

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

DANILO DE CARVALHO LEANDRO

ANÁLISE DA IMUNIDADE DE *Aedes aegypti* (DIPTERA: CULICIDAE)
AO VÍRUS DENGUE EM POPULAÇÕES DE CAMPO COM
COMPETÊNCIA VETORIAL DIFERENCIADA.

RECIFE
2011

DANILO DE CARVALHO LEANDRO

**ANÁLISE DA IMUNIDADE DE *Aedes aegypti* (DIPTERA: CULICIDAE)
AO VÍRUS DENGUE EM POPULAÇÕES DE CAMPO COM
COMPETÊNCIA VETORIAL DIFERENCIADA.**

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado Acadêmico em Biologia Animal, do Departamento de Zoologia da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Zoologia, na área de concentração de Zoologia Aplicada à Saúde Pública.

Orientadora: Dra. Constância Flávia Junqueira Ayres

Co-orientadora: Dra. Tereza Magalhães

**RECIFE
2011**

Leandro, Danilo de Carvalho

Análise da imunidade de *Aedes Aegypti* (Diptera: Culicidae) ao vírus dengue em populações de campo com competência vetorial diferenciada / Danilo de Carvalho Leandro. – Recife: O Autor, 2011.

79 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Constância Flávia Junqueira Ayres

Co-Orientadora: Tereza Magalhães

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Biologia Animal, 2011.

Inclui bibliografia

1. *Aedes Aegypti* 2. Dengue 3. Arboviroses I. Título.

595.77

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2011-109

DANILO DE CARVALHO LEANDRO

**ANÁLISE DA IMUNIDADE DE *Aedes aegypti* (DIPTERA: CULICIDAE) AO VÍRUS
DENGUE EM POPULAÇÕES DE CAMPO COM COMPETÊNCIA VETORIAL
DIFERENCIADA.**

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado Acadêmico em Biologia Animal, do Departamento de Zoologia da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Zoologia, na área de concentração de Zoologia Aplicada à Saúde Pública.

Apresentada em: 28/02/2011

BANCA EXAMINADORA:

Dra. Constância Flávia Junqueira Ayres (Orientadora)
Dept. Entomologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – FIOCRUZ

Dra. Tereza Magalhães (Co-orientadora)
Dept. Entomologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – FIOCRUZ

Dr. Marcos Henrique Ferreira Sorgine (1º Titular)
Dept. de Bioquímica Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ

Dra. Cleide Maria Ribeiro de Albuquerque (2º Titular)
Departamento de Zoologia/UFPE

Dra. Lêda Narcisa Regis (3º Titular)
Dept. Entomologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – FIOCRUZ

Dra. Maria Alice Varjal de Melo Santos (Suplente Externo)
Dept. Entomologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – FIOCRUZ

Dra. Cláudia Maria Fontes de Oliveira (Suplente Interno)
Dept. Entomologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – FIOCRUZ

**RECIFE
2011**

Pedras no caminho? Guardo todas, um dia construirei um castelo.
(Fernando Pessoa)

Dedico esse trabalho à:

Sávia Cristina Teixeira de Carvalho, Tereza Magalhães, e a Diego Fillipe de Souza, pessoas muito especiais em minha vida, que cada uma à sua forma, tiveram fundamental importância na finalização desse trabalho.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por ter me dado saúde e oportunidades de traçar meus caminhos em terras firmes, colocando sempre ao meu lado pessoas abençoadas que vem ajudando-me cotidianamente em minha caminhada.

À Constância Flávia Junqueira Ayres, pela confiança ao aceitar me orientar e pela atenção e disposição durante todo o processo de execução desse trabalho.

À Tereza Magalhães, grande amiga e mestre, que tem me ensinado a cada dia a ser um profissional melhor, não se cansando e nem negando esforços para lutar junto comigo nessa incansável jornada científica. Teca, a você meu agradecimento mais que especial, não só pela maravilhosa co-orientação em todas as etapas do projeto, mas também por ter acreditado em mim, quando ainda mal me conhecia, dando-me a oportunidade de aprender mais e mais sobre esse admirável mundo da biologia molecular. Muitíssimo obrigado!

À Duschinka Guedes, pelos momentos memoráveis de trabalho árduo e parceria nesse projeto. Duka, a você agradeço o companheirismo, os ombros e ouvidos amigos nos momentos difíceis. Agradeço aos saudáveis momentos de discussão sobre artigos, aos agradáveis e engraçados momentos na bancada e no infectório, aos sábados e domingos de dissecação, momentos estes, que com certeza, tornaram-se muito mais agradáveis devido à sua presença.

Às Dras. Maria Alice Varjal e Cláudia Fontes, que sempre estavam prontas para ajudar no que preciso fosse, não medindo esforços para a finalização do infectório. Além disso, agradeço o importantíssimo apoio no desenho experimental desse projeto, e aos preciosos conselhos nos trabalhos de insetário, como dicas no estabelecimento de populações de campo, criação de larvas e alimentação artificial.

À Dra. Marli Tenório, pelas importantes contribuições na parte de virologia molecular, e principalmente por ter cedido a cepa viral do vírus dengue usado nesse trabalho. Adicionalmente, agradeço à equipe do Laboratório de Virologia e Terapia Experimental (Lavitte) do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, e a chefia desse departamento, Dra.

Laura Gil, por ter cedido os equipamentos e as instalações do laboratório para a realização de todos os procedimentos experimentais na parte da virologia.

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. Em especial, agradeço à Dra. Cássia Docena, ao Dr. Carlos e a Viviane Carvalho, pelas diversas contribuições durante esse processo de feitura das PCRs em tempo real.

À Lincoln Suesdek, do Laboratório de Parasitologia do Instituto Butantan, São Paulo-SP, pela colaboração na parte das análises de morfometria geométrica alar desenvolvida neste estudo.

À Eloína Santos e Bruno Filgueiras, pela contribuição na feitura do mapa de localização geográfica das cidades.

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

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo financiamento do projeto.

Aos amigos do Departamento de Entomologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – FIOCRUZ, que sempre estiveram ao meu lado, apoiando no que fosse preciso, sempre tranquilizando-me com conselhos e palavras afáveis. Em especial agradeço à Tatyane Romão e Alessandra Albuquerque, que tiveram importância fundamental na etapa final desse projeto, entendendo minhas necessidades de silêncio para escrever, e ao mesmo tempo compartilhando nos momentos de pausa para o café, boas histórias e sinceras risadas.

À minha mãe, Sávia Carvalho, grande guerreira e meu porto seguro, sempre estando meu lado, em situações alegres e tristes, dando-me apoio, dispondo seu tempo para me ouvir, aconselhar e traçar planos de como fazer e acontecer. Agradeço ao meu pai, Sebastião Leandro, pelo apoio e por acreditar sempre em mim, trabalhando firme para garantir meus estudos na certeza de me assegurar um futuro promissor. Agradeço à minha querida e amada

irmã Geovanna Marcela e ao meu primo-irmão Murillo Henrique, ambos com sua alegria e carinho, sempre foram companheiros nos mais diversos momentos. Agradeço aos meus avós maternos, em especial à vó Edna, que esteve sempre junto de mim, mesmo que distante fisicamente, estendendo suas abençoadas mãos sempre. Agradeço em especial à Tia/Madrinha Rejane, pelo seu companheirismo, amizade e aconselhamentos. Adicionalmente, agradeço a toda a minha família, materna e paterna, pois sem eles eu não seria nada nem ninguém.

A todos os meus amigos de turma do mestrado, e em especial aos meus e mais novos irmãos zoólogos, Daiane Anzolin, Cecília Mayer, Camila Bione, Samuel Cardoso, Fernanda Oliveira e Liliane Amorim, que viveram comigo momentos únicos durante essa nossa caminhada do mestrado. Impossível apagar da memória os momentos de discussão sobre projetos, desenho experimental, revistas, *papers*, qualização, fator de impacto e outras coisas mais em ambientes inusitados, como bares, pizzarias, praias e shoppings. Queridos amigos, amo muito vocês e os carregarei no coração para sempre.

Aos amigos mais que especiais que fiz na cidade do Recife, especialmente a Diego Fillipe de Souza, Márcio Bezerra, Iwelton Madson, Leandro Vieira, Ademir Júnior, Jailton Cavalcante e Paulo Mesquita, que estiveram sempre junto a mim, entendendo minhas ausências e alterações de humor, formando a minha grande e adorável família recifense. Amigos de Recife, vocês são a base que me mantém firme para lutar aqui nessa terra maravilhosa. A vocês, meu muito obrigado!!!

LISTA DE ILUSTRAÇÕES E TABELAS

	Página
<i>Referencial Teórico</i>	
Figura 1. <i>Aedes aegypti</i> : A) Adulto; B) Fêmea ovipositando na lâmina d'água. C) Ciclo de desenvolvimento do mosquito. Fase alada (adulto) e fase aquática (ovo, larva e pupa).	22
Figura 2. Esquema da transmissão vertical e horizontal de arbovírus. A - Transmissão vertical (transovariana), B- Transmissão horizontal (fêmea A, infectada, contamina um hospedeiro vertebrado e fêmea B, não infectada, alimenta-se no hospedeiro infectado, infectando-se), C- Transmissão horizontal (venérea, via fluido seminal de macho infectando verticalmente a fêmea durante a cópula).	26
Figura 3. Esquema das barreiras de infecção em mosquitos.	27
Figura 4. Representação esquemática das 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.	32
Figura 5. Representação esquemática da via JAK-STAT.	34
Figura 6. Representação esquemática do mecanismo de RNA de interferência 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).	36
<i>Material e Métodos</i>	
Figura 7. Mapas: A) Brasil; B) Estado de Pernambuco, mostrando as	

- localizações geográficas das cidades onde foram coletados ovos de *Aedes aegypti*, Recife (litoral) Petrolina (sertão). **44**
- Figura 8.** Pontos anatômicos utilizados para as análises de morfometria geométrica para identificar as variações de tamanho entre as populações analisadas. **45**
- Figura 9.** Esquema de alimentação sanguínea de fêmeas de *Aedes aegypti* em alimentador artificial. A) Banho-maria circulante aquecido a 37°C, com recipientes de vidro contendo sangue cobertos com membrana de intestino de boi. B) Visão da parte superior da gaiola de contenção com o recipiente de vidro apoiado sobre a tela. C) Visão interna da gaiola de contenção, com as fêmeas reconhecendo o sítio de alimentação contendo sangue. **46**
- Resultados**
- Figura 10.** Percentual de intestinos de mosquitos *Aedes aegypti* infectados artificialmente por alimentação sanguínea contendo vírus dengue tipo 2. As populações de mosquitos usadas foram: RecLab (laboratório), Recife (campo) e Petrolina (campo). As análises foram feitas nos dias 3, 7, 11, 15 e 21 após a alimentação. Foram analisados de 8-10 mosquitos em cada um dos dias após a infecção. **52**
- Figura 11.** Percentual de corpo gorduroso de mosquitos *Aedes aegypti* infectados artificialmente por alimentação sanguínea contendo vírus dengue tipo 2. As populações de mosquitos usadas foram: RecLab (laboratório), Recife (campo) e Petrolina (campo), e as análises foram feitas nos dias 3, 7, 11, 15 e 21 após a alimentação. Foram analisados de 7-10 mosquitos por população em cada um dos dias após a infecção. **53**
- Figura 12.** Percentual de glândulas salivares de mosquitos *Aedes aegypti* infectados artificialmente por alimentação sanguínea contendo vírus dengue tipo 2. As populações de mosquitos usadas foram: RecLab (laboratório), Recife (campo) e

- Petrolina (campo), e as análises foram feitas nos dias 3, 7, 11, 15 e 21 após a alimentação. Foram analisados 3 *pools* de mosquitos (3 pares de glândulas/*pool*) de cada população em cada um dos dias após a infecção. **54**
- Figura 13.** Tamanhos isométricos globais das asas de mosquitos *Aedes aegypti* das populações: RecLab, Recife e Petrolina. As análises foram feitas aos pares (RecLab x Recife; RecLab x Petrolina; Recife x Petrolina). D: asa direita. E: asa esquerda. **55**
- Figura 14.** Número de cópias de RNA do vírus dengue sorotipo 2 em amostras individuais de intestino de mosquitos *Aedes aegypti* das população RecLab (laboratório) Recife (campo) e Petrolina (campo). Os mosquitos foram alimentados artificialmente com sangue infectado e os pontos de análise foram aos 3, 7, 11, 15 e 21 dias após a infecção. **56**
- Figura 15.** Número de cópias de RNA do vírus dengue sorotipo 2 em amostras individuais de corpo gorduroso de mosquitos *Aedes aegypti* das população RecLab (laboratório) Recife (campo) e Petrolina (campo). Os mosquitos foram alimentados artificialmente com sangue infectado e os pontos de análise foram aos 3, 7, 11, 15 e 21 dias após a infecção. **57**
- Figura 16.** Número de cópias de RNA do vírus dengue sorotipo 2 em *pools* com amostras de 3 glândulas salivares de mosquitos *Aedes aegypti* das população RecLab (laboratório), Recife (campo) e Petrolina (campo). Os mosquitos foram alimentados artificialmente com sangue infectado e os pontos de análise foram aos 3, 7, 11, 15 e 21 dias após a infecção. **58**
- Figura 17.** Percentual de expressão de genes de resposta imune em amostras individuais de intestino de mosquitos *Aedes aegypti* das populações RecLab (laboratório), Recife (campo) e Petrolina (campo) em diferentes momentos após a alimentação com sangue infectado ou não infectado (controles). Cont: grupo controle; Inf: grupo infectado. **60**

- Figura 18.** Percentual de expressão de genes de resposta imune em amostras individuais de corpo gorduroso de mosquitos *Aedes aegypti* das populações RecLab (laboratório), Recife (campo) e Petrolina (campo) em diferentes momentos após a alimentação com sangue infectado ou não infectado (controles). Cont: grupo controle; Inf: grupo infectado. **61**
- Figura 19.** Percentual de expressão de genes de resposta imune em pools com amostras de 3 glândulas salivares de mosquitos *Aedes aegypti* das populações RecLab (laboratório), Recife (campo) e Petrolina (campo) em diferentes momentos após a alimentação com sangue infectado ou não infectado (controles). Cont: grupo controle; Inf: grupo infectado. **62**
- Figura 20.** Percentual de expressão individual de genes de resposta imune em amostras de intestino e corpo gorduroso de *Aedes aegypti* das populações RecLab, Recife e Petrolina nos grupos infectados e controle de cada população. Cont: grupo controle; Inf: grupo infectado. **64**
- Figura 21.** Percentual de co-expressão de genes de resposta imune em amostras de intestino e corpo gorduroso de *Aedes aegypti* das populações RecLab, Recife e Petrolina nos grupos infectados e controle de cada população. Cont: grupo controle; Inf: grupo infectado. **65**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ae.	→	Gênero <i>Aedes</i>
An.	→	Gênero <i>Anopheles</i>
Bti	→	<i>Bacillus thuringiensis israelensis</i>
cDNA	→	<i>Complementary Deoxyribonucleic Acid</i>
CPqAM	→	Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães
Ct	→	<i>Cycle threshold</i>
Cont.	→	Controle
D.	→	Gênero <i>Drosophila</i>
D	→	Asa direita
DC	→	Dengue Clássica
DCR-2	→	Dicer-2
DENV	→	Dengue Vírus
DENV-1	→	Dengue Vírus sorotipo 1
DENV-2	→	Dengue Vírus sorotipo 2
DENV-3	→	Dengue Vírus sorotipo 3
DENV-4	→	Dengue Vírus sorotipo 4
Dif	→	<i>Dorsal-related immunity factor</i>
DNA	→	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
Dome	→	Domeless
dsRNA	→	<i>double- stranded RNA</i>
dpi	→	Dias após a infecção
E	→	Asa esquerda
f	→	<i>Forward</i> (Primer)
FFA	→	<i>Fluorescent Focus Assay</i>
FHD	→	Febre Hemorrágica da Dengue
h	→	horas
hab	→	habitantes
Hop	→	Hopschotch
IB	→	Índice de Breteau
Imd	→	<i>Immune Deficiency</i>
Inf.	→	Infectado
IIP	→	Índice de Infestação Predial
JAK	→	<i>Janus kinase</i>
JAK-STAT	→	<i>Janus kinase signal transducer and activation of transcription</i>
kb	→	kilobases

μL	→	Microlitros
μM	→	Micromolar
MEB	→	<i>Midgut Escape Barrier</i>
MIB	→	<i>Midgut Infection Barrier</i>
mRNA	→	RNA mensageiro
nm	→	nanômetro
ng	→	nanograma
NS5	→	<i>Non-structural protein 5</i>
ORF	→	<i>Open reading frame</i>
OMS	→	Organização Mundial de Saúde
PAMPs	→	<i>Pathogen Associated Molecular Patterns</i>
PCR	→	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PIE	→	Período de Incubação Extrínseco
PIAS	→	<i>Protein Inhibitor of Activated STAT</i>
PGRPs	→	<i>Peptoglycan Recognition Proteins</i>
PNCD	→	Programa Nacional do Controle da Dengue
PRRs	→	<i>Pattern Recognition Receptors</i>
qPCR	→	<i>Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction</i>
qRT-PCR	→	<i>Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i>
r	→	<i>Reverse (Primer)</i>
RISC	→	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RNA	→	<i>Ribonucleic Acid</i>
RNAi	→	<i>RNA interference</i>
rpL8	→	<i>Ribosomal Protein L8</i>
siRNAs	→	<i>small interfering RNAs</i>
SINV	→	Vírus Sindbis
SOCS	→	<i>Suppressor of Cytocine Signaling</i>
SINVAS	→	Sistema de Informação da Vigilância Ambiental em Saúde
TB	→	<i>Transmission Barrier</i>
TLRs	→	<i>Toll-like receptors</i>
Upd	→	<i>Unpaired</i>

CARVALHO-LEANDRO, Danilo. **Análise da imunidade de *Aedes aegypti* (DIPTERA: CULICIDAE) ao vírus dengue em populações de campo com competência vetorial diferenciada.** 2011. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal). Departamento de Zoologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2011.

RESUMO

Um dos determinantes envolvidos no complexo ciclo de transmissão da dengue é o nível de susceptibilidade do *Aedes aegypti* ao vírus dengue (DENV), ou seja, a competência vetorial, que varia entre populações de mosquitos. Identificar moléculas envolvidas na interação mosquito-vírus pode auxiliar no conhecimento dos mecanismos envolvidos na competência vetorial, até então pouco elucidados. Estudos recentes mostraram a participação de certos mecanismos na interação mosquito-DENV, porém, pouco se sabe do real papel destes na modulação da competência vetorial em mosquitos de campo ou até da relação entre eles. Mediante isso, objetivamos analisar a expressão de três moléculas representantes de diferentes mecanismos de defesa antiviral no *Ae. aegypti*, em resposta à infecção com vírus dengue sorotipo 2 (DENV-2), sendo elas REL1, HOP e Dicer-2, em populações de campo e de laboratório do mosquito. Para isso, as diferentes linhagens foram artificialmente infectadas com DENV-2, e tecidos variados foram coletados em diversos momentos após infecção. Tanto a quantificação viral quanto a expressão das moléculas selecionadas nas amostras foram realizadas por PCR em tempo real quantitativo (qRT-PCR). Os resultados mostraram que tanto o padrão de infecção viral quanto a expressão das moléculas variaram entre as populações de *A. aegypti* nos diferentes momentos após infecção com DENV-2. Os resultados aqui obtidos poderão ser bastante relevantes na pesquisa da interação vetor-vírus e poderão auxiliar no desenvolvimento de novas estratégias de controle da dengue, como na pesquisa com mosquitos transgênicos.

Palavras-chave: Interação mosquito-DENV, Toll, JAK-STAT, RNAi.

CARVALHO-LEANDRO, Danilo. **Analysis of *Aedes aegypti*'s (DIPTERA: CULICIDAE) immunity to dengue virus in field populations with differentiated vector competence.**

2011. Dissertation (Master of Animal Biology). Zoology Department, Biological Science Center, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2011.

ABSTRACT

One of the determinants involved in the complex dengue transmission cycle is the susceptibility level of *Aedes aegypti* to dengue virus (DENV), i.e., vector competence, which varies among mosquito populations. The identifications of molecules involved in mosquito-virus interaction may help in understanding mechanisms involved in vector competence, so far poorly understood. Recent studies show the involvement of certain mechanisms in DENV-mosquito interaction. However, little is known about the actual role of such molecules in modulating vector competence in mosquito field populations or of any relationship among them. Based on that, we aimed to analyze the expression of three molecules representing different mechanisms of antiviral defense in *Ae. aegypti* in response to dengue virus serotype 2 (DENV-2) infection: REL1, HOP and Dicer-2, in field and laboratory mosquito populations. For this purpose, different strains were artificially infected with DENV-2, and various tissues were collected at specific moments after infection. The virus quantification and the expression of selected molecules in the samples were performed by quantitative real time PCR (qRT-PCR). Results showed that both the kinetics of viral infection as well as the expression of molecules varied among populations of *Ae. aegypti* at different time points after DENV-2 infection. Results obtained here may be quite relevant to the research of virus-vector interaction, and thus assist in the development of new strategies to control dengue, as well as in research with transgenic mosquitoes.

Key-words: Mosquito-DENV interaction, Toll, JAK-STAT, RNAi.

SUMÁRIO

	Página
AGRADECIMENTOS	VI
LISTA DE ILUSTRAÇÕES E TABELAS	IX
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	XIII
RESUMO	XV
ABSTRACT	XVI
1. INTRODUÇÃO	19
1.1 A doença.....	19
1.2 O vetor.....	21
1.3 O patógeno.....	23
1.4 Interação vetor-patógeno.....	24
1.4.1 Tipos de transmissão.....	24
1.4.2 Competência vetorial e capacidade vetorial.....	26
1.5 Sistema imune de insetos.....	28
1.5.1 Respostas celulares e humorais.....	29
1.5.1.1 Vias de sinalização.....	30
1.5.1.1.1 Via Toll.....	30
1.5.1.1.2 Via Imd.....	33
1.5.1.1.3 Via Jak-STAT.....	33
1.5.2 RNA de interferência.....	35
1.6 Interação <i>Aedes aegypti</i> -DENV.....	37
2. OBJETIVOS	40
3. JUSTIFICATIVA	41
4. PERGUNTA CONDUTORA	42
5. MATERIAL E MÉTODOS	43
5.1 Coleta e manutenção dos mosquitos.....	43
5.2 Análises de morfometria geométrica alar.....	44
5.3 Infecção viral.....	45
5.4 Coleta de material.....	47
5.5 Extração de RNA.....	47
5.6 Quantificação de DENV-2 por RT-PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR).....	47
5.7 Expressão de REL1, HOP e Dicer-2 através de PCR quantitativo em tempo real (qPCR).....	48
6. RESULTADOS	50

6.1	Taxas de infecção.....	50
6.2	Morfometria geométrica alar.....	51
6.3	Quantificação viral	51
6.4	Expressão de genes de resposta imune nos órgãos de diferentes populações de <i>Aedes aegypti</i>	59
6.5	Expressão individual ou simultânea de REL1, HOP e DCR-2.....	63
7.	DISCUSSÃO	66
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71

1. INTRODUÇÃO

1.1 - A doença

Dengue é uma doença infecciosa causada por um arbovírus (*arthropod-borne virus* - vírus que se mantêm na natureza devido à propagação biológica entre vertebrado hospedeiro e artrópode hematófago) que ocorre, principalmente, em áreas tropicais e subtropicais do mundo (BEATY; MARQUARDT, 1996a; GUZMAN; KOURI, 2003). A Organização Mundial de Saúde (OMS) a considera a mais importante arbovirose que afeta o homem, pois apresenta alta taxa de morbidade e uma pequena parcela dos casos clínicos severos pode ser fatal (HALSTEAD, 2007). A doença tem como agente etiológico o Dengue virus (DENV), o qual apresenta quatro sorotipos antigenicamente distintos (DENV-1; DENV-2; DENV-3 e DENV-4) que podem causar a doença

A classificação da OMS para os casos de dengue segue três diferentes categorias a depender da forma das manifestações clínicas, sendo elas a febre não diferenciada, febre da dengue clássica (DC) e febre hemorrágica da dengue (FHD). As manifestações clínicas vão desde um quadro de febre aguda, a sintomas mais severos que podem envolver importantes quadros de hemorragia a partir do extravasamento plasmático. Como diversas manifestações clínicas podem aparecer nos quadros de dengue, é importante mencionar que há hoje um grande debate sobre essa classificação, pois muitos casos clínicos não se encaixam nos critérios estabelecidos pela OMS. Diante disso, o diagnóstico clínico da dengue está constantemente em pauta entre os profissionais da área e é um assunto complexo, devido à importância do diagnóstico correto no tratamento da doença. As mortes por dengue estão normalmente relacionadas aos casos de FHD e estima-se que de 3-5% das pessoas infectadas com o DENV desenvolvem a forma clínica severa da doença com risco de fatalidade (GUZMAN et al., 2010).

Historicamente, a dengue é uma doença antiga que foi disseminada mundialmente nos trópicos durante os séculos XVIII e XIX, quando houve uma grande expansão da navegação industrial e comercial (GUBLER, 2002). Essa expansão favoreceu a disseminação do *Aedes aegypti*, o principal mosquito vetor do DENV, para diversas regiões do mundo (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994; GRATZ, 2004; GUBLER, 2002). Os primeiros relatos de epidemias com quadros clínicos compatíveis com dengue clássica 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, 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 *Ae. 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 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).

Em relação ao desenvolvimento de uma vacina para a dengue, diversos 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. Um exemplo de vacina para a dengue em teste clínico é a quimérica ChimeriVax (estrutura viral das cepas 17D do vírus da febre amarela com genes que expressam proteínas do envelope do vírus dengue), a candidata principal para a fase 3 de teste clínico (eficácia vacinal) (WEBSTER et al., 2009).

No Brasil, os primeiros relatos de casos de dengue datam de 1846, porém, foi na segunda metade do século XX que a dengue realmente adquiriu uma grande importância epidemiológica (BRAGA; VALLE, 2007a). Os primeiros casos de dengue confirmados laboratorialmente ocorreram em Boa Vista (Roraima) em 1981-1982, com o isolamento do DENV-1 e DENV-4. No período, não houveram registros significativos envolvendo o DENV-4 na transmissão viral pelo país (OSANAI et al., 1983). Desde 2003, no Brasil circulam os sorotipos DENV-1, DENV-2 e DENV-3, e mais recentemente foi detectado o DENV-4, cujo registro foi confirmado pelo Ministério da Saúde nos Estados de Roraima e Amazonas, causando imensa preocupação nas secretarias de saúde do país (BRASIL, 2010).

As ações de controle da dengue no Brasil 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 (ovitrampa) (MEDEIROS et al., 2011; REGIS 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, tem sido demonstrado que a maioria das populações de *Ae. aegypti* monitoradas está resistente, sobretudo ao temefós (BRAGA; VALLE, 2007b; MELO-SANTOS et al., 2010), o que representa um grave problema para o controle do vetor baseado em 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). No entanto, mais recentemente, o diflubenzuron (inibidor de síntese de quitina) foi adotado pelo Ministério da Saúde para controle de larvas de *Ae. aegypti* no país (BRASIL, 2009).

1.2 - O 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-C). Seus ovos (Figura 1-B), podem sobreviver por vários meses em locais secos, sob condições ambientais adversas, devido ao fenômeno de quiescência (caracterizado pela interrupção do processo de maturação embrionária devido à redução drástica da umidade relativa). A característica da quiescência apresenta importantes implicações na dispersão de mosquitos (BICOUT et al., 2002; WOODRING et al., 1998), podendo possibilitar sua ressurgência em áreas previamente tratadas (CARDOSO JR, 1997).

Estudos demonstram que a capacidade de dispersão de *Ae. aegypti* pelo vôo pode atingir até 800 m, principalmente quando a fêmea está em busca de sítios de oviposição (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 do vírus (ORDONEZ-GONZALEZ et al., 2001) e

direcionamento para intensificação das ações de controle e bloqueio da transmissão viral. Entretanto, há evidências de que quando há fonte de alimentação e sítio de oviposição suficientes, fêmeas de *Ae. aegypti* se deslocam por pequenas distâncias (50-100m), mantendo-se restritas às casas onde emergiram ou deslocando-se apenas para casas vizinhas (HARRINGTON; et al., 2005; RUSSELL et al., 2005).

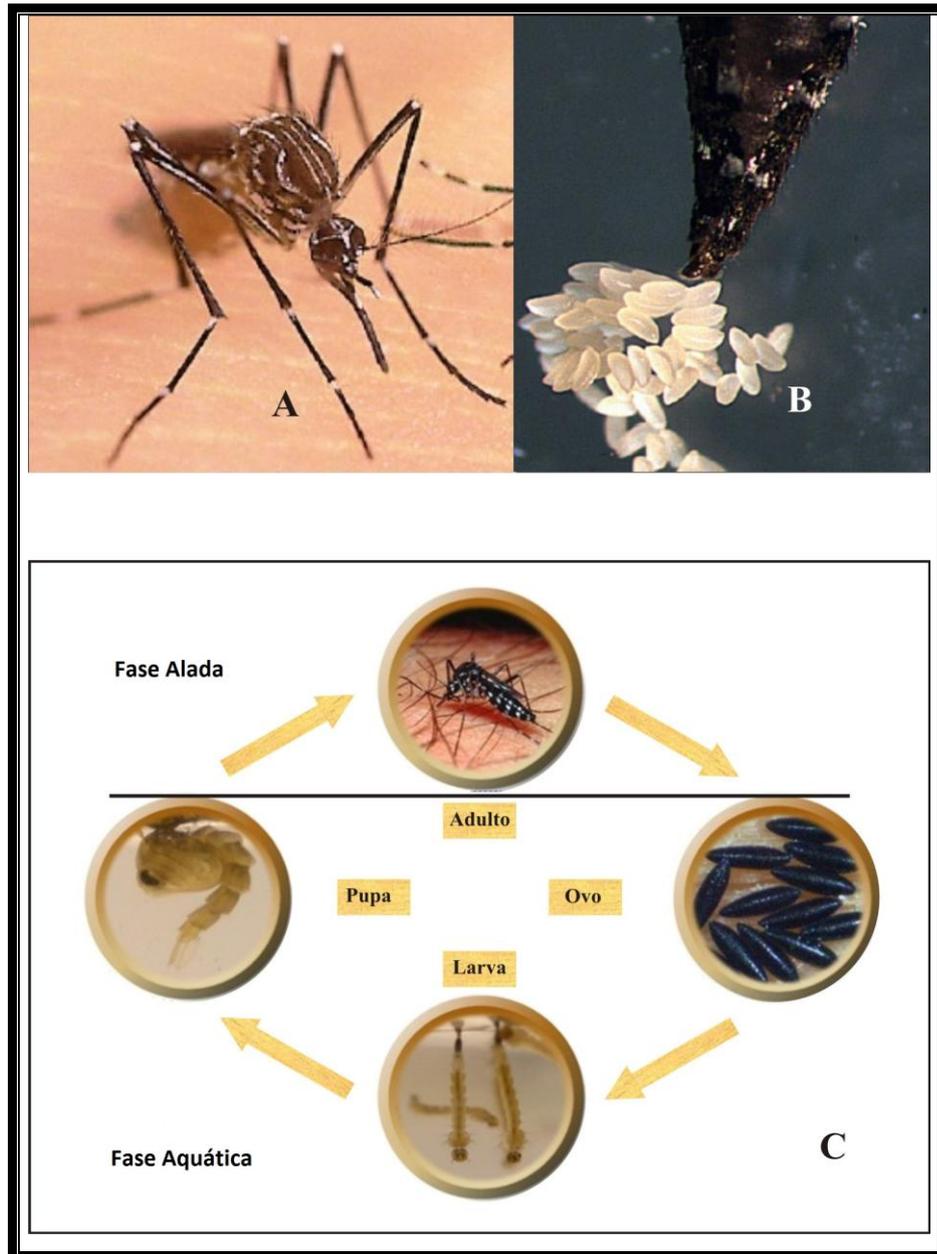


Figura 1. *Aedes aegypti*: A) Adulto; B) Fêmea ovipositando na lâmina d'água. C) Ciclo de desenvolvimento do mosquito. Fase alada (adulto) e fase aquática (ovo, larva e pupa).

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

Por último, é importante mencionar outra espécie importante epidemiologicamente na transmissão do dengue, o mosquito *Aedes albopictus*. Diversos estudos comprovam a susceptibilidade de *Ae. albopictus* a diferentes arbovírus, entre eles o DENV e vírus da febre amarela (LOURENÇO DE OLIVEIRA et al., 2003). Surtos de transmissão de DENV atribuídos à 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).

1.3- O patógeno

Vírus dengue, patógeno causador de todas as formas em que a dengue pode se apresentar, pertence ao gênero *Flavivirus*, e à família Flaviviridae (GUBLER; KUNO, 1997; KINEPE, 2007). Ao considerarmos as diversas variações dentro do gênero *Flavivirus* (morfologia viral, organização genômica, variações nas seqüências de nucleotídeos e ecologia viral), esse gênero é composto por 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 seqüências de aminoácidos, requerendo estudos a partir de análises multigênicas. Alguns estudos 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). Essas mutações ocorrem devido à ausência de atividade de *proofreading* da RNA polimerase viral, atividade esta que tem por função corrigir os erros cometidos pela RNA polimerase (HOLMES et al., 1999; TWIDDY; HOLMES, 2003). Em vírus dengue, além da 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 à 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 nucleotídeos, 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).

1.4- Interação vetor-patógeno

1.4.1- Tipos de transmissão

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 microorganismos em suas patas, e posteriormente transmiti-los a um hospedeiro vertebrado. 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 (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 primeira se dá quando o patógeno é passado da fêmea infectada para a prole, podendo ser do tipo 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). Já na transmissão 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).

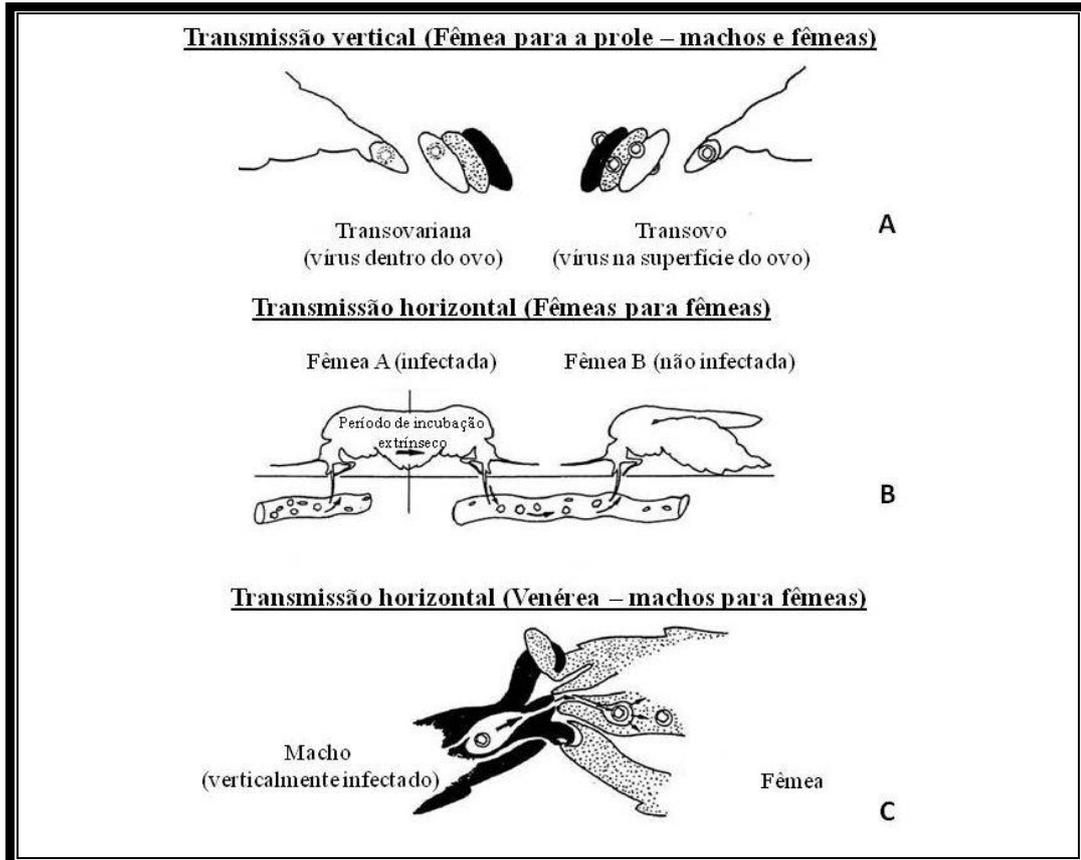


Figura 2. Esquema da transmissão vertical e horizontal de arbovírus. A - Transmissão vertical (transovariana), B- Transmissão horizontal (fêmea A, infectada, contamina um hospedeiro vertebrado e fêmea B, não infectada, alimenta-se no hospedeiro infectado, infectando-se), C- Transmissão horizontal (venérea, via fluido seminal de macho infectando verticalmente a fêmea durante a cópula). Fonte: Adaptado de Higgs & Beaty, 2004.

1.4.2- 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., 2000). 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 transmití-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 *Ae. 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 vetor 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 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).

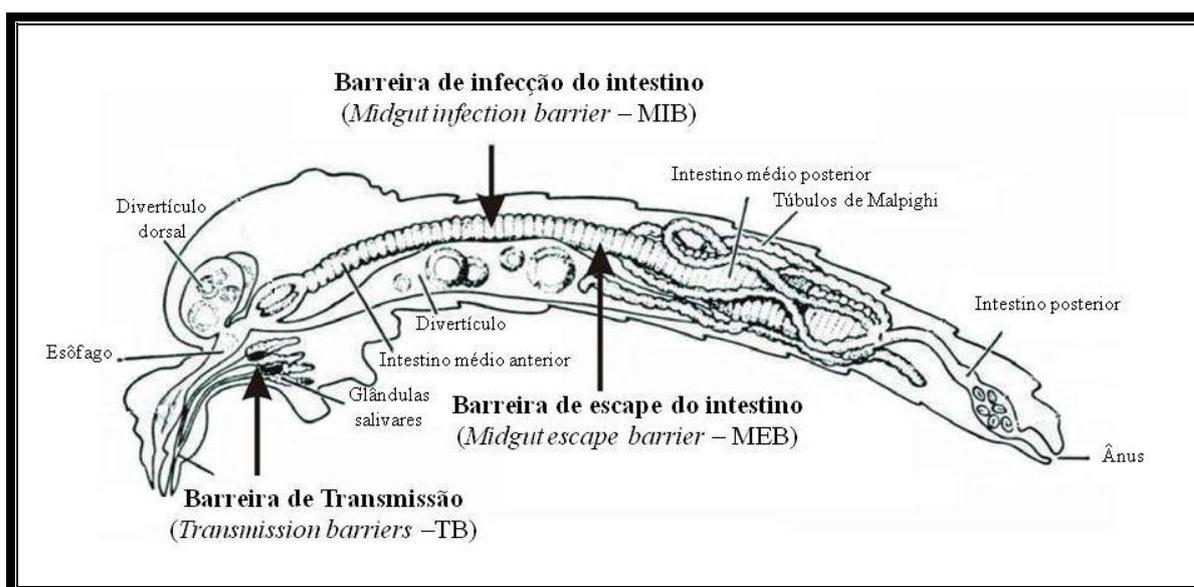


Figura 3. Esquema das barreiras de infecção em mosquitos. Fonte: Adaptado de Marquardt (2004).

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 uma 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), barreira esta bem mais raramente observada 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.

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, que envolvem características 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).

1.5- 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). Recentemente, 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 efectoras 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).

1.5.1- 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 *Ae. 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-fenoloxidasas é ativado, ocorrendo a 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 (SIM; DIMOPOULOS, 2010; SOUZA-NETO et al., 2009) e protozoários (GARVER et al., 2009).

1.5.1.1- Vias de sinalização

1.5.1.1.1- 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*, *Ae. 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, peptidoglicanos (PGRPs – *Peptoglycan 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 *Ae. aegypti* (NENE et al., 2007), análises comparativas com *Drosophila melanogaster* revelaram que mosquitos não possuem o fator de transcrição NF-kB 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, com 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 *Ae. 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 (suprimindo a via) silenciado. Os autores registraram uma diminuição viral em *cactus* silenciado e um aumento viral em MyD88 silenciado. Adicionalmente, esse estudo apresentou dados que referem-se a infecções de mosquitos MyD88-silenciado e alimentados com diferentes sorotipos virais (DENV2 e DENV4). Foi evidenciado que essa via responde diferentemente aos diferentes sorotipos virais, uma vez que houve um aumento significativo do título viral do DENV4 nos mosquitos aos 3 dias após infecção, quando comparado com os mosquitos infectados com DENV2.

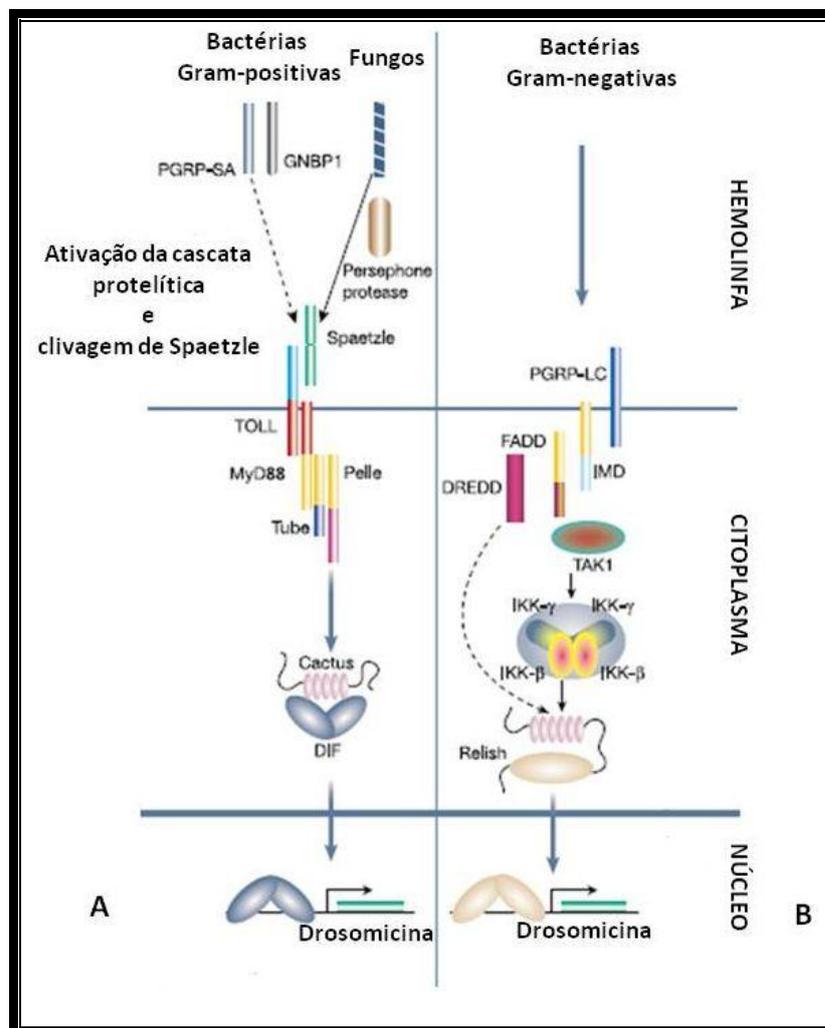


Figura 4. Representação esquemática das vias Toll (A) e Imd (B) em *Drosophila*, no controle da expressão de peptídeos antimicrobianos. Em *Aedes aegypti*, REL1 e REL2, foram identificadas como homólogos a Dif/Dorsal e Relish de *Drosophila*, respectivamente. Fonte: Adaptado de Hoffmann (2003).

1.5.1.1.2- 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 *Ae. 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).

1.5.1.1.3- 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 *Ae. 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 et 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 *Ae. aegypti*, após silenciarem genes envolvidos nessa via de sinalização.

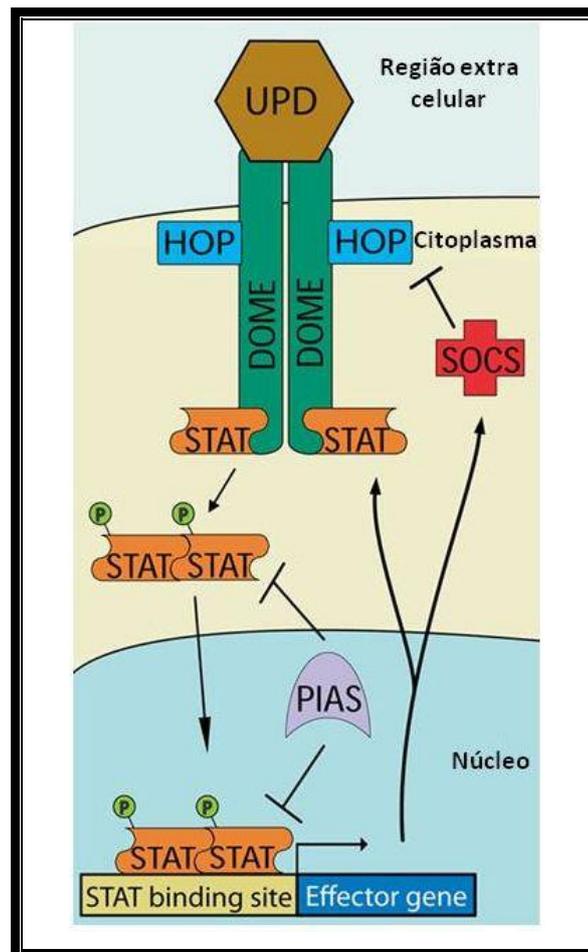


Figura 5. Representação esquemática da via JAK-STAT. Fonte: Adaptado de Souza-Neto et al. (2009).

1.5.2 - 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 em 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).

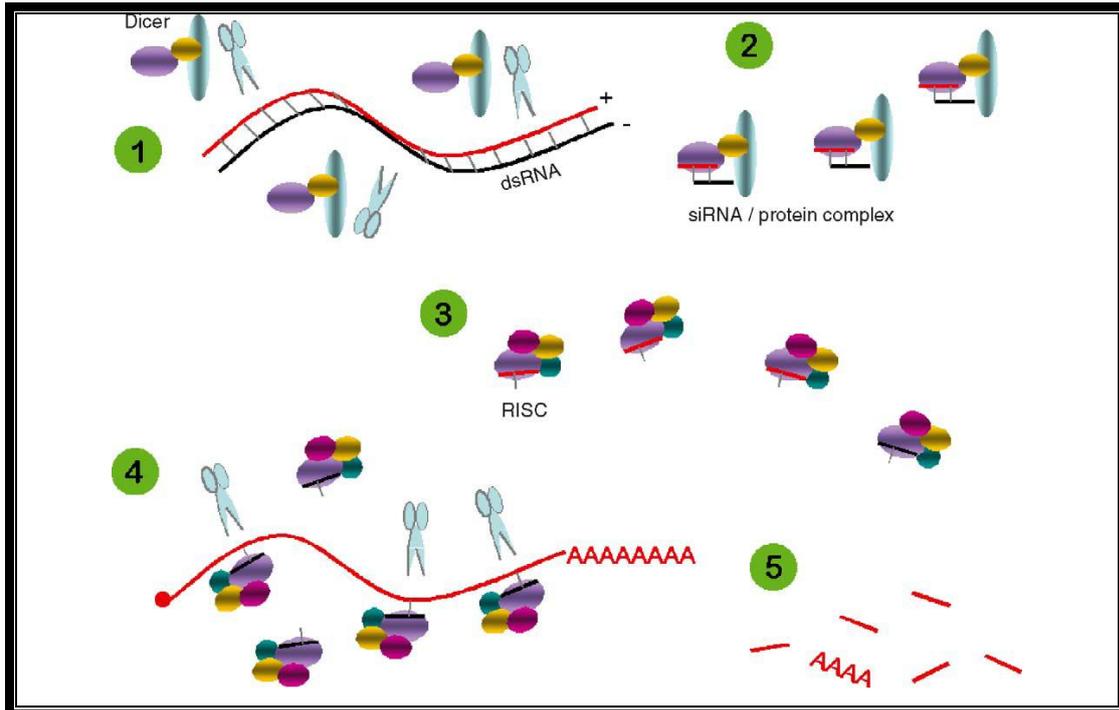


Figura 6. Representação esquemática do mecanismo de RNA de interferência em *Drosophila*. dsRNA são reconhecidos por Dicer e clivados em pequenos fragmentos de 21-25nt de tamanho (1), formando o complexo siRNA-proteína (2). Dicer-2 (helicase) desenrola os siRNA fita dupla e as enzimas do complexo RISC 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: Adaptado de Sanchez-Vargas et al (2004).

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). Em mosquitos, 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 *Ae. aegypti* contra infecções causadas pelo vírus Sindbis (SINV). Nesse estudo, foi demonstrado que o silenciamento de Dicer-2 e Argonaute-2 causou aumento nos títulos de SINV. Em outro estudo, desenvolvido por Khoo et 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 conseqüente disseminação em menor tempo para os órgãos secundários. Sánchez-Vargas et al. (2009), estudando a modulação do DENV2 em *Ae. 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 conseqüentemente a uma diminuição no período de incubação extrínseca, o que poderia aumentar a eficiência na transmissão viral.

1.6- 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 populações do vetor. Vários estudos mostram que diferentes populações de *Ae. aegypti* 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; 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 *Ae. 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 *Ae. 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 *Ae. 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.

Outro importante aspecto na interação mosquito-vírus está relacionado ao processo de evolução entre as populações de mosquito e o vírus dengue. Como a competência vetorial das diversas populações de *Ae. 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).

Até o momento, o conhecimento dos componentes moleculares envolvidos na interação *Ae. aegypti*-DENV é elusivo. Por exemplo, 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 *Ae. 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 *Ae. aegypti* já foram identificadas, dentre elas as das vias Toll e JAK-STAT e do mecanismo de RNAi. Esses estudos trazem mais perguntas sobre a complexa interação *Ae. aegypti*-DENV e abrem portas para diversos tipos de análises.

2. OBJETIVOS

Objetivo Geral

Analisar a expressão de três moléculas envolvidas na resposta imune do *Aedes aegypti* ao vírus dengue, que representam três mecanismos antivirais distintos, em diferentes populações do mosquito em resposta ao DENV-2.

Objetivos Específicos

1. Quantificar a infecção por DENV-2 em populações de *Aedes aegypti* provenientes de duas regiões do estado de Pernambuco e uma linhagem de laboratório;
2. Avaliar se há expressão diferencial do gene REL1, envolvido na via de sinalização Toll, nas populações de *Ae. aegypti* após infecção com DENV-2;
3. Avaliar se há expressão diferencial do gene HOP, envolvido na via de sinalização JAK-STAT, nas populações de *Ae. aegypti* após infecção com DENV-2;
3. Avaliar se há expressão diferencial do gene Dicer-2, envolvido no mecanismo de RNAi, nas populações de *Ae. aegypti* após infecção com DENV-2;
4. Verificar qualquer relação entre a expressão de REL1, HOP e Dicer-2 com a presença do DENV-2 em diferentes tecidos de *Ae. aegypti*.

3. JUSTIFICATIVA

Dentre as diversas razões pelas quais os programas de controle de vetores são ineficientes, uma delas é o lento progresso no conhecimento dos determinantes do ciclo de transmissão da dengue. Um desses determinantes é o nível de susceptibilidade dos mosquitos ao DENV, que varia entre populações. Apesar de alguns componentes envolvidos na competência vetorial de *Ae. aegypti* ao DENV serem conhecidos, os mecanismos moleculares que a controlam ainda não foram elucidados.

Estudos sobre moléculas envolvidas na modulação da infecção por DENV em mosquitos, principalmente em populações de campo, tornam-se de grande valor científico e certamente poderão auxiliar no desenvolvimento de novos métodos de controle que previnam a infecção e/ou disseminação viral no vetor.

4. PERGUNTA CONDUTORA

Há diferença no padrão de expressão de REL1, HOP e DCR-2, representantes das vias de sinalização Toll, JAK-STAT e RNAi, respectivamente, entre populações de *Aedes aegypti* com níveis distintos de susceptibilidade ao vírus dengue sorotipo 2?

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1- Coleta e manutenção dos mosquitos

Ovos de *Aedes aegypti* foram coletados através de armadilhas do tipo ovitrampa, em duas cidades do estado de Pernambuco localizadas em regiões biogeográficas distintas (Figura 7). As cidades foram Recife, situada em região litorânea e Petrolina no sertão pernambucano. Uma vez que as regiões possuem características diferentes, a possibilidade de variação na competência vetorial entre as populações coletadas torna-se maior (LOURENÇO-DE-OLIVEIRA et al., 2004). A população de laboratório RecLab foi usada nos experimentos como a população controle. Ressalva-se que RecLab é uma população oriunda de coleta de ovos por ovitrampas na cidade de Recife (bairro das Graças), que vem sendo mantida no laboratório do Departamento de Entomologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães há mais de 10 anos. Para a coleta dos ovos, o número de armadilhas instalados em cada município obedeceu ao critério do número de imóveis existentes no município, estabelecido pela Rede MoReNAa – Rede de Nacional de Monitoramento da Resistência de *Aedes aegypti* a Inseticidas (2009).

Os ovos coletados em campo foram trazidos para o insetário do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, o qual possui condições padrões ideais de criação, com 70-80% de umidade relativa, ciclo de 12h:12h claro:escuro, $26 \pm 2^\circ\text{C}$. Os procedimentos de criação foram conduzidos para a obtenção de insetos adultos. Para o estabelecimento da população parental, os ovos foram imersos em solução de gramínea 30% e após a eclosão das larvas, estas foram colocadas em bandejas contendo água mineral. As larvas foram alimentadas com tabletes de ração para gatos esterilizados (Friskies®) e mantidas sob procedimento de criação até a fase de pupas. Estas foram coletadas e transferidas para gaiolas de contenção para a emergência de adultos. Os adultos foram mantidos com água e solução de sucrose 10%. As fêmeas foram alimentadas em galinhas vivas (*Gallus gallus*), permitindo a produção de ovos para o estabelecimento da primeira geração (F1). Os ovos da F1 foram coletados e todo o procedimento de criação até a emergência de adultos foi repetido.

Os experimentos desse trabalho foram conduzidos com insetos adultos da F2. Para os experimentos de infecção, os ovos (F2) de cada população foram imersos, em solução de gramínea 30%. Após eclosão das larvas L1, estas foram contadas e 3000 larvas L1 de cada

população foram colocadas em 10 bandejas plásticas contendo 1,5L de água (300 L1/bandeja). A mesma quantidade de ração foi adicionada em todas as bandejas, e um rodízio da posição das bandejas na sala de criação foi feito, para que houvesse mínima variação de luminosidade e temperatura entre as bandejas. Esse procedimento de criação padronizado foi feito com o intuito de minimizar as variações de tamanho dos indivíduos entre as populações, relativas à pressão por alimento, espaço e luminosidade.

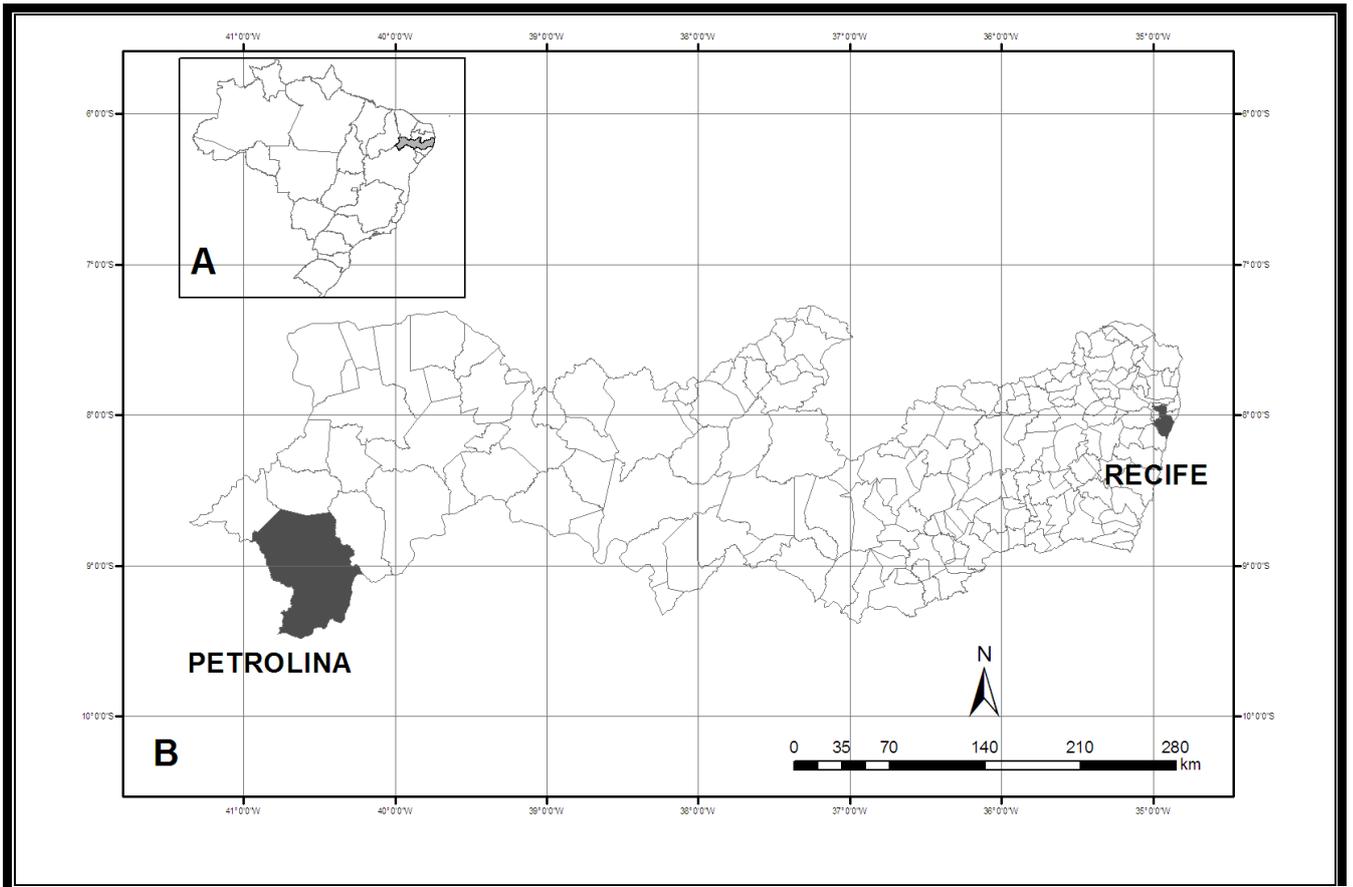


Figura 7. Mapas: A) Brasil; B) Estado de Pernambuco, mostrando as localizações geográficas das cidades onde foram coletados ovos de *Aedes aegypti*, Recife (litoral) Petrolina (sertão).

5.2- Análises de morfometria geométrica alar

Para identificar possíveis variações de tamanho entre os indivíduos das populações, uma análise morfométrica alar foi realizada. As asas direitas e esquerdas de fêmeas de *Ae. aegypti* das três populações estudadas foram montadas entre lâmina e lamínula com uma resina sintética (Entellan). Cerca de 40 indivíduos de cada população foram analisados, e as imagens dessas asas foram capturadas através de câmera fotográfica digital Leica 320 acoplada a um microscópio estereoscópio Leica S6, no aumento de 40x.

Sobre as imagens, e com o auxílio do software, foram tomadas as coordenadas posicionais de cada um dos 18 pontos anatômicos sobre um plano cartesiano (Figura 8). Sobre esses dados foram computados os tamanhos de centróides, com o auxílio dos programas de computador TpsRelw. Esta etapa do estudo foi realizada no Laboratório de Parasitologia do Instituto Butantan, São Paulo-SP.

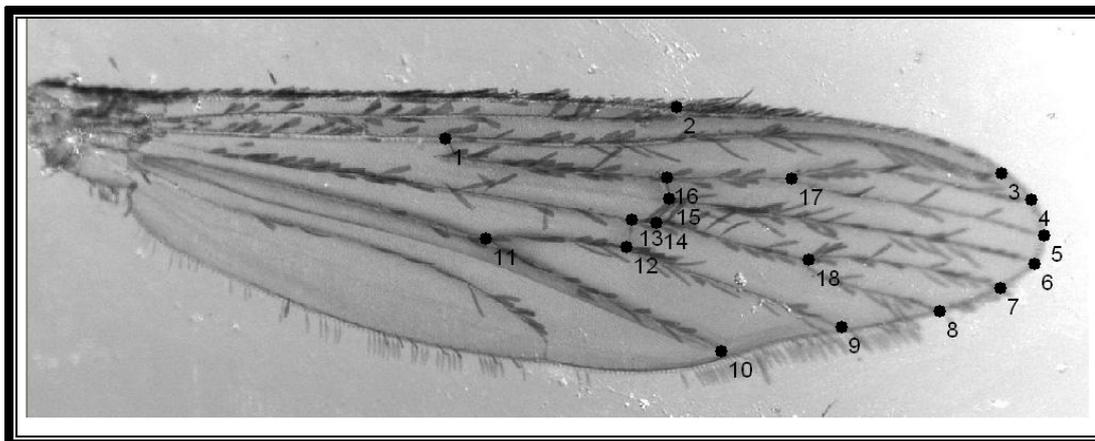


Figura 8. Pontos anatômicos utilizados para as análises de morfometria geométrica para identificar as variações de tamanho entre as populações analisadas.

5-3. Infecção viral

As alimentações artificiais dos mosquitos foram realizadas no insetário do Departamento de Entomologia do CPqAM, o qual possui todas as condições de biossegurança requeridas para infecção com vírus (ADEGAS et al., 2005). Fêmeas adultas das populações de Recife (F2), Petrolina (F2), e RecLab (laboratório) de *Ae. aegypti* foram usadas para os experimentos de infecção. Para as alimentações, DENV-2 3808 (vírus dengue isolado de paciente diagnosticado com dengue na cidade de Recife em 1995 (número de acesso no GeneBank:EU259569), foi propagado em células de mosquito *Aedes albopictus* C6/36. Alíquotas de 0,25 ml do estoque de vírus foram usadas para infectar células C6/36 a 80% de confluência em frascos de 25mm³. Após incubação de 5-7 dias, as células infectadas foram coletadas dos frascos e lisadas para a liberação das partículas virais. A lise foi feita através de três séries consecutivas de congelamento/descongelamento. A suspensão viral foi misturada numa razão 1:1 com sangue de carneiro desfibrinado. Para o controle negativo, células C6/36 não infectadas foram misturadas da mesma forma com o sangue. A amostra de sangue utilizada no experimento de infecção viral após a mistura com DENV-2 foi submetida à técnica de *Fluorescent Focus Assay* (FFA), adaptada de Payne et al. (2006). Cerca de 500

fêmeas com 5-7 dias de emergência, cuja alimentação com sucrose foi retirada 24 horas antes da alimentação artificial, foram alimentadas através de um alimentador artificial conectados a um banho-maria circulante a 37°C (Figura 9). O sangue foi colocado em recipientes de vidro cobertos com membrana de intestino de boi desidratada e re-hidratada em solução salina por 24hs antes do experimento. Após 45 minutos de alimentação, os mosquitos foram anestesiados a 4°C e colocados em placa de petri sobre gelo para a remoção de insetos que não se alimentaram. As fêmeas alimentadas foram transferidas de volta para as gaiolas.

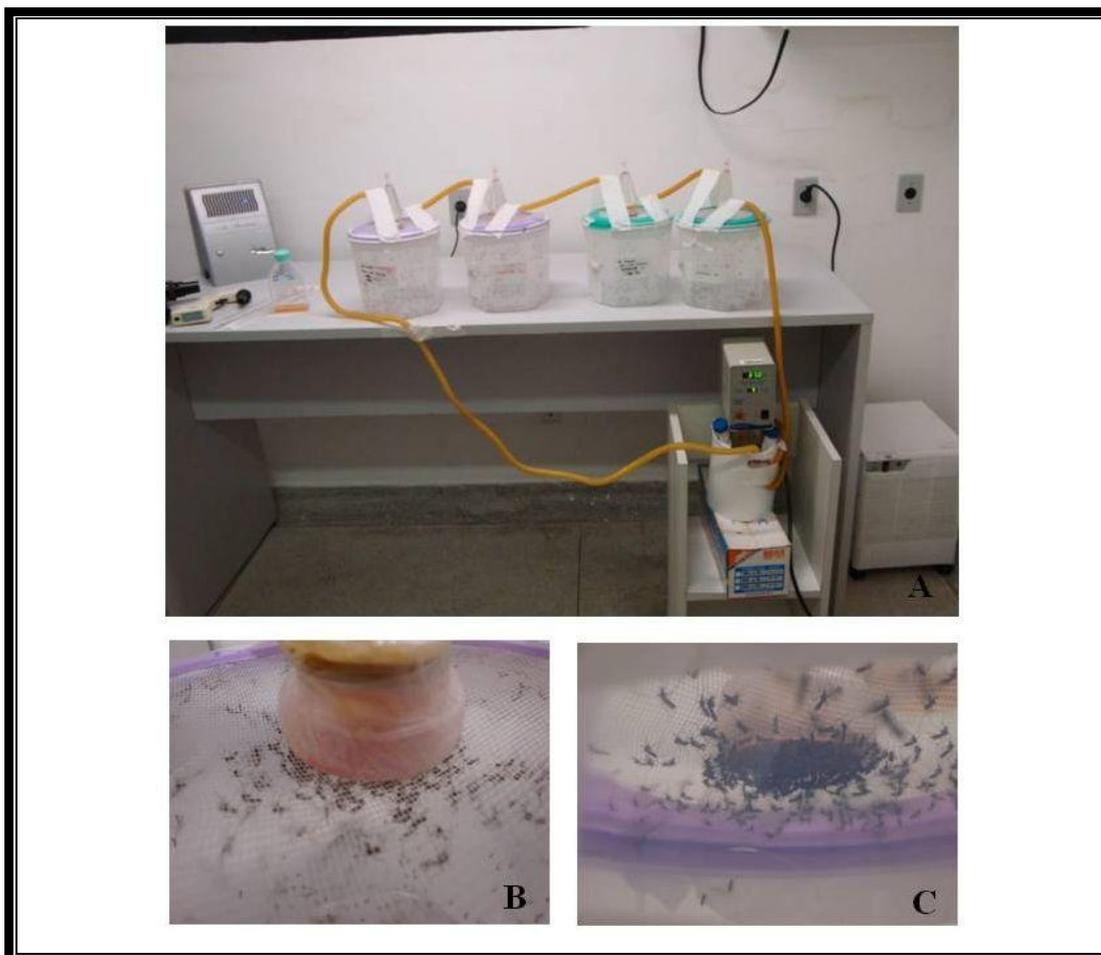


Figura 9. Esquema de alimentação sanguínea de fêmeas de *Aedes aegypti* em alimentador artificial. A) Banho-maria circulante aquecido a 37°C, com recipientes de vidro contendo sangue cobertos com membrana de intestino de boi. B) Visão da parte superior da gaiola de contenção com o recipiente de vidro apoiado sobre a tela. C) Visão interna da gaiola de contenção, com as fêmeas reconhecendo o sítio de alimentação contendo sangue. Fonte: O autor.

5.4- Coleta de material

Mosquitos alimentados com sangue infectado (sangue e C6/36 contendo DENV-2 a $2,0 \times 10^6$ FFA/mL) e não infectado (sangue e C6/36) foram coletados aos 3, 7, 11, 15 e 21 dias após a infecção (dpi) e dissecados para retirada dos diferentes órgãos. Foram coletados intestinos, corpo gorduroso e glândulas salivares (coletada apenas no 21º dpi). Um total de oito a dez indivíduos por população em cada dpi foram dissecados e os órgãos foram armazenados individualmente (exceto glândula salivar que foram feitos *pools* com glândulas resultante de três indivíduos). Todo o procedimento de dissecação foi realizado com critérios para impedir contaminações entre as amostras e degradação de RNA. Os mosquitos foram dissecados em placa de pétri resfriada com gelo, com auxílio de microscópio estereoscópio e de pinças para dissecação. Logo após a dissecação, cada órgão foi colocado, separadamente, em microtubos de 1,7mL livres de RNases, contendo 300 µL de diluente para mosquito (LAMBRECHTS et al., 2009). Os órgãos foram armazenados a -80°C para posterior extração de RNA.

5.5- Extração de RNA

Após homogeneização dos tecidos com pistilo e aparelho automático (Pellet Pestle[®] Motor), 100µL (1/3) da amostra foram utilizados para extração de RNA total com o uso do reagente Trizol[®] (Invitrogen), a partir de adaptações do protocolo do fabricante. Os 200µL restantes das amostras foram armazenados novamente a -80°C, para experimentos posteriores. Após protocolo de extração, o RNA foi ressuscitado em 30µL de água ultra pura, e posteriormente submetido a tratamento com TURBO DNase[®] (Ambion), a partir de protocolo do fabricante. As amostras foram quantificadas por densidade óptica no espectrofotômetro de luz Ultrospec[™] 2100 *pro*.

5.6- Quantificação de DENV-2 por RT-PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)

As amostras resultantes das coletas após a infecção viral foram analisadas individualmente, e o número de cópias virais em cada órgão dos mosquitos coletados foi determinado por RT-PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR), feito a partir das amostras de RNA total extraído por Trizol[®]. Para isso, o gene NS5, referente a proteína não estrutural 5, foi escolhido para as análises. A concentração de todas as amostras foi normalizada e 25ng

de RNA por reação foram utilizado nos ensaios em placas de 96 poços. O Kit QuantiTect® SYBR Green RT-PCR® (QIAGEN) foi utilizado para as reações de qRT-PCR *one-step*. Os primers NS5 *forward* e *reverse* usados foram os descritos por Kong et al. (2006), sendo: NS5 *f* 5'-GGAAGGAGAAGGACTGCACA-3', e NS5 *r* 5'-ATTCTTGTGTCCCATCCTGCT-3', ambos a uma concentração de 0,2 µM. O programa usado na reação foi o seguinte: 50°C por 30 minutos, para a reação de transcrição reversa, 95°C por 15 minutos, para ativação da Taq, e 40 ciclos de 94°C por 15 segundos, 58°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos. As amostras foram amplificadas no termociclador 7500 Real-Time PCR System®, da Applied Biosystems.

Para a curva padrão, transcrito purificado do fragmento NS5 foi utilizado. Para isso, uma amostra de cDNA de tecido de *Ae. aegypti* previamente diagnosticada como positiva para DENV-2 foi utilizada como molde para PCR com primers NS5. O primer *reverse* utilizado nessa reação foi o mesmo citado acima, já o primer *forward* constituiu da mesma seqüência do primer usado para a qRT-PCR mas com adição da seqüência T7 no terminal 5' (TAATACGACTCACTATAGGG), para permitir reação de transcrição (KONG et al., 2006). Após amplificação do fragmento NS5 contendo a seqüência T7, 1 µL de solução diluída 1:10 do amplicon foi submetida à transcrição *in vitro* com o kit MAXIscript® (Ambion), de acordo com o protocolo do fabricante. A concentração do transcrito foi determinada por densidade óptica e diluições seriadas de 10⁻⁷ a 10⁻¹¹ foram preparadas. O número de cópias de RNA dessas soluções foi calculado pela seguinte fórmula descrita por (KONG et al., 2006):

$$Y \text{ de moléculas}/\mu\text{L} = \frac{X \text{ g} / \mu\text{L RNA}}{\text{Tamanho do transcrito (pb)} \times 340} \times 6,02 \times 10^{23}$$

A quantificação do DENV-2 nas amostras de mosquitos foi realizada da seguinte maneira: em cada placa de qRT-PCR, a curva padrão de NS5 foi incluída (5 diluições), gerando valores de *cycle threshold* (Ct). Para cada ensaio, uma fórmula de regressão linear foi construída com os valores de Ct relativos ao número de moléculas das diluições da curva padrão. Os valores de Ct das amostras foram então colocados nessa fórmula para se obter o número de moléculas. Todas as amostras das qRT-PCRs, incluindo a curva padrão, foram corridas em duplicatas.

5.7- Expressão de REL1, HOP e Dicer-2 através de PCR quantitativo em tempo real (qPCR).

Amostras de RNA positivas e negativas para DENV-2 dos diferentes órgãos dos mosquitos e de três momentos após infecção (7, 15 e 21 dias) de todas as populações foram submetidas à qPCR com primers para as moléculas REL1, HOP e Dicer-2 (DCR-2). Os primers para REL1 amplificam um fragmento de 57 pb do transcrito e foram os seguintes: *f* 5'- CGGACGCCCCGATACC-3'; *r* 5'- GTTGAATGTTCCACCATGACAGGAT-3'. Para HOP, os primers amplificaram um fragmento de 60 pb do transcrito e foram: *f* 5'- ACAGGCACAGGCCGAAA-3'; *r* 5'- ACACGACGCCACACCAT-3'. Já os primers para Dicer-2 foram desenhados para amplificar 61 pb do transcrito e foram: *f* 5'- CGGGCAAACCCTGTTACATC-3'; *r* 5'- TGTTGGATCCTGCGCAAAC-3'. Como controle endógeno, os seguintes primers do gene ribossomal rpl8 (LAN; FALLON, 1992) foram utilizados para amplificar um fragmento de 60 pb: *f* 5'- CCACACCAAGAAGCGAAAGG-3'; *r* 5'- GTGACGTTCCGGCATAATCGA-3'.

O kit utilizado nessas qPCRs foi o Power SYBR Green Master Mix (Applied) e portanto, a síntese de cDNA das amostras foi feita anteriormente com 200 ng de RNA. Para a síntese de cDNA os reagentes utilizados foram: oligodT(20), dNTPs, RNase OUT e AMV cloned reverse transcriptase, todos da Invitrogen. O protocolo utilizado foi adaptado do fabricante, onde 1/3 dos reagentes foram usados por reação com volume final de 20 µL. Nas reações de qPCR, 2 µL de cDNA foi usado. As concentrações dos primers nessas reações foram 0,5 µM, exceto o primer *forward* REL1, o qual foi usado a 0,9 µM. Como controle positivo, cDNA de pool de 20 fêmeas de *Ae. aegypti* infectadas com DENV-2 (cDNA de mosquitos inteiros) foi utilizado em todas as placas para os três genes.

Como a quantidade de RNA nessas amostras era um fator limitante (devido à pouca quantidade de tecido), a positividade de expressão dos genes foi determinada tanto pelo Ct, como pelo pico da curva de dissociação, ou seja, a expressão gênica foi considerada positiva se havia um valor de Ct e um pico único na curva de dissociação, comparado ao controle. Foram eliminadas das análises as amostras que foram negativas para o gene rpl8.

Adicionalmente, amostras aleatórias positivas para rpl8, REL1 e Dicer-2 foram clonadas e sequenciadas. Para isso, o material do poço positivo da placa de qPCR foi purificado por kit de purificação de PCR (QIAGEN) e clonado em pGEM T-Easy, de acordo com o protocolo do fabricante. O plasmídeo contendo o inserto foi purificado e sequenciado. Por último, amostras aleatórias positivas das placas foram corridas em gel de agarose 2,5%, juntamente com os controles, para checagem do tamanho dos fragmentos.

6. RESULTADOS

6.1-Taxas de infecção

A infecção artificial com DENV-2 em populações de laboratório e de campo de *Ae. aegypti* foi bem sucedida. Foram analisados intestino (amostras individuais), corpo gorduroso (amostras individuais) e glândulas salivares (*pools* de três indivíduos) e as taxas de infecção foram calculadas. Nos intestinos, ao 3º dpi, RecLab e Petrolina registraram uma taxa de infecção de DENV-2 em 10% dos indivíduos (Figura10). Nesse momento de coleta, Recife não teve positividade registrada nesse órgão. Aos 7dpi, todas as populações estavam positivas para o DENV-2, com taxas de 44,4, 55,5 e 62,6% para RecLab, Recife e Petrolina, respectivamente. Aos 11dpi, Recife apresentou a maior positividade de infecção de intestino ao se comparar os 5 pontos de análise dentro dessa população, apresentando 80% de positividade para o vírus. Nesse mesmo dpi, Petrolina teve uma taxa infecção de 40%, seguida de RecLab com 20% de intestinos infectados. No 15º dpi, Petrolina apresentou 70% de infecção, seguida de Recife com 60% dos intestinos positivos, já a RecLab apresentou 40%. No 21º dpi, a população de Petrolina apresentou o pico máximo de positividade (83,3%) para intestinos entre todas as populações e todos os dpi analisados. Nesse mesmo dpi, RecLab e Recife tiveram uma taxa de infecção de 55,5% e 33,3% de intestino, respectivamente (Figura 10).

Diante da importância do corpo gorduroso na resposta imune do mosquito ao DENV e por ser um órgão amorfo distribuído por todo o corpo do mosquito (podendo, então, servir como parâmetro para taxa de disseminação viral), investigamos as taxas de infecção também nesse tecido (Figura 11). Aos 3pi, apenas Petrolina teve positividade registrada para DENV-2 no corpo gorduroso, com 11,1% de infecção. Aos 7dpi, o corpo gorduroso das três populações continham o vírus, com uma taxa de infecção de 30, 10 e 20% para RecLab, Recife e Petrolina, respectivamente. Aos 11dpi, somente RecLab e Petrolina foram positivas para o DENV, com um percentual de infecção de 50 e 77% dos mosquitos analisados, respectivamente. No 15º dpi, as três populações encontraram-se positivas, com a presença do vírus registrada em 37,5, 66,6 e 57,1% dos indivíduos analisados em RecLab, Recife e Petrolina, respectivamente. A positividade para o DENV no corpo gorduroso também foi

registrada no 21º dpi, com Petrolina apresentando 100% de positividade, seguida de RecLab e Recife, com 57,1 e 40%, respectivamente (Figura 11).

Outro órgão incluído nas análises de positividade, devido à sua importância na transmissão do vírus, foram as glândulas salivares (Figura 12). Nas populações analisadas em nosso estudo, não houve positividade para DENV-2 nos *pools* analisados aos 3dpi, com positividade registrada para DENV-2 apenas aos 7dpi, unicamente na população de Recife, cuja taxa de infecção foi de 33,3% dos *pools* de mosquitos analisados. Em 11dpi registrou-se uma positividade de 66,6 para RecLab e 33,3% para as populações Recife e Petrolina. Recife apresentou 100% de positividade no 15º dpi, seguido de Petrolina com 66,6% e RecLab com 33,3%. No 21º dpi, RecLab e Recife apresentaram uma positividade de 66,6%, e Petrolina apresentou 100% (Figura 12).

6.2-Morfometria geométrica alar

As análises de morfometria geométrica alar (Figura 13) demonstraram que o tamanho isométrico entre as duas populações de campo, Recife e Petrolina, foi similar, não diferindo significativamente ao se considerar as médias calculadas. A homogeneidade foi calculada pelo teste paramétrico T. Já o tamanho das asas da população de laboratório RecLab foi significativamente maior que as duas de campo (ANOVA, $p < 0.05$), o que reflete o maior tamanho das fêmeas dessa população.

6.3-Quantificação viral

A quantificação viral nos tecidos analisados variou de $7,1 \times 10^6$ a $4,5 \times 10^{10}$ cópias de RNA por amostra. Nos intestinos, o padrão geral da infecção viral apresentou um pico no 11º dpi, e diminuiu nos momentos subsequentes (15 e 21dpi) (Figura 14). No corpo gorduroso, a quantificação viral foi parecida nos 7, 11, 15 e 21dpi nas três populações (Figura 15), com exceção do 11º dpi de Recife, onde não foi registrada positividade. Nas glândulas salivares, a quantificação viral também foi similar nos 11, 15 e 21dpi, sendo que na população de Petrolina o título nas glândulas foi discretamente maior no 11º dpi. Recife foi a única população com glândula salivar positiva ao 7º dpi, sendo que a quantificação viral nesse momento foi a mais baixa (Figura 16). A média de quantificação viral em cada dpi foi similar entre as populações.

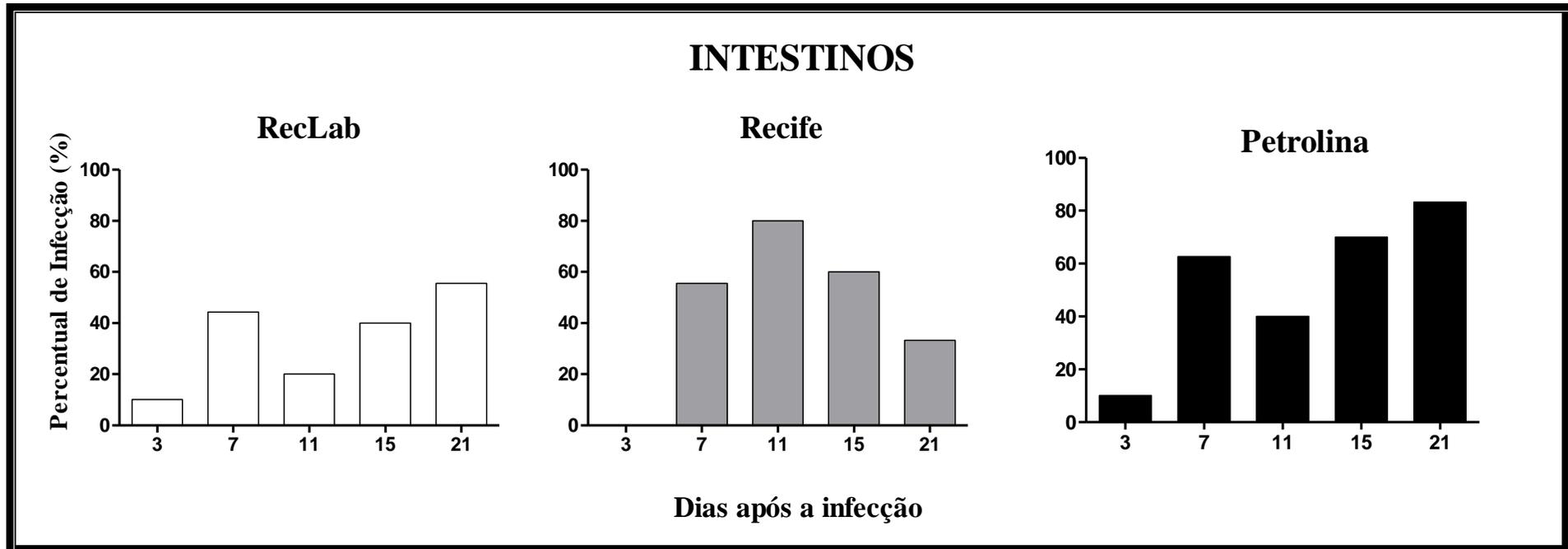


Figura 10. Percentual de intestinos de mosquitos *Aedes aegypti* infectados artificialmente por alimentação sanguínea contendo vírus dengue tipo 2. As populações de mosquitos usadas foram: RecLab (laboratório), Recife (campo) e Petrolina (campo). As análises foram feitas nos dias 3, 7, 11, 15 e 21 após a alimentação. Foram analisados de 8-10 mosquitos em cada um dos dias após a infecção.

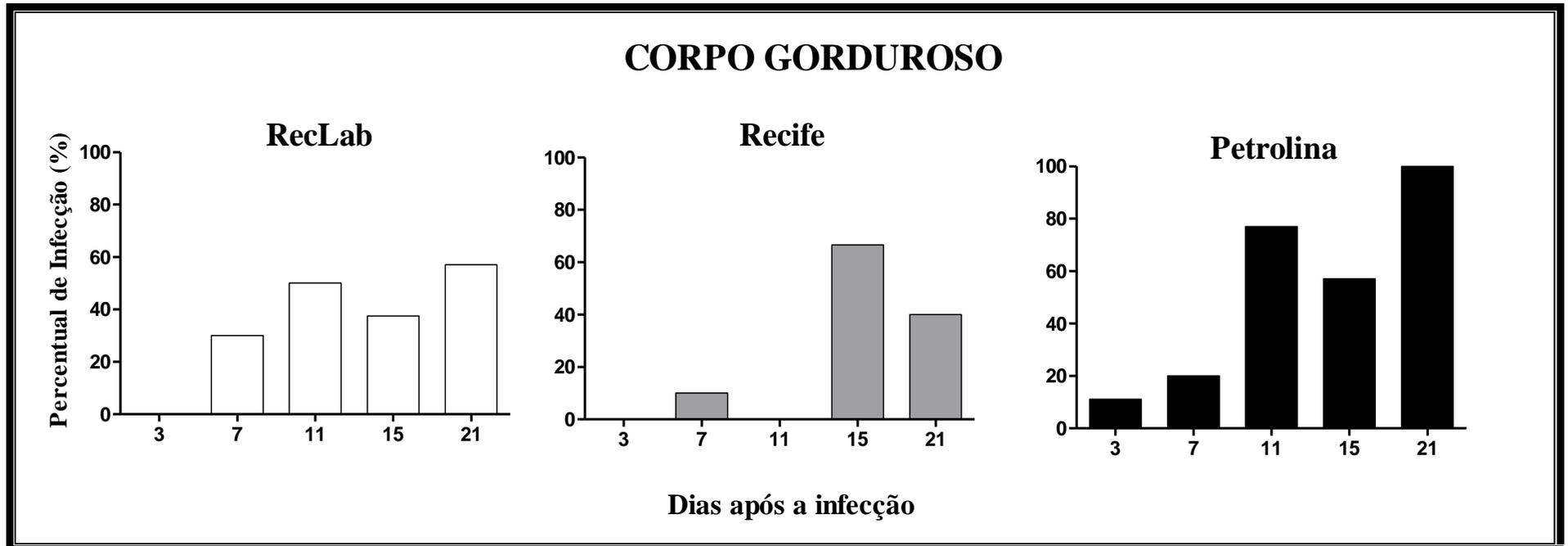


Figura 11. Percentual de corpo gorduroso de mosquitos *Aedes aegypti* infectados artificialmente por alimentação sanguínea contendo vírus dengue tipo 2. As populações de mosquitos usadas foram: RecLab (laboratório), Recife (campo) e Petrolina (campo), e as análises foram feitas nos dias 3, 7, 11, 15 e 21 após a alimentação. Foram analisados de 7-10 mosquitos por população em cada um dos dias após a infecção.

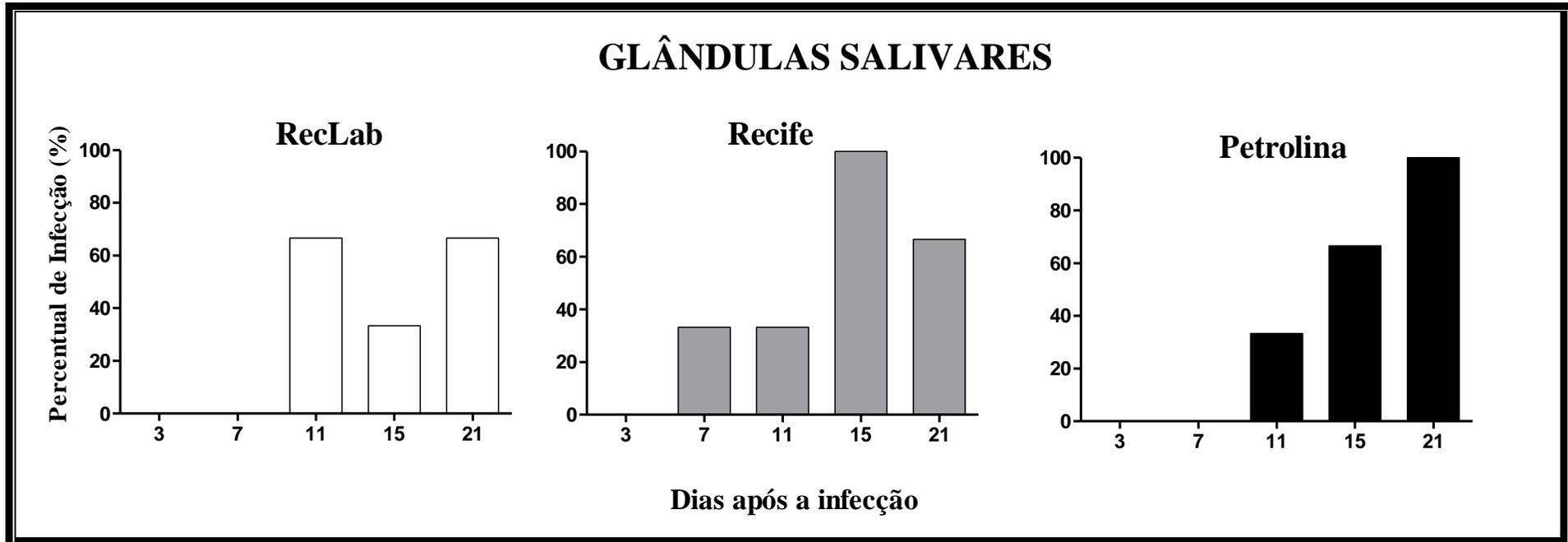


Figura 12. Percentual de glândulas salivares de mosquitos *Aedes aegypti* infectados artificialmente por alimentação sanguínea contendo vírus dengue tipo 2. As populações de mosquitos usadas foram: RecLab (laboratório), Recife (campo) e Petrolina (campo), e as análises foram feitas nos dias 3, 7, 11, 15 e 21 após a alimentação. Foram analisados 3 *pools* de mosquitos (3 pares de glândulas/*pool*) de cada população em cada um dos dias após a infecção.

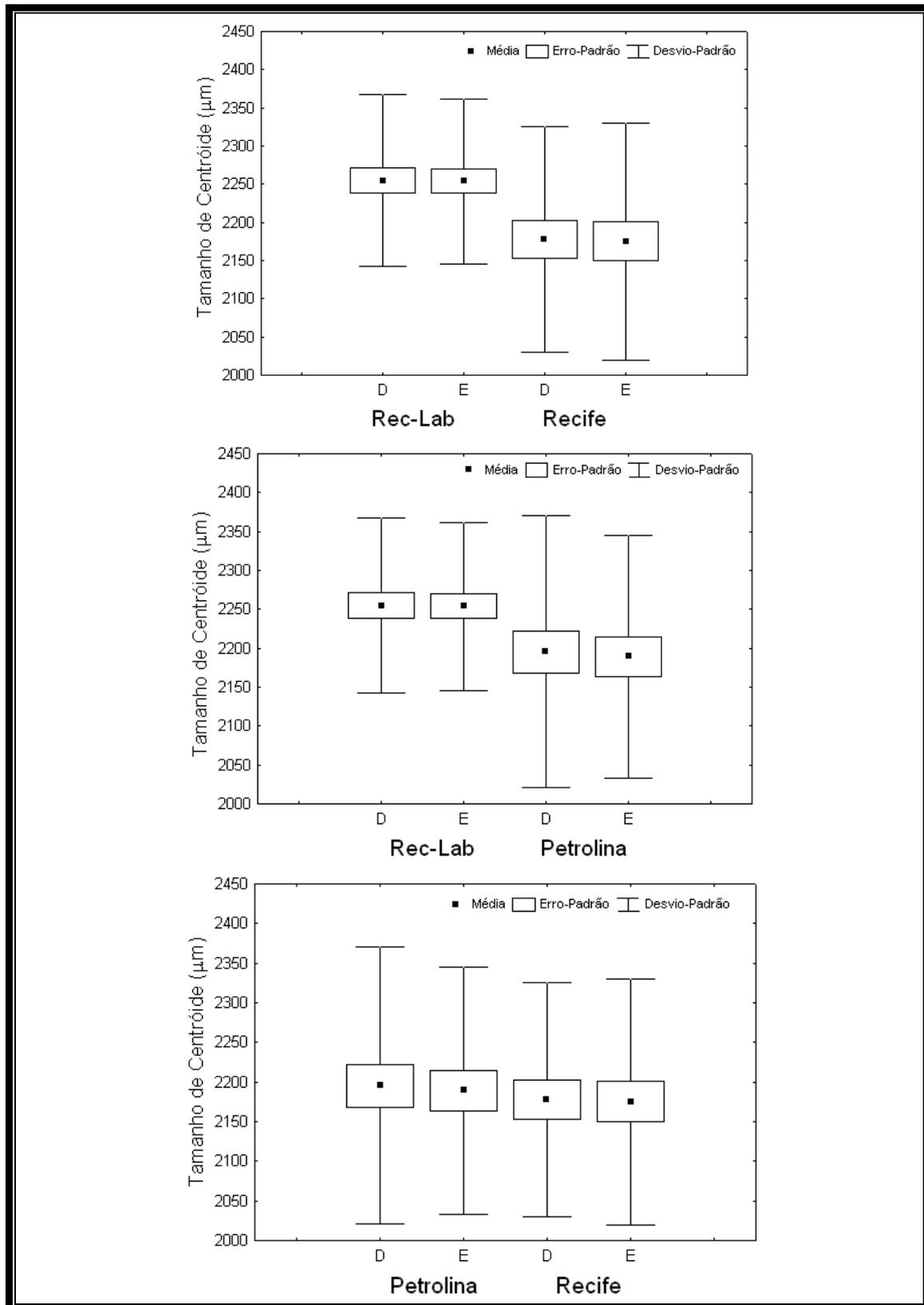


Figura 13. Tamanhos isométricos globais das asas de mosquitos *Aedes aegypti* das populações: RecLab, Recife e Petrolina. As análises foram feitas aos pares (RecLab x Recife; RecLab x Petrolina; Recife x Petrolina). D: asa direita. E: asa esquerda.

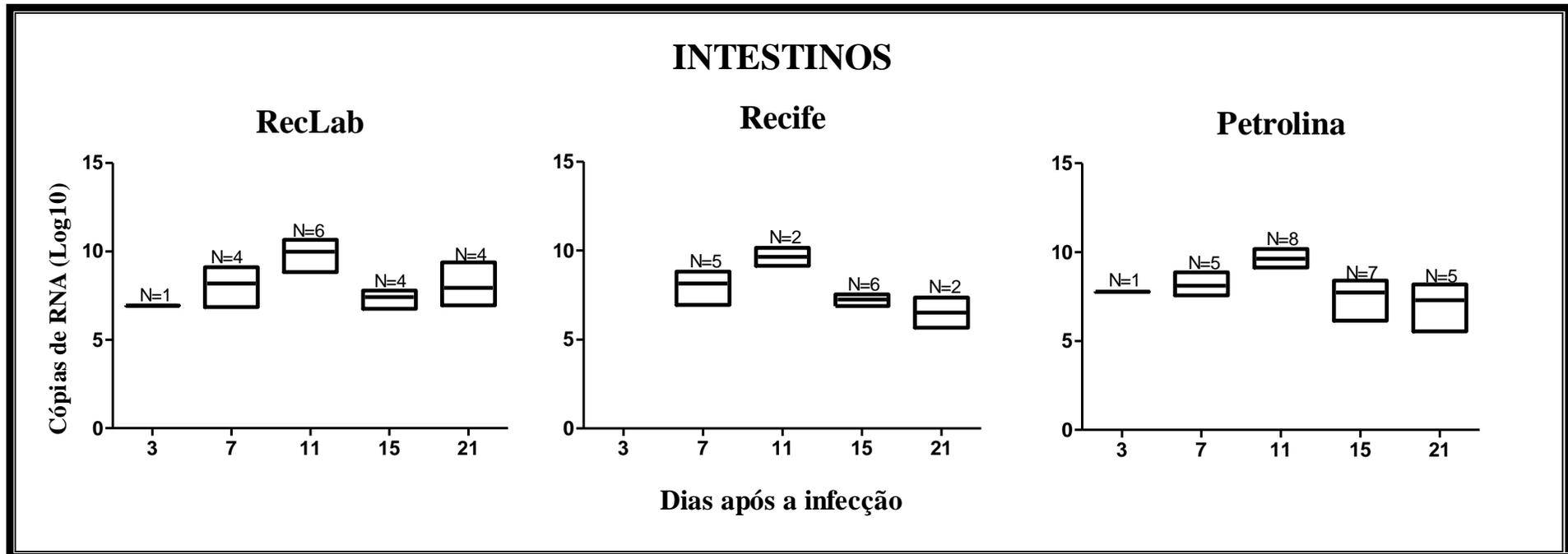


Figura 14. Número de cópias de RNA do vírus dengue sorotipo 2 em amostras individuais de intestino de mosquitos *Aedes aegypti* das população RecLab (laboratório) Recife (campo) e Petrolina (campo). Os mosquitos foram alimentados artificialmente com sangue infectado e os pontos de análise foram aos 3, 7, 11, 15 e 21 dias após a infecção.

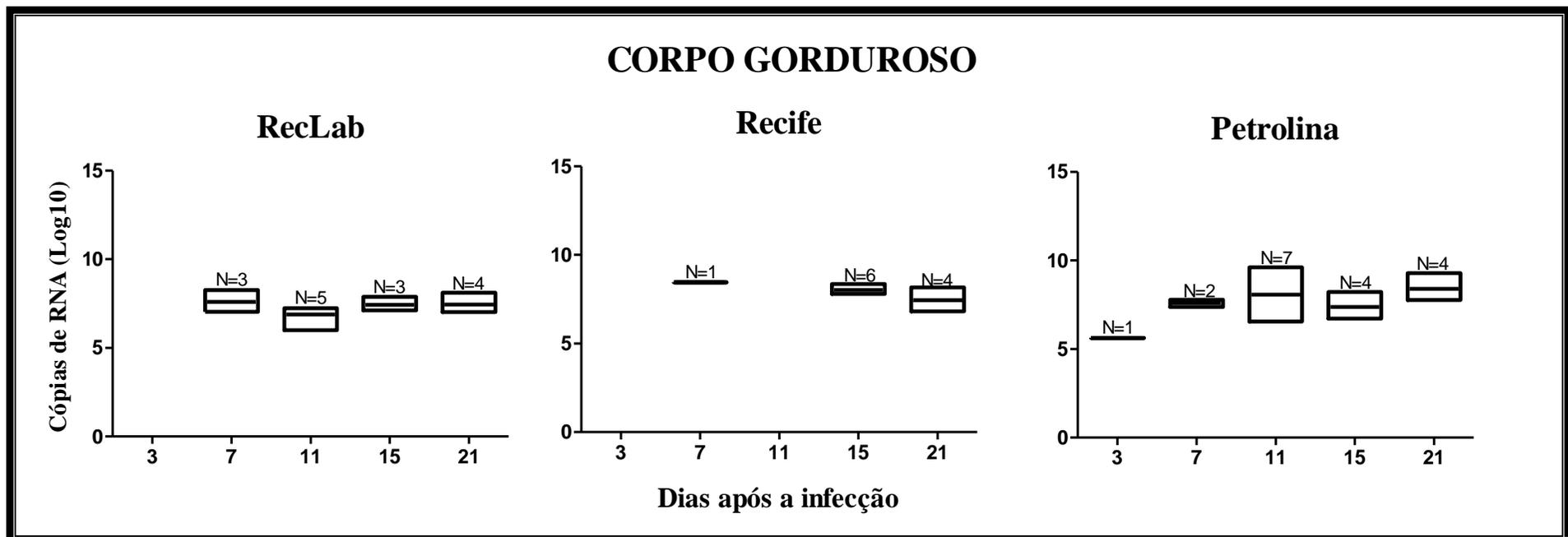


Figura 15. Número de cópias de RNA do vírus dengue sorotipo 2 em amostras individuais de corpo gorduroso de mosquitos *Aedes aegypti* das população RecLab (laboratório) Recife (campo) e Petrolina (campo). Os mosquitos foram alimentados artificialmente com sangue infectado e os pontos de análise foram aos 3, 7, 11, 15 e 21 dias após a infecção.

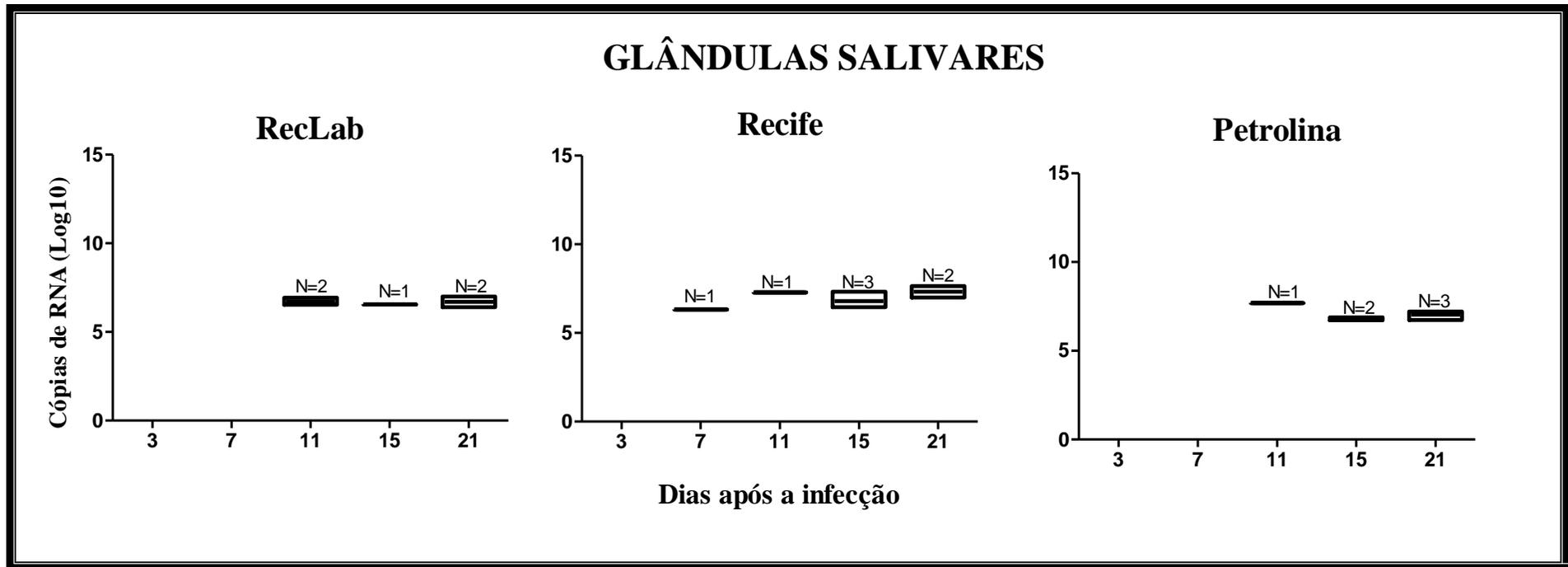


Figura 16. Número de cópias de RNA do vírus dengue sorotipo 2 em pools com amostras de 3 glândulas salivares de mosquitos *Aedes aegypti* das população RecLab (laboratório), Recife (campo) e Petrolina (campo). Os mosquitos foram alimentados artificialmente com sangue infectado e os pontos de análise foram aos 3, 7, 11, 15 e 21 dias após a infecção.

6.4-Expressão de genes de resposta imune nos órgãos de diferentes populações de *Aedes aegypti*.

No geral, a molécula expressa na maior quantidade de indivíduos foi, claramente, REL1, chegando a 100% em alguns casos (intestino de indivíduos controles da RecLab no 21º dpi; corpo gorduroso de indivíduos infectados da RecLab no 7º dpi, conforme observado na figura 17 e 18, respectivamente). Sua expressão entre controles e infectados e entre populações apresentou maior variação no intestino, ao se comparar com corpo gorduroso. Nesse órgão, a porcentagem de indivíduos com níveis detectáveis de expressão de REL1 aumentou nos infectados no primeiro dpi analisado (7º) e diminuiu nos infectados no 15º dpi, em todas as populações. No corpo gorduroso, com exceção de um aumento no número de indivíduos infectados expressando REL1 em RecLab no 7º dpi, sua expressão não variou muito entre controles e infectados nas três populações. Nas glândulas salivares, REL1 também foi detectado no maior número de amostras nas três populações.

Seguindo REL1, HOP foi a segunda molécula mais detectada nas amostras. Em RecLab e Recife, nos 7º e 15º dpi, a proporção de indivíduos infectados expressando HOP diminuiu em relação ao grupo controle, nos casos onde sua expressão foi detectada.

A molécula com expressão detectada na menor parte de indivíduos de todas as populações de *Ae. aegypti* foi DCR-2, representante do mecanismo de RNAi. No grupo de mosquitos infectados com DENV-2, a expressão de DCR-2 no intestino no 7º dpi só foi detectada na população RecLab. No 15º dpi a expressão dessa molécula foi observada em mosquitos da RecLab e Recife, sendo que a proporção de infectados com expressão positiva foi menor que nos controles. Não houve expressão de DCR-2 no intestino dos mosquitos de Petrolina nos 7º e 15º dpi.

Nas glândulas salivares, a expressão de REL1 foi observada nas três populações, sendo que mosquitos de Petrolina expressaram exclusivamente esta molécula nesse tecido. Já a expressão de HOP foi mais observada nos insetos de Recife, seguida daqueles da colônia RecLab. A expressão de DCR-2 nas glândulas salivares só foi observada nos grupos controles de RecLab ao 21º dpi e Recife ao 7º dpi. Não houve expressão de HOP e DCR-2 nas glândulas salivares de insetos da população de Petrolina.

Esses resultados podem ser visualizados nas figuras 17 para resultados referentes a intestinos, Figura 18 para corpo gorduroso e Figura 19 para glândulas salivares.

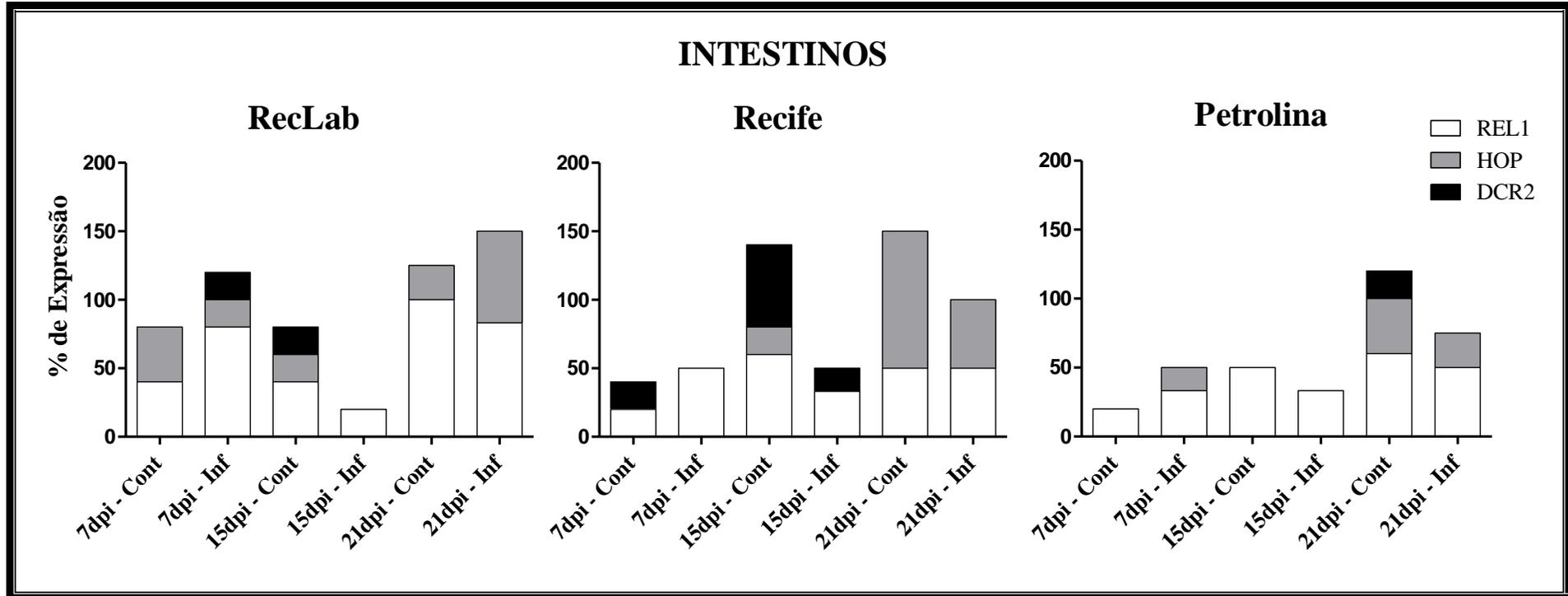


Figura 17. Percentual de expressão de genes de resposta imune em amostras individuais de intestino de mosquitos *Aedes aegypti* das populações RecLab (laboratório), Recife (campo) e Petrolina (campo) em diferentes momentos após a alimentação com sangue infectado ou não infectado (controles). Cont: grupo controle; Inf: grupo infectado.

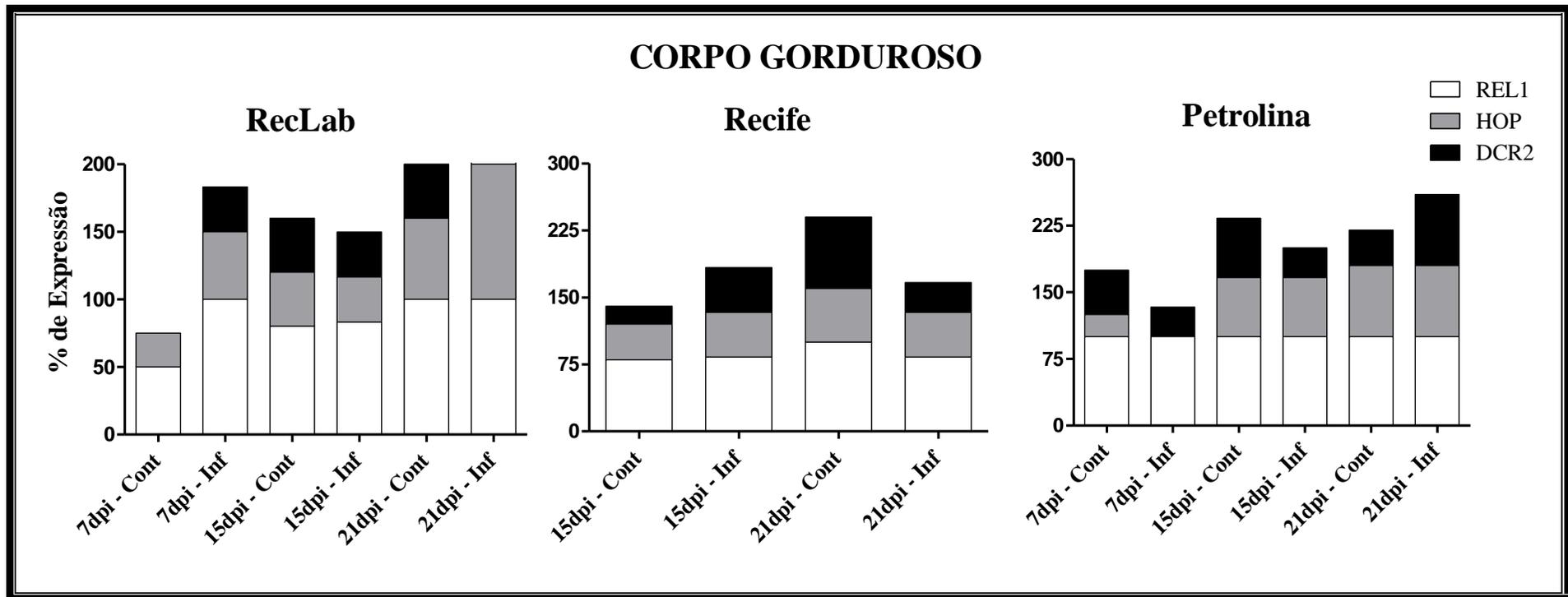


Figura 18. Percentual de expressão de genes de resposta imune em amostras individuais de corpo gorduroso de mosquitos *Aedes aegypti* das populações RecLab (laboratório), Recife (campo) e Petrolina (campo) em diferentes momentos após a alimentação com sangue infectado ou não infectado (controles). Cont: grupo controle; Inf: grupo infectado.

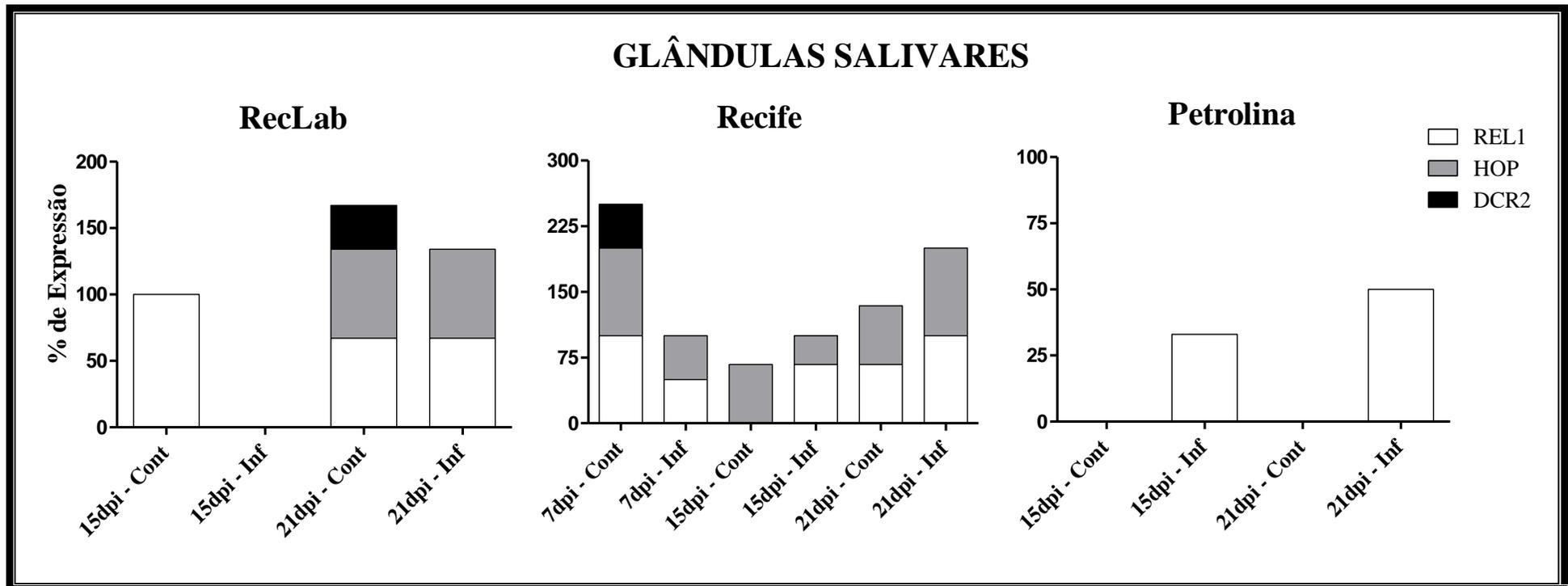


Figura 19. Percentual de expressão de genes de resposta imune em pools com amostras de 3 glândulas salivares de mosquitos *Aedes aegypti* das populações RecLab (laboratório), Recife (campo) e Petrolina (campo) em diferentes momentos após a alimentação com sangue infectado ou não infectado (controles). Cont: grupo controle; Inf: grupo infectado.

6.5-Expressão individual ou simultânea de REL1, HOP e DCR-2

Os resultados para intestinos individuais da colônia RecLab mostram que houve expressão única de REL1 tanto nos controles como nos infectados, com uma proporção maior no último grupo. Já uma pequena proporção de indivíduos no grupo controle em RecLab expressou HOP unicamente. Não houve expressão única de DCR-2 no intestino de RecLab (Figura 20). Na população de Recife, foram observados indivíduos que expressaram unicamente REL1, HOP e DCR-2 no intestino, sendo que nos infectados houve somente expressão exclusiva de REL1, em maior proporção que nos controles (Figura 20). Na população de Petrolina, houve expressão única de REL1 e HOP no intestino de indivíduos infectados e controles, em proporções ligeiramente diferentes. Não foi observada a expressão única de DCR-2 nessa população (Figura 20).

Em relação à co-expressão de moléculas no intestino das populações de *Ae. aegypti* analisadas, os padrões diferiram entre elas. Em RecLab, houve co-expressão de REL1/HOP e REL1/HOP/DCR-2 nos controles e infectados, sendo que a proporção de infectados com co-expressão de REL1/HOP foi maior que no grupo controle (Figura 21). Já na população de Recife, houve co-expressão de REL1/HOP, REL1/DCR-2 e REL1/HOP/DCR-2 (a primeira combinação em maior proporção), já nos infectados a co-expressão das três moléculas não foi observada (Figura 21). Em relação à Petrolina, somente a co-expressão REL1/DCR-2 foi encontrada nos controles. Já nos infectados não houve co-expressão de moléculas (Figura 21). No corpo gorduroso a expressão única de REL1 foi observada nos grupos controle e infectado das três populações. A expressão única de DCR-2 foi observada somente em RecLab no grupo controle e em Recife no grupo infectado. Já a expressão exclusiva de HOP, foi detectada somente no grupo controle de Recife (Figura 20). No corpo gorduroso de RecLab, os indivíduos do grupo controle co-expressaram REL1/HOP e REL1/HOP/DCR-2 (a segunda em maior proporção). Nos infectados dessa população, houve co-expressão de REL1/HOP, REL1/DCR-2 (em pequena proporção) e REL1/HOP/DCR-2, com uma maior proporção de indivíduos co-expressando REL1/HOP nos infectados quando comparados aos controles (Figura 21). Em *Ae. aegypti* de Recife, houve co-expressão no corpo gorduroso de REL1/HOP, REL1/DCR-2 e REL1/HOP/DCR-2, sendo a segunda combinação de maior proporção (Figura 21). Na população de Petrolina, a co-expressão de REL1/HOP, REL1/DCR-2 e REL1/HOP/DCR-2 no corpo gorduroso foi observada tanto nos controles quanto nos infectados, sendo que a combinação REL1/HOP/DCR-2 foi em maior proporção nos infectados (Figura 21).

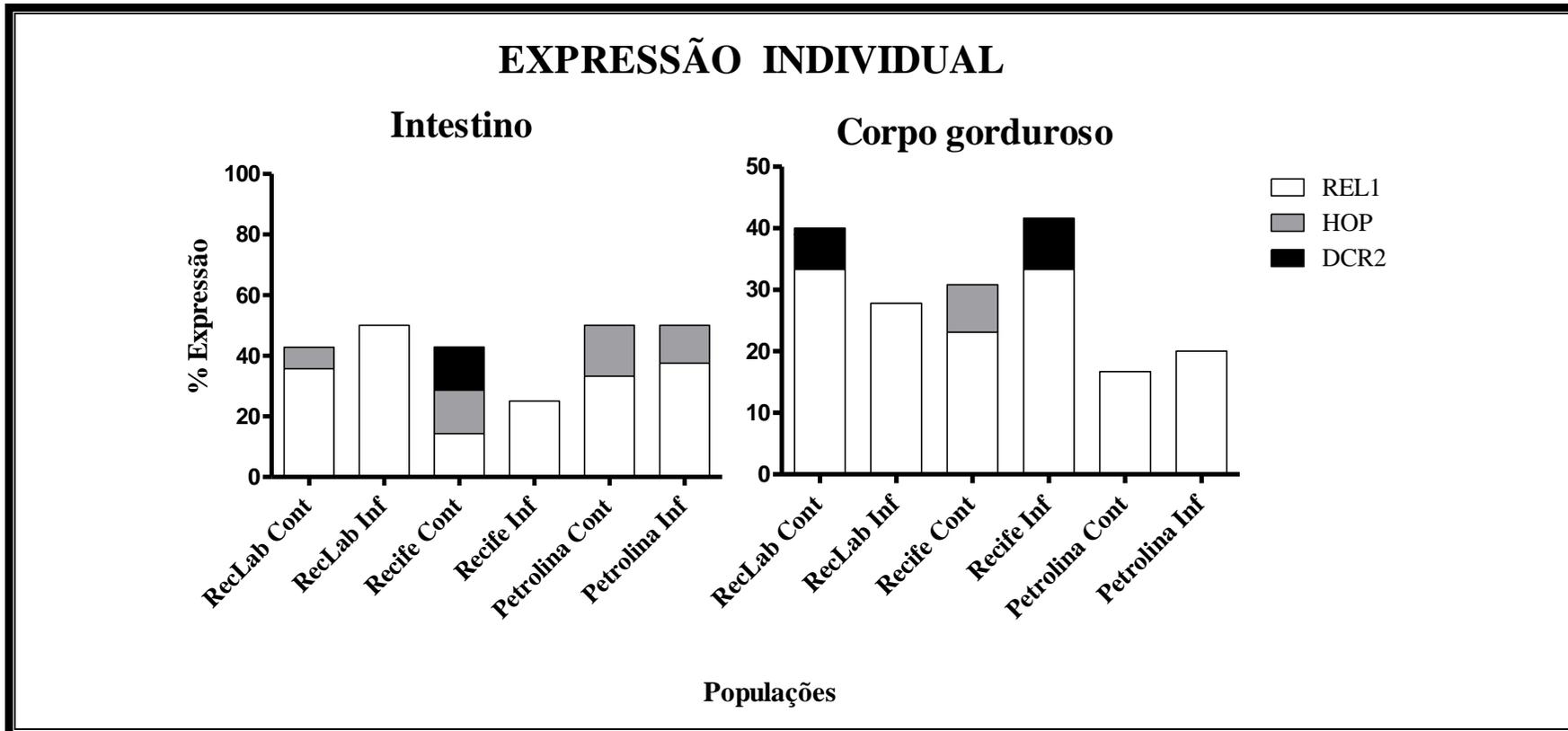


Figura 20. Percentual de expressão individual de genes de resposta imune em amostras de intestino e corpo gorduroso de *Aedes aegypti* das populações RecLab, Recife e Petrolina nos grupos infectados e controle de cada população. Cont: grupo controle; Inf: grupo infectado.

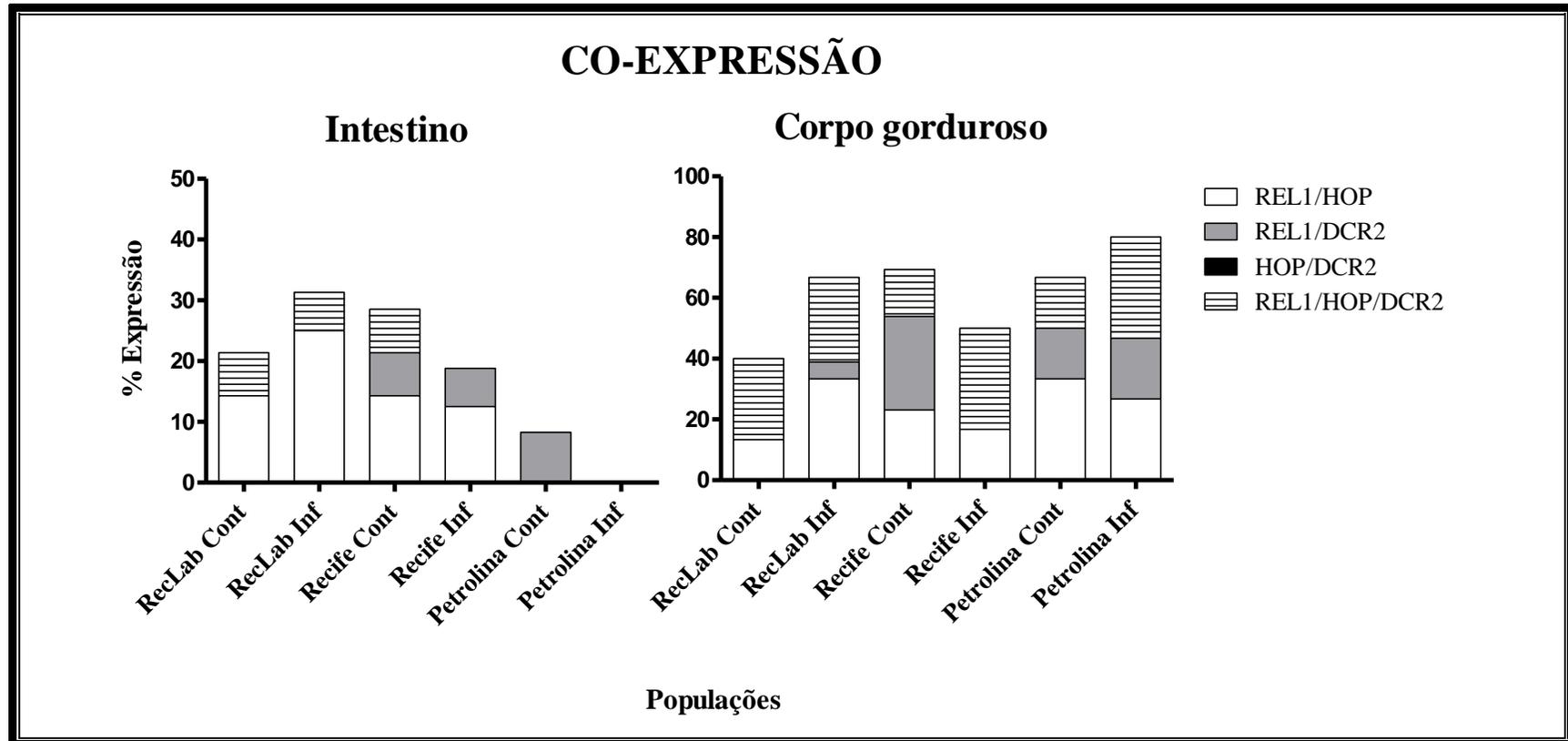


Figura 21. Percentual de co-expressão de genes de resposta imune em amostras de intestino e corpo gorduroso de *Aedes aegypti* das populações RecLab, Recife e Petrolina nos grupos infectados e controle de cada população. Cont: grupo controle; Inf: grupo infectado.

7. DISCUSSÃO

Este trabalho demonstrou que há variação na resposta à infecção viral nas diferentes populações estudadas. Uma análise em pequena escala releu o emprego de mecanismos antivirais após a infecção com DENV-2, através do registro da expressão de moléculas-chave representantes de cada um dos três mecanismos antivirais conhecidos até o momento em mosquitos.

No presente estudo, a quantificação viral no intestino aumentou gradualmente do 3º ao 11º dpi, havendo um declínio nos momentos seguintes. Esse padrão se repetiu em todas as populações. Sanchez-Vargas et al. (2009), em *Ae. aegypti* HWE infectado com DENV-2, mostraram um padrão similar, com um pico da titulação viral no 11º dpi e começo de declínio do mesmo no 12º dpi. Apesar do pico observado nas três populações do nosso estudo ao 11º dpi no intestino, a quantidade de partículas virais parece ter permanecido constante nos outros casos (vide quantificação viral nas glândulas). É possível que o pico observado aos 11dpi no intestino reflita uma replicação viral mais intensa nesse órgão.

Apesar do vírus ter sido detectado no corpo gorduroso de um indivíduo da população de Petrolina aos 3dpi, nas três populações o vírus foi encontrado nesse tecido no 7º dpi. A presença do vírus no corpo gorduroso reflete o período de disseminação viral, ou seja, período em que o vírus sai do intestino e se dissemina para outros órgãos. Em outros estudos, órgãos como perna e cabeça são usados para se obter a taxa de disseminação viral (GUBLER et al., 1979; LAMBRECHTS et al., 2009; LOURENCO-DE-OLIVEIRA et al., 2004). Considerando este fato, a população de Petrolina apresentou a taxa mais alta de disseminação viral, sugerindo que a barreira de escape do intestino nessa população, um dos determinantes da competência vetorial, seria menos eficiente.

Os nossos dados sobre as taxas de infecção das glândulas salivares, apesar de oferecerem alguma informação sobre a infecção do DENV-2 nesse tecido nas populações analisadas, possuem alguns problemas de análise. Além das coletas terem sido feitas em *pools*, impossibilitando assim uma análise dos reais percentuais de infecção, o número de amostras foi pequeno (3 *pools*/dpi/população). Portanto, pode-se verificar somente que em todas as populações houve infecção viral nas glândulas e que a população de Recife foi a única onde houve uma amostra positiva aos 7dpi (nas outras o vírus foi detectado pela primeira vez aos 11dpi). Em termos de amostras positivas totais (todos os dpi) de glândulas salivares, a população RecLab foi a que apresentou a menor porcentagem. Em outro estudo,

Salazar et al. (2007), detectaram DENV-2 nas glândulas de *Ae. aegypti* Chetumal em 10% dos indivíduos no 3º dpi e em 76-95% a partir do 10º dpi. Em relação à quantificação viral, a quantidade de vírus observada foi constante e menor que nos outros órgãos.

As análises de percentual de infecção dos diferentes órgãos e da quantificação viral indicam que a população de RecLab pode ser menos competente vetorialmente que as outras. Adicionalmente, as análises de morfometria geométrica alar indicam que as fêmeas da RecLab são significativamente maiores que as fêmeas das outras duas populações estudadas. Fêmeas maiores ingerem maior quantidade de sangue e conseqüentemente podem apresentar uma maior taxa de infecção viral, o que não foi o caso observado em nosso estudo. Uma vez que RecLab é uma população de laboratório não selecionada para susceptibilidade viral, é possível que as populações de campo, Recife e Petrolina, sejam mais competentes, pois Pernambuco é um estado endêmico para o DENV, e essas populações podem estar constantemente em contato com o vírus. Há também o importante fato da cepa do DENV-2 3808, aqui utilizada, ter sido isolada durante epidemia viral em PE.

Estudos sobre a interação de *Ae. aegypti* de campo com DENV são escassos (ANDERSON; RICO-HESSE, 2006; BENNETT et al., 2005; BENNETT et al., 2002; GUBLER et al., 1979; LAMBRECHTS et al., 2009; LOURENCO-DE-OLIVEIRA et al., 2004; SALAZAR et al., 2007) mas mostram, claramente, que diferentes populações de mosquitos respondem de maneira distinta aos sorotipos/genótipos do vírus. Isso se deve tanto a fatores ambientais/ecológicos, como também a fatores genéticos, tanto do vetor quanto do vírus. Urdaneta-Marques et al. (2008), ao investigarem polimorfismos de genes mitocondriais em populações venezuelanas, fizeram uma relação entre as variações genéticas existentes nas oito populações analisadas, e os níveis de competência vetorial desses mosquitos ao vírus dengue sorotipo 2, mostrando diferenças significativas nas taxas de infecção e disseminação. Para populações de mosquitos coletados em diversas regiões do Brasil, Lourenço-de-Oliveira et al. (2004) correlacionaram a variabilidade genética dessas diferentes populações com padrões de susceptibilidade dos mosquitos aos vírus dengue sorotipo 2 e vírus da febre amarela. Esses autores mostraram naquele estudo que as taxas de infecção realizadas experimentalmente em *Ae. aegypti* para ambos os vírus são elevadas e heterogêneas ao se comparar as diferentes populações.

A susceptibilidade ao vírus é determinada, em parte, pela resposta imune do vetor. Ao mesmo tempo, o vírus, durante o processo de co-evolução com seu hospedeiro vetor, adquiriu mecanismos de evasão da resposta imune para continuar seu ciclo de propagação. Apesar dos mecanismos antivirais em mosquitos serem ainda pouco conhecidos, há estudos mostrando o

envolvimento das vias de sinalização Toll (RAMIREZ; DIMOPOULOS, 2010; XI et al., 2008) e JAK-STAT (SOUZA-NETO et al., 2009) e do mecanismo de RNAi (SANCHEZ-VARGAS et al., 2009). Entretanto o conhecimento desses mecanismos ainda é bastante primário. Não se sabe como o vírus os ativa ou se linhagens/populações diferentes de *Ae. aegypti* empregam um dos mecanismos mais eficientemente que outras ou até mais de um mecanismo em combinação.

Quando olhamos o gráfico de expressão gênica individual de todas as populações (Figuras 20 e 21), o grupo de indivíduos infectados tem uma menor porcentagem de HOP e DCR-2 (representantes de JAK-STAT e RNAi, respectivamente) sempre que estes estão presentes no grupo controle, o que pode significar que o vírus está manipulando estes mecanismos, como sugerido previamente (SANCHEZ-VARGAS et al., 2009; SIM; DIMOPOULOS, 2010). Isso faz sentido, pois há evidências de que esses mecanismos são mais impactantes para o vírus no começo da infecção (SANCHEZ-VARGAS et al., 2009; SIM; DIMOPOULOS, 2010). Nos primeiros momentos da infecção, pode-se observar que os insetos de Petrolina, que por sua vez apresentaram uma taxa mais alta de infecção no intestino, não expressaram DCR-2 ou HOP. Por outro lado, no 7º dpi, os insetos infectados da RecLab expressaram todas as moléculas, sendo que a taxa de infecção no momento seguinte (11 dpi) foi bem mais baixa, indicando que os mecanismos de defesa ativados no vetor pela infecção podem ter sido eficientes.

No corpo gorduroso, essas diferenças não foram tão evidentes. Isso é de se esperar, devido ao fato desse órgão ser o principal local de produção de moléculas de resposta imune e estar ativo não só após a infecção com o vírus, mas também após alimentação com sangue em si (BARILLAS-MURY et al., 2004).

Nas glândulas salivares, os padrões de expressão foram bastante distintos entre as populações. Em RecLab, registramos taxa de infecção de glândulas salivares mais baixas dentre as três populações, não sendo detectada a expressão de nenhuma molécula na amostra positiva ao 15º dpi. Mesmo não havendo expressão no 15º dpi, a expressão de REL1 e HOP ocorreu no 21º dpi. Nesse dpi, o vírus parece ter modulado a expressão de DCR-2, que aparece nos controles. Na população de Recife, onde a detecção do vírus ocorreu pela primeira vez no 7º dpi, a expressão de HOP diminuiu tanto nesse mesmo dpi quanto no 15º, ao se comparar com o grupo controle. DCR-2 não foi expresso no 7º dpi de Recife infectado, diferentemente do que ocorre no grupo controle, sugerindo uma possível modulação pelo vírus da via de RNAi. A expressão de REL1 nas glândulas foi evidente tanto em insetos de Recife quanto de Petrolina, sendo que os insetos infectados de Petrolina expressaram

unicamente REL1. Esses dados levantam a possibilidade de JAK-STAT e RNAi serem também importantes no controle da infecção das glândulas por DENV, já que os mosquitos infectados das duas populações que apresentaram taxas mais altas de infecção nesse órgão, não expressaram ou expressaram em menor porcentagem essa moléculas (quando comparados aos respectivos controles). Esses dados são relevantes por não haver registro do papel dos mecanismos antivirais nas glândulas salivares, apesar desse órgão ser alvo vital para o ciclo viral no mosquito, ocorrendo também nessa região replicação viral (BEATY; MARQUARDT, 1996b).

As análises de expressão individual ou em combinação das moléculas-chave de mecanismos antivirais no intestino e corpo gorduroso também ofereceram informações relevantes. No intestino, houve supressão individual de HOP e DCR-2 sempre que transcritos desse gene estavam presentes nos controles. Já a co-expressão de REL1 e HOP na população RecLab aumentou nos infectados, podendo significar o emprego simultâneo da via Toll e JAK-STAT contra o vírus. Nessa população houve também co-expressão das três moléculas nos indivíduos infectados, não diferindo dos controles. Os dados da RecLab sugerem que o vírus não consegue modular eficientemente a defesa antiviral nessa população. Nos insetos da população de Recife, é evidente a supressão da expressão de genes individuais no grupo infectado, ao mesmo tempo em que a ausência da co-expressão das três moléculas nesse mesmo grupo é interessante, podendo sugerir diferenças entre defesas antivirais entre as populações. Nos indivíduos de Petrolina, o fato de DCR-2 só aparecer em co-expressão com REL1 é importante. Enquanto há evidências de que as vias Toll e JAK-STAT são independentes (SOUZA-NETO et al., 2009), não há registro ainda sobre o nível de dependência entre a via Toll e o mecanismo de RNAi. Nesse sentido, os presentes resultados mostram que a expressão individual de DCR-2 no intestino só ocorreu na população de Recife, mas que na maior parte dos indivíduos sua expressão ocorreu com REL1 (tanto na combinação REL1/DCR-2 quanto REL1/HOP/DCR-2). Esse fato levanta a questão sobre a relação entre esses mecanismos. Por outro lado, a ausência da co-expressão entre DCR-2 e HOP, sem REL1, pode indicar a falta de dependência desses mecanismos.

No corpo gorduroso, o aumento da co-expressão das três moléculas em todas as populações no grupo infectado sugere que o emprego de mecanismos antivirais é mais crucial no intestino, reforçando a hipótese da barreira no intestino, de infecção ou escape, na modulação da competência vetorial (MARQUARDT, 2004). Entretanto, a barreira de infecção das glândulas salivares também pode estar implicada na competência vetorial (MARQUARDT, 2004).

Os resultados aqui descritos indicam que diferentes populações de *Ae. aegypti* possivelmente empregam respostas antivirais distintas, tanto na magnitude quanto nas combinações. Além disso, os dados também indicam que o vírus tem capacidade de modulação diferente nas distintas populações. Uma das explicações para isso seria o polimorfismo das moléculas envolvidas nos mecanismos antivirais. Por fim, o fato de REL1 ter sido a molécula mais expressa em todos os tecidos e populações, está de acordo com estudos prévios que mostram o emprego dessa via na defesa antiviral em insetos (HOFFMANN, 2003; RAMIREZ; DIMOPOULOS, 2010; XI et al., 2008). Além disso, essa via está também envolvida na resposta imune contra outros patógenos, o que pode também explicar sua ativação generalizada nesses insetos. Sendo essa uma resposta de maior magnitude, pode ser que o vírus tenha adquirido meios para supressão de mecanismos também importantes, porém mais passíveis de modulação, como a JAK-STAT e RNAi. A ativação da JAK-STAT e do RNAi nos indivíduos controles, em alguns casos, também pode ser devida à resposta imune ativada após alimentação com sangue. Adicionalmente, as vias Toll e JAK-STAT podem estar relacionadas com outros sistemas fisiológicos em insetos, que não a resposta imune (LEMAITRE; HOFFMANN, 2007) e que o RNAi serve, além de defesa antiviral, como mecanismo endógeno de regulação gênica (MELLO; CONTE, 2004). Essas seriam outras possíveis explicações para a expressão de REL1, HOP e DCR-2 nos controles.

Este trabalho, assim como estudos anteriores, abre novas perspectivas para o desenvolvimento de ferramentas alternativas de controle vetorial, uma vez que revela o importante papel de diferentes vias de resposta antiviral. Recentemente, a liberação de insetos modificados geneticamente foi reportada no Caribe, o que mostra o início de uma nova era no controle dos insetos vetores. Desta forma, o conhecimento sobre a interação vírus-mosquito será fundamental na construção destas novas estratégias.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, M. D. *et al.* The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. Science, v. 287, n. 5461, p. 2185-2195, 2000.
- ADEGAS, M. G. *et al.* Parâmetros de Biossegurança para insetário e infectórios de vetores: aplicação e adaptação das normas gerais para laboratórios definidas pela Comissão Técnica de Biossegurança da Fiocruz. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2005.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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, 2000.
- 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.

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.

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.

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.

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

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

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

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.

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.

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.

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.

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.

GUZMAN, M. G. *et al.* Dengue: a continuing global threat. Nat Rev Microbiol, v. 8, n. 12 Suppl, p. S7-S16, 2010.

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.

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.

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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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. *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.
- LAN, Q. FALLON, A. M. Sequence analysis of a mosquito ribosomal protein rpL8 gene and its upstream regulatory region. Insect Mol Biol, v. 1, n. 2, p. 71-80, 1992.
- 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.

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. São Paulo: 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.

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.

- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- PAYNE, A. F. *et al.* Quantitation of *Flaviviruses* by fluorescent focus assay. J Virol Methods, v. 134, n. 1-2, p. 183-189, 2006.
- 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.
- 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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

WEBSTER, D. P.; FARRAR, J.; ROWLAND-JONES, S. Progress towards a dengue vaccine. Lancet Infect Dis, v. 9, n. 11, p. 678-687, 2009.

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.