, após emergência, foram armazenados em gaiolas de criação. Ao 3°, 7°, 14°, 21°, 28° e 35° dias após a emergência (dpe), os mosquitos foram coletados e sacrificados por congelamento a -20°C. Em cada ponto de coleta, um total de cinco pools contendo três machos foram coletados e armazenados em microtubos de 1,5 mL, contendo 500 µL de PBS 1X estéril. Nos mesmos momentos de coleta, outros cinco pools contendo três fêmeas foram coletados. Exclusivamente nos pools de fêmeas, as cabeças foram separadas do corpo por dissecação e foram armazenadas em pools correspondentes às cabeças e corpos. Dessa forma, cada pool com três fêmeas originou dois pools separados, sendo: um pool contendo três cabeças e outro contendo três corpos. Esse procedimento de separação das cabeças dos corpos foi feito com o objetivo de compreender em qual momento após a emergência, a fêmea da F<sub>1</sub> oriunda de fêmeas que receberam alimentação sanguínea infectada, poderá estar infectada com o vírus e este disseminado pelo corpo do inseto, tornando essa fêmea, potencial infectante. Todo esse procedimento de coleta foi realizado em triplicata.

Os pools foram armazenados a -80°C e posteriormente homogeneizados com pistilos e aparelho automático (Pellet Pestle<sup>®</sup> Motor). Após homogeneização, as

amostras foram centrifugadas para separação do sobrenadante a 2500 rpm, por 5 minutos, a uma temperatura de 4°C. 50 µL do sobrenadante de cada pool foram usados em ensaio imunoenzimático para detecção do DENV-2 pelo kit *Platelia Dengue NS1* Ag. (BioRad)®. O ensaio foi realizado seguindo as recomendações do fabricante.

### 5.7 Análise do efeito da infecção viral nos padrões reprodutivos das fêmeas

Fêmeas dos grupos infectado e controle após alimentação sanguínea artificial foram individualizadas em gaiolas de criação contendo um sítio de oviposição (Figura 9). Os sítios de oviposição consistiram em recipientes plásticos de 50 mL, contendo 20 mL de solução fenada a 30%, e uma palheta porosa de madeira, com dimensões de 5 cm x 2,5 cm para servir de substrato para a oviposição. Foi ofertado a cada fêmea individualizada, solução de sucrose a 10% *ad libitum* em algodões embebidos e mantidos em cima da gaiola recoberto por copos plásticos de 50 mL, para reduzir a evaporação da água nos algodões.

**Figura 9** – Esquema de análise individual do número de ovos de fêmeas de *Aedes aegypti* dos grupos infectado e controle.



Fonte: O autor.

Seis dias após a alimentação artificial, as palhetas foram removidas das gaiolas individuais e substituídas por nova palheta. No oitavo dia após a alimentação artificial, as fêmeas foram realimentadas em camundongos (*Mus musculus*) anestesiados (Figura 10). Essa alimentação foi para possibilitar aporte sanguíneo e verificação da produção

de ovos no segundo ciclo gonadotrófico da fêmea. Ao 14º dpi, o mesmo procedimento de retirada das palhetas foi repetido e a nova palheta para coletar os ovos do próximo ciclo foi adicionada dentro das gaiolas. Ao 15º dpi, as fêmeas foram realimentadas em camundongos anestesiados, para proporcionar aporte sanguíneo para o terceiro ciclo gonadotrófico. Ao 21º dpi, as palhetas foram removidas das gaiolas e as fêmeas sobreviventes foram sacrificadas.

**Figura 10** – Esquema de realimentação de fêmeas de *Aedes aegypti* dos grupos infectados e controle em camundongos (*Mus musculus*) anestesiados. A: Visão geral da organização do processo de alimentação. B: Visão aproximada do momento em que uma fêmea de *Aedes aegypti* se alimenta no camundongo (seta).



Fonte: O autor.

Foi analisado um total de 60 fêmeas por grupo, em experimentos realizados em triplicatas. Os ovos de cada fêmea/palheta/ciclo foram contados e a taxa de fecundidade obtida a partir do número total de ovos produzidos por fêmeas em cada ciclo gonadotrófico. Após a contagem dos ovos, as palhetas foram imersas individualmente em infusão de gramíneas a 30%, para permitir a eclosão das larvas de primeiro estágio (L<sub>1</sub>). As larvas L<sub>1</sub> foram contadas, para a obtenção dos dados de fertilidade. Essa análise

de fertilidade foi realizada para cada conjunto de ovos coletados por fêmea em cada ciclo gonadotrófico.

Para analisarmos o efeito da infecção viral nos padrões reprodutivos das fêmeas, utilizamos os dados do quantitativo de ovos (fecundidade) e larvas (fertilidade) e aplicamos o teste ANOVA de medidas repetidas. Para análise da existência de uma correlação entre número de ovos produzidos e o número de larvas que eclodiram, utilizamos a Correlação de Pearson.

## 5.8 Histopatologia e Ultraestrutura

Fêmeas dos grupos infectado e controle, após alimentação sanguínea, foram submetidas ao processamento para análises histopatológicas e ultraestruturais. Os insetos foram sacrificados em etanol 70% ao 14º dpi e posteriormente submetidos à dissecação da cabeça e do abdômen. Apenas mosquitos do grupo infectado tiveram cabeças coletadas, pois esta foi utilizada como indicador de disseminação viral no inseto. As cabeças foram armazenadas em água ultra pura e submetidas à extração de RNA total e ensaio de qPCR para detecção e quantificação viral.

Os abdomens dos grupos infectado e controle foram fixados em solução de formol neutro tamponado 4% por 24 h. Após fixação, as amostras foram submetidas a série crescente de desidratação com etanol (70%, 80%, 90% e 2x 100%) e diafanização em xilol PA (2x). Na sequência, as amostras foram incluídas em parafina. Cortes seriados de 3 µm foram realizados em micrótomo HYRAX M55 (Zeiss®). Os cortes foram submetidos a procedimento de coloração baseado em hematoxilina-eosina. As amostras foram visualizadas em microscópio DM500 invertido (Leica®) acoplado a um sistema de captação de imagens *Leica Application Suite Version 2.0.0* (Leica®) (Aumento de 100x, 400x e 1000x).

No grupo infectado, apenas os abdomens que corresponderam a mosquitos com a cabeça positiva para o DENV-2 foram analisados. No grupo controle, todos os abdomens foram analisados.

Para as análises ultraestruturais, o mesmo procedimento de coleta de cabeça dos infectados e detecção/quantificação viral foi realizado. Ovários das fêmeas dos grupos infectado e controle foram fixados em solução contendo glutaraldeído 2.5%, paraformaldeído 4% em tampão cacodilato de sódio 0.1 M , pH 7.2, por 24 horas. As amostras foram lavadas no mesmo tampão e pós-fixadas por 1 hora em solução de

tetróxido de ósmio 1%, ferrocianeto de potássio 0.8% e cloreto de cálcio 5 mM em tampão cacodilato 0.1 M, pH 7.2. Após lavagem no mesmo tampão, os tecidos foram submetidos ao processo de contrastação em bloco com acetato de uranila 5% por 1 hora. Após contrastação, os órgãos foram lavados em água destilada e posteriormente desidratados em série crescente de acetona e incluídos em resina *Epoxy Embedding Medium*<sup>®</sup> (Sigma). Cortes ultrafinos de 70 nm foram obtidos em ultramicrotomo EM UC6 (Leica<sup>®</sup>) e corados com acetato de uranila 5% e citrato de chumbo 1%. As observações foram realizadas em microscópio eletrônico de transmissão (MORGAGNI<sup>®</sup>, FEI – 80kV).

### **5.9 Quantificação de transcritos de resposta imune e apoptóticos por PCR quantitativo em tempo real (qPCR)**

Para análise dos genes *Relish-1* (via Toll), *Hop* (Via JAK-STAT), *Argonaute 2* (Mecanismo de RNA de interferência), e dos genes envolvidos na via apoptótica *Caspase 16*, *AeDronc*, *Ae IAP1*, RNA total de ovários de fêmeas coletados ao 14<sup>o</sup>, 21<sup>o</sup> e 28<sup>o</sup> dpi do grupo infectado (positivo e negativo para o DENV-2) e do grupo controle foram utilizados. As amostras foram analisadas em pools, a partir da união de RNA total de ovários de três fêmeas, sendo: 1) Pools de ovários do grupo infectado (positivo para DENV-2); 2) Pools de ovários do grupo infectado (negativo para o DENV-2); 3) Pools do grupo controle. Para os ensaios de qPCR, utilizou-se 50 ng de RNA total dos pools em análises em duplicata. O *kit* utilizado para as reações foi o QuantiTect<sup>®</sup> SYBR Green RT-PCR<sup>®</sup> (Quiagen), em reações *one-step*, com primeira etapa consistindo em uma reação de transcrição reversa e a segunda de PCR em tempo real. As sequências dos primers utilizados foram obtidas de trabalhos previamente publicados (Tabela 1). Para o controle endógeno, utilizou-se primers do gene  $\beta$ -actina, também listado na Tabela 1. A concentração de todos os primers utilizados (forward e reverse) foi de 0,5 $\mu$ M e a temperatura de anelamento das reações foi 56°C. A expressão diferencial dos transcritos foi realizada através dos valores de *Ct* (*Cycle threshold*) das amostras entre os grupos infectado positivo e infectado negativo; infectado positivo e controle; e infectado negativo e controle. O método  $\Delta\Delta C_t$  (CARVALHO-LEANDRO *et al.*, 2012; LIVAK; SCHMITTGEN, 2001) foi utilizado para essas análises.

**Tabela 1** - Sequência dos primers utilizados nas reações de PCR quantitativo em tempo real para determinar a expressão diferencial de diversos genes em ovários de fêmeas de *Aedes aegypti*, em diferentes momentos após a alimentação sanguínea infectada com DENV-2.

Gene	Abreviação	Informações	Primer	Sequência 5' - 3'	Referência
<i>β-actina</i>	β-act	Controle endógeno	Forward	AAGGCTAACCGTGAGAAGATGAC	OCAMPO, 2013
<i>β-actina</i>	β-act	Controle endógeno	Reverse	GATTGGGACAGTGTGGGAGAC	OCAMPO, 2013
<i>Relish-1</i>	Rel-1	Toll	Forward	CGGACGCCCCGATAACC	CARVALHO-LEANDRO, 2012
<i>Relish-1</i>	Rel-1	Toll	Reverse	GTTGAATGTTCCACCATGACAGGAT	CARVALHO-LEANDRO, 2012
<i>Hop</i>	Hop	JAK-STAT	Forward	ACAGGCACAGGCCGAAAA	OCAMPO, 2013
<i>Hop</i>	Hop	JAK-STAT	Reverse	CCGTTGGACAGCTCGATAAAG	OCAMPO, 2013
<i>Argonaute 2</i>	Argo	RNA de interferência	Forward	CCGTTCTGGACATGACTTGC	OCAMPO, 2013
<i>Argonaute 2</i>	Argo	RNA de interferência	Reverse	CACAGCTCATGGTTGCTTCC	OCAMPO, 2013
<i>Caspase 16</i>	Casp	Apoptose	Forward	TCCGCTATCTTCATATTGTATCCTTTG	OCAMPO, 2013
<i>Caspase 16</i>	Casp	Apoptose	Reverse	GACCCGCCACTGTATCTCTG	OCAMPO, 2013
<i>AeDronc</i>	Dronc	Apoptose	Forward	CAACTTCCAACTGCCTATAAAATTGC	OCAMPO, 2013
<i>AeDronc</i>	Dronc	Apoptose	Reverse	CTCCACCGTATCGTTATTGTTCTTAG	OCAMPO, 2013
<i>AeIAP1</i>	IAP	Apoptose	Forward	CTGAAACTAATGAAGGGCGAAGC	OCAMPO, 2013
<i>AeIAP1</i>	IAP	Apoptose	Reverse	TTGAGATGACTGAAGCGAGGATG	OCAMPO, 2013

Fonte: O autor

## 6 RESULTADOS

### 6.1 Cinética de infecção ovariana e quantificação viral

Após a extração do RNA total das amostras de ovários coletados em diferentes dias após infecção (3°, 7°, 14°, 21° e 28°) nos dois grupos experimentais, AU e MA, obtivemos os resultados de cinética de infecção ovariana. Os títulos virais das amostras utilizadas para a alimentação artificial em cada uma das três replicatas biológicas estão sumarizados na Tabela 2.

**Tabela 2** - Titulação viral das alíquotas de sangue humano com DENV-2 coletadas no processo de alimentação sanguínea infectada, em diferentes momentos, para diversas análises.

Titulação viral de DENV-2	Réplicas	Análise
1,5 x 10 <sup>6</sup> FFU/mL	1 <sup>a</sup>	Cinética de infecção e análise da expressão de genes de resposta imune e apoptóticos
3,5 x 10 <sup>6</sup> FFU/mL	2 <sup>a</sup>	
2,0 x 10 <sup>6</sup> FFU/mL	3 <sup>a</sup>	
6,5 x 10 <sup>5</sup> FFU/mL	1 <sup>a</sup>	Efeito nos padrões reprodutivos (fecundidade e fertilidade) e coleta de ovos para análise da primeira geração filial
7,0 x 10 <sup>5</sup> FFU/mL	2 <sup>a</sup>	
1,0 x 10 <sup>6</sup> FFU/mL	3 <sup>a</sup>	
4,0 x 10 <sup>6</sup> FFU/mL	1 <sup>a</sup>	Efeito histopatológico e ultraestrutural

Fonte: Do autor.

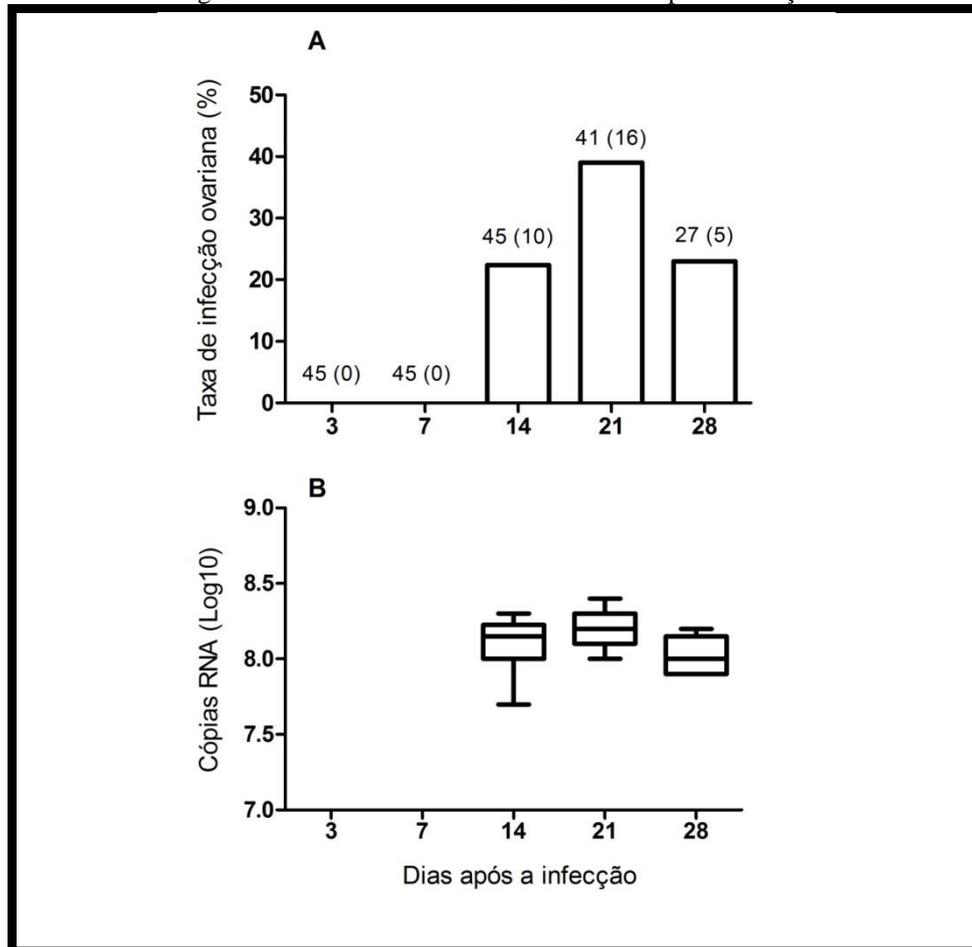
Nos dois grupos, AU e MA, ao 3° e 7° dpi, não foi registrado nenhum ovário positivo dentre todas as amostras analisadas (Gráfico 1A e 2A). A positividade para o tecido ovariano infectado foi registrada somente ao 14°, 21° e 28° dpi (Gráfico 1A e 2A).

A quantificação viral das amostras do grupo AU, após a realização dos ensaios por qPCR, apresentou resultados muito similares entre as amostras positivas. Não foram registradas diferenças significativas entre a quantificação viral dos ovários das fêmeas do grupo AU nos três pontos de coleta que apresentaram indivíduos positivos ( $p=0,0478$   $f=6,081$ ). Esses dados podem ser observados no Gráfico 1B.

Para o grupo MA (Gráfico 2B), os dados de quantificação viral das amostras positivas apresentaram diferença significativa entre os indivíduos positivos ao 14° e 21° dpi, quando comparado aos indivíduos positivos ao 28° dpi ( $p=0,0180$   $f=8,039$ ).

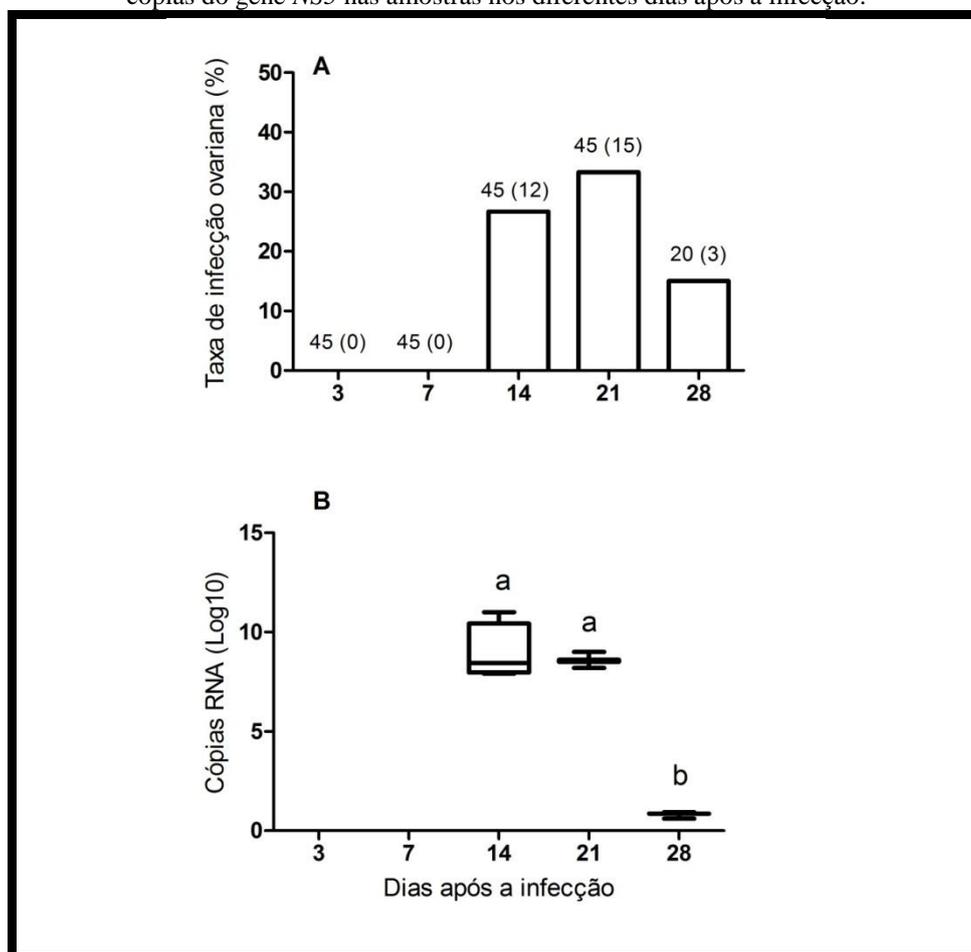
Nenhuma variação estatisticamente significativa foi observada nas análises de quantificação viral entre as amostras de cada dia de coleta para os dois grupos, AU e MA ( $p=0,3006$   $f=6,05$ ).

**Gráfico 1 – A:** Taxa de infecção transovariana (%) do grupo Alimentação Única (AU) em diferentes dias após a infecção. **B:** Quantificação viral por PCR quantitativo em tempo real (qPCR) das amostras positivas do grupo AU a partir do número de cópias do gene *NS5* nas amostras nos diferentes dias após a infecção.



Nota: Sobre as barras observa-se o número de fêmeas analisadas em cada ponto de coleta e entre parênteses o número de fêmeas com ovário positivo para o vírus Dengue. Os títulos foram obtidos a partir de uma comparação com a curva padrão. As barras evidenciam o desvio padrão entre as amostras positivas. Fonte: O autor.

**Gráfico 2 - A:** Taxa de infecção transovariana (%) do grupo Múltiplas Alimentações (MA) em diferentes dias após a infecção. **B:** Quantificação viral por PCR quantitativo em tempo real (qPCR) das amostras positivas do grupo MA a partir do número de cópias do gene *NS5* nas amostras nos diferentes dias após a infecção.



Nota: Sobre as barras observa-se o número de fêmeas analisadas em cada ponto de coleta e entre parênteses o número de fêmeas com ovário positivo para o vírus Dengue. Os títulos foram obtidos a partir de uma comparação com a curva padrão. As barras evidenciam o desvio padrão entre as amostras positivas. a: sem diferença significativa ( $p > 0,05$ ) e b: com diferença estatística ( $p < 0,05$ ). Fonte: O autor.

## 6.2 Detecção viral na primeira geração filial

Um total de 90 pools de machos e 180 pools de fêmeas (90 pools de cabeça e 90 pools de corpo) foi analisado nos diferentes pontos de coleta (Tabela 3). Desse total, registros para a presença do DENV-2 na F<sub>1</sub> ocorreram apenas em mosquitos machos, com dois pools positivos coletados no 14<sup>o</sup> dpe (13,3% de positividade) e três pools positivos coletados ao 21<sup>o</sup> dpe (20% de positividade). Todos os pools positivos foram referentes ao terceiro experimento, com título viral de  $1,0 \times 10^6$  FFU/mL.

### 6.3 Análise do efeito da infecção viral nos padrões reprodutivos das fêmeas

A partir da análise da oviposição das fêmeas individualmente após a alimentação com sangue infectado, foram obtidos resultados de fecundidade e fertilidade, apresentados no Gráfico 3A e 3B, respectivamente. Observou-se que o grupo que realizou o repasto sanguíneo em sangue infectado com DENV-2, produziu ovos igualmente ao grupo controle ( $p= 0,6327$ ;  $df: 3$ ).

Após a imersão desses ovos em solução de gramíneas a 30%, para análise de fertilidade a partir do número de larvas L1, não registrou-se nenhuma diferença significativa entre a quantidade de larvas produzidas entre o grupo infectado e controle ( $p= 0,4248$ ;  $df: 3$ ).

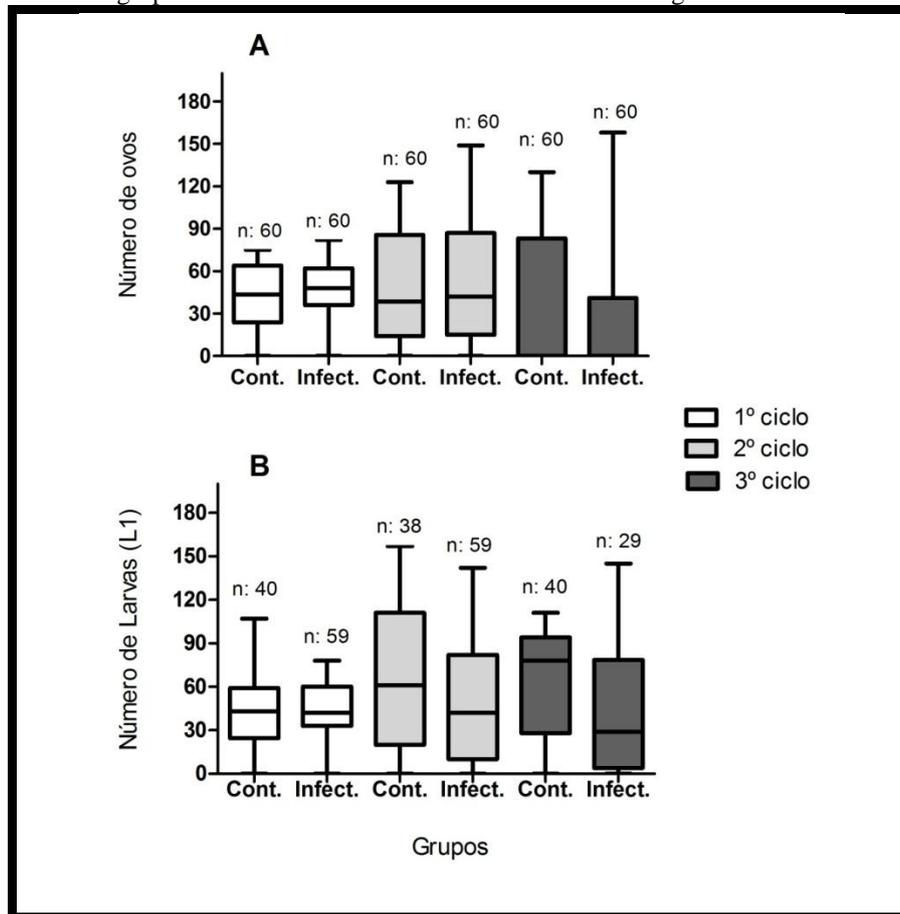
Na avaliação da correlação entre o quantitativo de larvas que eclodiram e sua relação com o número de ovos, observou-se uma correlação estatisticamente significativa nos diferentes ciclos gonadotróficos, com um reduzido número de ovos produzidos ao terceiro ciclo, quando comparado aos primeiros e segundos ciclos ( $r^2: 0.8376$ ;  $p<0,00$ ).

**Tabela 3** - Número de pools de mosquitos machos e fêmeas da primeira geração filial ( $F_1$ ) analisados para a presença viral ao 3°, 7°, 14°, 21°, 28° e 35° dia após a emergência. Nas fêmeas, as observações foram feitas em pools de corpo e cabeça. Nos machos, as análises foram realizadas a partir de pools de corpo inteiro. Em parênteses observa-se o número de pools positivos para DENV-2. Análises referentes a três experimentos independentes, com variação de título viral.

	Fêmeas						Machos		
	Corpo			Cabeça			Corpo inteiro		
	1° experimento $6,5 \times 10^5$ FFU/mL	2° experimento $7,0 \times 10^5$ FFU/mL	3° experimento $1,0 \times 10^6$ FFU/mL	1° experimento $6,5 \times 10^5$ FFU/mL	2° experimento $7,0 \times 10^5$ FFU/mL	3° experimento $1,0 \times 10^6$ FFU/mL	1° experimento $6,5 \times 10^5$ FFU/mL	2° experimento $7,0 \times 10^5$ FFU/mL	3° experimento $1,0 \times 10^6$ FFU/mL
3° dpe	5 (0)	5 (0)	5 (0)	5 (0)	5 (0)	5 (0)	5 (0)	5 (0)	5 (0)
7° dpe	5 (0)	5 (0)	5 (0)	5 (0)	5 (0)	5 (0)	5 (0)	5 (0)	5 (0)
14° dpe	5 (0)	5 (0)	5 (0)	5 (0)	5 (0)	5 (0)	5 (0)	5 (0)	5 (2)
21° dpe	5 (0)	5 (0)	5 (0)	5 (0)	5 (0)	5 (0)	5 (0)	5 (0)	5 (3)
28° dpe	5 (0)	5 (0)	5 (0)	5 (0)	5 (0)	5 (0)	5 (0)	5 (0)	5 (0)
35° dpe	5 (0)	5 (0)	5 (0)	5 (0)	5 (0)	5 (0)	5 (0)	5 (0)	5 (0)

Nota: dpe – dia após a emergência. Fonte: O autor.

**Gráfico 3 - A:** Número de ovos ovipositados por cada fêmea analisada nos grupos controle e infectado em três diferentes ciclos gonadotróficos. **B:** Número de larvas em primeiro estágio (L1) resultantes da eclosão dos ovos das fêmeas do grupo controle e infectado em três diferentes ciclos gonadotróficos.

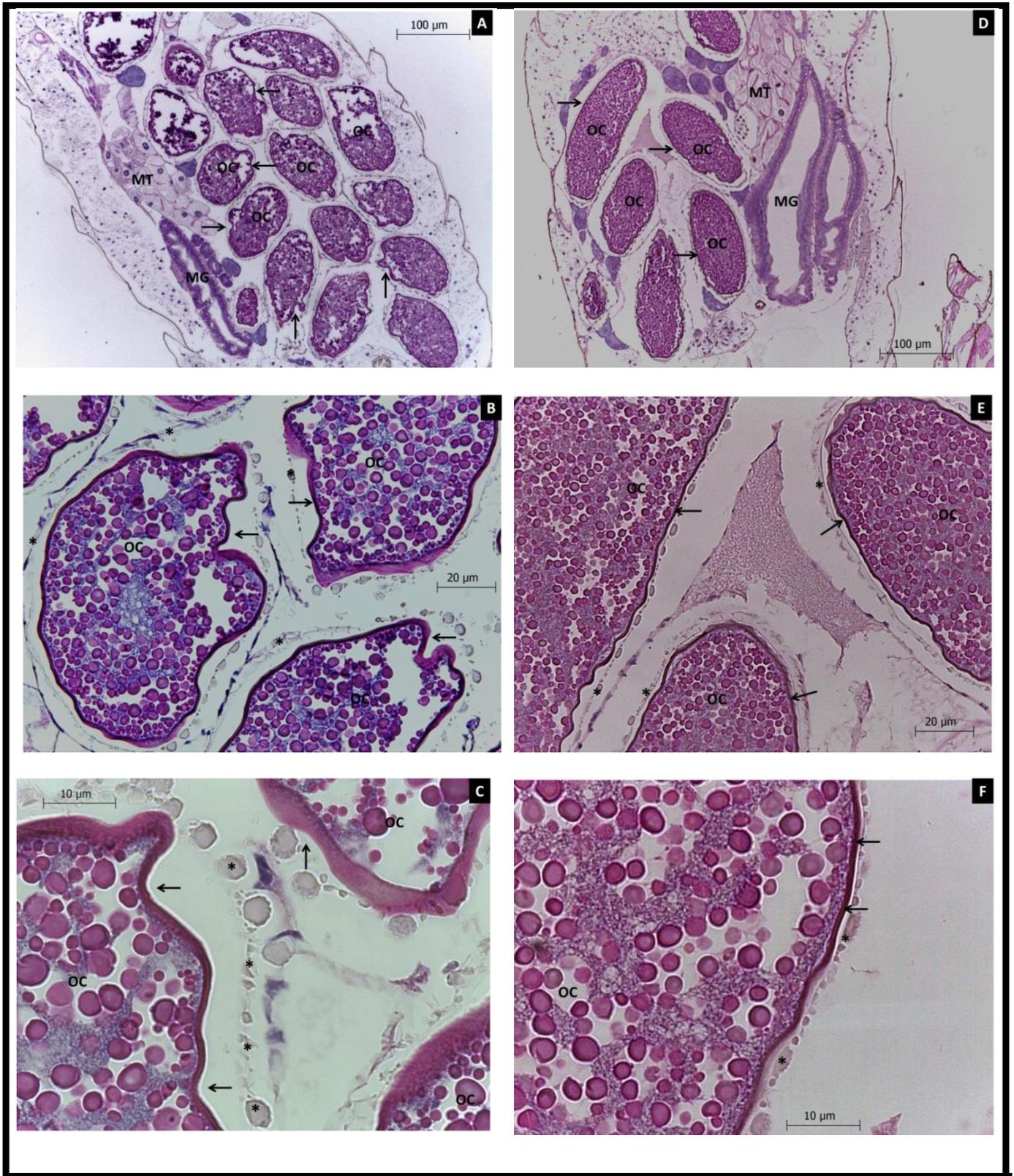


Nota: n: número de fêmeas analisadas. Fonte: O autor.

#### 6.4 Histopatologia e ultraestrutura

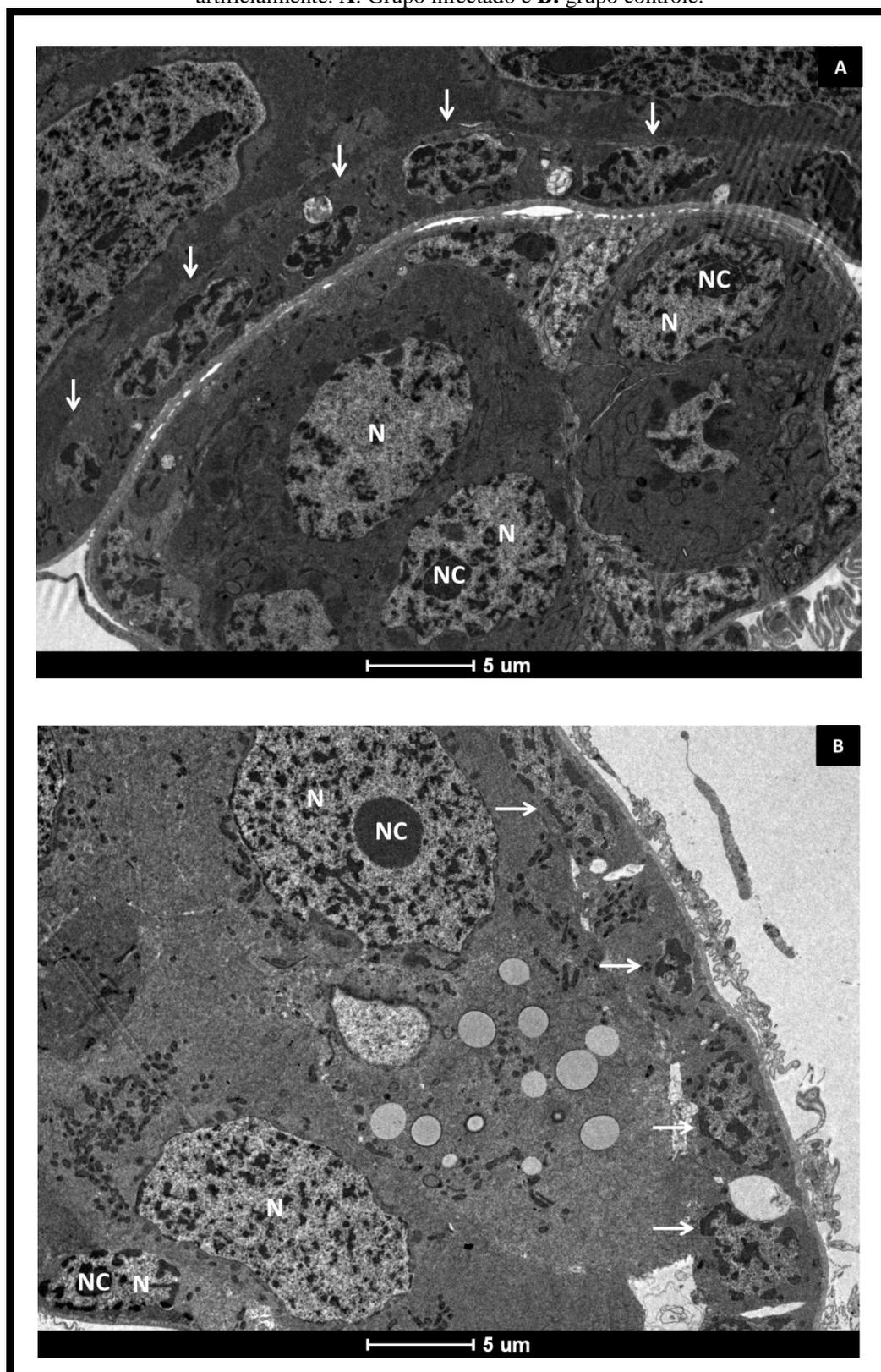
A quantificação viral das amostras de cabeça analisadas por qPCR variou de  $4,3 \times 10^5$  a  $3,0 \times 10^{07}$  cópias de RNA por amostra. Para o grupo infectado, somente os mosquitos que tiveram a confirmação da presença viral na cabeça foram analisados (20 mosquitos) nas análises histopatológicas e ultraestruturais. As imagens obtidas dos cortes histológicos evidenciaram uma alteração no epitélio folicular do oócito, apresentando invaginações no grupo que recebeu alimentação sanguínea infectada (Figuras 11A, B e C). No grupo controle, nenhuma invaginação foi observada (Figuras 11D, E e F). Nas análises ultraestruturais, nenhuma alteração foi observada quando comparamos o grupo infectado (Figura 12A) com o grupo controle (Figura 12B).

**Figura 11** - Histopatologia de amostra de ovários de fêmeas de *Aedes aegypti*. **A, B e C**: grupo infectado com invaginações no epitélio folicular (seta). **D, E e F**: grupo controle com epitélio ovariano sem apresentar invaginações (seta).



Nota: OC: oócito; MG: intestino médio; MT: túbulos de Malphigi; \*: bainha ovariana. Escala: A e D: 100 μm; B e E: 20 μm; C e F: 10 μm. Fonte: O autor.

**Figura 12** - Análises ultraestruturais de ovários de fêmeas de *Aedes aegypti* alimentadas artificialmente. **A:** Grupo infectado e **B:** grupo controle.



Nota: Seta: epitélio ovariolar; N: núcleo; NC: nucléolo. Escala: 5 µm.

Fonte: O autor

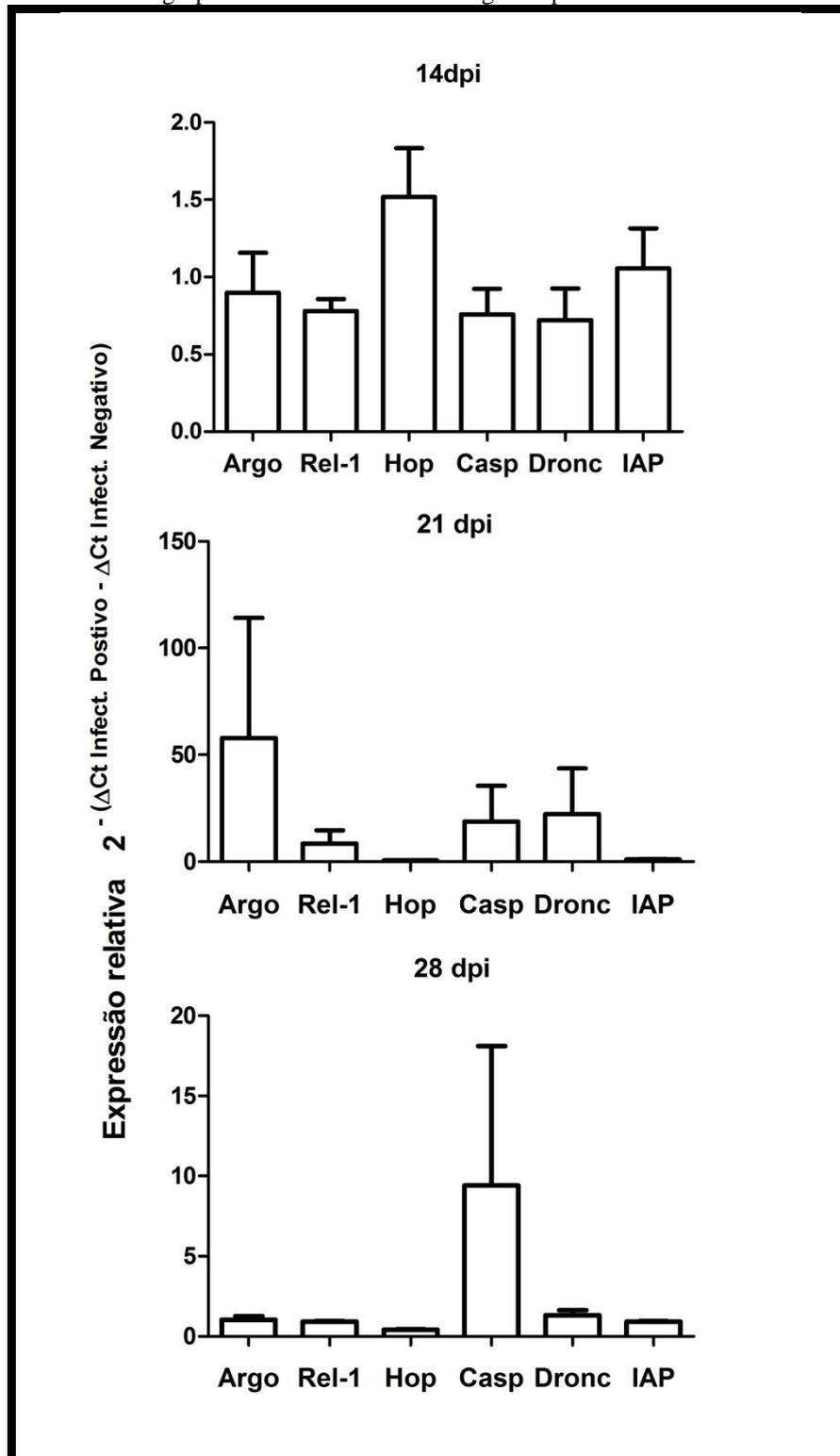
## 6.5 Análise da expressão de genes de resposta imune e apoptóticos

Ao realizarmos a análise da expressão relativa dos genes avaliados nas amostras de ovários de fêmeas do grupo infectado com positividade para o DENV-2, com a expressão gênica do grupo infectado negativo para o DENV-2, observou-se uma maior expressão para os seis genes analisados, em todos os dias após infecção avaliados (Gráfico 4). Ao 14º dpi, *Hop*, representante da via JAK-STAT, foi o de maior expressão relativa (1,51-fold), seguido de *IAP* (1,05-fold) e *Argonaute-2* (0,89-fold), representantes das vias apoptóticas e mecanismo de RNA de interferência, respectivamente.

Ao 21ºdpi, A expressão de *Argonaute-2* (5,8-fold), *Caspase-16* (18,84-fold) e *AeDronc* (22,15-fold) foi bastante expressiva em comparação aos outros genes investigados, *Relish-1* (8,48-fold), *Hop* (0,50-fold) e *IAP* (0,98-fold). Ao 28º dpi, o gene de maior expressão foi *Caspase-16* (9,42-fold) (Gráfico 4).

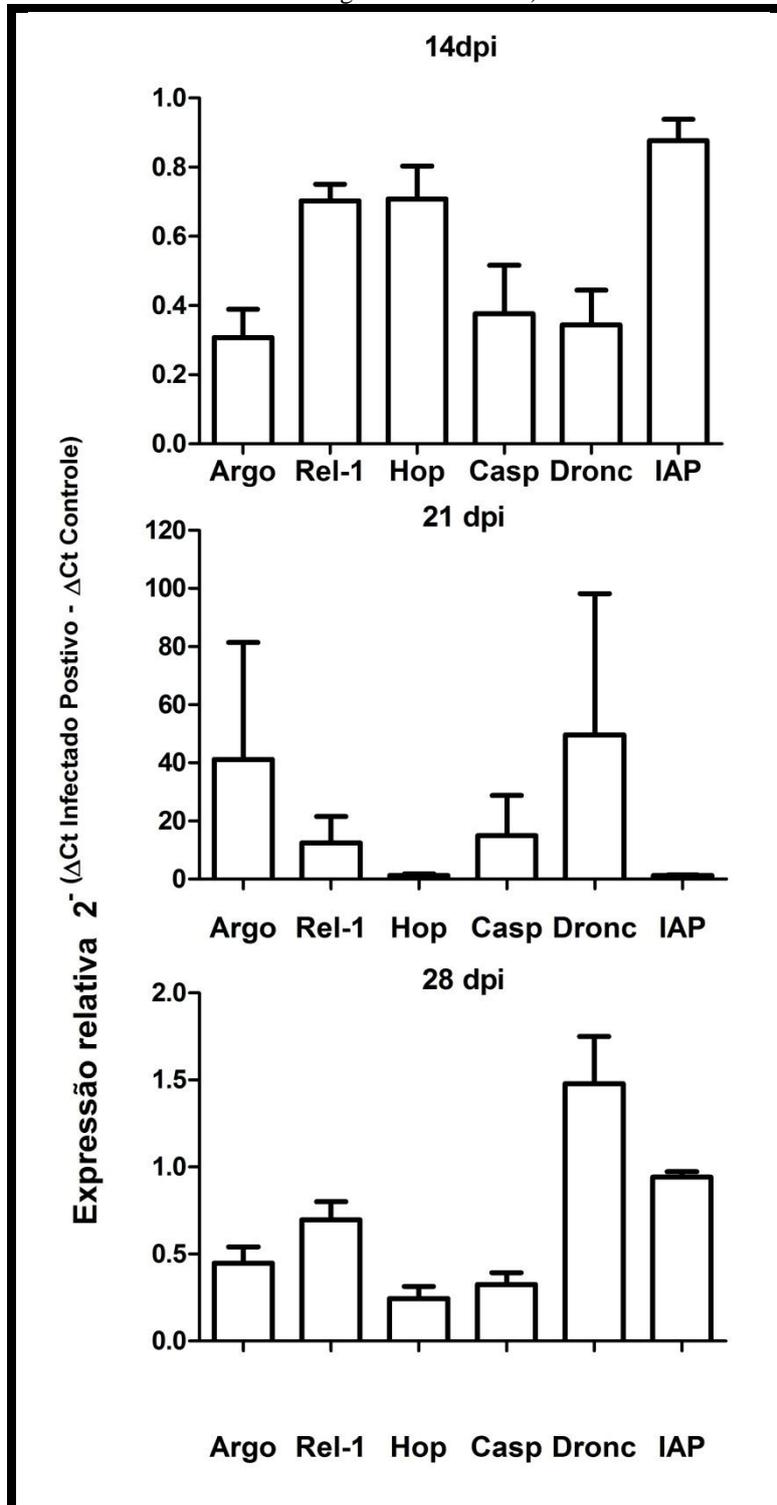
Uma maior expressão dos genes de resposta imune e apoptóticos também foram registradas em todos os pontos analisados ao compararmos a expressão gênica do grupo infectado com ovário positivo para o DENV-2 com o grupo controle (Gráfico 5). O 21º dpi registrou as maiores diferenças na expressão gênica, especialmente para os genes *Argonaute-2* (41,22-fold) e *AeDronc* (49,68-fold) (Gráfico 5).

**Gráfico 4** - Expressão diferencial de *Argonaute-2*, *Relish-1*, *Hop*, *Caspase-16*, *AeDronc* e *AeIAP* em ovários de *Aedes aegypti* do grupo infectado com positividade para DENV-2 em comparação aos ovários de *Aedes aegypti* do grupo infectado com ovários negativo para DENV-2.



Nota: Como controle endógeno, foi utilizado o gene  $\beta$ -actina. As análises foram realizadas pelo método  $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ . Fonte: O autor.

**Gráfico 5** - Expressão diferencial de *Argonaute-2*, *Relish-1*, *Hop*, *Caspase-16*, *AeDronc* e *AeIAP* em ovários de *Aedes aegypti* do grupo infectado com positividade para DENV-2 em comparação aos ovários de *Aedes aegypti* do grupo controle (alimentação realizada com sangue não infectado).



Nota: Como controle endógeno, foi utilizado o gene  $\beta$ -actina. As análises foram realizadas pelo método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Fonte: O autor.

## 7 DISCUSSÃO

Os dados mostrados em nosso estudo evidenciam que os ovários das fêmeas de *A. aegypti*, são infectados pelo vírus Dengue tardiamente, com taxas de infecção reduzidas. Quando comparamos as taxas de infecção ovariana obtida nesse estudo às taxas de infecção de outros órgãos, tais como intestino, corpo gorduroso e glândulas salivares, percebemos que esse órgão não é um dos alvos principais na infecção. Em estudo desenvolvido por Carvalho-Leandro *et al.* (2012), com a mesma população e isolado viral utilizado nesse estudo, foram observadas altas taxas de infecção do intestino, corpo gorduroso e glândulas salivares, diferindo nitidamente das taxas de infecção registradas para ovário nesse estudo.

Todas as amostras de ovários positivas para o vírus dengue apresentaram quantificação viral muito similar. Essa mesma similaridade foi observada em outros órgãos infectados dessa população, como publicado anteriormente (CARVALHO-LEANDRO *et al.*, 2012). Apenas os ovários do 28º dpi do grupo de múltiplas alimentações apresentaram uma variação significativa na quantificação viral, quando comparados às amostras de outros momentos de análise. Esse grupo, ao 28º dpi, apresentou um número de partículas virais muito reduzido quando comparado às outras amostras observadas. Acreditamos que, fêmeas que realizaram diversos repastos sanguíneos, como o observado aqui, em diferentes ciclos gonadotróficos, podem ovipositar ovos infectados entre o 21º e o 28º dpi, após terem realizado a postura correspondente a três ciclos gonadotróficos. Com isso, essas fêmeas podem ter liberado uma grande quantidade de ovos infectados nos diferentes ciclos, reduzindo assim o número de oócitos positivos para o vírus no ovário, uma vez que o aporte sanguíneo foi diversas vezes disponibilizado. Além disso, ao 28º dpi do grupo de alimentações múltiplas, registrou um percentual de positividade de apenas 15% dos ovários das fêmeas analisadas. Isso corrobora a ideia de que as fêmeas teriam ovipositado ovos infectados entre o 21º e 28º dpi, colaborando para a redução do percentual de positividade das fêmeas nesse ponto de análise. Outra justificativa relacionada à redução da quantidade viral nos ovários ao 28º dpi pode estar relacionada à expressão de genes de resposta imune e genes envolvidos na via apoptótica.

Diversos fatores envolvidos na resposta imune do mosquito contra o vírus podem estar modulando essa infecção viral no ovário, impossibilitando o sucesso de infecção. Um dos fatores, certamente, relaciona-se à atuação das vias Toll, JAK-STAT,

mecanismo de RNA de interferência e a via apoptótica, como apresentado nesse estudo. Alguns estudos já demonstraram que as vias de sinalização Toll (RAMIREZ; DIMOPOULOS, 2010; XI *et al.*, 2008) e JAK-STAT (SOUZA-NETO *et al.*, 2009) e o mecanismo de RNA de interferência (CARVALHO-LEANDRO *et al.*, 2012; SANCHEZ-VARGAS *et al.*, 2009) desempenham uma importante resposta antiviral em outros órgãos de mosquitos. Nos ovários analisados em nosso estudo, em análises de expressão diferencial para diversos genes, observou-se uma maior expressão dos genes Argonaute-2, Caspase-16 e AeDronc no 21º dpi, o que pode ter conseguido, em partes, reduzir a infecção viral. Observamos também que ao 28º dpi, o gene mais expresso no grupo infectado foi a Caspase-16, evidenciando a forte influência do processo apoptótico como resposta antiviral em mosquitos, conforme observado por estudos anteriores (FRAGKLOUDIS *et al.*, 2009; GEORGEL *et al.*, 2001; OCAMPO *et al.*, 2013; PAQUETTE *et al.*, 2010). No estudo desenvolvido por Ocampo e colaboradores (2013), observou-se o importante envolvimento da via apoptótica e sua relação com a diferente susceptibilidade das populações de mosquitos ao DENV (OCAMPO *et al.*, 2013).

Adicionalmente, avaliamos como importante uma análise adicional a nível proteômico, para entender as respostas ao vírus dengue a nível ovariano. Em estudo desenvolvido por Angel *et al.* (2008), os autores analisaram a associação de uma proteína ovariana de 200 kD com a transmissão transovariana em população de mosquitos de Rajasthan, na Índia. Esses autores sugerem o envolvimento dessa proteína com a modulação da infecção no ovário, porém não fazem a sua caracterização.

Estudos sobre a interação de *A. aegypti* de campo com o DENV têm mostrado que diferentes populações de mosquitos respondem de maneira distinta aos sorotipos/genótipos do vírus (ANDERSON; RICO-HESSE, 2006; BENNETT *et al.*, 2005; BENNETT *et al.*, 2002; CARVALHO-LEANDRO *et al.*, 2012; GUBLER *et al.*, 1979; LAMBRECHTS *et al.*, 2009; LOURENCO-DE-OLIVEIRA *et al.*, 2004; MOURA *et al.*, 2015; SALAZAR *et al.*, 2007). Alguns autores atribuem ao intestino a responsabilidade principal pela contenção da disseminação viral e consequente infecção das glândulas salivares, devido às barreiras de infecção do intestino e barreira de escape do intestino (BARILLAS-MURY *et al.*, 2004; BEATY; MARQUARDT, 1996b; BEERNTSEN *et al.*, 2000b; OCAMPO *et al.*, 2013; SALAZAR *et al.*, 2007). Sabe-se que no ciclo de infecção viral no mosquito, após vencido essas barreiras, o vírus migra para diversos órgãos do corpo do inseto, especialmente a glândula salivar (BARILLAS-

MURY *et al.*, 2004; MARQUARDT, 2004). Percebemos que mesmo a população de Petrolina tendo uma taxa de positividade para o vírus dengue de 100% nas glândulas salivares registrada em estudo anterior (CARVALHO-LEANDRO *et al.*, 2012), o vírus ao conseguir escapar do intestino não consegue infectar de forma eficiente o ovário, diferentemente da sua capacidade de infecção nas glândulas salivares, como observado anteriormente por Carvalho-Leandro *et al.* (2012), com estudo da mesma população de mosquito e sorotipo viral utilizado nesse trabalho. Recentemente, Moura e colaboradores (2015), observaram a variação na competência vetorial de mosquitos *A. aegypti* oriundos de Cabo Verde, na África, em infecções com DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4, e evidenciaram diferenças importantes na resposta do vetor aos diferentes sorotipos. Enquanto que o DENV-4 registrou infecção apenas no intestino, o DENV-2 e DENV-3 apresentaram altas taxas de infecção de glândulas salivares, enquanto para o DENV-1, observou-se infecção apenas para intestino e cabeça. Esses dados reforçam, mais uma vez, a importância do intestino como barreira contra a infecção.

Os títulos virais utilizados nos experimentos de infecção artificial conduzidos nesse trabalho, variaram de  $6,5 \times 10^5$  FFU/mL a  $4,0 \times 10^6$  FFU/mL. Esses títulos estão de acordo com os títulos virais necessários para infectar mosquitos e torná-los competente vetorialmente (NGUYET *et al.*, 2013). Além disso, utilizamos um isolado viral do mesmo Estado da população de mosquito submetida à infecção, o que demonstra a possibilidade de uma íntima relação entre o genótipo viral x genótipo do mosquito (G x G). Essa relação G x G tem sido apresentada como fundamental para o sucesso na infecção do mosquito pelo DENV (FANSIRI *et al.*, 2013; LAMBRECHTS, 2010; LAMBRECHTS *et al.*, 2009; LAMBRECHTS; SCOTT, 2009). Portanto, avaliamos que as nossas análises de infecção ovariana, apresentam dados que podem estar refletindo de forma muito aproximada a realidade vivenciada em campo, visto que além de utilizarmos um isolado viral coletado no mesmo Estado da população de mosquito utilizada, havíamos caracterizado previamente essa população como competente para o DENV-2 3808 (CARVALHO-LEANDRO *et al.*, 2012).

Estudos que buscam estimar as taxas de transmissão viral transovariana a diferentes arbovírus na natureza têm sido publicados, porém, todos com foco na coleta de ovos de mosquitos por armadilhas de oviposição, coleta de formas imaturas em depósitos que acumulam água no campo, ou mesmo por aspiração de mosquitos adultos (ANGEL; JOSHI, 2008; ARUNACHALAM *et al.*, 2008; CHEN *et al.*, 2010; FLORES

*et al.*, 2010; GUEDES *et al.*, 2010; GUNTHER *et al.*, 2007; JOSHI *et al.*, 2002; JOSHI *et al.*, 1996; KHIN; THAN, 1983; KOW *et al.*, 2001; LIOTTA *et al.*, 2005; URDANETA *et al.*, 2005; WASINPIYAMONGKOL *et al.*, 2003; WOODRING *et al.*, 1998). As taxas de infecção transovariana para o DENV nesses estudos, de forma geral, vêm sendo registradas com variação entre 0 a 3% de positividade para o DENV nas amostras analisadas. Apenas trabalhos voltados para coleta de mosquitos em casas de pacientes previamente detectados com dengue, registraram taxas de infecção transovariana mais expressivas quando comparados a outros estudos, com valores que variavam de 10 a 13% (GUEDES *et al.*, 2010; URDANETA *et al.*, 2005). Em nosso estudo, na análise da presença viral na F<sub>1</sub> oriunda de fêmeas que receberam alimentação infectada, observamos apenas machos infectados ao 14° e 21° dia após a emergência, com 13,3% e 20% de positividade, respectivamente. Isso demonstra que a transmissão transovariana é um evento realmente de rara ocorrência. Como apenas machos foram positivos para a presença viral, sinalizamos que estudos futuros e mais detalhados sobre transmissão viral venérea na F<sub>1</sub> devem ser conduzidos, para a melhor compreensão desse tipo de infecção. Uma vez que machos da F<sub>1</sub> estão infectados, o vírus pode, dessa forma, passar para a F<sub>2</sub> a partir da infecção de fêmeas pela cópula. Chamamos a atenção também para o fato da transmissão viral transovariana ter ocorrido apenas no experimento que registrou o maior título viral das três réplicas analisadas (1,0 x10<sup>6</sup> FFU/mL). Isso sugere que a transmissão transovariana acontece somente quando altos títulos virais são disponibilizados no momento da alimentação.

Em relação às análises sobre a possível interferência do vírus na fecundidade e fertilidade das fêmeas que receberam alimentação infectada, nossos dados demonstram que não existe qualquer relação entre a presença viral e alterações nos padrões reprodutivos da fêmea. Foi observado que a produção de ovos e eclosão larvária nos grupos infectado e controle foram bastante similares, não apresentando qualquer alteração significativa. Esses resultados são contrários aos dados publicados por Josi e colaboradores (2002), que avaliaram a transmissão transovariana em mosquitos *A. aegypti* da população da cidade de Jodhpur (Estado de Rajasthan/Índia), mantida em laboratório por 10 anos. O estudo registrou a presença do DENV-3 em sete gerações filiais (F<sub>1</sub>-F<sub>7</sub>) com taxas que variaram de 2,4 a 13%. Nos mosquitos da F<sub>7</sub>, os autores avaliaram os padrões de fecundidade e fertilidade da população e evidenciaram que a presença do vírus influenciou na produção e viabilidade dos ovos. Ressalvamos que o isolado viral utilizado por Josi e colaboradores (2002) nos experimentos de infecção

intratorácica dos mosquitos foi o DENV-3, isolado no ano de 1963 na Tailândia, e submetido a 21 passagens por cultura de células de camundongo.

Por outro lado, em nosso trabalho, essa influência da presença do vírus nos padrões reprodutivos da fêmea não foi observada e atribuímos essa diferença de resultados a fatores como: 1) o fato de utilizarmos uma população coletada em campo e mantida em laboratório somente por três gerações, garantindo dessa forma características de uma população de campo; 2) o isolado viral utilizado ser do mesmo Estado que a população de mosquitos avaliada; 3) o vírus ser de outro sorotipo (DENV-2) e não ter sido submetido a diversas infecções em cultura de células, o que faz com que o vírus altere alguns mecanismos de invasão celular e replicação viral; 4) a metodologia de infecção dos mosquitos ser baseada em infecção oral, permitindo que as barreiras de infecção do mosquito possam atuar, modulando a infecção do vírus no vetor.

O fato de verificarmos que não há influência da presença do vírus nos padrões reprodutivos da fêmea tem considerável importância epidemiológica, uma vez que os mosquitos são a principal forma de permanência do vírus em campo. Fêmeas infectadas não apresentam nenhuma desvantagem em relação às fêmeas sadias. Esses dados condizem com as teorias que abordam a evolução parasita-vetor (LAMBRECHTS, 2010; LAMBRECHTS *et al.*, 2009), visto que não é interessante para um parasita, causar danos importantes ao seu vetor, principalmente àqueles que poderiam levar a uma alteração reprodutiva e consequente redução populacional (MARQUARDT, 2004).

Estudos sugerem que a microflora do mosquito adulto é crítica para influenciar na transmissão de agentes patogênicos humanos (BIAN *et al.*, 2010; CIRIMOTICH *et al.*, 2011; DEMAIO *et al.*, 1996; KAMBRIS *et al.*, 2010; MOREIRA *et al.*, 2009; MOUSSON *et al.*, 2010; RAMIREZ *et al.*, 2012). Ramirez e colaboradores (2012), observaram uma diminuição acentuada na suscetibilidade à infecção pelo DENV quando os mosquitos possuíam espécies bacterianas no intestino. Gaio *et al.* (2011), em estudo com microbiota intestinal de *A. aegypti* demonstraram uma redução na produção e viabilidade dos ovos em mosquitos que tiveram uma redução na microbiota intestinal a partir do tratamento com antibióticos. Outros dois estudos com a bactéria endossimbionte *Wolbachia* (BIAN *et al.*, 2010; MOREIRA *et al.*, 2009) demonstram que a presença desse microrganismo inibe a replicação viral, visto que a imunidade basal do mosquito é estimulada pela bactéria, a partir da ativação de mecanismos antimicrobianos com produção de moléculas efetoras. Diante disso, esperávamos que

com a presença do vírus no sangue utilizado na alimentação dos mosquitos, o sistema imune do vetor, a partir do reconhecimento viral e consequente ativação dos mecanismos antivirais, produziria moléculas efetoras que além de atuarem sobre o vírus poderiam atuar reduzindo a quantidade de bactérias e por fim, interferir na produção de ovos. Porém, essa relação da presença viral e redução dos ovos não foi observada, demonstrando que o vírus não interfere nos padrões reprodutivos das fêmeas.

As imagens obtidas em nossas análises histopatológicas, as quais evidenciam invaginações no epitélio folicular dos oócitos dos indivíduos do grupo infectado, apontam para uma alteração que poderia, em parte, estar envolvida com uma redução da produção de ovos. Os resultados mostraram que a morfologia do oócito do grupo infectado é nitidamente diferente quando comparada com a morfologia do grupo controle. Porém, o efeito dessa alteração na produção e viabilidade dos ovos não foi observado. Isso foi justificado com as análises ultraestruturais, as quais demonstraram que não existe diferenças nos padrões celulares do tecido analisado, resultando, possivelmente, em padrões fisiológicos inalterados com a presença viral. Isso demonstra, mais uma vez, a existência de uma íntima adaptação parasita-vetor.

De forma geral, acreditamos que os dados por nós apresentados, chamam a atenção para os importantes aspectos da transmissão transovariana. Mesmo que em baixos índices, e de ocorrência registrada nesse estudo apenas em mosquitos machos, a transmissão transovariana ocorre e não deve ser desconsiderada. Sugerimos que, nas metodologias de investigação das taxas de transmissão transovariana em campo, uma maior atenção quanto à sexagem dos insetos coletados deve ser realizada. Entendemos como fundamental a análise de detecção viral em pools de machos e em pools de fêmeas, separadamente. Adicionalmente, acreditamos que um aumento no número de pools analisados de machos nos estudos deve ser considerado. Em estudo desenvolvido por Guedes e colaboradores (2010), o qual investigou as taxas de mosquitos (adultos e ovos) com DENV coletados em casas de pacientes confirmados com dengue na cidade do Recife, a sexagem foi devidamente realizada, porém, as análises e apresentação dos dados referentes à transmissão transovariana foi feita sem apresentar a positividade para DENV nos diferentes sexos.

Os ovos presentes nos criadouros podem auxiliar na manutenção da presença viral nas populações de mosquitos, uma vez que as taxas de infecção ovariana foram registradas ao 14º dia após a infecção e mantidas, mesmo que em baixos índices, até o 28º dia após a infecção. Reforçamos, mais uma vez, a necessidade de uma melhor

investigação dos mecanismos envolvidos na modulação da infecção viral a nível ovariano. Uma melhor análise desse órgão, em estudos futuros voltados especialmente para a compreensão das vias antivirais, poderá auxiliar nas pesquisas que envolvem a produção de insetos transgênicos e conseqüentemente, novas possibilidades de estratégias de controle vetorial.

## 8 CONCLUSÕES

- a) Ovários de *Aedes aegypti* são infectados com o DENV-2 a partir do 14º dpi, com baixas taxas de infecção;
- b) A infecção por DENV-2 se estabelece nos ovários das fêmeas de *Aedes aegypti* com títulos virais similares a outros órgãos, quando infectados;
- c) A infecção por DENV-2 não afetou os padrões reprodutivos (fertilidade e fecundidade) das fêmeas de *Aedes aegypti*;
- d) As taxas de transmissão transovariana do DENV-2 para a F<sub>1</sub> de fêmeas infectadas artificialmente foram baixas e nesse estudo, confirmada apenas em machos;
- e) Nossos resultados confirmam o importante papel dos ovários na resposta imune de *Ae. aegypti*, visto que todos os genes avaliados tiveram expressão alterada nesse órgão.
- f) A infecção por DENV-2 na F<sub>1</sub> somente ocorreu a partir de título viral de 10<sup>6</sup> x FFU/ml.

## 9 RECOMENDAÇÕES

- a) Nas metodologias de coleta de mosquitos adultos e ovos em campo, para análise de taxas de transmissão transovariana, recomendamos que a detecção viral deve ser feita sempre em pools de machos e fêmeas, separadamente;
- b) Em novos estudos de transmissão transovariana a partir de alimentação artificial, recomendamos títulos virais com titulação superior a 1,0 x 10<sup>6</sup> FFU/ml.

## 10 REFERÊNCIAS

- ADAMS, M. D. *et al.* The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. Science, v. 287, n. 5461, p. 2185-2195, 2000.
- AGAISSE, H.PERRIMON, N. The roles of JAK/STAT signaling in *Drosophila* immune responses. Immunol Rev, v. 198, p. 72-82, 2004.
- ANDERSON, J. R.RICO-HESSE, R. *Aedes aegypti* vectorial capacity is determined by the infecting genotype of dengue virus. Am J Trop Med Hyg, v. 75, n. 5, p. 886-892, 2006.
- ANGEL, B.JOSHI, V. Distribution and seasonality of vertically transmitted dengue viruses in *Aedes* mosquitoes in arid and semi-arid areas of Rajasthan, India. J Vector Borne Dis, v. 45, n. 1, p. 56-59, 2008.
- ANGEL, B.; SHARMA, K.; JOSHI, V. Association of ovarian proteins with transovarial transmission of dengue viruses by *Aedes* mosquitoes in Rajasthan, India. Indian J Med Res, v. 128, n. 3, p. 320-323, 2008.
- ANTONOVA, Y. *et al.* The role of NF-kappaB factor REL2 in the *Aedes aegypti* immune response. Insect Biochem Mol Biol, v. 39, n. 4, p. 303-314, 2009.
- ARAUJO, A. P. *et al.* The susceptibility of *Aedes aegypti* populations displaying temephos resistance to *Bacillus thuringiensis israelensis*: a basis for management. Parasit Vectors, v. 6, n. 1, p. 297, 2013.
- ARBOUZOVA, N. I.ZEIDLER, M. P. JAK/STAT signalling in *Drosophila*: insights into conserved regulatory and cellular functions. Development, v. 133, n. 14, p. 2605-2616, 2006.
- ARUNACHALAM, N. *et al.* Natural vertical transmission of dengue viruses by *Aedes aegypti* in Chennai, Tamil Nadu, India. Indian J Med Res, v. 127, n. 4, p. 395-397, 2008.
- AYRES, C. E. *et al.* Genetic structure of natural populations of *Aedes aegypti* at the micro- and macrogeographic levels in Brazil. J Am Mosq Control Assoc, v. 20, n. 4, p. 350-356, 2004.
- AYRES, C. F. *et al.* Genetic differentiation of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), the major dengue vector in Brazil. J Med Entomol, v. 40, n. 4, p. 430-435, 2003.
- BARILLAS-MURY, C.; PASKEWITZ, S.; KANOST, M. R. Immune Responses of Vectors. In: MARQUARDT, W. C. (Ed.). Biology of disease vectors. Burlington: Elsevier Academic Press, 2004. Cap.27. p. 363-376.
- BEATY, B. J.MARQUARDT, W. C. The Biology of Disease Vectors. Niwot: University Press of Colorado, 1996a.

BEATY, B. J. MARQUARDT, W. C. The Biology of disease vectors. Niwot: University Press of Colorado, 1996b.

BEERNTSEN, B. T.; BARTHOLOMAY, L. C.; LOWERY, R. J. Penetration of the mosquito midgut is not required for *Brugia pahangi* microfilariae to avoid the melanotic encapsulation response of *Armigeres subalbatus*. Vet Parasitol, v. 144, n. 3-4, p. 371-374, 2007.

BEERNTSEN, B. T.; JAMES, A. A.; CHRISTENSEN, B. M. Genetics of mosquito vector competence. Microbiology and Molecular Biology Reviews, v. 64, n. 1, p. 115-137, 2000a.

BEERNTSEN, B. T.; JAMES, A. A.; CHRISTENSEN, B. M. Genetics of mosquito vector competence. Microbiol Mol Biol Rev, v. 64, n. 1, p. 115-137, 2000b.

BENNETT, K. E.; BEATY, B. J.; BLACK, W. C. T. Selection of D2S3, an *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) strain with high oral susceptibility to Dengue 2 virus and D2MEB, a strain with a midgut barrier to Dengue 2 escape. J Med Entomol, v. 42, n. 2, p. 110-119, 2005.

BENNETT, K. E. *et al.* Variation in vector competence for dengue 2 virus among 24 collections of *Aedes aegypti* from Mexico and the United States. Am J Trop Med Hyg, v. 67, n. 1, p. 85-92, 2002.

BEST, S. M. Viral subversion of apoptotic enzymes: escape from death row. Annu Rev Microbiol, v. 62, p. 171-192, 2008.

BIAN, G. *et al.* The endosymbiotic bacterium *Wolbachia* induces resistance to dengue virus in *Aedes aegypti*. PLoS Pathog, v. 6, n. 4, p. e1000833, 2010.

BICOUT, D. J.; CHALVET-MONFRAY, K.; SABATIER, P. Infection persistence time of *Aedes* breeding habitats. Physia A, v. 305, p. 597-603, 2002.

BLACK IV, W. C. SEVERSON, D. Genetics of Vector Competence. In: MARQUARDT, W. C. (Ed.). Biology of disease vectors. Burlington: Elsevier Academic Press, 2005. Cap.30.

BLACK, W. C. T. *et al.* Flavivirus susceptibility in *Aedes aegypti*. Arch Med Res, v. 33, n. 4, p. 379-388, 2002.

BLANDIN, S. A. LEVASHINA, E. A. Phagocytosis in mosquito immune responses. Immunol Rev, v. 219, p. 8-16, 2007.

BOWERS, D. F.; COLEMAN, C. G.; BROWN, D. T. Sindbis virus-associated pathology in *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). J Med Entomol, v. 40, n. 5, p. 698-705, 2003.

BRADY, O. J. *et al.* Refining the global spatial limits of dengue virus transmission by evidence-based consensus. PLoS Negl Trop Dis, v. 6, n. 8, p. e1760, 2012.

- BRAGAVALLE. *Aedes aegypti*: histórico e controle no Brasil. Epidemiologia e Serviços de Saúde., v. 16, p. 113-118, 2007a.
- BRAGAVALLE. *Aedes aegypti*: vigilância, monitoramento da resistência e alternativas de controle no Brasil. Epidemiol. Serv. Saúde, v. 16, n. 4, p. 295-302, 2007b.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Programa Nacional do Contole de Dengue**. Brasília - 2002.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Nota Técnica: Uso do larvicida Diflubenzuron (PM25%) para controle de *Aedes aegypti***. Brasília - 2009.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Nota Técnica: Isolamento do sorotipo DENV 4 em Roraima / Brasil**. Roraima - 2010.
- BRUMMELKAMP, T. R.; BERNARDS, R.; AGAMI, R. Stable suppression of tumorigenicity by virus-mediated RNA interference. Cancer Cell, v. 2, n. 3, p. 243-247, 2002.
- BULET, P. *et al.* Antimicrobial peptides in insects; structure and function. Dev Comp Immunol, v. 23, n. 4-5, p. 329-344, 1999.
- CALEGARI, F. *et al.* Tissue-specific RNA interference in postimplantation mouse embryos with endoribonuclease-prepared short interfering RNA. Proc Natl Acad Sci U S A, v. 99, n. 22, p. 14236-14240, 2002.
- CAMPBELL, C. L. *et al.* *Aedes aegypti* uses RNA interference in defense against Sindbis virus infection. BMC Microbiol, v. 8, p. 47, 2008.
- CARDOSO JR, R. P. S., S. A. S.; MELLO, N. V.; ERNANDES, S.; BOTTI, M. V.; NASCIMENTO, E. M. M. . Detecção de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* na zona urbana do município de Catanduva-SP, após controle de epidemia de dengue. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 30, p. 37-40, 1997.
- CARVALHO-LEANDRO, D. *et al.* Immune transcript variations among *Aedes aegypti* populations with distinct susceptibility to dengue virus serotype 2. Acta Trop, v. 124, n. 2, p. 113-119, 2012.
- CASTILLO, J. C.; ROBERTSON, A. E.; STRAND, M. R. Characterization of hemocytes from the mosquitoes *Anopheles gambiae* and *Aedes aegypti*. Insect Biochem Mol Biol, v. 36, n. 12, p. 891-903, 2006.
- CASTRO, M. G. *et al.* Dengue virus detection by using reverse transcription-polymerase chain reaction in saliva and progeny of experimentally infected *Aedes albopictus* from Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 99, n. 8, p. 809-814, 2004.
- CHAPMAN, R. F. The insects: struture and function. 4. ed. Cambridge: Cambridge University, 1999.

- CHEN, C. F. *et al.* Screening of dengue virus in field-caught *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) by one-step SYBR green-based reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay during 2004-2007 in Southern Taiwan. Vector Borne Zoonotic Dis, v. 10, n. 10, p. 1017-1025, 2010.
- CHEVILLON, C. *et al.* The Chikungunya threat: an ecological and evolutionary perspective. Trends Microbiol, v. 16, n. 2, p. 80-88, 2008.
- CIRIMOTICH, C. M. *et al.* Natural microbe-mediated refractoriness to Plasmodium infection in *Anopheles gambiae*. Science, v. 332, n. 6031, p. 855-858, 2011.
- CIRIMOTICH, C. M. *et al.* Mosquito immune defenses against *Plasmodium* infection. Dev Comp Immunol, v. 34, n. 4, p. 387-395, 2010.
- CLARKE, T. E. CLEM, R. J. Insect defenses against virus infection: the role of apoptosis. Int Rev Immunol, v. 22, n. 5-6, p. 401-424, 2003.
- CLEMENTS, A. N. The biology of mosquitoes. London: Chapman e Hall, 1992.
- CLEMENTS, A. N. The Biology of mosquitoes. London: Chapman and Hall, 1999.
- COLOGNA, R.; ARMSTRONG, P. M.; RICO-HESSE, R. Selection for virulent dengue viruses occurs in humans and mosquitoes. J Virol, v. 79, n. 2, p. 853-859, 2005.
- CONSOLI, R. A. G. B. OLIVEIRA, R. L. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 1994.
- COOK, S. HOLMES, E. C. A multigene analysis of the phylogenetic relationships among the flaviviruses (Family: Flaviviridae) and the evolution of vector transmission. Arch Virol, v. 151, n. 2, p. 309-325, 2006.
- DAS, S. *et al.* Protocol for dengue infections in mosquitoes (*A. aegypti*) and infection phenotype determination. J Vis Exp, n. 5, p. 220, 2007.
- DEMAIO, J. *et al.* The midgut bacterial flora of wild *Aedes triseriatus*, *Culex pipiens*, and *Psorophora columbiae* mosquitoes. Am J Trop Med Hyg, v. 54, n. 2, p. 219-223, 1996.
- DIMOPOULOS, G. Insect immunity and its implication in mosquito-malaria interactions. Cell Microbiol, v. 5, n. 1, p. 3-14, 2003.
- DOSTERT, C. *et al.* The Jak-STAT signaling pathway is required but not sufficient for the antiviral response of *Drosophila*. Nat Immunol, v. 6, n. 9, p. 946-953, 2005.
- FANSIRI, T. *et al.* Genetic mapping of specific interactions between *Aedes aegypti* mosquitoes and dengue viruses. PLoS Genet, v. 9, n. 8, p. e1003621, 2013.
- FIRE, A. *et al.* Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. Nature, v. 391, n. 6669, p. 806-811, 1998.

- FLORES, F. S. *et al.* Vertical Transmission of St. Louis Encephalitis Virus in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) in Cordoba, Argentina. Vector Borne Zoonotic Dis, 2010.
- FORATTINI, O. P. Entomologia Médica. São Paulo: Edusp, 1962.
- FORATTINI, O. P. Culicidologia Médica. São Paulo: Edusp, 2002.
- FRAGKLOUDIS, R. *et al.* Advances in dissecting mosquito innate immune responses to arbovirus infection. J Gen Virol, v. 90, n. Pt 9, p. 2061-2072, 2009.
- GAIIO ADE, O. *et al.* Contribution of midgut bacteria to blood digestion and egg production in *Aedes aegypti* (diptera: culicidae) (L.). Parasit Vectors, v. 4, p. 105, 2011.
- GALIANA-ARNOUX, D. *et al.* Essential function in vivo for Dicer-2 in host defense against RNA viruses in *Drosophila*. Nat Immunol, v. 7, n. 6, p. 590-597, 2006.
- GARVER, L. S.; DONG, Y.; DIMOPOULOS, G. Caspar controls resistance to *Plasmodium falciparum* in diverse anopheline species. PLoS Pathog, v. 5, n. 3, p. e1000335, 2009.
- GEORGEL, P. *et al.* *Drosophila* immune deficiency (IMD) is a death domain protein that activates antibacterial defense and can promote apoptosis. Dev Cell, v. 1, n. 4, p. 503-514, 2001.
- GIRARD, Y. A. *et al.* Ultrastructural study of West Nile virus pathogenesis in *Culex pipiens quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). J Med Entomol, v. 42, n. 3, p. 429-444, 2005.
- GOULD, E. A. *et al.* Potential arbovirus emergence and implications for the United Kingdom. Emerg Infect Dis, v. 12, n. 4, p. 549-555, 2006.
- GRATZ, N. G. Critical review of the vector status of *Aedes albopictus*. Med Vet Entomol, v. 18, n. 3, p. 215-227, 2004.
- GUBLER, D. J. Dengue and dengue hemorrhagic fever: its history and resurgence as a global public health problem. In: GUBLER, D. J.; KUNO, G. (Ed.). Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. New York: CAB International, 1997. Cap.1. p. 1-22.
- GUBLER, D. J. Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21<sup>st</sup> century. Trends Microbiol, v. 10, n. 2, p. 100-103, 2002.
- GUBLER, D. J. KUNO, G. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. New York: CAB International, 1997.
- GUBLER, D. J. MARKOFF, L. Flavivirus. In: KNIPE, D. M. H.; HOWLEY, P. M. (Ed.). Fields Virology. Philadelphia: Lippicott Williams & Wilkins, 2007.

- GUBLER, D. J. *et al.* Variation in susceptibility to oral infection with dengue viruses among geographic strains of *Aedes aegypti*. Am J Trop Med Hyg, v. 28, n. 6, p. 1045-1052, 1979.
- GUBLER, D. J. K., G.; MARKOFF, L. Flaviviruses. In: KINEPE, D. M. H., P. M. (Ed.). Fields Virology. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. Cap.34.
- GUEDES, D. R. *et al.* Patient-based dengue virus surveillance in *Aedes aegypti* from Recife, Brazil. J Vector Borne Dis, v. 47, n. 2, p. 67-75, 2010.
- GUNTHER, J. *et al.* Evidence of vertical transmission of dengue virus in two endemic localities in the state of Oaxaca, Mexico. Intervirology, v. 50, n. 5, p. 347-352, 2007.
- GUZMAN, M. G. KOURI, G. Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas: lessons and challenges. J Clin Virol, v. 27, n. 1, p. 1-13, 2003.
- GUZMAN, M. G.; MUNE, M.; KOURI, G. Dengue vaccine: priorities and progress. Expert Rev Anti Infect Ther, v. 2, n. 6, p. 895-911, 2004.
- HALSTEAD, S. B. Dengue. Lancet, v. 370, n. 9599, p. 1644-1652, 2007.
- HALSTEAD, S. B. Dengue virus-mosquito interactions. Annu Rev Entomol, v. 53, p. 273-291, 2008.
- HARRINGTON, L. C. *et al.* Dispersal of the dengue vector *Aedes aegypti* within and between rural communities. Am. J. Trop. Med. Hyg., v. 72, n. 2, p. 209-220, 2005.
- HEINTZE, C.; GARRIDO, M. V.; KROEGER, A. What do community-based dengue control programmes achieve? A systematic review of published evaluations. Trans R Soc Trop Med Hyg, v. 101, n. 4, p. 317-325, 2007.
- HENGARTNER, M. O. The biochemistry of apoptosis. Nature, v. 407, n. 6805, p. 770-776, 2000.
- HIGGS, S. BEATY, B. J. Natural cycles of vector-borne pathogens. In: MARQUARDT, W. C. (Ed.). Biology of disease vectors. Burlington: Elsevier Academic Press, 2004.
- HILLYER, J. F. CHRISTENSEN, B. M. Mosquito phenoloxidase and defensin colocalize in melanization innate immune responses. J Histochem Cytochem, v. 53, n. 6, p. 689-698, 2005.
- HILLYER, J. F.; SCHMIDT, S. L.; CHRISTENSEN, B. M. Hemocyte-mediated phagocytosis and melanization in the mosquito *Armigeres subalbatus* following immune challenge by bacteria. Cell Tissue Res, v. 313, n. 1, p. 117-127, 2003.
- HOFFMANN, J. A. The immune response of *Drosophila*. Nature, v. 426, n. 6962, p. 33-38, 2003.
- HOFFMANN, J. A. REICHHART, J. M. *Drosophila* innate immunity: an evolutionary perspective. Nat Immunol, v. 3, n. 2, p. 121-126, 2002.

HOLLAND, J. *et al.* Rapid evolution of RNA genomes. Science, v. 215, n. 4540, p. 1577-1585, 1982.

HOLMES, E. C.; WOROBEY, M.; RAMBAUT, A. Phylogenetic evidence for recombination in dengue virus. Mol Biol Evol, v. 16, n. 3, p. 405-409, 1999.

HOLMES, E. C. W., M.; RAMBAUT, A. Phylogenetic Evidence for Recombination in Dengue Virus. Mol. Biol. Evol., v. 16, n. 3, p. 405-409, 1999.

HOLT, R. A. *et al.* The genome sequence of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. Science, v. 298, n. 5591, p. 129-149, 2002.

HONORIO, N. A. *et al.* Dispersal of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in an urban endemic dengue area in the State of Rio de Janeiro, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 98, n. 2, p. 191-198, 2003.

JOSHI, V.; MOURYA, D. T.; SHARMA, R. C. Persistence of dengue-3 virus through transovarial transmission passage in successive generations of *Aedes aegypti* mosquitoes. Am J Trop Med Hyg, v. 67, n. 2, p. 158-161, 2002.

JOSHI, V.; SINGHI, M.; CHAUDHARY, R. C. Transovarial transmission of dengue 3 virus by *Aedes aegypti*. Trans R Soc Trop Med Hyg, v. 90, n. 6, p. 643-644, 1996.

JOY, D. A. *et al.* Local adaptation and vector-mediated population structure in *Plasmodium vivax* malaria. Mol Biol Evol, v. 25, n. 6, p. 1245-1252, 2008.

KAMBRIS, Z. *et al.* *Wolbachia* stimulates immune gene expression and inhibits plasmodium development in *Anopheles gambiae*. PLoS Pathog, v. 6, n. 10, p. e1001143, 2010.

KEENE, K. M. *et al.* RNA interference acts as a natural antiviral response to O'nyong-nyong virus (Alphavirus; Togaviridae) infection of *Anopheles gambiae*. Proc Natl Acad Sci U S A, v. 101, n. 49, p. 17240-17245, 2004.

KHIN, M. M. THAN, K. A. Transovarial transmission of dengue 2 virus by *Aedes aegypti* in nature. Am J Trop Med Hyg, v. 32, n. 3, p. 590-594, 1983.

KHOO, C. C. *et al.* The RNA interference pathway affects midgut infection- and escape barriers for Sindbis virus in *Aedes aegypti*. BMC Microbiol, v. 10, p. 130, 2010.

KIM, T. KIM, Y. J. Overview of innate immunity in *Drosophila*. J Biochem Mol Biol, v. 38, n. 2, p. 121-127, 2005.

KINEPE, D. M. H., P. M. . Fields Virology. 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007.

KNIPE, D. M. H. HOWLEY, P. M. Fields Virology. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007.

KONG, Y. Y. *et al.* Rapid detection, serotyping and quantitation of dengue viruses by TaqMan real-time one-step RT-PCR. J Virol Methods, v. 138, n. 1-2, p. 123-130, 2006.

KOW, C. Y.; KOON, L. L.; YIN, P. F. Detection of dengue viruses in field caught male *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Singapore by type-specific PCR. J Med Entomol, v. 38, n. 4, p. 475-479, 2001.

KUHN, R. J. *et al.* Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. Cell, v. 108, n. 5, p. 717-725, 2002.

LAMBRECHTS, L. Dissecting the genetic architecture of host-pathogen specificity. PLoS Pathog, v. 6, n. 8, p. e1001019, 2010.

LAMBRECHTS, L. *et al.* Genetic specificity and potential for local adaptation between dengue viruses and mosquito vectors. BMC Evol Biol, v. 9, p. 160, 2009.

LAMBRECHTS, L. SCOTT, T. W. Mode of transmission and the evolution of arbovirus virulence in mosquito vectors. Proc Biol Sci, v. 276, n. 1660, p. 1369-1378, 2009.

LAVINE, M. D. STRAND, M. R. Insect hemocytes and their role in immunity. Insect Biochem Mol Biol, v. 32, n. 10, p. 1295-1309, 2002.

LEMAITRE, B. HOFFMANN, J. The host defense of *Drosophila melanogaster*. Annu Rev Immunol, v. 25, p. 697-743, 2007.

LEMAITRE, B. *et al.* A recessive mutation, immune deficiency (*imd*), defines two distinct control pathways in the *Drosophila* host defense. Proc Natl Acad Sci U S A, v. 92, n. 21, p. 9465-9469, 1995.

LEMAITRE, B. *et al.* The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. Cell, v. 86, n. 6, p. 973-983, 1996.

LEMAITRE, B.; REICHHART, J. M.; HOFFMANN, J. A. *Drosophila* host defense: differential induction of antimicrobial peptide genes after infection by various classes of microorganisms. Proc Natl Acad Sci U S A, v. 94, n. 26, p. 14614-14619, 1997.

LIMA, E. P. *et al.* Insecticide resistance in *Aedes aegypti* populations from Ceara, Brazil. Parasit Vectors, v. 4, p. 5, 2011.

LIOTTA, D. J. *et al.* Molecular detection of dengue viruses in field caught *Aedes aegypti* mosquitoes from northeastern Argentina. Rev Latinoam Microbiol, v. 47, n. 3-4, p. 82-87, 2005.

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. Methods, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

LOURENCO-DE-OLIVEIRA, R. *et al.* *Aedes aegypti* in Brazil: genetically differentiated populations with high susceptibility to dengue and yellow fever viruses. Trans R Soc Trop Med Hyg, v. 98, n. 1, p. 43-54, 2004.

LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. *et al.* *Aedes aegypti* in Brazil: genetically differentiated populations with high susceptibility to dengue and yellow fever viruses. Trans R Soc Trop Med Hyg, v. 98, n. 1, p. 43-54, 2004.

LOURENCO DE OLIVEIRA, R. *et al.* Large genetic differentiation and low variation in vector competence for dengue and yellow fever viruses of *Aedes albopictus* from Brazil, the United States, and the Cayman Islands. Am J Trop Med Hyg, v. 69, n. 1, p. 105-114, 2003.

LOZOVEL, A. L. Culicídeos (Mosquitos). In: MARCONDES, C. B. (Ed.). Entomologia Médica e Veterinária. SãoPaulo: Atheneu, 2001. Cap.6. p. 59-104.

MAGALHAES, T.; LEANDRO, D. C.; AYRES, C. F. Knock-down of REL2, but not defensin A, augments *Aedes aegypti* susceptibility to *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. Acta Trop, v. 113, n. 2, p. 167-173, 2010.

MARQUARDT, W. C. Biology of disease vectors. Burlington: Elsevier Academic Press, 2004.

MCARTHUR, M. A.; SZTEIN, M. B.; EDELMAN, R. Dengue vaccines: recent developments, ongoing challenges and current candidates. Expert Rev Vaccines, v. 12, n. 8, p. 933-953, 2013.

MEDEIROS, L. C. C. *et al.* Modeling the dynamic transmission of dengue Fever: investigating disease persistence. PLoS Negl Trop Dis, v. 5, n. 1, p. e942, 2011.

MEISTER, S. *et al.* Immune signaling pathways regulating bacterial and malaria parasite infection of the mosquito *Anopheles gambiae*. Proc Natl Acad Sci U S A, v. 102, n. 32, p. 11420-11425, 2005.

MELLO, C. C. CONTE, D., JR. Revealing the world of RNA interference. Nature, v. 431, n. 7006, p. 338-342, 2004.

MELO-SANTOS, M. A. *et al.* Resistance to the organophosphate temephos: mechanisms, evolution and reversion in an *Aedes aegypti* laboratory strain from Brazil. Acta Trop, v. 113, n. 2, p. 180-189, 2010.

MINISTÉRIO-DA-SAÚDE. Rede Nacional de Monitoramento da Resistência de *Aedes aegypti* a inseticidas (Rede MoReNAa): metodologia de amostragem. Brasília - 2008.

MOITA, L. F. *et al.* In vivo identification of novel regulators and conserved pathways of phagocytosis in *A. gambiae*. Immunity, v. 23, n. 1, p. 65-73, 2005.

MOREIRA, L. A. *et al.* A *Wolbachia* symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with dengue, Chikungunya, and Plasmodium. Cell, v. 139, n. 7, p. 1268-1278, 2009.

- MOURA, A. J. F. *et al.* Vector competence of the *Aedes aegypti* population from Santiago Island, Cape Verde, to different serotypes of dengue virus. Parasites & Vectors, v. 8, p. 114, 2015.
- MOUSSON, L. *et al.* *Wolbachia* modulates Chikungunya replication in *Aedes albopictus*. Mol Ecol, v. 19, n. 9, p. 1953-1964, 2010.
- MUIR, L. E.KAY, B. H. *Aedes aegypti* survival and dispersal estimated by mark-release-recapture in northern Australia. Am J Trop Med Hyg, v. 58, n. 3, p. 277-282, 1998.
- MURRAY, N. E.; QUAM, M. B.; WILDER-SMITH, A. Epidemiology of dengue: past, present and future prospects. Clin Epidemiol, v. 5, p. 299-309, 2013.
- NAPOLI, C.; LEMIEUX, C.; JORGENSEN, R. Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into *Petunia* Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. Plant Cell, v. 2, n. 4, p. 279-289, 1990.
- NENE, V. *et al.* Genome sequence of *Aedes aegypti*, a major arbovirus vector. Science, v. 316, n. 5832, p. 1718-1723, 2007.
- NEWTON, E. A.REITER, P. A model of the transmission of dengue fever with an evaluation of the impact of ultra-low volume (ULV) insecticide applications on dengue epidemics. Am J Trop Med Hyg, v. 47, n. 6, p. 709-720, 1992.
- NGUYET, M. N. *et al.* Host and viral features of human dengue cases shape the population of infected and infectious *Aedes aegypti* mosquitoes. Proc Natl Acad Sci U S A, v. 110, n. 22, p. 9072-9077, 2013.
- NUNES, F. M.SIMOES, Z. L. A non-invasive method for silencing gene transcription in honeybees maintained under natural conditions. Insect Biochem Mol Biol, v. 39, n. 2, p. 157-160, 2009.
- OCAMPO, C. B. *et al.* Differential expression of apoptosis related genes in selected strains of *Aedes aegypti* with different susceptibilities to dengue virus. PLoS One, v. 8, n. 4, p. e61187, 2013.
- ORDONEZ-GONZALEZ, J. G. *et al.* The use of sticky ovitraps to estimate dispersal of *Aedes aegypti* in northeastern Mexico. J Am Mosq Control Assoc, v. 17, n. 2, p. 93-97, 2001.
- OSANAI, C. H. *et al.* Surto de dengue em Boa Vista, Roraima. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, v. 25, n. 1, p. 53-54, 1983.
- PAQUETTE, N. *et al.* Caspase-mediated cleavage, IAP binding, and ubiquitination: linking three mechanisms crucial for *Drosophila* NF-kappaB signaling. Mol Cell, v. 37, n. 2, p. 172-182, 2010.
- RAFF, M. Cell suicide for beginners. Nature, v. 396, n. 6707, p. 119-122, 1998.

RAMIREZ, J. L. DIMOPOULOS, G. The Toll immune signaling pathway control conserved anti-dengue defenses across diverse *Ae. aegypti* strains and against multiple dengue virus serotypes. Dev Comp Immunol, v. 34, n. 6, p. 625-629, 2010.

RAMIREZ, J. L. *et al.* Reciprocal tripartite interactions between the *Aedes aegypti* midgut microbiota, innate immune system and dengue virus influences vector competence. PLoS Negl Trop Dis, v. 6, n. 3, p. e1561, 2012.

REGIS, L. *et al.* Developing new approaches for detecting and preventing *Aedes aegypti* population outbreaks: basis for surveillance, alert and control system. Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 103, n. 1, p. 50-59, 2008.

REGIS, L. *et al.* Developing new approaches for detecting and preventing *Aedes aegypti* population outbreaks: basis for surveillance, alert and control system. Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 103, n. 1, p. 50-59, 2008.

RODRIGUES, J. *et al.* Hemocyte differentiation mediates innate immune memory in *Anopheles gambiae* mosquitoes. Science, v. 329, n. 5997, p. 1353-1355, 2010.

ROSOMER, W. S. The vector alimentary system. In: BEATY, B. J.; MARQUARDT, W. C. (Ed.). The Biology of disease vectors. Niwot: University Press of Colorado, 1996.

RUSSELL, R. C. *et al.* Mark-release-recapture study to measure dispersal of the mosquito *Aedes aegypti* in Cairns, Queensland, Australia. Med Vet Entomol, v. 19, n. 4, p. 451-457, 2005.

SALAZAR, M. I. *et al.* Dengue virus type 2: replication and tropisms in orally infected *Aedes aegypti* mosquitoes. BMC Microbiol, v. 7, p. 9, 2007.

SANCHEZ-VARGAS, I. *et al.* Dengue virus type 2 infections of *Aedes aegypti* are modulated by the mosquito's RNA interference pathway. PLoS Pathog, v. 5, n. 2, p. e1000299, 2009.

SANCHEZ-VARGAS, I. *et al.* RNA interference, arthropod-borne viruses, and mosquitoes. Virus Res, v. 102, n. 1, p. 65-74, 2004.

SANTOS, J. J. *et al.* Construction and characterisation of a complete reverse genetics system of dengue virus type 3. Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 108, n. 8, p. 983-991, 2013.

Science. First New Dengue Virus Type in 50 Years. 2013. Disponível em: <<http://news.sciencemag.org/health/2013/10/first-new-dengue-virus-type-50-years>>. Acesso em: 27/01/2014.

SHIN, S. W. *et al.* REL1, a homologue of *Drosophila* dorsal, regulates toll antifungal immune pathway in the female mosquito *Aedes aegypti*. J Biol Chem, v. 280, n. 16, p. 16499-16507, 2005.

- SILVA, V. C. *et al.* Diversidade de criadouros e tipos de imóveis frequentados por *Aedes albopictus* e *Aedes aegypti*. Rev Saude Publica, v. 40, n. 6, p. 1106-1111, 2006.
- SIM, S. DIMOPOULOS, G. Dengue virus inhibits immune responses in *Aedes aegypti* cells. PLoS One, v. 5, n. 5, p. e10678, 2010.
- SIMMONS, C. P. *et al.* Dengue. N Engl J Med, v. 366, n. 15, p. 1423-1432, 2012.
- SOUZA-NETO, J. A.; SIM, S.; DIMOPOULOS, G. An evolutionary conserved function of the JAK-STAT pathway in anti-dengue defense. Proc Natl Acad Sci U S A, v. 106, n. 42, p. 17841-17846, 2009.
- STRODE, C. *et al.* Expression profile of genes during resistance reversal in a temephos selected strain of the dengue vector, *Aedes aegypti*. PLoS One, v. 7, n. 8, p. e39439, 2012.
- SYLLA, M. *et al.* Gene Flow, Subspecies Composition, and Dengue Virus-2 Susceptibility among *Aedes aegypti* Collections in Senegal. PLoS Negl Trop Dis, v. 3, n. 4, p. e408, 2009.
- TABACHNICK, W. J. *et al.* Oral infection of *Aedes aegypti* with yellow fever virus: geographic variation and genetic considerations. Am J Trop Med Hyg, v. 34, n. 6, p. 1219-1224, 1985.
- TEMPORAO, J. G. *et al.* Dengue virus serotype 4, Roraima State, Brazil. Emerg Infect Dis, v. 17, n. 5, p. 938-940, 2011.
- THORNBERRY, N. A. Caspases: key mediators of apoptosis. Chem Biol, v. 5, n. 5, p. R97-103, 1998.
- TIMMONS, L. FIRE, A. Specific interference by ingested dsRNA. Nature, v. 395, n. 6705, p. 854, 1998.
- TRPIS, M.; HAUSERMANN, W.; CRAIG, G. B., JR. Estimates of population size, dispersal, and longevity of domestic *Aedes aegypti aegypti* (Diptera: Culicidae) by mark-release-recapture in the village of Shauri Moyo in eastern Kenya. J Med Entomol, v. 32, n. 1, p. 27-33, 1995.
- TSUDA, Y. *et al.* Movement of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) released in a small isolated village on Hainan Island, China. J Med Entomol, v. 38, n. 1, p. 93-98, 2001.
- TWIDDY, S. S. HOLMES, E. C. The extent of homologous recombination in members of the genus Flavivirus. J Gen Virol, v. 84, n. Pt 2, p. 429-440, 2003.
- TZOU, P.; REICHHART, J. M.; LEMAITRE, B. Constitutive expression of a single antimicrobial peptide can restore wild-type resistance to infection in immunodeficient *Drosophila* mutants. Proc Natl Acad Sci U S A, v. 99, n. 4, p. 2152-2157, 2002.
- URDANETA-MARQUEZ, L. *et al.* Genetic Relationships among *Aedes aegypti* Collections in Venezuela as Determined by Mitochondrial DNA Variation and Nuclear

- Single Nucleotide Polymorphisms. . Am. J. Trop. Med. Hyg., v. 78, n. 3, p. 479-491, 2008.
- URDANETA, L. *et al.* Detection of dengue viruses in field-caught *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Maracay, Aragua state, Venezuela by type-specific polymerase chain reaction. Infect Genet Evol, v. 5, n. 2, p. 177-184, 2005.
- VAIDYANATHAN, R. SCOTT, T. W. Apoptosis in mosquito midgut epithelia associated with West Nile virus infection. Apoptosis, v. 11, n. 9, p. 1643-1651, 2006.
- VAUX, D. L. KORSMEYER, S. J. Cell death in development. Cell, v. 96, n. 2, p. 245-254, 1999.
- VAZEILLE-FALCOZ, M. *et al.* Variation in oral susceptibility to dengue type 2 virus of populations of *Aedes aegypti* from the islands of Tahiti and Moorea, French Polynesia. Am J Trop Med Hyg, v. 60, n. 2, p. 292-299, 1999.
- VAZEILLE, M. *et al.* Orally co-Infected *Aedes albopictus* from La Reunion Island, Indian Ocean, can deliver both dengue and chikungunya infectious viral particles in their saliva. PLoS Negl Trop Dis, v. 4, n. 6, p. e706, 2010.
- VEGA-RUA, A. *et al.* High level of vector competence of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from ten American countries as a crucial factor in the spread of Chikungunya virus. J Virol, v. 88, n. 11, p. 6294-6306, 2014.
- WASINPIYAMONGKOL, L. *et al.* Susceptibility and transovarial transmission of dengue virus in *Aedes aegypti*: a preliminary study of morphological variations. Southeast Asian J Trop Med Public Health, v. 34 Suppl 2, p. 131-135, 2003.
- WEAVER, S. C. VASILAKIS, N. Molecular evolution of dengue viruses: contributions of phylogenetics to understanding the history and epidemiology of the preeminent arboviral disease. Infect Genet Evol, v. 9, n. 4, p. 523-540, 2009.
- WHO. Global Strategy For Dengue Prevention And Control, 2012-2020. Geneva - 2012.
- WOODRING, J. *et al.* Short report: Diapause, transovarial transmission, and filial infection rates in geographic strains of La Crosse virus-infected *Aedes triseriatus*. Am J Trop Med Hyg, v. 58, n. 5, p. 587-588, 1998.
- XI, Z.; RAMIREZ, J. L.; DIMOPOULOS, G. The *Aedes aegypti* toll pathway controls dengue virus infection. PLoS Pathog, v. 4, n. 7, p. e1000098, 2008.
- ZAMBON, R. A.; VAKHARIA, V. N.; WU, L. P. RNAi is an antiviral immune response against a dsRNA virus in *Drosophila melanogaster*. Cell Microbiol, v. 8, n. 5, p. 880-889, 2006.
- ZHOU, L. *et al.* Michelob\_x is the missing inhibitor of apoptosis protein antagonist in mosquito genomes. EMBO Rep, v. 6, n. 8, p. 769-774, 2005.

## 11 APÊNDICES

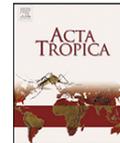
## 11.1 Artigo publicado na Revista Acta Tropica

Acta Tropica 124 (2012) 113–119



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Acta Tropica

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/actatropica](http://www.elsevier.com/locate/actatropica)Immune transcript variations among *Aedes aegypti* populations with distinct susceptibility to dengue virus serotype 2D. Carvalho-Leandro<sup>a,c</sup>, C.F.J. Ayres<sup>a,b,c</sup>, D.R.D. Guedes<sup>a,b</sup>, L. Suesdek<sup>d,e</sup>, M.A.V. Melo-Santos<sup>a,b</sup>, C.F. Oliveira<sup>a,b</sup>, M.T. Cordeiro<sup>f,g</sup>, L.N. Regis<sup>a,b</sup>, E.T. Marques<sup>b,f,h</sup>, L.H. Gil<sup>b,f</sup>, T. Magalhaes<sup>a,\*</sup><sup>a</sup> Departamento de Entomologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM), Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz-Pernambuco), Recife, Brazil<sup>b</sup> Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública, CPqAM, Fiocruz-Pernambuco, Recife, Brazil<sup>c</sup> Programa de Pós-graduação em Biologia Animal, Departamento de Zoologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, Brazil<sup>d</sup> Laboratório de Parasitologia, Instituto Butantan São Paulo, Brazil<sup>e</sup> Programa de Pós-graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, Brazil<sup>f</sup> Laboratório de Virologia e Terapia Experimental (LaVITE), CPqAM, Fiocruz-Pernambuco, Recife, Brazil<sup>g</sup> Secretaria de Saúde de Pernambuco, Recife, Brazil<sup>h</sup> Center for Vaccine Research, University of Pittsburg, Pittsburg, USA

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 4 February 2012

Received in revised form 6 July 2012

Accepted 9 July 2012

Available online 31 July 2012

## Keywords:

Mosquito

Dengue virus

Immune response

Toll

JAK-STAT

RNAi

## ABSTRACT

The innate immune response of insects is one of the factors that may dictate their susceptibility to viral infection. Two immune signaling pathways, Toll and JAK-STAT, and the RNA interference (RNAi) pathway are involved in *Aedes aegypti* responses against dengue virus (DENV), however natural differences in these antiviral defenses among mosquito populations have not been studied. Here, two field *Ae. aegypti* populations from distinct ecological environments, one from Recife and the other from Petrolina (Brazil), and a laboratory strain were studied for their ability to replicate a primary isolate of dengue virus serotype 2 (DENV-2). Virus infectivity and replication were determined in insect tissues collected after viral exposure through reverse-transcription real time PCR (RT-PCR). The expression of a transcript representing these defense mechanisms (Toll, JAK-STAT and RNAi) in the midgut and fat body was studied with RT-PCR to evaluate variations in innate immune mechanisms possibly employed against DENV. Analyses of infection rates indicated that the field populations were more susceptible to DENV-2 infection than the lab strain. There were distinct expression patterns among mosquito populations, in both control and infected insects. Moreover, lower expression of immune molecules in DENV-2-infected insects compared to controls was observed in the two field populations. These results suggest that natural variations in vector competence against DENV may be partly due to differences in mosquito defense mechanisms, and that the down-regulation of immune transcripts after viral infection depends on the insect strain.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Vector competence for arboviruses varies among mosquito populations (Bennett et al., 2002; Black et al., 2002; Diallo et al., 2008; Gubler et al., 1979; Lourenco-de-Oliveira et al., 2004; Tabachnick et al., 1985; Tardieux et al., 1990; Vazeille-Falcoz et al., 1999).

The innate immune response of insects is one of the factors that may dictate their susceptibility to viral infection. In *Aedes aegypti*, two immune signaling pathways have been linked to anti-DENV defense mechanisms, the Toll and Janus kinase-signal transducer and activator of transcription (JAK-STAT) (Ramirez and Dimopoulos, 2010; Souza-Neto et al., 2009; Xi et al., 2008), although no effector molecules that act against the virus have yet been clearly characterized. Another important antiviral mechanism in insects is the RNA interference (RNAi) pathway, which is considered by some authors to be the most important antiviral defense in mosquitoes (reviewed in Blair, 2011). RNAi is an endogenous silencing mechanism found in a variety of eukaryotic organisms that has two main functions: 1) to regulate the expression of endogenous genes (Ketting, 2011); and 2) to serve as a defense mechanism against invasive nucleic material (e.g. viruses) (Bivalkar-Mehla et al., 2011). Suppression of the RNAi pathway increases arboviral infection in *Anopheles gambiae* infected with O'nyong-nyong virus (Keene et al.,

\* Corresponding author. Current address: LaVITE, CPqAM, Fiocruz-Pernambuco, Recife, Brazil. Av. Moraes Rego s/n, Cidade Universitária, Recife-PE, 50670-420, Brazil. Tel.: +55 81 2101 2668; fax: +55 81 2101 2564.

E-mail addresses: [daniilo@cpqam.fiocruz.br](mailto:daniilo@cpqam.fiocruz.br) (D. Carvalho-Leandro), [tans@cpqam.fiocruz.br](mailto:tans@cpqam.fiocruz.br) (C.F.J. Ayres), [dguesdes@cpqam.fiocruz.br](mailto:dguesdes@cpqam.fiocruz.br) (D.R.D. Guedes), [linrocha@butantan.gov.br](mailto:linrocha@butantan.gov.br) (L. Suesdek), [mavarjal@cpqam.fiocruz.br](mailto:mavarjal@cpqam.fiocruz.br) (M.A.V. Melo-Santos), [claudia@cpqam.fiocruz.br](mailto:claudia@cpqam.fiocruz.br) (C.F. Oliveira), [marli@cpqam.fiocruz.br](mailto:marli@cpqam.fiocruz.br) (M.T. Cordeiro), [leda@cpqam.fiocruz.br](mailto:leda@cpqam.fiocruz.br) (L.N. Regis), [marques@pitt.edu](mailto:marques@pitt.edu) (E.T. Marques), [laura@cpqam.fiocruz.br](mailto:laura@cpqam.fiocruz.br) (L.H. Gil), [tecamagalhaes@hotmail.com](mailto:tecamagalhaes@hotmail.com), [teca@cpqam.fiocruz.br](mailto:teca@cpqam.fiocruz.br) (T. Magalhaes).

2004), and *Ae. aegypti* infected with Sindbis virus (Khoo et al., 2010) or DENV (Sanchez-Vargas et al., 2009).

The virus needs counter-defense mechanisms to continue its propagation cycle to survive mosquito responses. For instance, the virus may down-regulate key molecules of insect defense mechanisms or modulate the expression of other molecules in a self-advantageous strategy (Bartholomay et al., 2010; Colpitts et al., 2011; Fragkoudis et al., 2008; Li et al., 2002; Lin et al., 2004; Munoz-Jordan et al., 2003; Ramirez and Dimopoulos, 2010; Sanders et al., 2005). Following this premise, recent work using a mosquito cell line showed that DENV is able to suppress the expression of some immune molecules (Sim and Dimopoulos, 2010). In the case of RNAi, molecules that act as suppressors of the RNAi pathway have been identified in viruses that infect *Drosophila* (Li et al., 2002; van Cleef et al., 2011), however, such molecules have not been identified in mosquito-borne viruses and the viral counter-defense strategy against RNAi is not yet known (Sanchez-Vargas et al., 2009).

In this study, we infected one lab and two field populations of *Ae. aegypti* with DENV-2 and analyzed their susceptibility to viral infection. Natural differences in antiviral defenses among *Ae. aegypti* populations are not known, thus in order to perform a preliminary study on the variations of immune mechanisms employed against DENV, the expression of a transcript representing each of the three defense mechanisms (Toll, JAK-STAT and RNAi) in the midgut and fat body was studied through reverse-transcription real-time PCR (RT-PCR). The selection of REL1 and HOP was based on previous studies that show changes in their expression after DENV infection (Xi et al., 2008). REL1 is a NF- $\kappa$ B transcription factor of the Toll pathway that regulates the expression of antimicrobial peptides (Shin et al., 2005). HOP is a Janus kinase (JAK) involved in the activation of signal transducers and activators of transcription (STATs) of the JAK-STAT pathway (Souza-Neto et al., 2009). Dicer-2 (DCR2) was chosen since it is an essential molecule of the antiviral RNAi pathway in mosquitoes; it cleaves double-stranded RNA (dsRNA) of specific sizes to start the RNAi pathway (Blair, 2011).

## 2. Materials and methods

### 2.1. Establishment of *Aedes aegypti* populations

*Ae. aegypti* eggs were collected from ovitraps distributed throughout Petrolina (09°23'55"S 40°30'03"W) and Recife (08°03'14"S 34°52'51"W), Pernambuco (PE) State, Brazil. These districts are distinct demographically and ecologically and are over 700 km distant from each other. While Recife is a coast city densely populated (~7000 people/km<sup>2</sup>), Petrolina is located in the arid western part of PE and has much lower population density (~65 people/km<sup>2</sup>) (IBGE, 2010). Traps installation followed a criteria previously established, according to the number of properties and populated areas in each city (Ministério da Saúde, 2008). Eggs were taken to the insectary of the Department of Entomology at Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM, Fiocruz-Pernambuco) and mosquitoes were raised according to standard procedures. Adult females and males were allowed to copulate and blood meals (live chicken) were given to females for egg production. Eggs were collected and the procedure to allow adult emergence was repeated, giving rise to the first generation (F1). Subsequent generations were obtained and the experiments described below were performed with F2 or F3. *Ae. aegypti* Recife-Laboratory (ReCL) (Melo-Santos et al., 2009) was used as a laboratory strain in the experiments. This strain has been maintained in the lab for over 15 years and was initially collected in Recife in 1996. For the infection experiments, larvae from the three strains (ReCL, Petrolina and Recife) were raised at the same

time under identical conditions, e.g. same number of larvae per container (300 larvae in a tray with 1.5 l of water), same amount of food per container (Cat Chow® tablets of 0.24 g each; starting with 2 tablets at every 48 h and increasing the amount according to larval development), rotation of trays in the insectary room to minimize differences in light and temperature exposure. Insectary conditions were: 70–80% humidity, 12 h:12 h light:dark cycle, and 26 ± 2 °C.

### 2.2. Mosquito infection with DENV-2

Two infection experiments were performed. In the first infection midgut, fat body and salivary glands samples were used for infection rate, viral genome quantitation and transcript analyses. In the second infection midgut and salivary glands were assessed for infection rates, in order to confirm the susceptibility status of each population obtained in the first experiment.

Because female size is one of the factors involved in vector competence (Bonizzoni et al., 2012; Schneider et al., 2011), body size of individual females was assessed by wing centroid size. This isometric size estimator is an accurate multivariate alternative to wing length (Morales Vargas et al., 2010) and was computed as previously described (Vidal and Suesdek, 2011).

DENV-2 strain 3808 was used for mosquito infections. This strain was isolated from a patient during a dengue outbreak in Recife in 1995 (GenBank ID: EU259569). An aliquot of the viral stock was used to infect C6/36 cells (80–90% confluence) at a multiplicity of infection (MOI) of one. Cells were incubated at 28 °C for 1 h to allow virus adsorption and after addition of more culture media cells were incubated for 1 week at the same temperature, when strong cytopathic effects were observed. Cells and supernatant were mixed 1:1 with defibrinated sheep blood and used to feed 1 week-old female *Ae. aegypti* of ReCL, Petrolina and Recife populations, which had been starved for 24 h. Titration of infected cells was performed through Fluorescent Focus Assay (Lambrechts et al., 2009; Payne et al., 2006) and was  $2 \times 10^6$  and  $3 \times 10^7$  FFU/ml for the first and second infections, respectively. The control groups were mosquitoes fed on uninfected C6/36 cells mixed 1:1 with defibrinated sheep blood.

For statistical comparison of infection rate data, all temporal intervals were pooled and infection scores were considered as a single set for each organ (midgut and salivary glands) and population. Infection rates were then compared among populations using "Observed versus expected Chi-square", considering the ReCL strain as the standard.

### 2.3. Tissue collection and RNA extraction

Midguts, fat bodies and salivary glands of mosquitoes were collected at 3, 7, 15 and 21 days post-infection (dpi). Dissections were performed in five to ten individuals per time point per population and per group (control or infected). After dissection, tissues were immersed in 300  $\mu$ l of mosquito diluent (Lambrechts et al., 2009). Before immersion, the midguts and salivary glands were washed three times in PBS (the fat body was not washed for being a diffuse tissue). Samples were individually stored at –60 °C until further usage.

Tissues were homogenized in mosquito diluent using pestle and automated homogenizer, and RNA was extracted from 1/3 of the material. Trizol reagent (Invitrogen) was utilized for RNA extraction, according to the manufacturer's instructions, and RNAs were further treated with DNase TURBO (Ambion). After DNase inactivation, RNA quantitation was performed through optical density reads.

**Table 1**

Primers used for detection and quantitation of DENV-2, and detection of rpl8, REL1, HOP and DCR-2 transcripts in *Ae. aegypti* tissues. Primer for preparation of purified NSS transcript used in the standard curve is also listed (NSS IVT) and contains a T7 polymerase region (in bold).

Gene	Forward primer	Reverse primer	Fragment size (bp)
NSS	GGAAGGAGAAGGACTGCACA	ATTCCTGTGTCCTCATCTGCT	104
NSS IVT	TAATACGACTCACTATAGGGGGAAGGAGAAGGACTGCACA	–	–
Rp18	CCACACCAAGGACCGAAGG	GTGACGTTCCGGCATAATCGA	60
REL1	CGGACGCCCGATACC	GTTGAATGTTCCACCATGACAGGAT	57
HOP	ACAGGCACAGGCCGAAA	CCGTTGGACAGCTCGATAAAG	59
DCR-2	CGGGCAACCTGTTACATC	TGTTGGATCCTCGCAAC	61

#### 2.4. Viral genome quantitation

The QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit (QIAGEN) for one-step real-time reactions was used for virus quantitation of mosquito infected with DENV-2. For that, primers that amplify a 104bp region of the DENV non-structural protein 5 (NSS), described by Kong et al. (Kong et al., 2006), were used and are listed in Table 1. PCR reactions were performed with 25 ng of RNA and 0.2  $\mu$ M of each primer. Reaction conditions were: 50°C for 30 min, to allow reverse transcription; 95°C for 15 min, to activate Taq; and 40 cycles of 94°C for 15 s, 58°C for 30 s and 72°C for 30 s. The amount of viral RNA in each sample was calculated by cycle threshold (Ct) values from the standard curve included in each PCR plate. This curve consisted of known concentrations of purified NSS transcript, as described in Kong et al. (2006). The negative controls consisted of reactions with two control samples (mosquitoes fed on non-infected material) from each population. The positive control was a DENV-2-positive mosquito sample that was previously identified. Midgut, fat body and salivary glands samples from all time-points were assayed and reactions were performed in duplicate using the Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System. Viral genome quantitation of each dpi and tissue was compared among populations using Kruskal–Wallis ANOVA test.

#### 2.5. Immune transcript detection in individual tissues

For transcript analyses, midgut and fat body samples were used. The midgut was studied for being a critical tissue involved in vector competence (Bennett et al., 2002), and the fat body was analyzed because of its importance in mosquito immunity (Zou et al., 2011). The following *Ae. aegypti* transcripts were chosen for experiments: REL1, representing the Toll pathway; HOP, representing the JAK-STAT pathway; and DCR2, representing RNAi. Primers that amplify a 57–61 bp region of the transcripts were designed through Primer Express 3.0 software (Applied Biosystems) and are listed in Table 1. For the endogenous control, primers for the rpl8 ribosomal gene (Lan and Fallon, 1992; Magalhaes et al., 2008b) were used and are also listed in Table 1. For these experiments, cDNA was first synthesized from 200 ng of RNA samples, using Oligo(dT)<sub>20</sub> and AMV reverse transcriptase (both from Invitrogen), according to the manufacturer's instructions. Real-time PCR reactions were then performed with the Power SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems). Two microliters of the cDNAs were used per reaction and primer concentration was 0.5  $\mu$ M, except for rpl8 and DCR2 forward primers, which were used at 0.9  $\mu$ M. The positive control consisted of cDNA from a pool of DENV-2-infected *Ae. aegypti*, and the negative control was PCR mix with no template. Samples and controls were assayed separately with each set of primers and reactions were run in duplicates. Two criteria were followed to analyze detectable REL1, HOP and DCR2 transcripts in samples: if positive for the rpl8 gene; if the melting curve matched with that of the respective positive control. Only samples from 7, 15 and 21 dpi were assayed in these experiments. Samples of 3 dpi were not analyzed because of the low infection rate observed at

this time point (see Section 3). Even though viral infection of the midgut may start shortly after a blood meal (Salazar et al., 2007), a larger amount of infection responsive genes may be observed at later time-points (Bartholomay et al., 2010), when viral infection is established.

The Ct values of samples were used to calculate the differential expression of REL1, HOP and DCR2 between infected and control groups of all populations. This was performed through the  $\Delta\Delta$ Ct method (Livak and Schmittgen, 2001), as previously described (Magalhaes et al., 2008a). Results show the fold-difference of transcripts in infected insects when using as the baseline the expression obtained for controls. Finally, transcript expression was compared among the control groups of all populations, through the same method. In this case values obtained for the RecL strain were used as the baseline.

#### 2.6. Quantitation of immune transcripts in whole-body samples

For each population, ten pools of five non blood-fed females were homogenized in mosquito diluent and briefly centrifuged. The supernatant was transferred to new tubes and total RNA was extracted with Trizol. Three micrograms of RNA were used for cDNA synthesis with Oligo(dT)<sub>20</sub> and AMV reverse transcriptase (Invitrogen), according to the manufacturer's instructions. Five microliters of cDNA were used for quantitative RT-PCR, using the same procedures and primers described above. The differential expression of REL1, HOP and DCR2 of Petrolina and Recife in comparison to RecL was calculated through the  $\Delta\Delta$ Ct method (as above). Results show the fold-difference of transcripts in Petrolina and Recife insects when using as the baseline the expression obtained for the RecL strain.

### 3. Results

#### 3.1. DENV-2 infection rates

Fig. 1A shows the percent infection of midguts, fat bodies and salivary glands in the first infection experiment. In the second experiment, fat bodies were not assayed and Fig. 1B shows the percent infection of the midgut and salivary glands. When infection rates of the midgut and salivary glands of both infections were separately analyzed, RecL was significantly less infected than Recife and Petrolina populations (Chi-square = 17.77; df = 1;  $P < 0.001$ ). When combining midgut and salivary glands infection rates of both experiments, results were similar and corroborated that the RecL was significantly less infected (Chi-square = 25.36; df = 3;  $P < 0.001$ ). Petrolina had an apparent higher midgut infection rates than Recife, and higher fat body infection rates than Recife and RecL, but not significantly.

The body size estimator (wing centroid size) of RecL females was significantly higher than those of Recife ( $t$ -test; df = 81,  $F = 1.7$ ,  $P = 0.008$ ) and Petrolina ( $F = 2.25$ ; df = 171;  $P = 0.004$ ) populations, whereas wing size between Recife and Petrolina insects did not differ significantly (data not shown).

116

D. Carvalho-Leandro et al. / Acta Tropica 124 (2012) 113–119

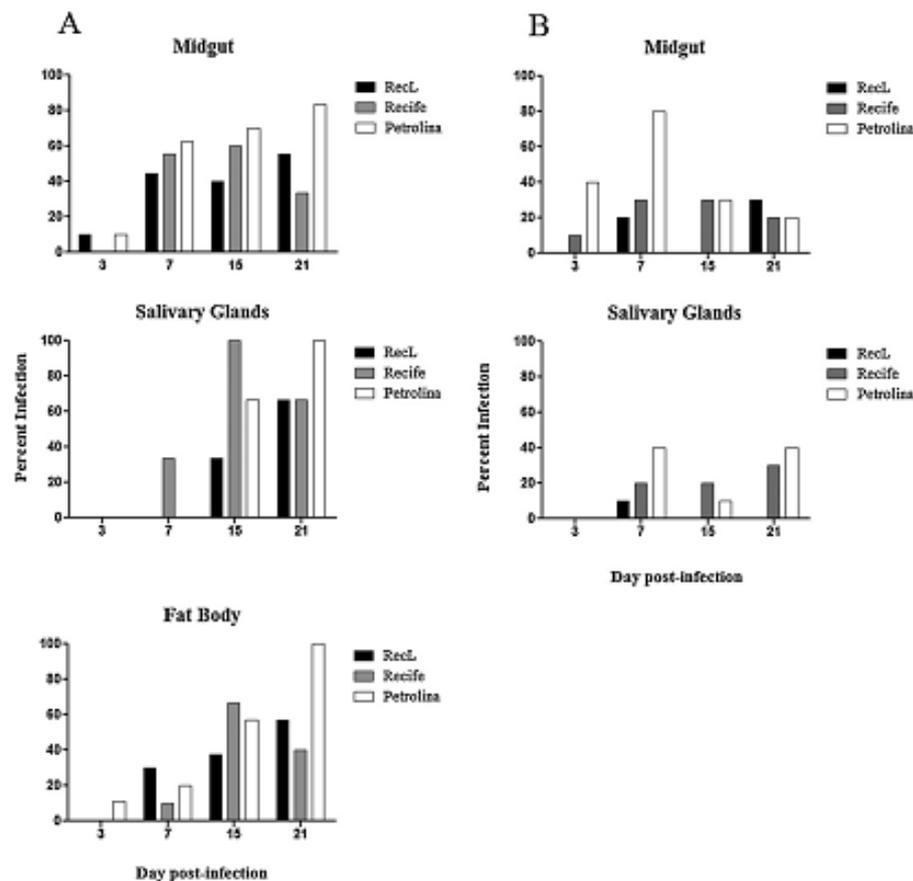


Fig. 1. Infection rates of DENV-2 strain 3808 in tissues of three *Aedes aegypti* populations. *Ae. aegypti* populations: RecL (lab), Recife (field) and Petrolina (field). Tissues were analyzed at 3, 7, 15 and 21 days post-infection. A: first infection experiment. B: second infection experiment.

### 3.2. Viral genome quantitation

Viral genome quantitation in tissues of the three *Ae. aegypti* populations varied from  $7.1 \times 10^6$  to  $4.5 \times 10^{10}$   $\log_{10}$  RNA copies/tissue in samples positive for DENV-2, in the first infection. In the midgut, fat body, and salivary glands viral copies were similar among the three populations, with subtle variations among time-points. No significant differences were observed in regards to viral quantitation among populations in any tissue per time-point (Fig. 2).

### 3.3. Quantitative data of immune transcripts

Quantitation of REL1 (representing Toll), HOP (representing JAK-STAT) and DCR2 (representing the RNAi) transcripts was performed for comparison between infected and control groups in each population. Results showed that in the midgut, the expression of HOP and DCR2 was significantly lower in infected samples than in controls ( $P < 0.05$ ) in Petrolina insects. In the fat body, HOP was significantly less expressed in infected insects of Recife ( $P < 0.05$ ) and Petrolina ( $P < 0.001$ ), in comparison to the respective control samples. This was also true for DCR2, of which the expression was significantly lower in infected samples of Recife ( $P < 0.001$ ) and Petrolina ( $P < 0.001$ ) populations (Fig. 3) versus non-infected samples.

Transcript expression in individual control samples showed that the field strains (Recife and Petrolina) expressed a significant higher amount of DCR2 in comparison to RecL (Fig. 4). The expression of HOP was significantly lower in control samples of Recife than RecL (Fig. 4).

Quantitation of REL1, HOP and DCR2 transcripts in whole-body samples of the three strains showed that Petrolina presented a slight but significant higher amount of REL1 ( $P < 0.05$ ) and DCR2 ( $P < 0.001$ ) transcripts when compared to RecL (Fig. 5).

## 4. Discussion

In the present study, field *Ae. aegypti* populations originated from distinct ecological environments, were smaller in size and had higher midgut and salivary gland infection rates than the lab strain, indicating they were more competent to the virus. The differences in susceptibility seemed to be restricted to the percentage of infected mosquitoes, since viral genome quantitation was similar among populations. Nevertheless, viral titers were not assayed and could have differed, since viral genome is not necessarily correlated to virus titers (Salazar et al., 2007). We also must consider that viral genome could differ among populations if a higher number of samples were assayed.

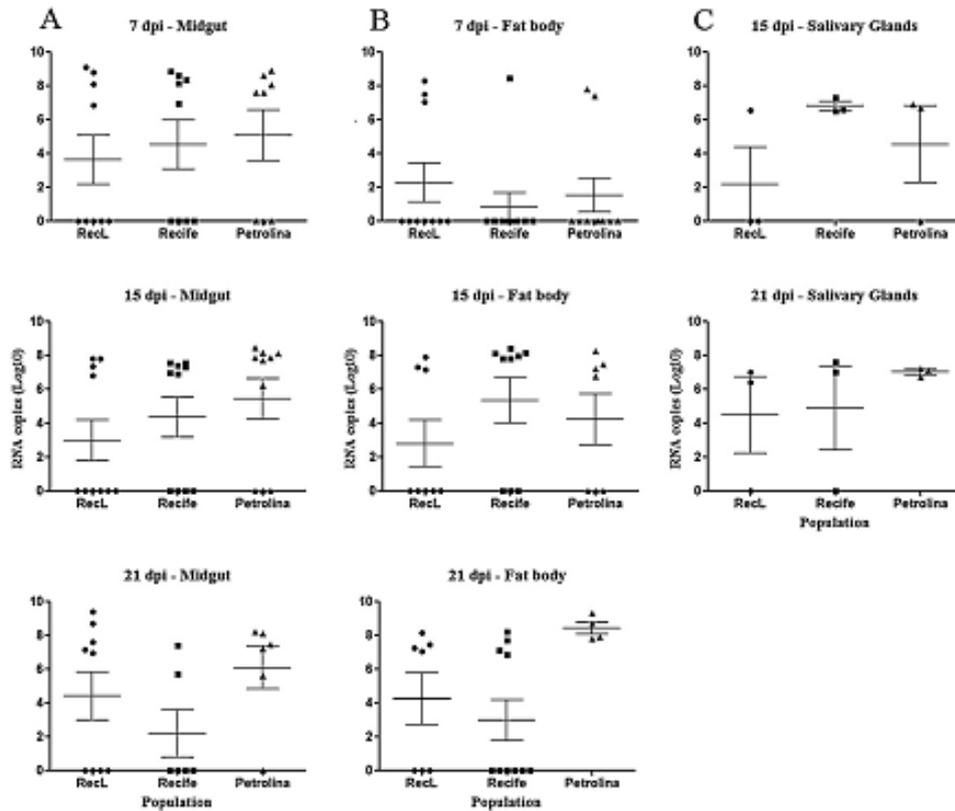


Fig. 2. Quantitation of DENV-2 genome through quantitative real-time PCR in tissues of three *Ae. aegypti* populations. *Ae. aegypti* populations: RecL (lab), Recife (field) and Petrolina (field). Titers in samples were obtained through comparison with a standard curve. Data from the first infection experiment.

Considering the importance of mosquito immune mechanisms toward pathogens, the magnitude and/or differences in anti-DENV defenses among insect populations could be partly involved in their susceptibility status toward the virus.

Transcriptome variations among strains of *Ae. aegypti* before and after a bloodmeal have been observed and may be important

to vector competence against DENV (Bonizzoni et al., 2012). Here, the results on fat body controls (bloodfed, non-infected) and whole-body samples (unfed, non-infected) also indicated distinct transcriptional patterns of the immune transcripts between the field and lab *Ae. aegypti* populations. Interestingly, Bonizzoni et al. (2012) show that among the three strains analyzed, the one most

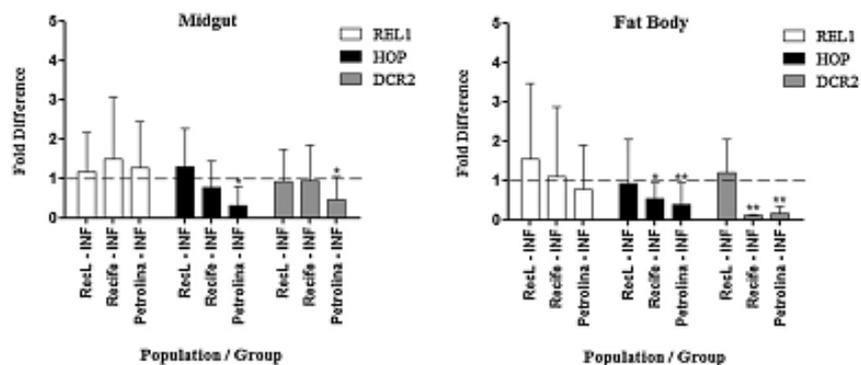


Fig. 3. Fold difference of REL1, HOP and DCR2 transcript expression in infected (INF) samples when using control samples as the baseline. Infected midgut or fat body samples of each population (RecL, Recife and Petrolina) were compared to control samples. Dashed line represents the baseline value (1.0) of the respective controls, according to the used methodology. (\*)  $P < 0.05$ ; (\*\*)  $P < 0.001$ . Data from the first infection experiment.

118

D. Carvalho-Leandro et al. / Acta Tropica 124 (2012) 113–119

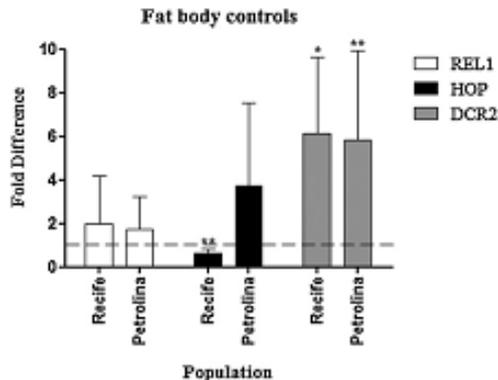


Fig. 4. Fold difference of REL1, HOP and DCR2 transcript expression in fat body control samples. Samples of Recife (field) and Petrolina (field) mosquitoes were compared to the Rec1 (lab) strain (represented by the dashed line). (\*)  $P < 0.05$ ; (\*\*)  $P < 0.001$ . Data from the first infection experiment.

susceptible to DENV-2 and with the shortest time of lab adaptation has the highest number of differentially regulated transcripts after a bloodmeal, including immunity-related transcripts.

Differential expression of immune transcripts, and therefore the vector competence of mosquitoes to pathogens, may also be influenced by the insect's natural microbiota (Boissiere et al., 2012; Dong et al., 2009; Ramirez et al., 2012; Xi et al., 2008). It is possible that the microbial flora of the three *Ae. aegypti* populations tested here differs and plays a role on their susceptibility to DENV, and although this was not assessed, further studies on vector competence of natural mosquito populations should address this issue.

Suppression of host immune molecules by viruses is shown by several studies (Bartholomay et al., 2010; Colpitts et al., 2011; Fragkoudis et al., 2008; Li et al., 2002; Lin et al., 2004; Munoz-Jordan et al., 2003; Ramirez and Dimopoulos, 2010; Sanders et al., 2005), and the down-regulation of *Ae. aegypti* immune molecules by DENV was recently demonstrated *in vitro* (Sim and Dimopoulos, 2010). Here, DENV-2-infected insects of Recife and Petrolina populations expressed a significant lower amount of HOP than the controls, indicating a possible viral modulation of JAK-STAT-related genes. JAK-STAT transcripts are down-regulated in *Ae. aegypti* infected with West Nile virus (WNV), DENV-2 and Yellow Fever virus (YFV) at 7 days post-infection (Colpitts et al., 2011).

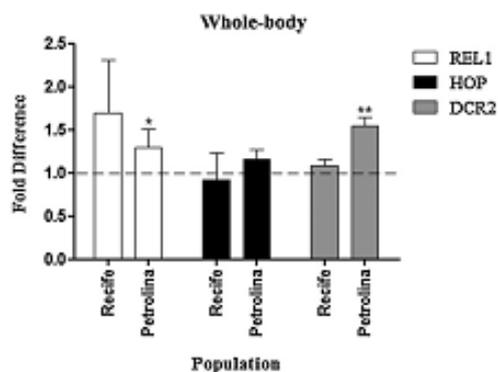


Fig. 5. Fold difference of REL1, HOP and DCR2 transcript expression in pooled whole-body samples. Samples of Recife (field) and Petrolina (field) mosquitoes were compared to the Rec1 (lab) strain (represented by the dashed line). (\*)  $P < 0.05$ ; (\*\*)  $P < 0.001$ .

Conversely, JAK-STAT-related molecules are up-regulated in *Ae. aegypti* infected with DENV-2, however, early in infection (3 h and 18 h post-infection) (Behura et al., 2011). Our results on REL1 transcripts showed no differences between control and infected groups in the three *Ae. aegypti* populations, indicating no viral interference in the Toll pathway at the time-points analyzed. The down-regulation of Toll-related transcripts has been shown in mosquitoes infected with DENV-2 (Ramirez and Dimopoulos, 2010), in mosquitoes infected with WNV, DENV-2 and YFV (Colpitts et al., 2011), and in DENV-2-infected cells (Sim and Dimopoulos, 2010), but at early moments after infection. All these results point to temporal variations in vector-virus interaction, where one immune defense mechanism may be more important at a certain period during infection. Moreover, the genotypes of both virus and mosquito account for the specific interactions between the two organisms (Lambrechts, 2011; Lambrechts et al., 2009), and this must be taken into account when comparing different studies.

The variations in DCR2 transcription among *Ae. aegypti* populations in fat body controls and whole-body samples are in accordance to the differential expression of RNAi-related molecules (AGO2 and DCR2) observed after a bloodmeal in distinct *Ae. aegypti* strains (Bonizzoni et al., 2012), pointing again to natural variations among strains. Lastly, although the mechanism by which DENV evades the mosquito's RNAi system is not yet known (Sanchez-Vargas et al., 2009), the lower quantitation of DCR2 transcripts in infected versus non-infected insects in the field populations is at least interesting. These results differ from those reported by Hess et al. (2011), where the up-regulation of DCR2 in DENV-2-infected *Ae. aegypti* was observed at earlier moments (1 and 2 dpi) and no significant variations in DCR2 transcription at later time-points were found.

## 5. Conclusions

Taken together, the results presented here indicate that *Ae. aegypti* populations may have innate differences in their antiviral defenses. Our data also suggest that the immune response of the midgut, besides that of the fat body, may be a determinant for viral infection. Antiviral responses of other tissues, e.g. the salivary glands, probably also have a role in determining vector competence for viruses. The down-regulation of immune transcripts after infection with DENV may indicate viral manipulation of mosquito defenses, however more time-points and molecules should be further analyzed.

## Acknowledgments

We thank Dr. Brian D. Foy (CSU, USA) for providing the opportunity for the one-month training in the techniques used in this study, and Dr. Marcos H. F. Sorgine (UFRJ, Brazil) for his helpful comments on an early version of the manuscript. We also thank the staff of Recife and Petrolina City Halls for collaborating with mosquito egg collection, and the PDTIS program at FIOCRUZ for supplying reagents for real-time PCRs and for technical support with these assays. Financial support for this work was obtained from CNPq (Grants Universal 479029/2010-5 and Pronex Rede Dengue 550140/2010-7), FACEPE (Grant PPSUS/APQ-1361-4.00/08) and FIOCRUZ.

## References

- Bartholomay, L.C., Waterhouse, R.M., Mayhew, G.F., Campbell, C.L., Michel, K., Zou, Z., Ramirez, J.L., Das, S., Alvarez, K., Arensbarger, P., Bryant, B., Chapman, S.B., Dong, Y., Erickson, S.M., Karunaratne, S.H., Kokoza, V., Kodira, C.D., Pignatelli, P., Shin, S.W., Vanlandingham, D.L., Atkinson, P.W., Birren, B., Christophides, G.K., Clem, R.J., Hemingway, J., Higgs, S., Megy, K., Ranson, H., Zdobnov, E.M., Raikhel, A.S., Christensen, B.M., Dimopoulos, G., Muskavitch, M.A., 2010. Pathogenomics

- of *Culex quinquefasciatus* and meta-analysis of infection responses to diverse pathogens. *Science* 330, 88–90.
- Behara, S.K., Gomez-Machorro, C., Harker, B.W., deBruyn, B., Lovin, D.D., Hemme, R.R., Mori, A., Romero-Severson, J., Severson, D.W., 2011. Global cross-talk of genes of the mosquito *Aedes aegypti* in response to dengue virus infection. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 5, e1385.
- Bennett, K.E., Olson, K.E., Munoz Mde, L., Fernandez-Salas, I., Farfan-Ale, J.A., Higgs, S., Black, W.C., Beaty, B.J., 2002. Variation in vector competence for dengue 2 virus among 24 collections of *Aedes aegypti* from Mexico and the United States. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 67, 85–92.
- Bivalkar-Mehla, S., Vakharia, J., Mehla, R., Abreha, M., Kanwar, J.R., Tikoo, A., Chauhan, A., 2011. Viral RNA silencing suppressors (RSS): novel strategy of viruses to ablate the host RNA interference (RNAi) defense system. *Virus Research* 155, 1–9.
- Black, W.C., Bennett, K.E., Gorochotegui-Escalante, N., Barillas-Mury, C.V., Fernandez-Salas, I., de Lourdes Munoz, M., Farfan-Ale, J.A., Olson, K.E., Beaty, B.J., 2002. Flavivirus susceptibility in *Aedes aegypti*. *Archives of Medical Research* 33, 379–388.
- Blair, C.D., 2011. Mosquito RNAi is the major innate immune pathway controlling arbovirus infection and transmission. *Future Microbiology* 6, 265–277.
- Boissiere, A., Tchioffo, M.T., Bachar, D., Abate, L., Marie, A., Nsango, S.E., Shahbazkia, H.R., Awono-Ambene, P.H., Levashina, E.A., Christen, R., Morlais, I., 2012. Midgut microbiota of the malaria mosquito vector *Anopheles gambiae* and interactions with *Plasmodium falciparum* infection. *PLoS Pathogens* 8, e1002742.
- Bonizzoni, M., Dunn, W.A., Campbell, C.L., Olson, K.E., Marinotti, O., James, A.A., 2012. Strain variation in the transcriptome of the dengue fever vector, *Aedes aegypti*. *G3:Genes, Genomes, Genetics (Bethesda)* 2, 103–114.
- Colpitts, T.M., Cox, J., Vanlandingham, D.L., Feitosa, F.M., Cheng, G., Kurscheid, S., Wang, P., Krishnan, M.N., Higgs, S., Fikrig, E., 2011. Alterations in the *Aedes aegypti* transcriptome during infection with West Nile, dengue and yellow fever viruses. *PLoS Pathogens* 7, e1002189.
- Diallo, M., Ba, Y., Faye, O., Soumare, M.J., Dia, I., Sall, A.A., 2008. Vector competence of *Aedes aegypti* populations from Senegal for sylvatic and epidemic dengue 2 virus isolated in West Africa. *Transactions of the Royal Society Tropical Medicine and Hygiene* 102, 493–498.
- Dong, Y., Manfredini, F., Dimopoulos, G., 2009. Implication of the mosquito midgut microbiota in the defense against malaria parasites. *PLoS Pathogens* 5, e1000423.
- Fragkoudis, R., Chi, Y., Sai, R.W., Barry, G., Attarzadeh-Yazdi, G., Merits, A., Nash, A.A., Fazakerley, J.K., Kohl, A., 2008. Semliki forest virus strongly reduces mosquito host defence signaling. *Insect Molecular Biology* 17, 647–656.
- Gubler, D.J., Nalim, S., Tan, R., Saipan, H., Sulianti Saroso, J., 1979. Variation in susceptibility to oral infection with dengue viruses among geographic strains of *Aedes aegypti*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 28, 1045–1052.
- Hess, A.M., Prasad, A.N., Pritsyn, A., Ebel, G.D., Olson, K.E., Barbacioru, C., Monighetti, C., Campbell, C.L., 2011. Small RNA profiling of Dengue virus-mosquito interactions implicates the Piwi RNA pathway in anti-viral defense. *BMC Microbiology* 11, 45.
- IBGE, 2010. Censo demográfico 2010. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (accessed on January 2012).
- Keene, K.M., Foy, B.D., Sanchez-Vargas, I., Beaty, B.J., Blair, C.D., Olson, K.E., 2004. RNA interference acts as a natural antiviral response to O'nyong-nyong virus (Alphavirus; Togaiviridae) infection of *Anopheles gambiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 17240–17245.
- Ketting, R.F., 2011. The many faces of RNAi. *Dev Cell* 20, 148–161.
- Khoo, C.C., Piper, J., Sanchez-Vargas, I., Olson, K.E., Franz, A.W., 2010. The RNA interference pathway affects midgut infection- and escape barriers for Sindbis virus in *Aedes aegypti*. *BMC Microbiology* 10, 130.
- Kong, Y.Y., Thay, C.H., Tin, T.C., Devi, S., 2006. Rapid detection, serotyping and quantitation of dengue viruses by TaqMan real-time one-step RT-PCR. *Journal of Virological Methods* 138, 123–130.
- Lambrechts, L., 2011. Quantitative genetics of *Aedes aegypti* vector competence for dengue viruses: towards a new paradigm? *Trends in Parasitology* 27, 111–114.
- Lambrechts, L., Chevillon, C., Albright, R.G., Thaisomboonsuk, B., Richardson, J.H., Jarman, R.G., Scott, T.W., 2009. Genetic specificity and potential for local adaptation between dengue viruses and mosquito vectors. *BMC Evolutionary Biology* 9, 160.
- Lan, Q., Fallon, A.M., 1992. Sequence analysis of a mosquito ribosomal protein rpl8 gene and its upstream regulatory region. *Insect Molecular Biology* 1, 71–80.
- Li, H., Li, W.X., Ding, S.W., 2002. Induction and suppression of RNA silencing by an animal virus. *Science* 296, 1319–1321.
- Lin, C.C., Chou, C.M., Hsu, Y.L., Lien, J.C., Wang, Y.M., Chen, S.T., Tsai, S.C., Hsiao, P.W., Huang, C.J., 2004. Characterization of two mosquito STATs, AaSTAT and C1STAT. Differential regulation of tyrosine phosphorylation and DNA binding activity by lipopolysaccharide treatment and by Japanese encephalitis virus infection. *Journal of Biological Chemistry* 279, 3308–3317.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method. *Methods* 25, 402–408.
- Lourenco-de-Oliveira, R., Vazeille, M., de Filippis, A.M., Failloux, A.B., 2004. *Aedes aegypti* in Brazil: genetically differentiated populations with high susceptibility to dengue and yellow fever viruses. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 98, 43–54.
- Magalhaes, T., Brackney, D.E., Beier, J.C., Foy, B.D., 2008a. Silencing an *Anopheles gambiae* caralase and sulphydryl oxidase increases mosquito mortality after a blood meal. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 68, 134–143.
- Magalhaes, T., Oliveira, L.F., Melo-Santos, M.A., Oliveira, C.M., Lima, C.A., Ayres, C.F.J., 2008b. Expression of defensin, cecropin, and transferrin in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) infected with *Wuchereria bancrofti* (Spirurida: Onchocercidae) and the abnormal development of nematodes in the mosquito. *Experimental Parasitology* 120, 364–371.
- Melo-Santos, M.A.V., Araujo, A.P., Rios, E.M.M., Regis, L.N., 2009. Long lasting persistence of *Bacillus thuringiensis* serovar. israelensis larvicidal activity in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) breeding places is associated to bacteria recycling. *Biological Control* 49, 186–191.
- Morales Vargas, R.E., Ya-Umphun, P., Phumala-Morales, N., Komalamisra, N., Dujardin, J.P., 2010. Climate associated size and shape changes in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations from Thailand. *Infection Genetics and Evolution* 10, 580–585.
- Munoz-Jordan, J.L., Sanchez-Burgos, G.G., Laurent-Rolle, M., Garcia-Sastre, A., 2003. Inhibition of interferon signalling by dengue virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 14333–14338.
- Payne, A.F., Binduga-Gajewska, I., Kauffman, E.B., Kramer, L.D., 2006. Quantitation of flaviviruses by fluorescent focus assay. *Journal of Virological Methods* 134, 183–189.
- Ramirez, J.L., Dimopoulos, G., 2010. The Toll immune signaling pathway control conserved anti-dengue defenses across diverse *Ae. aegypti* strains and against multiple dengue virus serotypes. *Developmental & Comparative Immunology* 34, 625–629.
- Ramirez, J.L., Souza-Neto, J., Torres Cosme, R., Rovira, J., Ortiz, A., Pascale, J.M., Dimopoulos, G., 2012. Reciprocal tripartite interactions between the *Aedes aegypti* midgut microbiota, innate immune system and dengue virus influences vector competence. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 6, e1561.
- Salazar, M.L., Richardson, J.H., Sanchez-Vargas, I., Olson, K.E., Beaty, B.J., 2007. Dengue virus type 2: replication and tropisms in orally infected *Aedes aegypti* mosquitoes. *BMC Microbiology* 7, 9.
- Sanchez-Vargas, I., Scott, J.C., Poole-Smith, B.K., Franz, A.W., Barbosa-Solomieu, V., Wilusz, J., Olson, K.E., Blair, C.D., 2009. Dengue virus type 2 infections of *Aedes aegypti* are modulated by the mosquito's RNA interference pathway. *PLoS Pathogens* 5, e1000299.
- Sanders, H.R., Foy, B.D., Evans, A.M., Ross, L.S., Beaty, B.J., Olson, K.E., Gill, S.S., 2005. Sindbis virus induces transport processes and alters expression of innate immunity pathway genes in the midgut of the disease vector, *Aedes aegypti*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 35, 1293–1307.
- Ministério da Saúde, 2008. In: Secretaria de Vigilância em Saúde (Ed.). Rede Nacional de Monitoramento da Resistência de *Aedes aegypti* a inseticidas (Rede MoReNA): metodologia de amostragem. Ministério da Saúde, Brasília.
- Schneider, J.R., Chadee, D.D., Mori, A., Romero-Severson, J., Severson, D.W., 2011. Heritability and adaptive phenotypic plasticity of adult body size in the mosquito *Aedes aegypti* with implications for dengue vector competence. *Infection Genetics and Evolution* 11, 11–16.
- Shin, S.W., Kokoza, V., Bian, C., Cheon, H.M., Kim, Y.J., Raikhel, A.S., 2005. REL1, a homologue of *Drosophila* dorsal, regulates toll antifungal immune pathway in the female mosquito *Aedes aegypti*. *Journal of Biological Chemistry* 280, 16499–16507.
- Sim, S., Dimopoulos, G., 2010. Dengue virus inhibits immune responses in *Aedes aegypti* cells. *PLoS ONE* 5, e10678.
- Souza-Neto, J.A., Sim, S., Dimopoulos, G., 2009. An evolutionary conserved function of the JAK-STAT pathway in anti-dengue defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 17841–17846.
- Tabachnick, W.J., Wallis, G.P., Aitken, T.H., Miller, B.R., Amato, G.D., Lorenz, L., Powell, J.R., Beaty, B.J., 1985. Oral infection of *Aedes aegypti* with yellow fever virus: geographic variation and genetic considerations. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 34, 1219–1224.
- Tardieux, L., Poupel, O., Lapchin, L., Rodhain, F., 1990. Variation among strains of *Aedes aegypti* in susceptibility to oral infection with dengue virus type 2. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 43, 308–313.
- van Cleef, K.W., van Mierlo, J.T., van den Beek, M., van Rij, R.P., 2011. Identification of viral suppressors of RNAi by a reporter assay in *Drosophila* S2 cell culture. *Methods in Molecular Biology* 721, 201–213.
- Vazeille-Falcoz, M., Mousson, L., Rodhain, F., Chungue, E., Failloux, A.B., 1999. Variation in oral susceptibility to dengue type 2 virus of populations of *Aedes aegypti* from the islands of Tahiti and Moorea, French Polynesia. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 60, 292–299.
- Vidal, P.O., Suesdek, L., 2011. Comparison of wing geometry data and genetic data for assessing the population structure of *Aedes aegypti*. *Infection, Genetics and Evolution*.
- Xi, Z., Ramirez, J.L., Dimopoulos, G., 2008. The *Aedes aegypti* toll pathway controls dengue virus infection. *PLoS Pathogens* 4, e1000098.
- Zou, Z., Souza-Neto, J., Xi, Z., Kokoza, V., Shin, S.W., Dimopoulos, G., Raikhel, A., 2011. Transcriptome analysis of *Aedes aegypti* transgenic mosquitoes with altered immunity. *PLoS Pathogens* 7, e1002394.

11.2 Artigo a ser submetido à Revista *Parasites & Vectors***Kinetics of the ovarian infection of *Aedes aegypti* mosquitoes and its implication in the reproductive biology of the vector and dengue transmission.**

Danilo de Carvalho-Leandro<sup>1,2</sup>, Elisângela Santos Ferreira Dias<sup>2</sup>, Janaina Viana de Melo<sup>3</sup>, Duschinka Ribeiro Duarte Guedes<sup>2</sup>, Gabriel Bezerra Faienstein<sup>2</sup>, Maria Alice Varjal de Melo-Santos<sup>2</sup>, Cláudia Maria Fontes de Oliveira<sup>1,2</sup>, Regina Célia Bressan Queiroz de Figueiredo<sup>4</sup>, Constância Flávia Junqueira Ayres<sup>1,2</sup>

- 1- Departamento de Zoologia, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-graduação em Biologia Animal – Universidade Federal de Pernambuco.
- 2- Departamento de Entomologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – FIOCRUZ/PE.
- 3- Departamento de Microscopia. Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste – CETENE/MCTI
- 4- Departamento de Microbiologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – FIOCRUZ/PE.

**ABSTRACT**

**Background:** The mosquito *Aedes aegypti*, due to its importance in the transmission of dengue virus (DENV), has been studied for the comprehension of aspects related to vector competence. The ovaries, important organ involved in the reproduction of the vector and implied in the transovarial transmission, have been neglected in the analysis of the viral infection. In the light of this, the present study analyzed the kinetics of the ovarian infection, the transovarial transmission in the first filial generation, and evaluated if the presence of the virus in this organ implies in alterations in the reproductive biology in the vector as well.

**Methods:** Experiments of artificial infection were performed in laboratories by using a field population for the analysis of kinetics of ovarian infection to the 7<sup>th</sup>, 14<sup>th</sup>, 21<sup>st</sup> and 28<sup>th</sup> days post-infection (dpi) in two experimental groups: unique feeding (UF) and multiple feedings (MF). Analyses of transovarial transmission were conducted from the viral detection in male and female mosquitoes from the mosquitoes' eggs that received infected blood feeding. Experiments of fertility and fecundity have been conducted in females which had their meal with infected blood feeding and subsequently individualized for the eggs collection. In

addition, ovaries were collected and submitted to the process to histopathology and ultrastructural analysis.

**Results:** The positivity for DENV in the ovarian tissue were registered only at 14<sup>th</sup>, 21<sup>st</sup> and 28<sup>th</sup> dpi. The quantification of the viral load of the positive samples for the virus presented similar results, with the exception of 28<sup>th</sup> dpi in the MF group. The transovarial transmission in the first filial generation were registered only in males at 14<sup>th</sup> and 21<sup>st</sup> day after the emergency, with 13,3% and 20% of positivity respectively. In relation to the reproductive standards (fertility and fecundity) any difference had been observed. During the histopathology analysis, it was observed an invagination of the follicular epithelium of the oocytes of the infected group. Any alteration at a cellular level was observed in the ultrastructural analysis.

**Conclusions:** The ovarian infection and the transovarial transmission occur at reduced levels. Even in low levels, the viral quantification of the positive ovaries for the virus presented in this study is similar to the results found in studies in salivary glands, what shows that when the ovary is infected allows the virus replication in a significant way. This viral presence in the ovarian tissue, as it doesn't represent a significant loss in the reproductive biology of the vector, points out the importance of bigger investigations of transovarial transmission in the field studies.

**Key-words:** Transovarial transmission. Fertility. Fecundity. Histopathology. Ultrastructure.

Diseases which have in their cycles of transmission insects as vectors, have presented alarming taxes of mortality and morbidity in several regions in the world. It highlights, especially diseases like malaria, leishmaniasis, yellow fever and dengue fever, whose have mosquitoes or sand flies as vectors in the cycle of transmission. The World Health Organization (WHO) has shown that the number of cases of dengue has risen drastically in the last 50 years, been considered the most important viral disease in the world at the moment (WHO, 2012). Possessing as a main vector the *Aedes aegypti* mosquito, the four serotypes of the Dengue virus (DENV-1; DENV-2, DENV-3, DENV-4) are broadly spread in the tropical and subtropical regions of the earth, affecting about 100 million of people annually, and it can reach about 20% of severe clinical cases of the disease (BRADY et al., 2012; MURRAY et al., 2013; SIMMONS et al., 2012).

The main way of prevention and contention of the disease has been through the programs of control of vector mosquitoes, since there is no vaccine available (GUZMAN et

al., 2004; MURRAY et al., 2013). However, these programs have limited efficiency due to the complexity of urban environments where the disease occurs, the great resistance of populations of insects to several insecticides, in addition to exceptional adaptation of *Ae. aegypti* to the conditions of life in human populations (HALSTEAD, 2008; HEINTZE et al., 2007; MELO-SANTOS et al., 2010; REGIS; MONTEIRO; MELO-SANTOS; SILVEIRA; et al., 2008; STRODE et al., 2012).

The types of viral transmission in vector mosquitoes occur by horizontal and vertical transmission processes. In the first, a non-infected female can be infected from the blood feeding in a host previously infected by another female infected by the virus (HIGGS; BEATY, 2004). In the vertical transmission, the pathogen is transmitted from the female of the mosquito infected to their offspring, and it can be of the transovarial transmission (virus inside the egg) or transovum transmission (virus on the surface of the egg) (HIGGS; BEATY, 2004; LAMBRECHTS; SCOTT, 2009). The vertical transmission of the transovarial type, can occur when the virus invades the embryonic follicle infecting the embryo, or during the oviposition, where the virus is transmitted to the inside the eggs from the micropyle (opening of the egg) in the moment in which the eggs pass by the oviduct. The transmission of the type transovum, it occurs from the infection of the eggs with the virus in the moment of the oviposition, being deposited in the surface of the egg (HIGGS; BEATY, 2004).

Previous studies have shown that the various biological and epidemiological aspects of the viral transmission of the horizontal type in vector mosquitoes (BENNETT et al., 2005; BENNETT et al., 2002; BLACK et al., 2002; CARVALHO-LEANDRO et al., 2012; GUBLER et al., 1979; LAMBRECHTS et al., 2009; SALAZAR et al., 2007; SYLLA et al., 2009). Transovarial transmission has been neglected in the studies which involve aspects concerning the maintenance of the virus of the dengue in populations of mosquitoes. Little is known about the epidemiological importance of this type of transmission and the existing studies about the topic are directed to analysis of viral detection in mosquitoes which are resulted from the field eggs (ANGEL; JOSHI, 2008; CASTRO et al., 2004; GUEDES et al., 2010; GUNTHER et al., 2007; WASINPIYAMONGKOL et al., 2003).

Once epidemiological importance of the transovarial transmission is unclear, the majority of the programs of the vector mosquitoes control direct their actions against the larvae and adult mosquitoes. Little attention is directed to the eggs in the environment, as well as the effect of the viral infection in the ovarian tissue and the impact of this infection in the reproductive biology of the vector remains unknown.

In the light of this, the present study analyzed the kinetics of the infection of the female ovaries of the mosquito *Ae. aegypti* after the blood feeding infected by the DENV, as well as it investigated the presence of virus in the first filial generation of the infected mosquitoes. In addition to this, it was evaluated if the presence of virus in the ovaries provokes alterations in the reproductive standards of the female, and if the infected tissue might suffer histopathologic and ultrastructural alterations.

## MATERIAL AND METHODS

### *Establishment of Aedes aegypti population*

*Aedes aegypti* eggs were collected from ovitraps distributed throughout Petrolina City (9°23'55"S 40°30'03"W), located in the countryside of the State of Pernambuco, Brasil. Petrolina is located 700 kilometers away from the capital of the State of Pernambuco, Recife, having a low demographic density with 65 people/km<sup>2</sup>. The methodology of sampling followed criteria previously established (MINISTÉRIO-DA-SAÚDE, 2008). The choice of this population was due to the vector competence rates registered in study developed by Carvalho-Leandro *et al.* (2012), once that high rates of viral dissemination in Petrolina strain were registered in this study, registering 100% of positivity for the presence of the dengue virus in salivary glands and faty body of *Ae. aegypti* female after 21 days post-infection.

### *Artificial infection with DENV-2*

Eggs of *Ae. aegypti* from Petrolina (F<sub>3</sub>) were water-immersed for the hatching of larvae. The larvae were grown in standard conditions of creation (300 larvae L1 in a tray with 2 liters of water and 2g of cat food Friskies – Purina®) till the emergence of the adults. The adults were kept in cages of creation for five days to allow the *ad libitum* copulation. Females 6 days-old were separated in small plastic cages, with 300 females each. On the third day after the separation, the females were submitted to artificial feeding.

For the feeding, Dengue virus serotype 2 (DENV-2) 3808 strain (GenBank ID: EU25969) was used. This strain was isolated of the patient during a dengue outbreak in the city of Recife in 1995. The artificial feeding apparatus and the methodology used to artificial infections following the proceedings described previously by Carvalho-Leandro *et al.* (CARVALHO-

LEANDRO et al., 2012). After an hour of feeding, the mosquitoes were anesthetized at 4°C and putted in petri dish on the ice for the removal of insects which haven't been fed. The engorged females were transferred to cages and kept in laboratory in conditions of humidity, photoperiod, and controlled temperature (70-80% of humidity and 12 h: 12 h dark: light cycle, 26± 2°C). This artificial infection procedure was conducted in triplicate for each analysis. The viral titration was completed from titration trial with the revelation by peroxidase in C6/36 cells (DAS et al., 2007; MOURA et al., 2015; SANTOS et al., 2013).

#### *Kinetics of the ovarian infection*

The ovaries were dissected from the females at the 3<sup>rd</sup>, 7<sup>th</sup>, 15<sup>th</sup>, 21<sup>st</sup> and 28<sup>th</sup> days post-infection for the analysis of the kinetics of the ovarian infection. For this analysis, two experimental groups were analyzed: unique feeding (UF) and multiple feeding (MF). These experimental groups were conducted to simulate natural situations of feeding in the field. The group UF, in order to simulate a female which completes only a blood repast in infected host and after doesn't complete any other blood feeding for the minimum of 21 days, and the group MF, simulating a female with several blood repasts, being only one in infected host and other subsequent in non-infected hosts. In this way, the UF group completed only one infected blood feeding in laboratory and the MF group fed the first time in infected blood feeding and twice more in mouse (*Mus musculus*) anesthetized with intraperitoneal ketamine chloridrate injection (10%) and xylazine chloridrate (2%)

The procedure of anesthesia was achieved according to a preconized protocol by the Ethics Committee in the Use of Animals (ECUA – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães). The additional feedings in mouse of MF group were completed in the 8<sup>th</sup> and 15<sup>th</sup> dpi. Approximately 15 mosquitos were collected per time point in each one of the three replicates/group. The organs were dissected in PBS 1X (Phosphate-Buffered Saline), under microscope stereoscopic, in petri dish appropriately cleaned with ethanol 70% and RNase away (Invitrogen®). Each organ was washed in three drops of PBS 1X to avoid contamination with haemolymph and/or faty body of the insect, avoiding in this way false-positive ones. The collected samples were individualized in microtubes containing 300 uL of PBS 1X sterile and kept at -80°C for RNA extraction and viral quantification by quantitative real-Time PCR (qPCR).

### *RNA Extraction*

The collected ovaries were homogenized with pestle in automatic equipment (Pellet Pestle<sup>®</sup> Motor). 150 µL from the sample were used for RNA extraction with Trizol reagent (Invitrogen). After extraction, the RNA was resuspended in 50 µL of ultrapure water, and afterwards submitted to treatment with TURBO DNase<sup>®</sup> (Ambion), following the protocol of the producer.

### *Quantification of DENV by quantitative real-time PCR (qPCR)*

The number of viral copies in each sample of ovary from the collected mosquitoes was determined by qPCR. The analyzed organs were from the samples of the ovary of infected UF and MF groups collected in different days post-infection (3<sup>rd</sup>, 7<sup>th</sup>, 15<sup>th</sup>, 21<sup>st</sup>, and 28<sup>th</sup> dpi). The gene for the viral quantification was the *NS5*, concerning the protein non-structural 5 of the virus. In each plate of reaction of absolute qPCR, a standard curve was used with dilutions serialized of transcript of *NS5* amplified and purified *in vitro*. QuantiTect<sup>®</sup> SYBR Green RT-PCR<sup>®</sup> (Quiagen) was used for the reactions of qPCR *one-step*, with the first step referring to reverse transcription reaction and the second of real-time PCR. Primers used for detection and quantitation of *NS5* gene were: Fw: 5'-GGAAGGAGAAGGACTGCACA-3' and Rev: 5'-ATTCTTGTGTCCCATCCTGCT-3' (KONG et al., 2006). The numbers of viral copies were determined by the formulae used in the study developed by Kong *et al.* (2006).

The variation of the number of viral copies of dpi positive in groups UF and MF was compared through the Kruskal-Wallis ANOVA test. It was also analyzed, for the same test, the variation of viral quantification among the samples of all positive dpi.

### *Viral detection in the first filial generation*

Mosquitos of the infected group, after artificial DENV-blood feeding, were stored in cages with two oviposition sites for the collection of eggs concerning to the first filial generation. The oviposition sites were constituted from two plastic containers of 50 mL, containing 20 mL of grass infusion at 30% each one. As the substrate of oviposition, it was used absorbent filter paper. Every five days, the females were fed back in mouse anesthetized according the procedure previously described. The places of oviposition were moved at 7<sup>th</sup>,

14<sup>th</sup>, 21<sup>st</sup> and 28<sup>th</sup> dpi totalizing four moments of egg collection. Eggs corresponding at the 21<sup>st</sup> dpi were water-immersed the hatching and liberation of larvae in the first stage (L<sub>1</sub>).

The larvae were grown in insectary and the mosquitoes, after emergence, were stored in cages. At 3<sup>rd</sup>, 7<sup>th</sup>, 14<sup>th</sup>, 21<sup>st</sup>, 28<sup>th</sup>, and 35<sup>th</sup> days post-emergence (dpe), the mosquitoes were collected and sacrificed by freezing at -20°C. In every time point of the collection, a total of five pools with three males were collected and stored in microtubes of 1,5 mL, containing 500 µL of sterile PBS 1X. In the same time points of the collection, other five pools with three females were collected. Exclusively in the pools of females, the heads were separated from the body by dissection and were stored in corresponding pools for the heads and bodies. In this way each pool with three females originated two separated pools contained three heads and another with three bodies.

This procedure of separation of the bodies from the heads aimed at understanding in which moment after the emergence the female of the first filial generation from the females which received the blood infected feeding is likely to be widespread in the body of the insect, becoming this female, a potential infectant. All this collection procedure was done in triplicate. The pools were stored at -80°C and afterwards, the samples were homogenized with pistle. After that, the samples were centrifuged for the separation of the supernatant at 2500 rpm for five minutes at 4°C. 50 µL of the supernatant of each pool were conducted to the immunosorbent assay for the detection of DENV-2 by the kit *Platelia Dengue NS1 Ag.* (BioRad®). The assay was performed following the producer's recommendations.

#### *Analysis of the viral infection effect in the reproductive standards of the females*

Females of the infected group and control after artificial blood feeding were individualized in cages having one oviposition site. The oviposition sites consisted of plastic containers of 50 mL, containing 20 mL of grass infusion at 30% and a wood porous paddle, with the dimensions of 5cm x 2,5cm for serving of the substrate for the oviposition. Six days after the artificial feeding, the paddles were removed from the individual cages and replaced by a new one. On the 8<sup>th</sup> day after the artificial feeding, the females were fed back in anesthetized mouse. This feeding was to become possible the blood supply and checking the production of eggs on the second gonadotrophic cycle of the female. At the 14<sup>th</sup> dpi, the same procedure of paddle removing was repeated for collecting the eggs in the next cycle was added inside the cages. At the 15<sup>th</sup> dpi the females were fed back in anesthetized mouse for

providing blood supply for the third gonadotrophic cycle. At the 21<sup>st</sup> dpi the paddle were removed from the cages and the surviving females were sacrificed.

It was analyzed a total of 60 females per group, in experiments done in triplicate. The referring eggs to the oviposition of each female, for paddle and in each gonadotrophic cycle, were counted and the tax of fecundity achieved from the total number of eggs produced by the females in each cycle. After having counted the eggs, the paddles were individually immersed in grass infusion at 30 % in order to allow the hatching and liberation of larvae L<sub>1</sub>. The larvae L1 were counted, allowing, in this way, the data collection of the fertility. This analysis of fertility was completed for each set of collected eggs by female in each gonadotrophic cycle.

In order to analyze the viral infection effect in the reproductive standards of the females, we used the data quantitative of eggs (fecundity) and larvae (fertility) and we applied the ANOVA test with repetitive measurements. In order to analyze the existence of a correlation between number of produced eggs and the number of larvae which hatched, we used the Correlation of Pearson analysis.

#### *Histopathology and Ultrastructure*

Females of infected groups and control, after blood feeding, were submitted to the process for histopathology and ultrastructural analysis. The insects were sacrificed in ethanol 70% at 14<sup>th</sup> dpi and submitted afterwards to the dissection of head and abdomen. Only the mosquitoes of the infected group had their heads collected, as they were used to indicate the viral dissemination of the insect. Their heads were stored in ultrapure water and submitted to total RNA extraction and assay of qPCR for the detection and viral quantification.

The abdomens of the infected groups and control were fixed in neutrally buffered formalin solution 4% for 24 h. After that, the samples were submitted to a crescent of dehydration series with ethanol (70%, 80%, 90% and 2x 100%) and diaphanization in xylol PA (2x).

In the sequence, the samples were included in paraffin. Serial slices of 3 µm were done in HYRAX M 55 (Zeiss<sup>®</sup>) microtome. The slices were submitted to the procedure of coloration based on hematoxylin and eosin. The samples were visualized in inverted microscope DM500 (Leica<sup>®</sup>) connected to a system of capitation of images *Leica Application Suite Version 2.0.0* (Leica<sup>®</sup>) (magnification of 100x, 400x, 1000x). In the infected group, only

the abdomens which corresponded to mosquitoes with head positive for the DENV-2 were analyzed. In the control group, all the abdomens were analyzed.

For the ultra-structural analysis, the same procedure of the collection of heads from the infected ones and viral detection/quantification was done. Female ovaries of the infected group and control were fixed in solution which contained glutaraldehyde 2.5%, paraformaldehyde 4% in sodium cacodylate buffer 0,1M, pH 7.2 for 24 hours. The samples were washed in the same buffer and post-fixed for 1 hour in osmium tetroxide 1%, *potassium ferrocyanide* 0.8% and calcium chloride 5 mM in cacodylate buffer 0.1 M, pH 7.2. After being washed in the same buffer, the tissues were submitted to the contrast process in block with uranyl acetate 5% for an hour. After the contrast, the organs were washed in distilled water and afterwards dehydrated in crescent series of acetone and included in *Epoxy Embedding Medium*<sup>®</sup> (Sigma) resin. Ultrathin sections of 70 nm were added in ultramicrotome EM UC6 (Leica<sup>®</sup>) and stained with uranyl acetate 5% and lead citrate 1%. The observations were performed in electronic microscope of transmission (MORGAGNI<sup>®</sup>, FEI – 80kV).

## RESULTS

### *Kinetics of the ovarian infection and DENV-2 quantification*

After RNA extraction from the samples of ovaries collected in different days post-infection (3<sup>rd</sup>, 7<sup>th</sup>, 14<sup>th</sup>, 21<sup>st</sup> and 28<sup>th</sup>) in two experimental groups UF and MF, we had results of kinetics of ovarian infection. The viral titer of the samples used for the artificial feeding in each of the three biological replicates is summarized in Table 1. In the two groups UF and MF on 3<sup>rd</sup> and 7<sup>th</sup> dpi it was not registered any positive ovary among all the samples analyzed (Fig. 1A and 2A). The viral quantification of the samples of the group UF, after conducting the tests by qPCR, presented quite similar results among the positive samples. Significant differences were not registered between the viral quantification of the ovaries from females of the UF group in the three stages of the collection which presented positive subjects ( $p=0.0478$   $f=6.081$ ). These data can be observed in Figure 1B.

For the group MF (Figure 2B), the data of viral quantification of the positive samples presented significant difference between positive subjects at 14<sup>th</sup> and 21<sup>st</sup> dpi when compared to the positive subjects at 28<sup>th</sup> dpi ( $p=0.0180$   $f=8.039$ ). No variation statistically significant

was observed in the analysis of viral quantification between the samples of each day of the collection for the two groups, UF and MF ( $p= 0.3006$   $f= 6.05$ )

#### *Viral detection on the first filial generation*

A total of 90 pools of males and 180 pools of females (90 pools of head and 90 pools of body) were analyzed in the different time points (Table 2). From this total, registers for the presence of DENV-2 in the first filial generation occurred only in male mosquitoes with two positive pools collected at 14<sup>th</sup> dpe (13,3% of positivity) and three positive pools collected at 21<sup>st</sup> dpe (20% of positivity). All the positive pools were referred to the third experiment, with viral titer of  $1.0 \times 10^6$  FFU/mL.

#### *Analysis of the effect of viral infection in the reproductive standards from the females*

The oviposition analysis from the females isolated individually after the blood feeding with infected blood, results of fertility and fecundity were achieved, presented in the Figure 2A and 2B, respectively. It was observed that the group that achieved the blood repast in infected blood with DENV-2, produced eggs equally to the control group ( $p=0.6327$ ;  $df$  3).

After the immersion of these eggs in grass infusion at 30%, for the analysis of fertility from the number of larvae L<sub>1</sub>, it wasn't registered any significant difference between the quantity of larvae produced between the infected group and control ( $p=0.4248$ ;  $df$ : 3). In the evaluation of the correlation between the quantitative of larvae which hatched and its relation with the number of eggs, it was observed a correlation statistically significant in the different gonadotrophic cycles, with a reduced number of produced eggs at the third cycle, when compared to the first and second cycles. ( $r^2$ : 0.8376;  $p<0.00$ ).

#### *Histopathology and Ultrastructure*

The viral quantification of samples of heads analyzed by qPCR varied from  $4.3 \times 10^5$  to  $3.0 \times 10^7$  copies of RNA. For the infected group, only the mosquitoes which had the confirmation of viral presence in their heads were analyzed in histopathological and ultrastructural analysis. The given images from the histological slices showed an alteration in the follicular epithelium of the oocyte, presenting invaginations in the group which received

infected blood feeding. (Figures 4A, B and C) In the control group, any invagination was observed (Figures 4D, E and F). In the ultrastructural analysis, any alteration was observed when we compared the infected group (Figure 5A) with the control group (Figure 5B).

## DISCUSSION

The data displayed in our study showed that the ovaries of the females of *Ae. aegypti*, are infected by dengue virus lately, with reduced infection rates. When we compared the rates of the ovarian infection obtained in this study to infection rates of other organs, such as midgut, faty body and salivary glands, we realized that this organ is not one of the main targets in the infection. In a study developed by Carvalho-Leandro *et al* (2012), with the same population and isolated viral used in this study, high rates of infection of the midgut, faty body and salivary glands were observed, differing clearly from the infection rates registered for the ovary in this study.

All of ovaries positive for the dengue virus presented quite similar viral. This same similarity was observed in other infected organs from this population, as it was published previously (CARVALHO-LEANDRO *et al.*, 2012). Only in ovaries at 28<sup>th</sup> dpi of the group of the MF presented a significant variation in the viral quantification, when compared to the samples of the other moments in the analysis. This group, at 28<sup>th</sup> dpi, presented a number of viral particles quite reduced when compared to other observed samples. We believe that, the females which achieved several blood repasts, as the one observed here, in different gonadotrophic cycles, may lay infected eggs between the 21<sup>st</sup> and 28<sup>th</sup> dpi, after having achieved ovipositions corresponding to the three gonadotrophic cycles.

Thus, these females might have released a great number of infected eggs in the different cycles, reducing the number of infected oocytes in the ovaries, once the blood feeding was available several times. Moreover, at the 28<sup>th</sup> dpi of the MF, it was registered a percentage of positivity of only 15% of the ovaries from the females analyzed. This validates the idea of those females had oviposited infected eggs between the 21<sup>st</sup> and 28<sup>th</sup> dpi contributing for the reduction of percentage of positivity of the females in this stage of analysis. Another reason related to the reduction of viral quantity in the ovaries at 28<sup>th</sup> dpi, might have related to the expression of genes of immune response and genes involved in the apoptotic pathway in this organ.

Studies about *Ae. aegypti* from field and DENV-interaction has shown that different populations of mosquitoes respond in a distinct way to the serotypes/genotypes of the virus (ANDERSON; RICO-HESSE, 2006; BENNETT et al., 2005; BENNETT et al., 2002; CARVALHO-LEANDRO et al., 2012; GUBLER et al., 1979; LAMBRECHTS et al., 2009; LOURENCO-DE-OLIVEIRA et al., 2004; MOURA et al., 2015; SALAZAR et al., 2007). Some authors attribute to the midgut the main responsibility for the contention of the viral dissemination and consequently the infection of the salivary glands, due to midgut infection barrier and midgut escape barrier (BARILLAS-MURY et al., 2004; BEATY; MARQUARDT, 1996b; BEERNTSEN et al., 2000b; OCAMPO et al., 2013; SALAZAR et al., 2007). It is believed that in the viral infection cycle in the mosquito, after having overcome these barriers, the virus migrates to the several organs of the body of the insect, especially the salivary gland (BARILLAS-MURY et al., 2004; MARQUARDT, 2004). We realized that even the Petrolina strain, with the infection rates for the dengue virus of 100% in the salivary glands registered in the previous study (CARVALHO-LEANDRO et al., 2012), the virus when escape of the midgut, can't infect the ovary in a very efficient way, different from its capacity of infection in the salivary glands, as observed by Carvalho-Leandro *et al.* (2012), with the study of the same population and the viral serotype used in this study. Recently, Moura *et al.* (2015), observed the variation in the vector competence of *A. aegypti* from Cabo Verde, in Africa, in infections with DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4, and showed important differences in the responses of the vector to the different serotypes. While the DENV-4 registered infection only in the midgut, the DENV-2 e DENV-3 presented high rates of infection of salivary glands, while for the DENV-1, it was observed infection only for the midgut and head. These data enhance, once more, the importance of the midgut as important organ in the infection process.

Some studies present the pathways of signalization Toll (RAMIREZ; DIMOPOULOS, 2010; XI et al., 2008), JAK-STAT (SOUZA-NETO et al., 2009) and the mechanism of RNA interference (CARVALHO-LEANDRO et al., 2012; SANCHEZ-VARGAS et al., 2009) performed an important response antiviral in mosquitoes. Beyond these ways, it was observed the involvement of the apoptotic pathway, and its relation with the different susceptibility of the populations of mosquitoes to the DENV (OCAMPO et al., 2013). Faced with it, we believe that the studied of the differential expression of genes of immune response might have achieved at the ovarian level, in order to search the comprehension of mechanisms involved in the antiviral response in this organ.

Additionally, we evaluate as important an additional analysis at the proteomic level in order to understand the responses for the dengue virus at the ovarian level. In a study developed by Angel *et al.* (2008), the authors analyzed the association of a protein ovarian of 200 kD with the transovarial transmission in a population of mosquitoes from Rajasthan in India. These authors suggest the involvement of this protein with the modulation of infection in the ovary, but they don't do their characterization.

The viral titers used in the experiments of the artificial infection conducted in this study, varied from  $6.5 \times 10^5$  FFU/mL to  $4.0 \times 10^6$  FFU/mL. These titers are in accordance with the viral titers necessary to infect mosquitoes and become them vector competent (NGUYET *et al.*, 2013). Apart from this, we used an isolated viral from the same state of the population of mosquito submitted to the infection, which demonstrates the possibility of a close relationship between the viral genotype x genotype of the mosquito (GxG). This relation GxG has been presented as fundamental for the success in the infection of the mosquito by DENV (FANSIRI *et al.*, 2013; LAMBRECHTS, 2010; LAMBRECHTS *et al.*, 2009; LAMBRECHTS; SCOTT, 2009). Therefore, we evaluated that our analysis of ovarian infection, present results that might be reflecting in a quite approximately way to the field reality, since that beyond using an isolated viral collected in the same state of the population of mosquito, once we had characterized previously this population as competent for DENV-2 3808 (CARVALHO-LEANDRO *et al.*, 2012).

Studies which search estimate transovarial transmission rates to the different arbovirus in the nature has been published, though all of them had a focus in the collection of eggs of mosquitoes by oviposition traps, collection of the larvae and pupae in containers which accumulate water in the field, or even by aspiration of the adult mosquitoes (ANGEL; JOSHI, 2008; ARUNACHALAM *et al.*, 2008; CHEN *et al.*, 2010; FLORES *et al.*, 2010; GUEDES *et al.*, 2010; GUNTHER *et al.*, 2007; JOSHI *et al.*, 2002; JOSHI *et al.*, 1996; KHIN; THAN, 1983; KOW *et al.*, 2001; LIOTTA *et al.*, 2005; URDANETA *et al.*, 2005; WASINPIYAMONGKOL *et al.*, 2003; WOODRING *et al.*, 1998).

The transovarial infection rates for DENV in these studies, in a general way, have been registered with the variation between 0 to 3% of the positivity for the DENV in analyzed samples. Only studies about the collection of mosquitoes in houses of the patients previously detected with dengue, registered transovarial infection rates more expressive when they are

compared to the other studies, with numbers that may vary from 10 to 13% (GUEDES et al., 2010; URDANETA et al., 2005).

In our study, in the analysis of the viral presence on the first filial generation coming from females which received infected feeding, we could observe that only infected males at 14<sup>th</sup> and 21<sup>st</sup> day after the emergence, with 13,3% and 20% of positivity, respectively.

This shows that the transovarial transmission is an event really of rare occurrence. As only males were positive for the viral presence, we signalized that future and more detailed studies about the viral venereal transmission in the F1 should be conducted, for a better comprehension of this type of infection. Once males of F1 are infected, the virus may, in this way, pass to F2 from the infection of the females for the copulation. We also call the attention for the fact of the viral transovarial transmission has occurred only in an experiment which registered the biggest viral title of the three analyzed replicates ( $1,0 \times 10^6$  FFU/mL). This suggests that the transovarial transmission happens only when high viral titles are available at the moment of feeding.

In relation to the analysis about the possible interference of the virus in the fecundity and fertility of the females which received infected feeding, our data show that there isn't any relation between the viral presence and the alterations in the reproductive standards of the female. It was observed that the production of the eggs and larvae in the infected groups and control were quite similar, and they haven't presented any significant alteration. These results are different of the published data by Josi *et al.* (2002), who evaluated the presence of DENV-3 in seven filial generations (F<sub>1</sub>-F<sub>7</sub>) with transovarial infection rates which varied from 2.4 to 13%. In the mosquitoes of F<sub>7</sub>, the authors evaluated the standards of fecundity and fertility of the population and observed the presence of virus influenced in the production and viability of the eggs. We pointed out that the viral isolated used by Josi *et al.* (2002) in the experiments of intrathoracic injection of the mosquitoes was the DENV-3, isolated in the year of 1963 in Thailand and submitted to 21 passages by culture of mouse cells.

On the other hand, in our study, this influence of the presence of the virus in the reproductive standards was not found and we can presume this difference of results to factors like the following: 1) the fact of using a population collected in field and kept in laboratory only for three generations, ensuring this way characteristics of a field population, 2) The viral isolated used is from the same state that a field population of evaluated mosquitoes, 3) the virus can be of other serotype (DENV-2) and it hasn't been submitted to the various infections in culture of cells, what makes that the virus alters some mechanisms of the cell

invasion and viral replication, 4) the methodology of infection of mosquitoes be based on oral infection, allowing that the infection barriers of the mosquito act, modulating the infection of the virus in the vector.

The fact of we observed that there is no influence in the presence of the virus in the reproductive standards of the female has considerable importance epidemiologic, once the mosquitoes are the main way of remaining of virus in the field. Infected females did not present any disadvantage in relation to the healthy females. These data are consistent with the theories which mention the vector-parasite co-evolution (LAMBRECHTS, 2010; LAMBRECHTS et al., 2009), since it is not interesting for a parasite, to cause important damage to its vector, mainly to the ones which could take to a reproductive alteration and resulting reduction of population (MARQUARDT, 2004).

Studies suggest that the microflora of the adult mosquito is critic as to influence in the transmission of human pathogenic agents (BIAN et al., 2010; CIRIMOTICH et al., 2011; DEMAIO et al., 1996; KAMBRIS et al., 2010; MOREIRA et al., 2009; MOUSSON et al., 2010; RAMIREZ et al., 2012). Ramirez *et al.* (2012), observed a sharp decline in the susceptibility to the infection by DENV when the mosquitoes had bacterial species in the midgut. Gaio *et al.* (2011), in a study with microbiota in the midgut of *Ae. aegypti* showed a reduction in the production and viability of the eggs in mosquitoes which had a reduction in the intestinal microbiota from the treatment with antibiotics.

Other two studies with the endosymbiont bacteria *Wolbachia* (BIAN et al., 2010; MOREIRA et al., 2009) show that the presence of this microorganism inhibits the viral replication, since the basal immunity of the mosquito is stimulated by the bacteria, from the activation of the mechanisms antimicrobial with the production of effector molecules. Accordingly, we hoped that with the presence of virus in the blood used in the mosquitoes, the immune system of vector from the viral and recognition and consequent activation of the antivirals mechanism would produce effector molecules that other than operate over the virus could be reducing the number of bacteria and finally interfere in the production of eggs. Nevertheless, the relationship of viral presence and reduction of eggs was not observed, showing that the virus does not affect reproductive standards in females.

The images obtained in our histopathological analysis, which show invaginations in the follicular epithelium of the oocytes of the infected group, point out an alteration which could partially be involved with a reduction of the production of eggs. The results showed that the morphology of the oocyte of the infected group is clearly different when compared

with the morphology of the control group. However, the effect of this alteration in the production and viability of the eggs was not observed.

It was justified with the ultrastructural analysis, which showed that there are no differences in the cell standards from the tissue analyzed, resulting, possibly in physiologic standards unaltered with the viral presence. This shows, once more, the existence of a close adaptation vector-parasite.

Generally, we believe that the data presented here draw the people's attention for the important aspects of the transovarial transmission. Even that in low rates, and the occurrence registered in this study only in male mosquitoes, the transovarial transmission occurs and should not be disregarded. We suggest that, in the methodologies of investigation in the transovarial transmission rates in the field, a bigger attention considering the sexing of the collected insects should be achieved. We understand as fundamental the analysis of viral detection in pools of males and in pools of females, separately. Additionally, we believe that a rise in the number of pools analyzed of males should be considered. In a study developed by Guedes *et al.* (2010), which investigated the rates of mosquitoes (adult and eggs) with DENV collected in houses of patients confirmed with dengue fever in the city of Recife, the sexing was properly carried out, but the analysis and the presentation of data referred to transovarial transmission was made without presenting the positivity for DENV in the different sexes.

The eggs present in the breeding grounds may help in the maintenance of viral presence in the populations of mosquitoes, given that the ovarian infection were registered on the 14<sup>th</sup> day post-infection and kept, even though that in low rates till the 28<sup>th</sup> day post-infection. We reforce once more the necessity of a better investigation of the mechanisms involved in the modulation of the viral infection at the ovarian level. A better analysis of this organ, in future studies aimed especially at understanding of antiviral ways, and will be able to help the searches which involve the production of transgenic insects and consequently, new possibilities of strategies of vector control.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

We would like to thank the technical team of insectary of the Research Center Aggeu Magalhães for the help in the procedures of feeding and maintenance of the colony during the experiments. We would also like to thank the PDTIS/FIOCRUZ, for the technical support concerning the analysis of real-time PCR and electronic microscopy of transmission and the

Department of Microscopy of CETENE/MCT, for the technical support in the process and analysis of the samples at the ultrastructural and histopathology levels.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, M. D. *et al.* The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. Science, v. 287, n. 5461, p. 2185-2195, 2000.

AGAISSE, H.PERRIMON, N. The roles of JAK/STAT signaling in *Drosophila* immune responses. Immunol Rev, v. 198, p. 72-82, 2004.

ANDERSON, J. R.RICO-HESSE, R. *Aedes aegypti* vectorial capacity is determined by the infecting genotype of dengue virus. Am J Trop Med Hyg, v. 75, n. 5, p. 886-892, 2006.

ANGEL, B.JOSHI, V. Distribution and seasonality of vertically transmitted dengue viruses in *Aedes* mosquitoes in arid and semi-arid areas of Rajasthan, India. J Vector Borne Dis, v. 45, n. 1, p. 56-59, 2008.

ANGEL, B.; SHARMA, K.; JOSHI, V. Association of ovarian proteins with transovarial transmission of dengue viruses by *Aedes* mosquitoes in Rajasthan, India. Indian J Med Res, v. 128, n. 3, p. 320-323, 2008.

ANTONOVA, Y. *et al.* The role of NF-kappaB factor REL2 in the *Aedes aegypti* immune response. Insect Biochem Mol Biol, v. 39, n. 4, p. 303-314, 2009.

ARAUJO, A. P. *et al.* The susceptibility of *Aedes aegypti* populations displaying temephos resistance to *Bacillus thuringiensis israelensis*: a basis for management. Parasit Vectors, v. 6, n. 1, p. 297, 2013.

ARBOUZOVA, N. IZEIDLER, M. P. JAK/STAT signalling in *Drosophila*: insights into conserved regulatory and cellular functions. Development, v. 133, n. 14, p. 2605-2616, 2006.

ARUNACHALAM, N. *et al.* Natural vertical transmission of dengue viruses by *Aedes aegypti* in Chennai, Tamil Nadu, India. Indian J Med Res, v. 127, n. 4, p. 395-397, 2008.

AYRES, C. E. *et al.* Genetic structure of natural populations of *Aedes aegypti* at the micro- and macrogeographic levels in Brazil. J Am Mosq Control Assoc, v. 20, n. 4, p. 350-356, 2004.

AYRES, C. F. *et al.* Genetic differentiation of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), the major dengue vector in Brazil. J Med Entomol, v. 40, n. 4, p. 430-435, 2003.

BARILLAS-MURY, C.; PASKEWITZ, S.; KANOST, M. R. Immune Responses of Vectors. In: MARQUARDT, W. C. (Ed.). Biology of disease vectors. Burlington: Elsevier Academic Press, 2004. Cap.27. p. 363-376.

BEATY, B. J.MARQUARDT, W. C. The Biology of Disease Vectors. Niwot: University Press of Colorado, 1996a.

BEATY, B. J. MARQUARDT, W. C. The Biology of disease vectors. Niwot: University Press of Colorado, 1996b.

BEERNTSEN, B. T.; BARTHOLOMAY, L. C.; LOWERY, R. J. Penetration of the mosquito midgut is not required for *Brugia pahangi* microfilariae to avoid the melanotic encapsulation response of *Armigeres subalbatus*. Vet Parasitol, v. 144, n. 3-4, p. 371-374, 2007.

BEERNTSEN, B. T.; JAMES, A. A.; CHRISTENSEN, B. M. Genetics of mosquito vector competence. Microbiology and Molecular Biology Reviews, v. 64, n. 1, p. 115-137, 2000a.

BEERNTSEN, B. T.; JAMES, A. A.; CHRISTENSEN, B. M. Genetics of mosquito vector competence. Microbiol Mol Biol Rev, v. 64, n. 1, p. 115-137, 2000b.

BENNETT, K. E.; BEATY, B. J.; BLACK, W. C. T. Selection of D2S3, an *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) strain with high oral susceptibility to Dengue 2 virus and D2MEB, a strain with a midgut barrier to Dengue 2 escape. J Med Entomol, v. 42, n. 2, p. 110-119, 2005.

BENNETT, K. E. *et al.* Variation in vector competence for dengue 2 virus among 24 collections of *Aedes aegypti* from Mexico and the United States. Am J Trop Med Hyg, v. 67, n. 1, p. 85-92, 2002.

BEST, S. M. Viral subversion of apoptotic enzymes: escape from death row. Annu Rev Microbiol, v. 62, p. 171-192, 2008.

BIAN, G. *et al.* The endosymbiotic bacterium *Wolbachia* induces resistance to dengue virus in *Aedes aegypti*. PLoS Pathog, v. 6, n. 4, p. e1000833, 2010.

BICOUT, D. J.; CHALVET-MONFRAY, K.; SABATIER, P. Infection persistence time of *Aedes* breeding habitats. Physia A, v. 305, p. 597-603, 2002.

BLACK IV, W. C. SEVERSON, D. Genetics of Vector Competence. In: MARQUARDT, W. C. (Ed.). Biology of disease vectors. Burlington: Elsevier Academic Press, 2005. Cap.30.

BLACK, W. C. T. *et al.* Flavivirus susceptibility in *Aedes aegypti*. Arch Med Res, v. 33, n. 4, p. 379-388, 2002.

BLANDIN, S. A. LEVASHINA, E. A. Phagocytosis in mosquito immune responses. Immunol Rev, v. 219, p. 8-16, 2007.

BOWERS, D. F.; COLEMAN, C. G.; BROWN, D. T. Sindbis virus-associated pathology in *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). J Med Entomol, v. 40, n. 5, p. 698-705, 2003.

BRADY, O. J. *et al.* Refining the global spatial limits of dengue virus transmission by evidence-based consensus. PLoS Negl Trop Dis, v. 6, n. 8, p. e1760, 2012.

BRAGAVALLE. *Aedes aegypti*: histórico e controle no Brasil. Epidemiologia e Serviços de Saúde, v. 16, p. 113-118, 2007a.

BRAGAVALLE. *Aedes aegypti*: vigilância, monitoramento da resistência e alternativas de controle no Brasil. Epidemiol. Serv. Saúde, v. 16, n. 4, p. 295-302, 2007b.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Programa Nacional do Controle de Dengue**. Brasília - 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Nota Técnica: Uso do larvicida Diflubenzuron (PM25%) para controle de *Aedes aegypti***. Brasília - 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Nota Técnica: Isolamento do sorotipo DENV 4 em Roraima / Brasil**. Roraima - 2010.

BRUMMELKAMP, T. R.; BERNARDS, R.; AGAMI, R. Stable suppression of tumorigenicity by virus-mediated RNA interference. Cancer Cell, v. 2, n. 3, p. 243-247, 2002.

BULET, P. *et al.* Antimicrobial peptides in insects; structure and function. Dev Comp Immunol, v. 23, n. 4-5, p. 329-344, 1999.

CALEGARI, F. *et al.* Tissue-specific RNA interference in postimplantation mouse embryos with endoribonuclease-prepared short interfering RNA. Proc Natl Acad Sci U S A, v. 99, n. 22, p. 14236-14240, 2002.

CAMPBELL, C. L. *et al.* *Aedes aegypti* uses RNA interference in defense against Sindbis virus infection. BMC Microbiol, v. 8, p. 47, 2008.

CARDOSO JR, R. P. S., S. A. S.; MELLO, N. V.; ERNANDES, S.; BOTTI, M. V.; NASCIMENTO, E. M. M. . Detecção de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* na zona urbana do município de Catanduva-SP, após controle de epidemia de dengue. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 30, p. 37-40, 1997.

CARVALHO-LEANDRO, D. *et al.* Immune transcript variations among *Aedes aegypti* populations with distinct susceptibility to dengue virus serotype 2. Acta Trop, v. 124, n. 2, p. 113-119, 2012.

CASTILLO, J. C.; ROBERTSON, A. E.; STRAND, M. R. Characterization of hemocytes from the mosquitoes *Anopheles gambiae* and *Aedes aegypti*. Insect Biochem Mol Biol, v. 36, n. 12, p. 891-903, 2006.

CASTRO, M. G. *et al.* Dengue virus detection by using reverse transcription-polymerase chain reaction in saliva and progeny of experimentally infected *Aedes albopictus* from Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 99, n. 8, p. 809-814, 2004.

CHAPMAN, R. F. The insects: structure and function. 4. ed. Cambridge: Cambridge University, 1999.

CHEN, C. F. *et al.* Screening of dengue virus in field-caught *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) by one-step SYBR green-based reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay during 2004-2007 in Southern Taiwan. Vector Borne Zoonotic Dis, v. 10, n. 10, p. 1017-1025, 2010.

CHEVILLON, C. *et al.* The Chikungunya threat: an ecological and evolutionary perspective. Trends Microbiol, v. 16, n. 2, p. 80-88, 2008.

CIRIMOTICH, C. M. *et al.* Natural microbe-mediated refractoriness to Plasmodium infection in Anopheles gambiae. Science, v. 332, n. 6031, p. 855-858, 2011.

CIRIMOTICH, C. M. *et al.* Mosquito immune defenses against Plasmodium infection. Dev Comp Immunol, v. 34, n. 4, p. 387-395, 2010.

CLARKE, T. E. CLEM, R. J. Insect defenses against virus infection: the role of apoptosis. Int Rev Immunol, v. 22, n. 5-6, p. 401-424, 2003.

CLEMENTS, A. N. The biology of mosquitoes. London: Chapman e Hall, 1992.

CLEMENTS, A. N. The Biology of mosquitoes. London: Chapman and Hall, 1999.

COLOGNA, R.; ARMSTRONG, P. M.; RICO-HESSE, R. Selection for virulent dengue viruses occurs in humans and mosquitoes. J Virol, v. 79, n. 2, p. 853-859, 2005.

CONSOLI, R. A. G. B. OLIVEIRA, R. L. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 1994.

COOK, S. HOLMES, E. C. A multigene analysis of the phylogenetic relationships among the flaviviruses (Family: Flaviviridae) and the evolution of vector transmission. Arch Virol, v. 151, n. 2, p. 309-325, 2006.

DAS, S. *et al.* Protocol for dengue infections in mosquitoes (*A. aegypti*) and infection phenotype determination. J Vis Exp, n. 5, p. 220, 2007.

DEMAIO, J. *et al.* The midgut bacterial flora of wild *Aedes triseriatus*, *Culex pipiens*, and *Psorophora columbiae* mosquitoes. Am J Trop Med Hyg, v. 54, n. 2, p. 219-223, 1996.

DIMOPOULOS, G. Insect immunity and its implication in mosquito-malaria interactions. Cell Microbiol, v. 5, n. 1, p. 3-14, 2003.

DOSTERT, C. *et al.* The Jak-STAT signaling pathway is required but not sufficient for the antiviral response of drosophila. Nat Immunol, v. 6, n. 9, p. 946-953, 2005.

FANSIRI, T. *et al.* Genetic mapping of specific interactions between *Aedes aegypti* mosquitoes and dengue viruses. PLoS Genet, v. 9, n. 8, p. e1003621, 2013.

FIRE, A. *et al.* Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. Nature, v. 391, n. 6669, p. 806-811, 1998.

FLORES, F. S. *et al.* Vertical Transmission of St. Louis Encephalitis Virus in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) in Cordoba, Argentina. Vector Borne Zoonotic Dis, 2010.

FORATTINI, O. P. Entomologia Médica. São Paulo: Edusp, 1962.

FORATTINI, O. P. Culicidologia Médica. São Paulo: Edusp, 2002.

FRAGKLOUDIS, R. *et al.* Advances in dissecting mosquito innate immune responses to arbovirus infection. J Gen Virol, v. 90, n. Pt 9, p. 2061-2072, 2009.

GAIO ADE, O. *et al.* Contribution of midgut bacteria to blood digestion and egg production in *aedes aegypti* (diptera: culicidae) (L.). Parasit Vectors, v. 4, p. 105, 2011.

GALIANA-ARNOUX, D. *et al.* Essential function in vivo for Dicer-2 in host defense against RNA viruses in *drosophila*. Nat Immunol, v. 7, n. 6, p. 590-597, 2006.

GARVER, L. S.; DONG, Y.; DIMOPOULOS, G. Caspar controls resistance to *Plasmodium falciparum* in diverse anopheline species. PLoS Pathog, v. 5, n. 3, p. e1000335, 2009.

GEORGEL, P. *et al.* *Drosophila* immune deficiency (IMD) is a death domain protein that activates antibacterial defense and can promote apoptosis. Dev Cell, v. 1, n. 4, p. 503-514, 2001.

GIRARD, Y. A. *et al.* Ultrastructural study of West Nile virus pathogenesis in *Culex pipiens quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). J Med Entomol, v. 42, n. 3, p. 429-444, 2005.

GOULD, E. A. *et al.* Potential arbovirus emergence and implications for the United Kingdom. Emerg Infect Dis, v. 12, n. 4, p. 549-555, 2006.

GRATZ, N. G. Critical review of the vector status of *Aedes albopictus*. Med Vet Entomol, v. 18, n. 3, p. 215-227, 2004.

GUBLER, D. J. Dengue and dengue hemorrhagic fever: its history and resurgence as a global public health problem. In: GUBLER, D. J.; KUNO, G. (Ed.). Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. New York: CAB International, 1997. Cap.1. p. 1-22.

GUBLER, D. J. Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. Trends Microbiol, v. 10, n. 2, p. 100-103, 2002.

GUBLER, D. J. KUNO, G. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. New York: CAB International, 1997.

GUBLER, D. J. MARKOFF, L. Flavivirus. In: KNIPE, D. M. H.; HOWLEY, P. M. (Ed.). Fields Virology. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007.

GUBLER, D. J. *et al.* Variation in susceptibility to oral infection with dengue viruses among geographic strains of *Aedes aegypti*. Am J Trop Med Hyg, v. 28, n. 6, p. 1045-1052, 1979.

GUBLER, D. J. K., G.; MARKOFF, L. Flaviviruses. In: KINEPE, D. M. H., P. M. (Ed.). Fields Virology. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. Cap.34.

GUEDES, D. R. *et al.* Patient-based dengue virus surveillance in *Aedes aegypti* from Recife, Brazil. J Vector Borne Dis, v. 47, n. 2, p. 67-75, 2010.

GUNTHER, J. *et al.* Evidence of vertical transmission of dengue virus in two endemic localities in the state of Oaxaca, Mexico. Intervirology, v. 50, n. 5, p. 347-352, 2007.

GUZMAN, M. G. KOURI, G. Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas: lessons and challenges. J Clin Virol, v. 27, n. 1, p. 1-13, 2003.

GUZMAN, M. G.; MUNE, M.; KOURI, G. Dengue vaccine: priorities and progress. Expert Rev Anti Infect Ther, v. 2, n. 6, p. 895-911, 2004.

HALSTEAD, S. B. Dengue. Lancet, v. 370, n. 9599, p. 1644-1652, 2007.

HALSTEAD, S. B. Dengue virus-mosquito interactions. Annu Rev Entomol, v. 53, p. 273-291, 2008.

HARRINGTON, L. C. *et al.* Dispersal of the dengue vector *Aedes aegypti* within and between rural communities. Am. J. Trop. Med. Hyg., v. 72, n. 2, p. 209-220, 2005.

HEINTZE, C.; GARRIDO, M. V.; KROEGER, A. What do community-based dengue control programmes achieve? A systematic review of published evaluations. Trans R Soc Trop Med Hyg, v. 101, n. 4, p. 317-325, 2007.

HENGARTNER, M. O. The biochemistry of apoptosis. Nature, v. 407, n. 6805, p. 770-776, 2000.

HIGGS, S. BEATY, B. J. Natural cycles of vector-borne pathogens. In: MARQUARDT, W. C. (Ed.). Biology of disease vectors. Burlington: Elsevier Academic Press, 2004.

HILLYER, J. F. CHRISTENSEN, B. M. Mosquito phenoloxidase and defensin colocalize in melanization innate immune responses. J Histochem Cytochem, v. 53, n. 6, p. 689-698, 2005.

HILLYER, J. F.; SCHMIDT, S. L.; CHRISTENSEN, B. M. Hemocyte-mediated phagocytosis and melanization in the mosquito *Armigeres subalbatus* following immune challenge by bacteria. Cell Tissue Res, v. 313, n. 1, p. 117-127, 2003.

HOFFMANN, J. A. The immune response of *Drosophila*. Nature, v. 426, n. 6962, p. 33-38, 2003.

HOFFMANN, J. A. REICHHART, J. M. *Drosophila* innate immunity: an evolutionary perspective. Nat Immunol, v. 3, n. 2, p. 121-126, 2002.

HOLLAND, J. *et al.* Rapid evolution of RNA genomes. Science, v. 215, n. 4540, p. 1577-1585, 1982.

HOLMES, E. C.; WOROBEY, M.; RAMBAUT, A. Phylogenetic evidence for recombination in dengue virus. Mol Biol Evol, v. 16, n. 3, p. 405-409, 1999.

HOLMES, E. C. W., M.; RAMBAUT, A. Phylogenetic Evidence for Recombination in Dengue Virus. Mol. Biol. Evol., v. 16, n. 3, p. 405-409, 1999.

HOLT, R. A. *et al.* The genome sequence of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. Science, v. 298, n. 5591, p. 129-149, 2002.

HONORIO, N. A. *et al.* Dispersal of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in an urban endemic dengue area in the State of Rio de Janeiro, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 98, n. 2, p. 191-198, 2003.

JOSHI, V.; MOURYA, D. T.; SHARMA, R. C. Persistence of dengue-3 virus through transovarial transmission passage in successive generations of *Aedes aegypti* mosquitoes. Am J Trop Med Hyg, v. 67, n. 2, p. 158-161, 2002.

JOSHI, V.; SINGHI, M.; CHAUDHARY, R. C. Transovarial transmission of dengue 3 virus by *Aedes aegypti*. Trans R Soc Trop Med Hyg, v. 90, n. 6, p. 643-644, 1996.

JOY, D. A. *et al.* Local adaptation and vector-mediated population structure in *Plasmodium vivax* malaria. Mol Biol Evol, v. 25, n. 6, p. 1245-1252, 2008.

KAMBRIS, Z. *et al.* *Wolbachia* stimulates immune gene expression and inhibits plasmodium development in *Anopheles gambiae*. PLoS Pathog, v. 6, n. 10, p. e1001143, 2010.

KEENE, K. M. *et al.* RNA interference acts as a natural antiviral response to O'nyong-nyong virus (Alphavirus; *Togaviridae*) infection of *Anopheles gambiae*. Proc Natl Acad Sci U S A, v. 101, n. 49, p. 17240-17245, 2004.

KHIN, M. M. THAN, K. A. Transovarial transmission of dengue 2 virus by *Aedes aegypti* in nature. Am J Trop Med Hyg, v. 32, n. 3, p. 590-594, 1983.

KHOO, C. C. *et al.* The RNA interference pathway affects midgut infection- and escape barriers for Sindbis virus in *Aedes aegypti*. BMC Microbiol, v. 10, p. 130, 2010.

KIM, T. KIM, Y. J. Overview of innate immunity in *Drosophila*. J Biochem Mol Biol, v. 38, n. 2, p. 121-127, 2005.

KINEPE, D. M. H., P. M. . Fields Virology. 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007.

KNIFE, D. M. H. HOWLEY, P. M. Fields Virology. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007.

KONG, Y. Y. *et al.* Rapid detection, serotyping and quantitation of dengue viruses by TaqMan real-time one-step RT-PCR. J Virol Methods, v. 138, n. 1-2, p. 123-130, 2006.

KOW, C. Y.; KOON, L. L.; YIN, P. F. Detection of dengue viruses in field caught male *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Singapore by type-specific PCR. J Med Entomol, v. 38, n. 4, p. 475-479, 2001.

KUHN, R. J. *et al.* Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. Cell, v. 108, n. 5, p. 717-725, 2002.

LAMBRECHTS, L. Dissecting the genetic architecture of host-pathogen specificity. PLoS Pathog, v. 6, n. 8, p. e1001019, 2010.

LAMBRECHTS, L. *et al.* Genetic specificity and potential for local adaptation between dengue viruses and mosquito vectors. BMC Evol Biol, v. 9, p. 160, 2009.

LAMBRECHTS, L. SCOTT, T. W. Mode of transmission and the evolution of arbovirus virulence in mosquito vectors. Proc Biol Sci, v. 276, n. 1660, p. 1369-1378, 2009.

LAVINE, M. D. STRAND, M. R. Insect hemocytes and their role in immunity. Insect Biochem Mol Biol, v. 32, n. 10, p. 1295-1309, 2002.

LEMAITRE, B. HOFFMANN, J. The host defense of *Drosophila melanogaster*. Annu Rev Immunol, v. 25, p. 697-743, 2007.

LEMAITRE, B. *et al.* A recessive mutation, immune deficiency (*imd*), defines two distinct control pathways in the *Drosophila* host defense. Proc Natl Acad Sci U S A, v. 92, n. 21, p. 9465-9469, 1995.

LEMAITRE, B. *et al.* The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. Cell, v. 86, n. 6, p. 973-983, 1996.

LEMAITRE, B.; REICHHART, J. M.; HOFFMANN, J. A. *Drosophila* host defense: differential induction of antimicrobial peptide genes after infection by various classes of microorganisms. Proc Natl Acad Sci U S A, v. 94, n. 26, p. 14614-14619, 1997.

LIMA, E. P. *et al.* Insecticide resistance in *Aedes aegypti* populations from Ceara, Brazil. Parasit Vectors, v. 4, p. 5, 2011.

LIOTTA, D. J. *et al.* Molecular detection of dengue viruses in field caught *Aedes aegypti* mosquitoes from northeastern Argentina. Rev Latinoam Microbiol, v. 47, n. 3-4, p. 82-87, 2005.

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. Methods, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

LOURENCO-DE-OLIVEIRA, R. *et al.* *Aedes aegypti* in Brazil: genetically differentiated populations with high susceptibility to dengue and yellow fever viruses. Trans R Soc Trop Med Hyg, v. 98, n. 1, p. 43-54, 2004.

LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. *et al.* *Aedes aegypti* in Brazil: genetically differentiated populations with high susceptibility to dengue and yellow fever viruses. Trans R Soc Trop Med Hyg, v. 98, n. 1, p. 43-54, 2004.

LOURENCO DE OLIVEIRA, R. *et al.* Large genetic differentiation and low variation in vector competence for dengue and yellow fever viruses of *Aedes albopictus* from Brazil, the United States, and the Cayman Islands. Am J Trop Med Hyg, v. 69, n. 1, p. 105-114, 2003.

LOZOVEL, A. L. Culicídeos (Mosquitos). In: MARCONDES, C. B. (Ed.). Entomologia Médica e Veterinária. SãoPaulo: Atheneu, 2001. Cap.6. p. 59-104.

MAGALHAES, T.; LEANDRO, D. C.; AYRES, C. F. Knock-down of REL2, but not defensin A, augments *Aedes aegypti* susceptibility to *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. Acta Trop, v. 113, n. 2, p. 167-173, 2010.

MARQUARDT, W. C. Biology of disease vectors. Burlington: Elsevier Academic Press, 2004.

MCARTHUR, M. A.; SZTEIN, M. B.; EDELMAN, R. Dengue vaccines: recent developments, ongoing challenges and current candidates. Expert Rev Vaccines, v. 12, n. 8, p. 933-953, 2013.

MEDEIROS, L. C. C. *et al.* Modeling the dynamic transmission of dengue Fever: investigating disease persistence. PLoS Negl Trop Dis, v. 5, n. 1, p. e942, 2011.

MEISTER, S. *et al.* Immune signaling pathways regulating bacterial and malaria parasite infection of the mosquito *Anopheles gambiae*. Proc Natl Acad Sci U S A, v. 102, n. 32, p. 11420-11425, 2005.

MELLO, C. C. CONTE, D., JR. Revealing the world of RNA interference. Nature, v. 431, n. 7006, p. 338-342, 2004.

MELO-SANTOS, M. A. *et al.* Resistance to the organophosphate temephos: mechanisms, evolution and reversion in an *Aedes aegypti* laboratory strain from Brazil. Acta Trop, v. 113, n. 2, p. 180-189, 2010.

MINISTÉRIO-DA-SAÚDE. Rede Nacional de Monitoramento da Resistência de *Aedes aegypti* a inseticidas (Rede MoReNAa): metodologia de amostragem. Brasília - 2008.

MOITA, L. F. *et al.* In vivo identification of novel regulators and conserved pathways of phagocytosis in *A. gambiae*. Immunity, v. 23, n. 1, p. 65-73, 2005.

MOREIRA, L. A. *et al.* A *Wolbachia* symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with dengue, Chikungunya, and Plasmodium. Cell, v. 139, n. 7, p. 1268-1278, 2009.

MOURA, A. J. F. *et al.* Vector competence of the *Aedes aegypti* population from Santiago Island, Cape Verde, to different serotypes of dengue virus. Parasites & Vectors, v. 8, p. 114, 2015.

MOUSSON, L. *et al.* *Wolbachia* modulates Chikungunya replication in *Aedes albopictus*. Mol Ecol, v. 19, n. 9, p. 1953-1964, 2010.

MUIR, L. E. KAY, B. H. *Aedes aegypti* survival and dispersal estimated by mark-release-recapture in northern Australia. Am J Trop Med Hyg, v. 58, n. 3, p. 277-282, 1998.

MURRAY, N. E.; QUAM, M. B.; WILDER-SMITH, A. Epidemiology of dengue: past, present and future prospects. Clin Epidemiol, v. 5, p. 299-309, 2013.

NAPOLI, C.; LEMIEUX, C.; JORGENSEN, R. Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into *Petunia* Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. Plant Cell, v. 2, n. 4, p. 279-289, 1990.

NENE, V. *et al.* Genome sequence of *Aedes aegypti*, a major arbovirus vector. Science, v. 316, n. 5832, p. 1718-1723, 2007.

NEWTON, E. A. REITER, P. A model of the transmission of dengue fever with an evaluation of the impact of ultra-low volume (ULV) insecticide applications on dengue epidemics. Am J Trop Med Hyg, v. 47, n. 6, p. 709-720, 1992.

NGUYET, M. N. *et al.* Host and viral features of human dengue cases shape the population of infected and infectious *Aedes aegypti* mosquitoes. Proc Natl Acad Sci U S A, v. 110, n. 22, p. 9072-9077, 2013.

NUNES, F. M. SIMOES, Z. L. A non-invasive method for silencing gene transcription in honeybees maintained under natural conditions. Insect Biochem Mol Biol, v. 39, n. 2, p. 157-160, 2009.

OCAMPO, C. B. *et al.* Differential expression of apoptosis related genes in selected strains of *Aedes aegypti* with different susceptibilities to dengue virus. PLoS One, v. 8, n. 4, p. e61187, 2013.

ORDONEZ-GONZALEZ, J. G. *et al.* The use of sticky ovitraps to estimate dispersal of *Aedes aegypti* in northeastern Mexico. J Am Mosq Control Assoc, v. 17, n. 2, p. 93-97, 2001.

OSANAI, C. H. *et al.* Surto de dengue em Boa Vista, Roraima. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, v. 25, n. 1, p. 53-54, 1983.

PAQUETTE, N. *et al.* Caspase-mediated cleavage, IAP binding, and ubiquitination: linking three mechanisms crucial for *Drosophila* NF-kappaB signaling. Mol Cell, v. 37, n. 2, p. 172-182, 2010.

RAFF, M. Cell suicide for beginners. Nature, v. 396, n. 6707, p. 119-122, 1998.

RAMIREZ, J. L. DIMOPOULOS, G. The Toll immune signaling pathway control conserved anti-dengue defenses across diverse *Ae. aegypti* strains and against multiple dengue virus serotypes. Dev Comp Immunol, v. 34, n. 6, p. 625-629, 2010.

RAMIREZ, J. L. *et al.* Reciprocal tripartite interactions between the *Aedes aegypti* midgut microbiota, innate immune system and dengue virus influences vector competence. PLoS Negl Trop Dis, v. 6, n. 3, p. e1561, 2012.

REGIS, L. *et al.* Developing new approaches for detecting and preventing *Aedes aegypti* population outbreaks: basis for surveillance, alert and control system. Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 103, n. 1, p. 50-59, 2008.

REGIS, L. *et al.* Developing new approaches for detecting and preventing *Aedes aegypti* population outbreaks: basis for surveillance, alert and control system. Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 103, n. 1, p. 50-59, 2008.

RODRIGUES, J. *et al.* Hemocyte differentiation mediates innate immune memory in *Anopheles gambiae* mosquitoes. Science, v. 329, n. 5997, p. 1353-1355, 2010.

ROSOMER, W. S. The vector alimentary system. In: BEATY, B. J.; MARQUARDT, W. C. (Ed.). The Biology of disease vectors. Niwot: University Press of Colorado, 1996.

RUSSELL, R. C. *et al.* Mark-release-recapture study to measure dispersal of the mosquito *Aedes aegypti* in Cairns, Queensland, Australia. Med Vet Entomol, v. 19, n. 4, p. 451-457, 2005.

SALAZAR, M. I. *et al.* Dengue virus type 2: replication and tropisms in orally infected *Aedes aegypti* mosquitoes. BMC Microbiol, v. 7, p. 9, 2007.

SANCHEZ-VARGAS, I. *et al.* Dengue virus type 2 infections of *Aedes aegypti* are modulated by the mosquito's RNA interference pathway. PLoS Pathog, v. 5, n. 2, p. e1000299, 2009.

SANCHEZ-VARGAS, I. *et al.* RNA interference, arthropod-borne viruses, and mosquitoes. Virus Res, v. 102, n. 1, p. 65-74, 2004.

SANTOS, J. J. *et al.* Construction and characterisation of a complete reverse genetics system of dengue virus type 3. Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 108, n. 8, p. 983-991, 2013.

Science. First New Dengue Virus Type in 50 Years. 2013. Disponível em: <<http://news.sciencemag.org/health/2013/10/first-new-dengue-virus-type-50-years>>. Acesso em: 27/01/2014.

SHIN, S. W. *et al.* REL1, a homologue of *Drosophila* dorsal, regulates toll antifungal immune pathway in the female mosquito *Aedes aegypti*. J Biol Chem, v. 280, n. 16, p. 16499-16507, 2005.

SILVA, V. C. *et al.* Diversidade de criadouros e tipos de imóveis frequentados por *Aedes albopictus* e *Aedes aegypti*. Rev Saude Publica, v. 40, n. 6, p. 1106-1111, 2006.

SIM, S.; DIMOPOULOS, G. Dengue virus inhibits immune responses in *Aedes aegypti* cells. PLoS One, v. 5, n. 5, p. e10678, 2010.

SIMMONS, C. P. *et al.* Dengue. N Engl J Med, v. 366, n. 15, p. 1423-1432, 2012.

SOUZA-NETO, J. A.; SIM, S.; DIMOPOULOS, G. An evolutionary conserved function of the JAK-STAT pathway in anti-dengue defense. Proc Natl Acad Sci U S A, v. 106, n. 42, p. 17841-17846, 2009.

STRODE, C. *et al.* Expression profile of genes during resistance reversal in a temephos selected strain of the dengue vector, *Aedes aegypti*. PLoS One, v. 7, n. 8, p. e39439, 2012.

SYLLA, M. *et al.* Gene Flow, Subspecies Composition, and Dengue Virus-2 Susceptibility among *Aedes aegypti* Collections in Senegal. PLoS Negl Trop Dis, v. 3, n. 4, p. e408, 2009.

TABACHNICK, W. J. *et al.* Oral infection of *Aedes aegypti* with yellow fever virus: geographic variation and genetic considerations. Am J Trop Med Hyg, v. 34, n. 6, p. 1219-1224, 1985.

TEMPORAO, J. G. *et al.* Dengue virus serotype 4, Roraima State, Brazil. Emerg Infect Dis, v. 17, n. 5, p. 938-940, 2011.

THORNBERRY, N. A. Caspases: key mediators of apoptosis. Chem Biol, v. 5, n. 5, p. R97-103, 1998.

TIMMONS, L. FIRE, A. Specific interference by ingested dsRNA. Nature, v. 395, n. 6705, p. 854, 1998.

TRPIS, M.; HAUSERMANN, W.; CRAIG, G. B., JR. Estimates of population size, dispersal, and longevity of domestic *Aedes aegypti aegypti* (Diptera: Culicidae) by mark-release-recapture in the village of Shauri Moyo in eastern Kenya. J Med Entomol, v. 32, n. 1, p. 27-33, 1995.

TSUDA, Y. *et al.* Movement of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) released in a small isolated village on Hainan Island, China. J Med Entomol, v. 38, n. 1, p. 93-98, 2001.

TWIDDY, S. S. HOLMES, E. C. The extent of homologous recombination in members of the genus *Flavivirus*. J Gen Virol, v. 84, n. Pt 2, p. 429-440, 2003.

TZOU, P.; REICHHART, J. M.; LEMAITRE, B. Constitutive expression of a single antimicrobial peptide can restore wild-type resistance to infection in immunodeficient *Drosophila* mutants. Proc Natl Acad Sci U S A, v. 99, n. 4, p. 2152-2157, 2002.

URDANETA-MARQUEZ, L. *et al.* Genetic Relationships among *Aedes aegypti* Collections in Venezuela as Determined by Mitochondrial DNA Variation and Nuclear Single Nucleotide Polymorphisms. Am. J. Trop. Med. Hyg., v. 78, n. 3, p. 479-491, 2008.

URDANETA, L. *et al.* Detection of dengue viruses in field-caught *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Maracay, Aragua state, Venezuela by type-specific polymerase chain reaction. Infect Genet Evol, v. 5, n. 2, p. 177-184, 2005.

VAIDYANATHAN, R. SCOTT, T. W. Apoptosis in mosquito midgut epithelia associated with West Nile virus infection. Apoptosis, v. 11, n. 9, p. 1643-1651, 2006.

VAUX, D. L. KORSMEYER, S. J. Cell death in development. Cell, v. 96, n. 2, p. 245-254, 1999.

VAZEILLE-FALCOZ, M. *et al.* Variation in oral susceptibility to dengue type 2 virus of populations of *Aedes aegypti* from the islands of Tahiti and Moorea, French Polynesia. Am J Trop Med Hyg, v. 60, n. 2, p. 292-299, 1999.

VAZEILLE, M. *et al.* Orally co-Infected *Aedes albopictus* from La Reunion Island, Indian Ocean, can deliver both dengue and chikungunya infectious viral particles in their saliva. PLoS Negl Trop Dis, v. 4, n. 6, p. e706, 2010.

VEGA-RUA, A. *et al.* High level of vector competence of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from ten American countries as a crucial factor in the spread of Chikungunya virus. J Virol, v. 88, n. 11, p. 6294-6306, 2014.

WASINPIYAMONGKOL, L. *et al.* Susceptibility and transovarial transmission of dengue virus in *Aedes aegypti*: a preliminary study of morphological variations. Southeast Asian J Trop Med Public Health, v. 34 Suppl 2, p. 131-135, 2003.

WEAVER, S. C. VASILAKIS, N. Molecular evolution of dengue viruses: contributions of phylogenetics to understanding the history and epidemiology of the preeminent arboviral disease. Infect Genet Evol, v. 9, n. 4, p. 523-540, 2009.

WHO. Global Strategy For Dengue Prevention And Control, 2012-2020. Geneva - 2012.

WOODRING, J. *et al.* Short report: Diapause, transovarial transmission, and filial infection rates in geographic strains of La Crosse virus-infected *Aedes triseriatus*. Am J Trop Med Hyg, v. 58, n. 5, p. 587-588, 1998.

XI, Z.; RAMIREZ, J. L.; DIMOPOULOS, G. The *Aedes aegypti* toll pathway controls dengue virus infection. PLoS Pathog, v. 4, n. 7, p. e1000098, 2008.

ZAMBON, R. A.; VAKHARIA, V. N.; WU, L. P. RNAi is an antiviral immune response against a dsRNA virus in *Drosophila melanogaster*. Cell Microbiol, v. 8, n. 5, p. 880-889, 2006.

ZHOU, L. *et al.* Michelob\_x is the missing inhibitor of apoptosis protein antagonist in mosquito genomes. EMBO Rep, v. 6, n. 8, p. 769-774, 2005.

## SUBTITLES OF TABLES AND FIGURES

**Table 1.** Viral titration of the aliquots of human blood with DENV-2 collected at the moment of the infected blood feeding, in different moments, for the several analyses.

**Figure 1. A:** Transovarial infection rates (%) from the Unique Feeding (UF) group in different days post-infection. Over the bars we can observe the number of females analyzed in each time point of collection and in parenthesis the number of females with the ovary positive for dengue virus. **B:** Viral quantification by quantitative real-time PCR (qPCR) of the positive samples of the group UF from the number of copies of the gene *NS5* in the samples with the standard curve. The bars show the standard deviation among the positive samples.

**Figure 2. A:** Transovarial infection rates (%) of the Multiple Feedings (MF) group in different days post- infection. Over the bars we can observe the number of females analyzed in each time point of collection and in parenthesis the number of females with the ovary positive for dengue virus. **B:** Viral quantification by quantitative real-time PCR (qPCR) of the positive samples of the group MF from the number of copies of the gene *NS5* in the samples with the standard curve. The bars show the standard deviation among the positive samples.  
a: no significant difference ( $p>0,05$ ) and b: with statistic difference ( $p<0.05$ ).

**Table 2.** Number of pools of male and female mosquitoes of the first filial generation ( $F_1$ ) analyzed for the viral presence on the 3<sup>rd</sup>, 7<sup>th</sup>, 14<sup>th</sup>, 21<sup>st</sup>, 28<sup>th</sup> and 35<sup>th</sup> day post-emergence. In the females, the observations were made in pools of body and head, separately. In the males, the analyses were carried out from the pools of the whole body. In parenthesis we can observe the number of positive pools for DENV-2. Analysis which refer to the three independent experiments with the variation of viral titer.

**Figure 3. A:** Number of eggs oviposited by each female analyzed in the infected groups and control in three different gonadotrophic cycles. **B:** Number of larvae in the first stage ( $L_1$ ) resulting of the hatch of the eggs of the females of the infected and control groups in three different gonadotrophic cycles. n: number of the females analyzed.

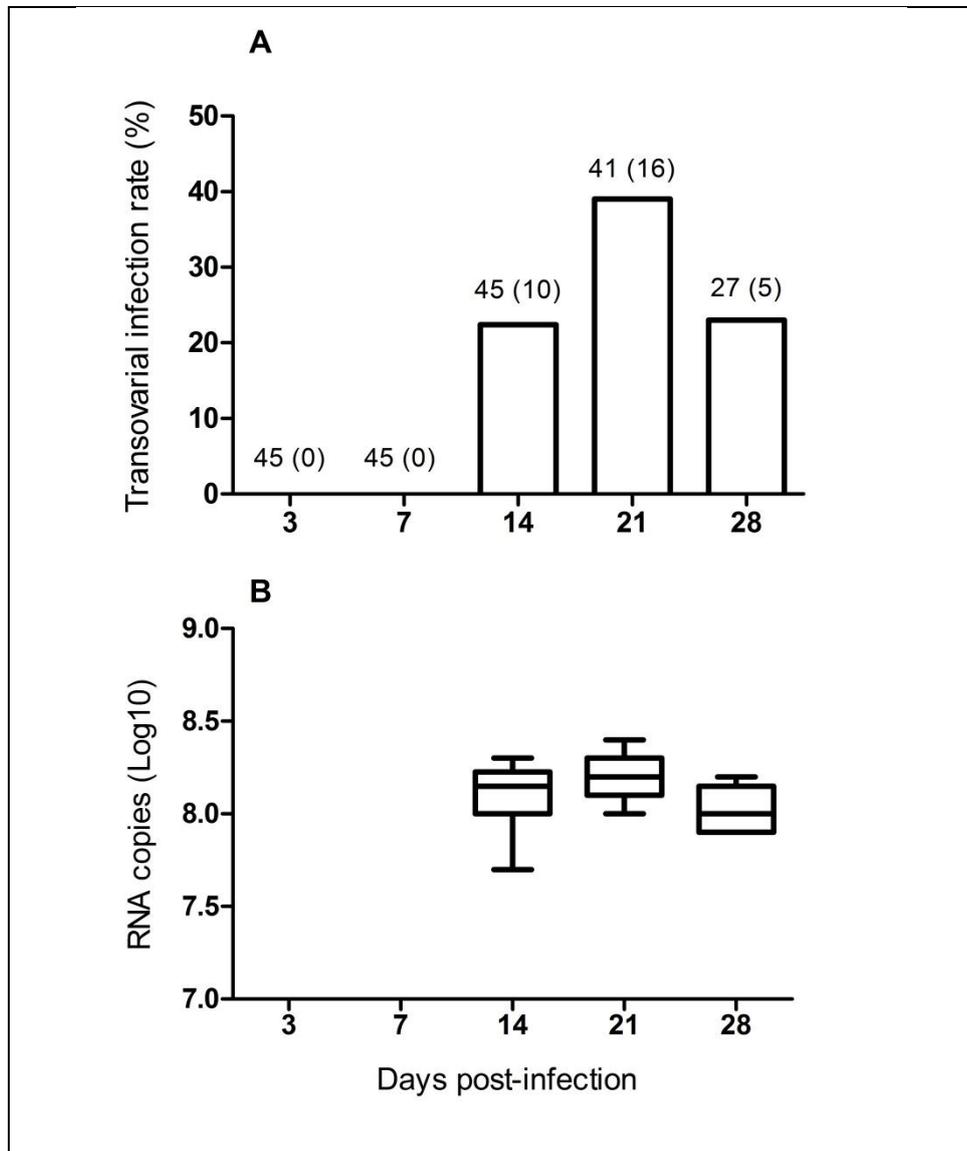
**Figure 4.** Histopathology of the sample of the ovary of the females of *Aedes aegypti*. A, B e C: infected group with invaginations in the follicular epithelium (arrow). D, E and F: control group with the follicular epithelium without presenting invaginations (arrow) OC: oocyte; MG: midgut; MT: Malpighian tubules; \*: ovarian sheath . Scale : A and D: 100 µm; B and E: 20 µm; C and F: 10 µm.

**Figure 5.** Ultrastructural analysis of ovaries of *Aedes aegypti* female artificially fed. **A:** Infected group and **B:**control group. Arrow: follicular epithelium; N: nucleo; NC nucleolo. Scale: 5 um

**TABLES AND FIGURES****Table 1.**

<b>Titration of DENV-2</b>	<b>Replica</b>	<b>Analyses</b>
1.5 x 10 <sup>6</sup> FFU/mL	1 <sup>a</sup>	Kinetics of ovarian infection
3.5 x 10 <sup>6</sup> FFU/mL	2 <sup>a</sup>	
2.0 x 10 <sup>6</sup> FFU/mL	3 <sup>a</sup>	
6.5 x 10 <sup>5</sup> FFU/mL	1 <sup>a</sup>	Fecundity and fertility
7.0 x 10 <sup>5</sup> FFU/mL	2 <sup>a</sup>	Transovarial infection rates (F <sub>1</sub> )
1.0 x 10 <sup>6</sup> FFU/mL	3 <sup>a</sup>	
4.0 x 10 <sup>6</sup> FFU/mL	1 <sup>a</sup>	Histopathological and ultrastructural

**Figure 1.**



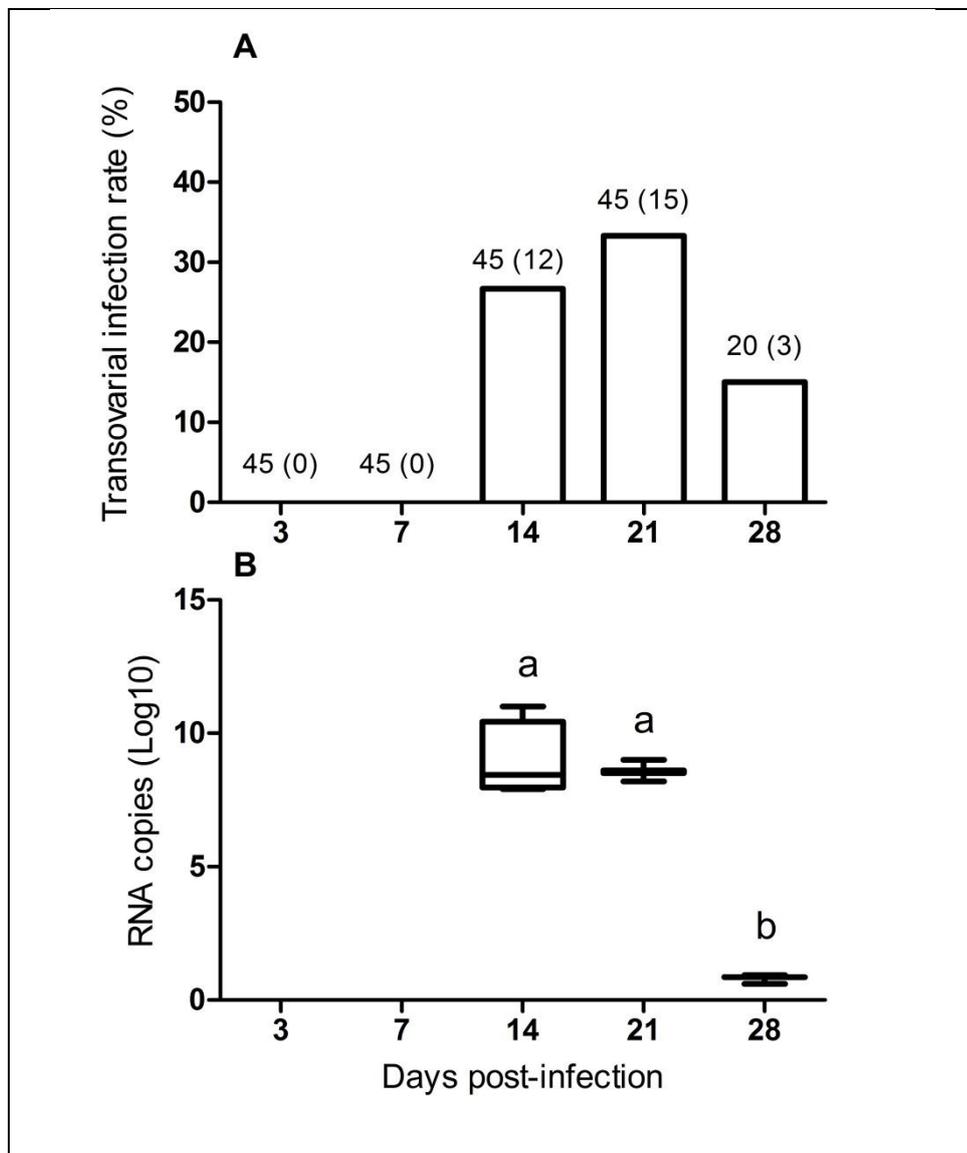
**Figure 2.**



Figure 3.

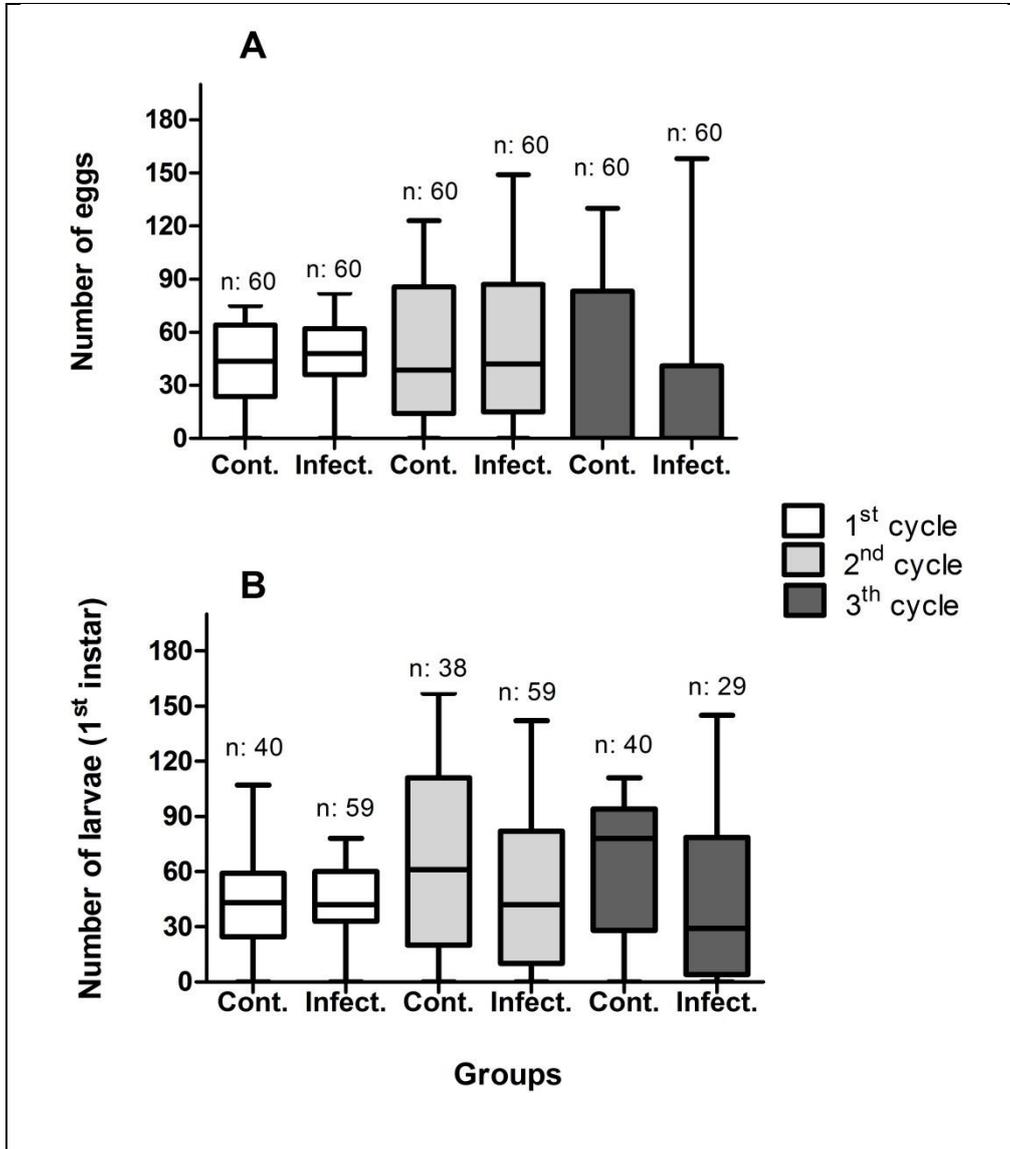
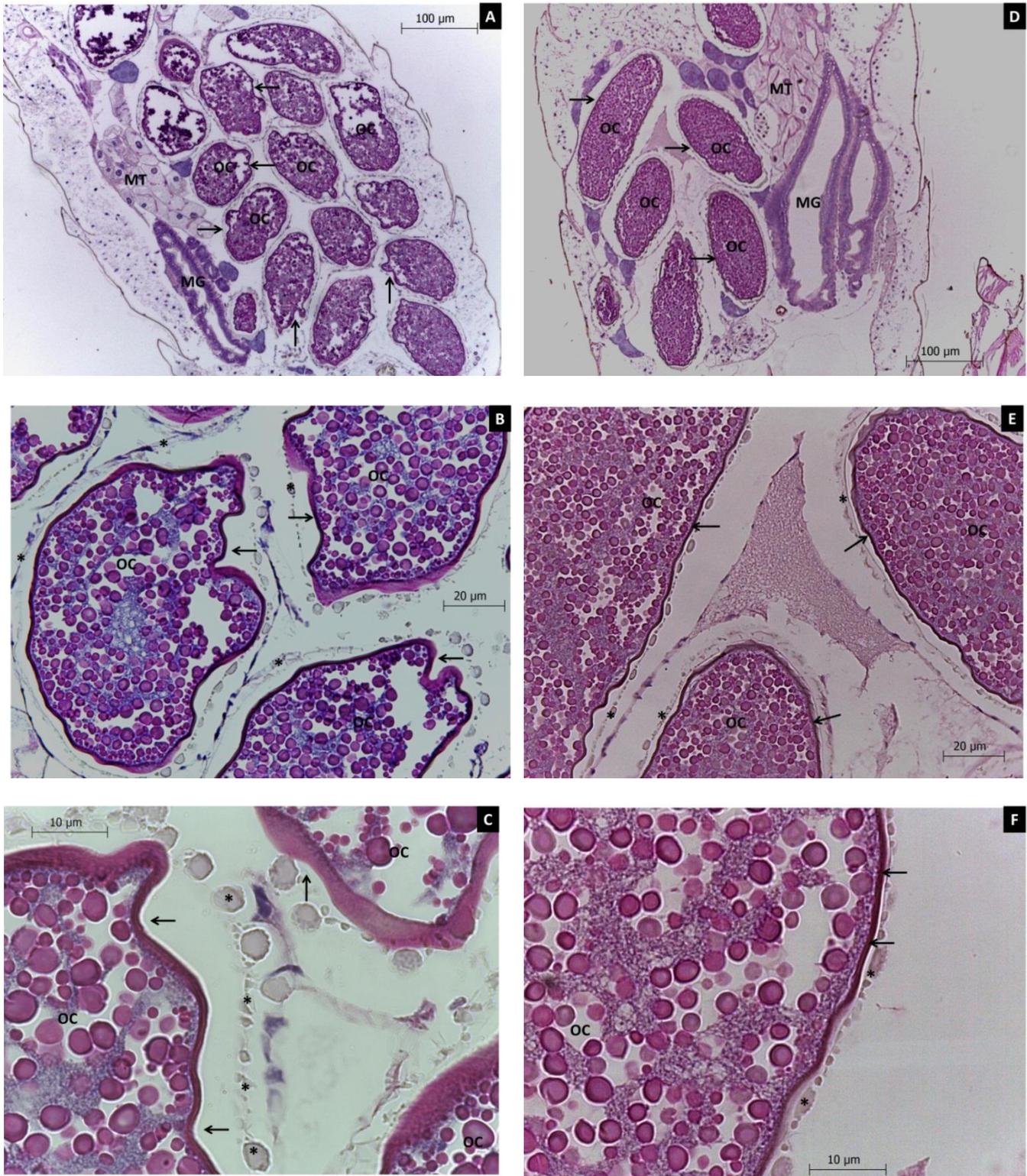


Figure 4.



**Figure 5.**

