

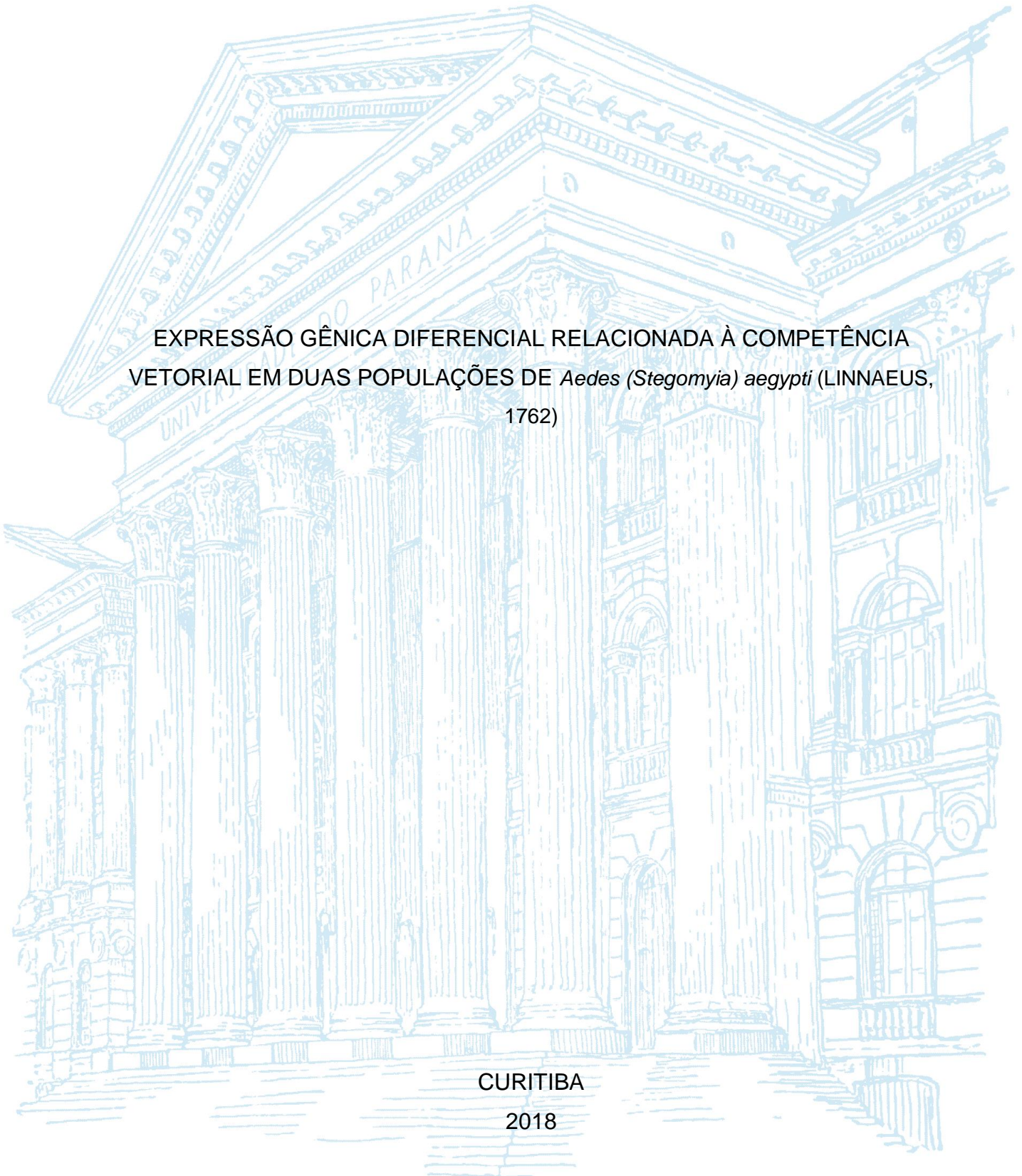
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

EMILY NENTWIG DE BARROS

EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL RELACIONADA À COMPETÊNCIA  
VETORIAL EM DUAS POPULAÇÕES DE *Aedes (Stegomyia) aegypti* (LINNAEUS,  
1762)

CURITIBA

2018



EMILY NENTWIG DE BARROS

EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL RELACIONADA À COMPETÊNCIA  
VETORIAL EM DUAS POPULAÇÕES DE *Aedes (Stegomyia) aegypti* (LINNAEUS,  
1762)

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Ciências Biológicas, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Mário Antônio Navarro da Silva

Coorientador: Dr. Vinicius Sobrinho Richardi

CURITIBA

2018

## TERMO DE APROVAÇÃO

EMILY NENTWIG DE BARROS

EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL RELACIONADA À CAPACIDADE VETORIAL  
EM DUAS POPULAÇÕES DE *Aedes (Stegomyia) aegypti* (LINNAEUS, 1762)

Monografia apresentada ao curso de Ciências Biológicas, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Prof. Dr. Mário Antonio Navarro da Silva  
Orientador – Departamento de Zoologia, UFPR

Profa. Dra. Ana Cláudia Bonatto  
Departamento de Genética, UFPR

Prof. Dr. Márcio Roberto Pie  
Departamento de Zoologia, UFPR

Curitiba, 20 de novembro de 2018.

Dedico este trabalho a minha mãe, Beatriz Nentwig,  
minha maior incentivadora.

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente e especialmente à minha mãe Beatriz que me apoia incondicionalmente e vive todos os meus sonhos junto comigo. Tudo é graças a você!

A todos os familiares que são a minha base mais pura de amor. Especialmente minha vó amada Lizette e minha madrinha Cris. Ao meu padastro Celso que é meu pai do coração. Às minhas primas Amanda, Thuany, Ohana e Natália, que tem os melhores ombros amigos para me apoiar. E também aos meus primos queridos Marcos e Fabíola, por sempre estarem do meu lado, ajudando inclusive na coleta de insetos para minha coleção entomológica.

A todas as minhas amigas e amigos de Morretes, que puderam acompanhar minha trajetória e sempre torceram por mim. Cada um tem um pedacinho especial do meu coração.

Aos amigos que a biologia me proporcionou que espero levar para a vida. Em especial Marcela, Marcos, Rebekah, Carolina, Luana e Rafael, vocês são demais.

A Universidade Federal do Paraná, o Curso de Ciências Biológicas e todos os docentes que contribuíram para minha formação.

A todos os colegas do Laboratório de Morfologia e Fisiologia de Culicidae e Chironomidae, pela convivência, auxílio e aprendizagem. Especialmente aquelas que hoje posso chamar de amigas: Mariana, Thalita, Gisele, Tatiana e Camila. Muito obrigada por tudo!

Ao meu orientador, Professor Mário ou como sempre chamo: “profê”. Sou imensamente agradecida por ter me dado a oportunidade de trabalhar e aprender com você. Em um momento que me via bem descontente com vários aspectos acadêmicos eu comecei o estágio no LAMFIC<sup>2</sup>, me encontrei e fiquei. Mais de dois anos de laboratório e muito planos para dar continuidade no futuro. Obrigada por sempre acreditar em mim, nas minhas ideias de pesquisa e me permitir fazer aquilo que gosto. E, além disso, por ser essa pessoa que trata o seu laboratório e seus alunos com muito respeito e carinho.

Por fim, ao meu coorientador e amigo Vinicius. Vini admiro você imensamente e obrigada por me ensinar tanto e sempre me incentivar a ser melhor.

“Que nada nos defina. Que nada nos sujeite.  
Que a liberdade seja a nossa própria substância.”

Simone de Beauvoir

## RESUMO

A Dengue é a arbovirose de maior relevância para a saúde pública, sendo o Culicidae *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) o seu principal vetor em área urbana. A relação entre o vetor e o patógeno é imprescindível na transmissão efetiva do vírus aos humanos, determinando, juntamente a outros fatores, a capacidade vetorial. A expressão gênica de vias relacionadas à susceptibilidade do mosquito ao vírus da dengue (DENV) vem sendo alvo de estudos, visto que diferentes espécies e diferentes populações da mesma espécie possuem competências distintas de transmitir os mesmos patógenos. Diante deste quadro, o objetivo do trabalho foi analisar a expressão gênica diferencial de três genes ligados à competência vetorial (dois da família das proteínas contendo tioéster e um do grupo das tripsinas digestivas), entre a população de campo (Paranaguá-PR) e a população de laboratório (Rockefeller). Para isso, foi realizada a extração de RNA das amostras em pools de cinco fêmeas e foi utilizada a técnica de RT-qPCR (“reverse transcription – quantitative real time PCR) e o método de expressão relativa. Para os genes das proteínas contendo tioéster (iTEPs), não houve diferença significativa na expressão relativa entre a população de campo e laboratório. Para a tripsina houve uma diferença significativa na expressão relativa entre as duas populações, indicando que para esse marcador, existem indícios de que a população de laboratório possua um nível de susceptibilidade maior ao vírus, ou seja, uma maior capacidade de se infectar e transmitir o patógeno. Os resultados podem auxiliar na vigilância entomológica molecular do vetor na medida que contribuem para compreensão dos mecanismos fisiológicos envolvidos na interação vetor arbovírus.

Palavras-chave: *Aedes aegypti*. Competência vetorial. iTEPs. Tripsinas. Arbovírus.

## ABSTRACT

Dengue is an arbovirose with relevance to public health, and the Culicidae *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) mosquito is the main vector in urban areas. The relationship between the vector and the pathogen is essential in the transmission of viruses to humans, determining the vector competence. The gene expression of pathways related to mosquito susceptibility to dengue virus (DENV) has been the subject of studies, since different species and different populations of the same species has distinct capacities of transmitting the same pathogens. In view of this situation, the objective of this work was to analyze the differential gene expression of three genes linked to vector competence (two of the family of the thioester containing proteins and one of the group of digestive trypsins), between a field population (Paranaguá-PR) and the laboratory population (Rockefeller ). For this, it was made the RNA extraction from five pools of females and the technique of RT-qPCR ("reverse transcription - real-time quantitative PCR") and method of relative expression were used. For the genes of the thioester containing proteins (iTEPs), there was no significant difference in the relative expression between the field and laboratory populations. For trypsin there was a significant difference in the relative expression between the two populations, indicating that for this marker, there are indications that the laboratory population has a higher level of susceptibility to the virus, that is, a greater capacity to infect and transmit the pathogen. The results may help in the molecular surveillance of the vector, contributing to the understanding of the molecular entomological surveillance involved in the arbovirus vector interaction.

Keywords: *Aedes aegypti*. Dengue. Vectorial competence. iTEPs. Trypsin. Arbovirus.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	09
1.1 Objetivo .....	11
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	12
2.1 Histórico e Epidemiologia .....	12
2.2 O Vetor e o Patógeno.....	13
2.3 Competência e Capacidade Vetorial .....	15
2.4 Sistema Imune dos Insetos.....	16
2.5 Genes Associados à Competência Vetorial.....	20
2.5.1 Proteínas da Família TEP .....	20
2.5.2 Tripsinas Digestivas.....	22
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	23
3.1 Área de Estudo .....	23
3.2 Material Biológico.....	24
3.2.1 Material de Campo.....	24
3.2.2 População Rockefeller .....	25
3.3 Análises Moleculares .....	25
3.3.1 Primers.....	25
3.3.2 Teste de Anelamento dos Primers .....	27
3.3.3 Extração de RNA .....	27
3.3.4 Eletroforese em Gel de Agarose 1%.....	27
3.3.5 RTPCR.....	28
3.3.6 RT-qPCR .....	28
3.3.7 Eficiência dos Primers .....	28
3.4 Análise dos Dados.....	29
3.3.5 Estatística .....	30
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	31
4.2 Genes das Proteínas Contendo Tioéster (TEPs) .....	31
4.2 Genes relacionados às Tripsinas Digestivas.....	33
<b>5. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	36
<b>4. REFERÊNCIAS</b> .....	37

## 1 INTRODUÇÃO

A dengue é considerada a arbovirose que mais atinge a população humana no mundo, sendo um grande problema para a saúde pública, principalmente em regiões tropicais (KYLE & HARRIS, 2008; PINHEIRO, 1997). O principal vetor da doença é o *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762), um artrópode pertencente à ordem Diptera e a família Culicidae, que pode transmitir também outros agentes etiológicos, como os causadores da Febre Amarela Urbana, Zika, Chikungunya, entre outros arbovírus (KANTOR, 2016; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA *et al.*, 2004).

As características biológicas do vetor, como ciclo de vida rápido, hábito urbano e semiurbano e preferência pela alimentação antropofágica, associados a fatores ambientais e antrópicos, auxiliam na compreensão do cenário atual da doença (CONSOLI & LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; FORATTINI, 1992). A dengue é endêmica em mais de 100 países e a última estimativa feita pela OMS (Organização Mundial de Saúde) em 2013, aponta para a ocorrência de cerca de 390 milhões de infecções anualmente (das quais 96 milhões com manifestações clínicas) e cerca de 20 mil óbitos.

O vírus dengue (DENV) pertence à família Flaviridae e inclui quatro sorotipos que circulam simultaneamente: DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 (TEIXEIRA & BARRETO, 1999). Todos os quatro já foram identificados com ocorrência no Brasil (BRAGA & VALLE, 2007). A dengue possui diferentes manifestações clínicas em humanos e alguns dos fatores de risco para casos graves são o sorotipo do vírus e infecção prévia por outra cepa (GUBLER, 1998).

A transmissão do vírus ocorre devido ao hábito hematófago da fêmea de *Ae. aegypti* que, durante repasto sanguíneo, pode ser contaminada por um indivíduo infectado. Após a alimentação, o vírus atinge as células do epitélio do intestino médio e inicia sua replicação, rompendo a barreira intestinal e espalhando-se pelo corpo do vetor através da hemolinfa (SALAZAR *et al.*, 2007; WOODRING *et al.*, 1996). O sucesso nesse processo e a eficiência da transmissão do patógeno dependem de diversos fatores de interação entre o vírus, vetor, ambiente e hospedeiro (DREYER, 2015).

Com isso, a habilidade da transmissão do vírus pelo inseto depende do que chamamos de sua capacidade vetorial. A capacidade vetorial diz respeito à eficácia

do vetor em disseminar o agente etiológico para a população de determinado local em condições naturais (FORATTINI, 1992). Essa capacidade abrange características fisiológicas, comportamentais e ecológicas. A competência vetorial é um dos parâmetros mais determinantes dentro da capacidade vetorial e está relacionada à susceptibilidade e aspectos da infecção do vírus no vetor, ou seja, facilidade com que o mosquito se infecta pelo vírus, replica-o e transmite (LOURENÇO-DE-OLIVEIRA & COURA, 2005; RHODAIN & ROSEN, 1997).

Sabe-se que os insetos possuem barreiras físicas e moleculares, controladas geneticamente, que podem interferir no estabelecimento e proliferação do patógeno, protegendo-os contra a infecção e afetando a competência como vetores (OBBARD & DUDAS, 2014). Considerando que diferentes populações geográficas apresentam diferenças em suas competências vetoriais (ROCCO *et al.*, 2001), muitos estudos vêm sendo direcionados para identificação e conhecimento do funcionamento dessas vias em diferentes populações de *Ae. aegypti* (DREYER, 2015).

Inicialmente, foi demonstrada a existência de fatores genéticos relacionados à susceptibilidade ao DENV, através da seleção artificial de linhagens susceptíveis e resistentes de *Ae. aegypti*, após a inoculação do vírus (MILLER & MITCHELL, 1991). Em seguida, passou-se a estudar quais mecanismos genéticos eram responsáveis por essas diferenças entre populações (BOSIO *et al.* 2000; DICKSON, *et al.* 2014; FANSIRI *et al.* 2013). Aparentemente, o nível de expressão de determinados genes parece estar mais envolvido no processo de competência vetorial do que a diferença na sequência desses genes (polimorfismos) (DENVER *et al.*, 2005; GIBSON, 2005). Por esse motivo, a análise de transcriptomas é pertinente para obter um panorama da competência vetorial (SIM *et al.*, 2013).

Os grandes avanços na área de biologia molecular propiciam a utilização de novas abordagens, como a utilização da RT-qPCR (*reverse transcription – quantitative real time PCR*), para avaliar quantitativamente alguns aspectos da competência vetorial (BUSTIN *et al.*, 2009; GUEDES, 2012).

Com isso, conhecer o status de susceptibilidade de diferentes populações de *Ae. aegypti* se torna importante para antecipar possíveis cenários de interação vetor-arbovírus. Mais especificamente, nos permite compreender a capacidade dessa população de se infectar e transmitir o patógeno, podendo levar a epidemias, por exemplo. Estudos nessa área contribuem para a vigilância entomológica molecular,

que pode ser utilizada como ferramenta efetiva na redução de ocorrência de transmissão de arbovírus na área urbana, levando-se em consideração características específicas de determinada população.

## 1.2 OBJETIVO

O objetivo foi avaliar a expressão gênica relativa de três genes (dois da via de proteínas contendo tioéster e um da via das tripsinas digestivas), relacionados à competência vetorial de *Aedes aegypti*.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 HISTÓRICO E EPIDEMIOLOGIA

Os primeiros possíveis casos registrados de dengue vem de uma enciclopédia chinesa que descreveu a existência de uma doença com sintomas semelhantes entre 265 a 420 d.C. Desde os anos de 1600 até a atualidade, foram feitos diversos registros de possíveis ocorrências da doença e de surtos e epidemias comprovadas, em diferentes regiões do globo. Nas Américas, a arbovirose tem sido registrada a mais de 200 anos, sendo as grandes epidemias iniciadas a partir da década de 1970 do século XX (GUBLER, 1998; GUBLER, 2006; PONTES & RUFFINO-NETTO, 1994).

Somente em 1903 a doença foi associada à transmissão por mosquitos vetores e após três anos confirmou-se que seu principal vetor é o *Ae. aegypti* (AMARAL & DANSA-PETRETSKI, 2012). Apesar de em menor escala, sabe-se que outra espécie do gênero, o *Aedes albopictus*, também é capaz de transmitir o vírus aos humanos (GUBLER & ROSEN, 1976).

Acredita-se que o *Ae. aegypti* seja originário da África, mais especificamente da região da Etiópia, de onde ampliou sua distribuição para as Américas e outras regiões do globo pelas rotas de comércio dos séculos XVII, XVIII, XIX. Atualmente, o inseto habita regiões tropicais e subtropicais de todo o mundo, que possuem condições ambientais adequadas ao vetor e que conseqüentemente, são afetadas por surtos e epidemias de dengue (FORATTINI, 1992; SLOSEK, 1986).

O Brasil se encaixa nessa perspectiva e já passou por diversas epidemias da doença. A primeira epidemia comprovada ocorreu em Boa Vista (Roraima), entre 1981 e 1982, na qual foram isoladas as cepas DENV-2 e DENV-4. Esses sorotipos circulavam em países próximos e provavelmente foram introduzidos pela fronteira com a Venezuela. Como a presença do mosquito no país ainda era baixa, essa epidemia foi rapidamente controlada. A propagação do vírus ocorreu somente mais tarde, em 1986. Relata-se que, devido à dificuldade de implantar programas efetivos após uma epidemia de DENV1 no Rio de Janeiro, a doença disseminou-se rapidamente para diversos estados, onde já havia a presença do mosquito (TEIXEIRA & BARRETO, 1999; SCHATZMAYR *et al.*, 1986).

O estado do Paraná teve seus primeiros casos autóctones de dengue registrados em 1993 (MENDONÇA *et al.*, 2006). Já o município de Paranaguá, no litoral do estado, não tinha ocorrência de epidemias de dengue e passou por uma intensa circulação do vírus, nos anos de 2015 e 2016. Segundo dados do boletim epidemiológico da Secretaria de Estado de Saúde do Paraná, entre os anos de 2015 e 2016, Paranaguá apresentou o maior número de casos confirmados da doença (15.779 casos com 29 óbitos), seguida de Foz do Iguaçu (6.527) e Londrina (4.515).

Atualmente, sabe-se que os quatro sorotipos da dengue circulam simultaneamente no país. Segundo o boletim epidemiológico da dengue de agosto/2018 as proporções de identificação dos diferentes sorotipos virais em casos da doença no Brasil correspondem: DENV-2 (52,4%), DENV-1 (23,9%), DENV-4 (0,4%) e DENV-3 (0,1%).

## 2.2 O VETOR E O PATÓGENO

O mosquito *Aedes aegypti* pertence à ordem Diptera, subordem Nematocera, família Culicidae, subfamília Culicinae, tribo Aedini, gênero *Aedes* e subgênero *Stegomyia*. É um inseto de coloração escura, com escamas brancas pelo corpo. Possui um desenho característico em forma de lira no dorso do tórax que facilita a identificação da espécie (CONSOLI & LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; FORATTINI, 2002).

As características comportamentais e fisiológicas são determinantes para o sucesso da espécie como vetor. Apresenta hábitos diurnos, se proliferando preferencialmente em habitat domiciliar e peridomiciliar, utilizando geralmente criadouros artificiais contendo água acumulada para oviposição. O macho se alimenta de néctar e a fêmea, além deste, necessita de sangue para completar seu ciclo (maturação dos ovos). O mosquito é holometábolo (metamorfose completa), possuindo os estágios de: ovo, larva (quatro instares), pupa e adulto. A fêmea pode colocar de 50 a 200 ovos por ciclo gonadotrófico e seus ovos podem permanecer viáveis por até um ano sem água, o que dificulta o controle do mosquito e da doença associada (CONSOLI & LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; FORATTINI, 2002).

O gênero Flavivirus, ao qual pertence o vírus da dengue, apresenta grande variabilidade genética devido a altas taxas de mutação e recombinação gênica

(HOLMES & TWIDDY, 2003). É chamado de arbovírus (“*arthropod borne virus*”), juntamente com outros vírus que afetam os vertebrados e tem a característica de serem transmitidos por artrópodes (ZELLER, 1990). As quatro cepas circulantes são sorotipicamente relacionadas, porém apresentam antígenos diferentes (TEIXEIRA & BARRETO, 1999).

O processo de infecção e estabelecimento do vírus no inseto requer que o mesmo ultrapasse diversas barreiras físicas e processos fisiológicos que serão discutidos adiante. O que vale salientar no momento é que a interação entre o vírus e o vetor é resultado de um processo de coevolução que envolve a tentativa do inseto de eliminar o patógeno e a capacidade do patógeno de resistir a esse sistema (OBBARD & DUDAS, 2014). Amaral e Dansa-Petretski (2012) definiram que “esse é um processo dinâmico, de longo prazo, que resulta na seleção de espécies ou populações de uma mesma espécie que funcionam, especificamente ou não, como vetores de um arbovírus”. Ainda em relação às considerações das autoras, a interação entre o vírus da dengue e o *Ae. aegypti* seria um exemplo de um “*modelo eficiente*”, onde o mosquito não é “*afetado*” pelo vírus e é capaz de transmiti-lo a um hospedeiro vertebrado.

Apesar de não causar a morte do inseto, trabalhos recentes indicam que o vírus pode levar a mudanças fisiológicas no vetor, influenciando aspectos metabólicos e comportamentais, como o aumento na atividade locomotora e da taxa de picada e a diminuição da sobrevivência e fecundidade (LIMA-CAMARA *et al.*, 2011; MACIEL-DE-FREITAS *et al.*, 2011). A influência real desse processo no “*fitness*” (aptidão) da espécie na natureza ainda é um cenário a ser explorado.

Quanto ao ciclo de transmissão da doença, têm início quando o vírus infecta a fêmea do Culicidae após o repasto sanguíneo. Em seguida, atinge as células do epitélio intestinal, replica-se e prolifera-se, até atingir a glândula salivar e poder ser transmitido novamente em outro repasto para o hospedeiro vertebrado. Esse período entre a primeira interação vetor-patógeno e subsequente condição de transmissão em novo repasto é chamado de período de incubação extrínseco (PIE) (BLACK *et al.*, 2002, WOODRING *et al.*, 1996).

A transmissão do vírus pode ser do tipo horizontal ou vertical. A primeira forma é comum, quando a fêmea do mosquito se infecta de sangue de um indivíduo contaminado por outra fêmea. Já o segundo tipo, envolve casos mais raros, onde a

fêmea infecta sua própria prole (infecção transovariana e transovo) (BEERNTSEN *et al.*, 2000).

No homem, o período de incubação do DENV varia geralmente de quatro a sete dias. Nessa fase, chamada de período de viremia, o vírus circula no sangue periférico e uma fêmea de *Ae. aegypti* ainda não infectada pode infectar-se após realizar o repasto sanguíneo. A infecção viral pode ser assintomática ou sintomática. Segundo o Ministério da Saúde (2013), a forma sintomática da doença abrange um amplo espectro clínico, podendo ocorrer em três fases clínicas: febril, crítica e de recuperação. Os sintomas incluem febre aguda até quadros hemorrágicos que podem levar a morte do paciente infectado (GUBLER, 1998; GUZMAN *et al.*, 2010).

O controle atual da doença está sustentado no controle do vetor, com a eliminação de criadouros e aplicação de inseticidas, visto que ainda não existem vacinas totalmente eficientes - apesar de algumas já estarem sendo testadas, inclusive em Paranaguá (Secretaria de Saúde do Paraná, 2018) - e principalmente tetravalentes às quatro cepas existentes da doença. Como a eficiência da transmissão do flavivírus aos humanos depende da capacidade e competência vetorial, diversos estudos buscam conhecer os fatores genéticos que influenciam na relação entre o patógeno e vetor e como estes evoluíram (DREYER, 2015; GONÇALVES, 2014; XIAO *et al.*, 2014).

### 2.3 COMPETÊNCIA E CAPACIDADE VETORIAL

A capacidade vetorial engloba diferentes fatores relacionados ao vetor (competência vetorial, densidade populacional, preferência alimentar, taxa de picada, longevidade, ciclo gonodotrófico) e também ao ambiente e ecologia (temperatura e umidade). Dentro da capacidade vetorial, a competência vetorial é um parâmetro que considera a relação vetor-patógeno e a capacidade do vetor em transmitir o vírus para humano (FORATTINI, 1992; RHODAIN & ROSEN, 1997). A competência depende de fatores como as barreiras anatômicas e a duração do período de incubação extrínseco que está relacionada à susceptibilidade do vetor a infecção e multiplicação viral, que depende diretamente do sistema imune do vetor e do genótipo de cada população (BEERNTSEN *et al.*, 2000).

## 2.4 SISTEMA IMUNE DOS INSETOS

O sistema imune dos insetos não possui anticorpos nem memória adaptativa como nos vertebrados (DIMOPOULOS, 2003). Alguns estudos apontam para a existência de um mecanismo semelhante à memória imunológica, indicando maior aproximação evolutiva entre insetos e vertebrados do que o esperado (RODRIGUES *et al.*, 2010; SCHMID-HEMPEL, 2005). Como esses mecanismos ainda vêm sendo estudados e não foram bem elucidados, a existência de um sistema imune basicamente inato é empregada na maioria dos trabalhos.

O sistema inato age rapidamente, de forma muitas vezes efetiva, mas com uma resposta de curta duração (LEMAITRE & HOFFMAN, 2007). A ativação dessa via depende do reconhecimento de moléculas patogênicas por receptores de membrana, chamados receptores de reconhecimento padrão. O que leva, em seguida, a uma cascata de regulação de sinalização e a mecanismos efetores que irão realizar a eliminação efetiva desses microorganismos (MEDZHITOV & JANEWAY JR., 2002).

Sabe-se que a hemolinfa dos insetos é composta por plasma linfático e células chamadas de hemócitos. Existem diferentes tipos de hemócitos, com características e funções distintas (LAVINE & STRAND, 2002). Araújo (2011) identificou e classificou seis tipos de hemócitos em *Aedes aegypti*: prohemócito, adipohemócito, granulócito, plasmatócito, oenocitóide e trombocitóide. Em estudos de interação com o vírus DENV foi observado que três destes (plasmatócitos, oenocitóides e granulócitos) são capazes de endocitar o vírus.

Nos insetos em geral, os plasmócitos e granulócitos parecem ser as principais células envolvidas no processo imunológico. Sabe-se que os granulócitos se acumulam ao redor do corpo estranho no processo de nodulação. Na encapsulação, ocorre o acúmulo de plasmócitos que também estão envolvidos no processo de melanização humoral (depósito de melanina ao redor do patógeno). Ambos fazem parte do processo de fagocitose, englobando microorganismos (BEERNTSEN *et al.*, 2007; BLANDIN & LEVASHINA, 2007; LAVINE & STRAND, 2002)

As respostas humorais envolvem a produção de peptídeos antimicrobianos produzidos pelo corpo gorduroso, hemócitos e outros órgãos dos insetos, que se ligam ao patógeno levando a sua eliminação (LEMAITRE & HOFFMAN, 2007).

Existe uma relação muito estreita entre o sistema imunológico celular e humoral, pois estes acabam muitas vezes se sobrepondo e atuando em conjunto para a eliminação de microrganismos. Logo, essa divisão é empregada apenas como forma didática (ARAÚJO, 2011).

Além dos mecanismos de defesa celulares (processos de fagocitose e encapsulação) e humorais (melanização e produção de moléculas efetoras), os insetos também possuem barreiras morfológicas, como por exemplo, as cutículas e as barreiras anatômicas do intestino (DE CARVALHO LEANDRO, 2011; LEMAITRE & HOFFMAN, 2007).

Em *Ae. aegypti*, após a fêmea ingerir o sangue de indivíduo infectado, o vírus precisa ultrapassar diferentes barreiras anatômicas existentes no vetor (Figura 1). A primeira é a barreira de infecção do intestino médio (MIB – “*midgut infection barrier*”), que impede o patógeno de infectar as primeiras células com que entram em contato, as do epitélio do intestino médio. A segunda barreira é a barreira de disseminação do intestino médio (MEB – “*midgut escape barrier*”) que impede que o vírus se espalhe para outros tecidos. Se o vírus ultrapassar essas barreiras, ainda existe a barreira de transmissão (TB – “*transmission barrier*”), que impede a infecção na glândula salivar e conseqüentemente, a transmissão do vírus para o hospedeiro vertebrado pela picada do mosquito (BEERNTSEN *et al.*, 2000, BENNET *et al.*, 2002). Diversos locus de caracteres quantitativos (QTLs - “*quantitative traci loci*”) já foram identificados e associados a essas barreiras. Por outro lado, essas são características complexas e multifatoriais, das quais o funcionamento ainda é pouco compreendido (BOSIO *et al.*, 2000; DICKSON, *et al.* 2014).

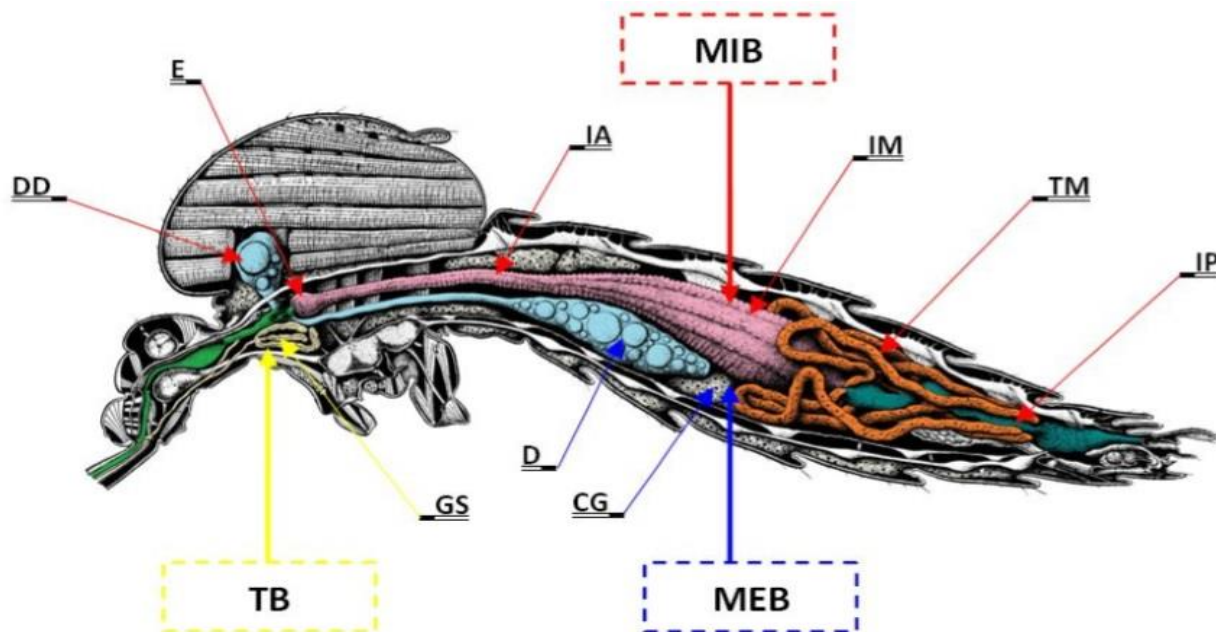


Figura 1. Esquema evidenciando as barreiras anatômicas de *Ae. aegypti*. MIB - barreira de infecção no intestino; MEB - barreira de escape do intestino; TB - barreira de transmissão. CG: Corpo gorduroso; D: Divertículo; DD: Divertículo dorsal; E: Estômago; GS: Glândula salivar; IA: Intestino anterior; IM: Intestino médio; IP; Intestino posterior; TM: Túbulos de Malpighi. Modificado de Jobling (1987) por Dreyer (2015).

O genoma de *Ae. aegypti* possui em torno de 17.700 genes codificadores de proteínas, onde 353 desses genes parecem estar associados à processos imunológicos, em comparação a 338 em *Anopheles gambiae* e 285 em *Drosophila melanogaster* (“mosca da fruta”) (NENE *et al.*, 2005; WATERHOUSE *et al.*, 2007). A drosófila é considerada um organismo modelo, possuindo diversos genes órtologos com mamíferos e o sistema imune mais bem caracterizado entre os insetos. A partir de estudos com o organismo, diversos processos imunológicos já foram descritos (LEMAITRE & HOFFMAN, 2007).

Sabe-se que em *D. melanogaster* existem três vias principais de respostas imunes inatas: Toll, Imd e Jack-STAT (LEMAITRE & HOFFMAN, 2007). Aparentemente, apesar das principais vias imunológicas serem conservadas entre esses grupos, os mosquitos apresentam expansões de processos relacionados a esse sistema, possivelmente por terem evoluído em conjunto com diversos patógenos, atuando inclusive como vetores dos mesmos (LEMAITRE & HOFFMAN, 2007; NENE *et al.*, 2005; WATERHOUSE *et al.*, 2007). Em *Ae. aegypti* já foi

demonstrado que genes relacionados às três vias podem atuar em conjunto influenciando na infecção por DENV (ZOU *et al.*, 2011).

A via Toll já foi associada à imunidade contra bactérias gram-positivas e fungos, envolvendo uma cascata de sinalização conservada evolutivamente com os mamíferos (LEMAITRE *et al.*, 1997; SHIN *et al.*, 2005). Em *Ae. aegypti*, o seu envolvimento na infecção de DENV foi demonstrado por intermédio da superativação e supressão da via, levando a diminuição e aumento da titulação viral, consecutivamente (ANTONOVA *et al.*, 2010; XI *et al.*, 2008). Além disso, Ramirez & Dimopoulos (2010) demonstraram que a resposta dessa via atua de forma diferente para os diferentes sorotipos da dengue.

A via Imd está relacionada à produção de diversos peptídeos antimicrobianos, principalmente relacionados a bactérias gram-negativas (FERRANDON *et al.* 2007). Similar a *Drosófila*, em *Ae. aegypti*, a vias Imd e Toll são as principais vias relacionadas a respostas imunológicas antimicrobianas (WATERHOUSE *et al.*, 2007). Diversos genes e fatores de transcrição relacionados a essas vias vêm sendo estudados e já foram elucidados em *Ae. aegypti* em resposta a diferentes patógenos (SHIN *et al.*, 2002; SHIN *et al.*, 2003; SHIN *et al.*, 2005; ZOU *et al.*, 2011).

A Via Jack Stat foi inicialmente identificada em mamíferos, envolvida na resposta imune contra vírus. É também conservada evolutivamente e aparenta apresentar papel antimicrobiano e antiviral para os insetos (AGAISSE & PERRIMON, 2004). Em *Ae. aegypti*, Zou *et al.* (2011) indicaram que a via parece estar diretamente envolvida no processo de defesa à infecção de *Plasmodium gallinaceum*. Em relação a resposta imunológica ao DENV, experimentos com inoculação viral mostraram que essa via é ativada no vetor após o contato com o vírus. Além disso, foi visto que a susceptibilidade do mosquito ao vírus aumenta quando a via é silenciada, indicando seu papel anti-dengue (SOUZA-NETO *et al.*, 2009).

Outro mecanismo importante relacionado à imunidade inata em insetos é o RNA de interferência (RNAi), sendo uma via autônoma de cada célula. É um mecanismo que além de atuar no silenciamento pós-transcricional (regulação da expressão gênica endógena), é um meio de resistência natural da célula contra ácidos nucleicos exógenos potencialmente patogênicos (como por exemplo, dos vírus), que podem modificar/prejudicar o material genético celular. Basicamente, a

célula produz pequenos RNAs complementares ao RNA mensageiro, que se ligam ao mesmo e com a ação de outras enzimas, levam a clivagem ou bloqueio da sua tradução (MELLO & CONTE, 2004; SANCHEZ-VARGAS, 2004).

Existem pelo menos três vias independentes nas células dos insetos: a via de siRNA (“*small interfering RNAs*”), via de miRNA (“*microRNAs*”), e a via de piRNA (“*piwiRNAs*”) (GHILDIYAL & ZAMORE, 2009). O siRNA parece ser a via mais relacionados a imunidade em insetos (DE FARIA *et al.* 2013) e os principais genes relacionados a essa via já foram identificados em *Ae. aegypti*. Estudos de ativação e silenciamento desses genes mostraram que o RNAi atua contra o estabelecimento e proliferação do vírus *DENV* em *Ae. aegypti*, apesar de não ser suficiente para eliminar o vírus. O silenciamento de genes da via amplia a titulação viral, além de uma relação com a menor eficiência de MIB e MEB e diminuição do período de incubação extrínseca (FRANZ *et al.*, 2006 E FRANZ *et al.*; 2014; SÁNCHEZ-VARGAS *et al.*, 2009).

Além dos fatores genéticos, os ambientais, como a microbiota intestinal, também podem atuar nesse processo. Algumas bactérias podem proteger os insetos contra infecção viral, agindo diretamente contra os patógenos ou indiretamente, através do aumento do sistema imune basal (HURST & HUTCHENCE, 2010; XI *et al.*, 2008).

## 2.5 GENES ASSOCIADOS À COMPETÊNCIA VETORIAL

Os genes escolhidos para análise da expressão gênica foram baseados nos resultados de maior relevância no trabalho realizado por Dreyer (2015). A partir da inoculação do vírus *DENV-4*, a autora detectou a ocorrência da expressão diferencial de diversos genes entre duas populações de *Ae. aegypti*, sendo uma considerada suscetível e outra refratária. Nesse estudo, houve destaque para alguns genes pertencentes à duas vias, a via de iTEPs e das tripsinas digestivas.

### 2.5.1 PROTEÍNAS DA FAMÍLIA TEP

As proteínas da superfamília TEP (*Thioester containing protein*) são parte importante do sistema imunológico dos vertebrados e invertebrados. São divididos

em três subfamílias distintas: complemento C3 / C4 / C5, A2Ms (alpha-2-macroglobulins) e iTEPs (*insect* TEP) (MOITA *et al.*, 2005; STROSCHEIN-STEVENSON *et al.*, 2006).

Em vertebrados, essas proteínas fazem parte do sistema complemento que participa da resposta imune inata. Os componentes desse sistema funcionam como proteínas de superfície que são ativadas para eliminação viral, inclusive de flavivírus, através da maturação e ativação de linfócitos B (AVIRUTNAN *et al.*, 2008; BAXTER *et al.*, 2007; CUMMINGS *et al.*, 2007; ENDO *et al.*, 2006).

Em drosófila, foram identificadas seis TEPs homólogas. Dentre elas, a regulação positiva da expressão de TEP1, TEP2 e TEP4 já foi associada à resposta imunológica contra bactérias (MEISTER & LAGUEUX, 2003). É provável que a família TEP em *Anopheles gambiae* seja representada por um total de 15 proteínas. Destas, a TEP1 é uma proteína típica e que foi caracterizada com mais detalhes. Já foi associada ao processo de fagocitose de bactérias e principalmente, à eliminação de *Plasmodium spp*, através da ligação com proteínas de superfície dos oocinetos. (BLANDIN *et al.*, 2004; LEVASHINA *et al.*, 2001).

Em *Ae. aegypti* as TEPs também estão relacionadas ao sistema imune inato na eliminação de diferentes patógenos. Zou *et al.* (2011) observaram que fatores de transcrição da via Toll e Imd, estão envolvidos na indução dos genes que codificam para diferentes proteínas da família TEP (*TEP2*, 3, 20, 21 e 22) e que esses genes foram positivamente regulados em resposta a infecção por plasmódio. Estudos com silenciamento de genes da via levaram a um aumento significativo de infecções pelo vírus (CHENG *et al.*, 2011; MOITA *et al.*, 2005; XIAO *et al.*, 2014). Xiao *et al.* (2014), mostraram que a proteína AaMCR (“macroglobulin complement-related fator”), pertencente a família TEP, é um mecanismo efetor na eliminação do vírus da dengue que desencadeia a expressão de peptídeos antimicrobianos.

## 2.5.2 TRIPSINAS DIGESTIVAS

As tripsinas são enzimas que fazem parte da digestão de sangue em dípteros hematófagos (SOARES *et al.*, 2011). Acredita-se que a digestão por estão proteínas ocorra em duas fases em *Ae. aegypti*. A primeira fase consiste na indução da tripsina inicial ou minoritária (AaET), após alimentação sanguínea, que como o próprio nome diz, atua nas primeiras horas de digestão. A tripsina inicial só é expressa no adulto e é regulada traducionalmente, ou seja, os RNA mensageiros já estão presentes no intestino da fêmea, mas somente serão traduzidos após a ingestão de sangue. Na segunda fase, regulada transcricionalmente, ocorre a síntese da tripsina chamada de tardia ou majoritária, a qual necessita de duas outras tripsinas para sua expressão. A primeira é a (AaLT) chamada de “late tripsina” e a segunda chamada de Aa5G1. Hoje, ao contrário do que se acreditava anteriormente, sabe-se que a tripsina tardia não necessita da inicial para ser expressa, sendo sua transcrição independente da presença da outra proteína (SILVA *et al.*, 2013).

Aparentemente, esse parece ser um cenário muito mais complexo do que se imaginava. Brandon *et al* (2008) mostraram que além das outras duas proteínas da fase majoritária, outra tripsina tardia (AaSP VII) também fazia parte desse processo. Por outro lado, das três, apenas Aa5G1 se encaixava no grupo das tripsinas. Mais tarde, estudando novas proteases serínicas, Brackney *et al.* (2010) observaram que três genes (AaSP I, AaSP VI, AaSP VII) estão fortemente expressos após a alimentação sanguínea. Utilizando análises filogenéticas, propuseram que dois deles (AaSP I, AaSP VI) poderiam ser classificados com tripsinas. Corroborando com o autor anterior, AaSP VII e AaLT (considerados mais próximos na filogenia), não se encaixam no grupo das tripsinas e sim no das colagenases.

Pelo seu papel na digestão de sangue, estudos começaram a analisar a possível relação das tripsinas com o processo de estabelecimento do vírus DENV em *Ae. aegypti*. Molina-Cruz *et al.* (2005) mostraram uma alta diminuição nas cópias e disseminação de RNA de DENV-2 após as fêmeas de *Ae. aegypti* serem alimentadas com sangue com inibidor de tripsina de soja. Em Dreyer (2015), genes do grupo tiveram maior expressão em população suscetível ao vírus e menor expressão em população refratária.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 ÁREA DE ESTUDO

Paranaguá está localizada no litoral do estado do Paraná. É uma cidade histórica e turística, sendo a mais antiga a ser fundada no estado, com grande importância econômica por abrigar o Porto de Paranaguá (NICHOLLS, 1970). O município está compreendido entre as coordenadas geográficas: 25°31'12" de latitude sul e 48°30'32" de longitude oeste do Meridiano de Greenwich. Segundo dados do IBGE, a cidade possui o tamanho territorial de 326.674 m<sup>2</sup> e o número de habitantes estimado para o ano de 2016 foi de 151.829 mil.

O presente trabalho faz parte de um macroprojeto de vigilância entomológica em área urbana com ocorrência de dengue. Para instalação das armadilhas de oviposição, a zona urbana do município de Paranaguá foi dividida em 16 estratos (Figura 2), considerando barreiras naturais como rios e também artificiais, como ferrovias, grande avenidas e estradas. Desta forma foi possível obter amostragem significativa da população do vetor.

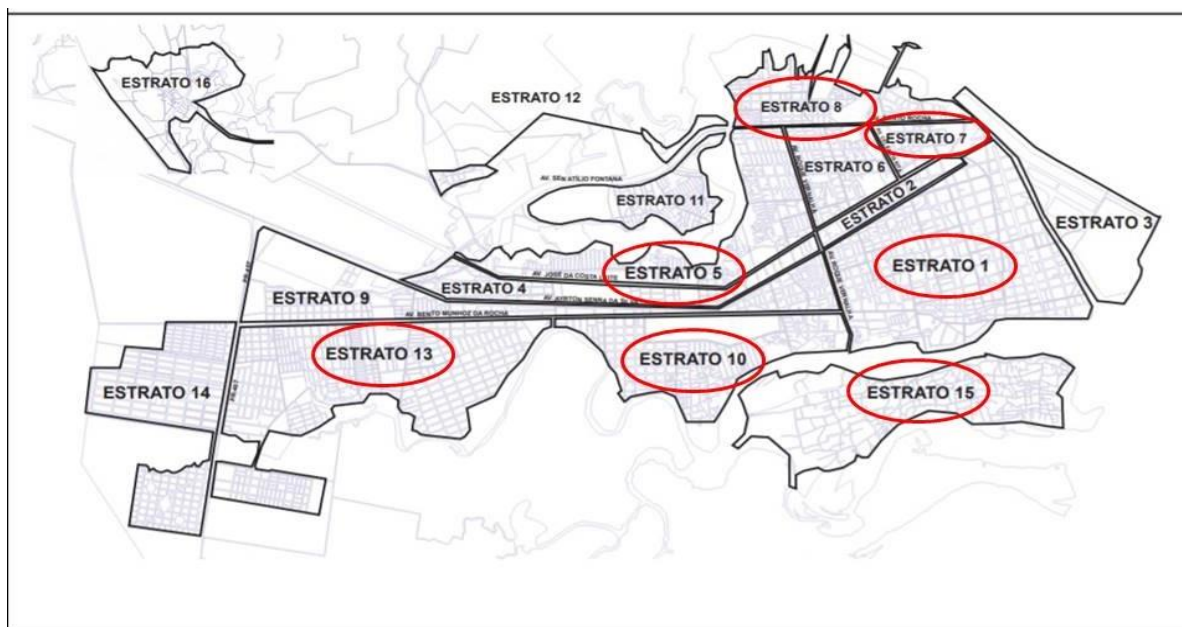


Figura 2. Mapa do município de Paranaguá com a divisão em 16 estratos. Circulados em vermelhos os estratos que foram avaliados no presente estudo nos meses de junho e julho de 2017

## 3.2 MATERIAL BIOLÓGICO

### 3.2.1 MATERIAL DE CAMPO (COLETA, CRIAÇÃO E ARMAZENAMENTO)

Através de uma parceria entre a 1º Regional de Saúde (Secretaria de Estado da Saúde do Paraná), Prefeitura Municipal de Paranaguá e o Laboratório de Morfologia e Fisiologia de Culicidae e Chironomidae (LAMFIC<sup>2</sup>, UFPR) foram obtidos ovos de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*, de junho e julho de 2017, a partir de ovitrampas instaladas em dezesseis estratos estabelecidos na área urbana do município de Paranaguá (Figura1).

As ovitrampas consistem em paletas do tipo eucatéx (2 cm de largura por 12 cm de comprimento) numeradas por localização, presas em suporte plástico e submersas em 500 ml de água. Antes da distribuição das armadilhas em campo, foi realizado estudo para obter a maior cobertura possível da área urbana associada, obtendo-se um total de 331 ovitrampas.

As armadilhas permaneceram no campo por quatro dias consecutivos durante cada mês. Em seguida, foram encaminhadas ao LAMFC<sup>2</sup> (Departamento de Zoologia da UFPR), onde foi realizada a triagem das paletas com auxílio de microscópio estereoscópico, para análise e quantificação dos ovos. As paletas positivas (com ovos) foram separadas por estrato de acordo com suas numerações previamente estabelecidas.

A criação dos ovos em laboratório foi realizada em condições controladas de temperatura ( $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ ), umidade ( $80\pm 10\%$ ) e fotoperíodo (12h: 12h). Para a eclosão das larvas, as paletas foram submersas em copos plásticos identificados e separados por estratos, contendo água desclorada e ração para gatos triturada. Após aproximadamente 48 horas (tempo de eclosão das larvas) as paletas foram retiradas, a água trocada e a comida colocada novamente. As larvas foram mantidas em copos até a formação da pupa e posteriormente transferidas para recipientes adequados para emergência do adulto.

Após a emergência, os adultos foram sacrificados por congelamento e separados por sexo e espécie. A triagem entre *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* foi realizada em microscópio estereoscópico, utilizando as chaves taxonômicas elaboradas por Consoli & Oliveira (1994) e Forattini (2002). As fêmeas foram

armazenadas em tubo de 1,5 ml (devidamente identificado) em pools de cinco indivíduos (separados por estrato) e mantidos a -80°C, para preservação ideal do RNA para as análises. No total foram obtidos 18 pools de amostras da população de campo dos meses de junho e julho de 2017, distribuídos conforme a tabela abaixo.

Tabela 1. Amostragem em número de pools obtidos por estrato para os meses de junho e julho de 2017.

Número do Estrato	Número de Pools
Estrato 1	5
Estrato 5	5
Estrato 7	3
Estrato 8	5
Estrato 10	4
Estrato 13	1
Estrato 15	1

### 3.2.2 POPULAÇÃO ROCKEFELLER

Como população controle, para fins comparativos de expressão relativa, foram utilizados mosquitos da cepa Rockefeller, referência em susceptibilidade a inseticidas. Os *Ae. aegypti* da cepa Rockefeller são mantidos em gaiolas em uma sala individualizada no laboratório e a alimentação é realizada por mamadeiras de água com mel e repasto sanguíneo (camundongos) manutenção da colônia (protocolo de aprovação nº 719 do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA/BIO - UFPR)). As fêmeas não ingurgitadas (sem repasto) foram retiradas da gaiola com sugador e congeladas em -80°C para extração do RNA total (pools de cinco indivíduos). No total foram obtidos seis pools de amostras de população de laboratório, do mesmo período do ano da coleta das amostras de campo.

## 3.3 ANÁLISES MOLECULARES

### 3.3.1 PRIMERS

As sequências dos primers dos genes de interesse foram obtidas em artigos que já haviam testado suas eficiências em RT- qPCR. Além dos três genes relacionados à capacidade vetorial, a betactina foi escolhida como gene referência,

para normalização da expressão basal, funcionando como controle interno/endógeno. As actinas são proteínas altamente conservadas, presentes em diversos organismos, sendo a betactina uma de suas isoformas. São essenciais para a integridade celular, fazendo parte do exoesqueleto da célula (RIBEIRO, 2009). São referências clássicas de genes utilizados em estudos de expressão gênica (BUNGER *et al.*, 2003), usualmente utilizados em trabalhos com insetos (SERRATO, 2017; ZHOU *et al.*, 2014; ZOU *et al.*, 2011).

O gene referencia é aquele que possui um nível de expressão contínuo em todas as células do organismo, mesmo após tratamentos experimentais. Apesar disso, diversos estudos demonstram que mesmo esses genes possuem certa modulação em condições experimentais e nem sempre estão expressos igualmente em todos os tecidos. Por isso, geralmente são utilizados mais de um normalizador (BUSTIN *et al.*, 2009; PFAFFL, 2001). Houve a tentativa também de utilizar o RPL8 (“*ribossomal protein L8*”), mas o primer não respondeu da maneira esperada.

Os primers são sequências iniciadoras que vão alinhar e propiciar a amplificação das fitas de cDNA pela enzima DNA polimerase, em RT-qPCR. Foram preparados em laboratório de acordo com informações do fabricante. Alíquotas de 10uM foram feitas para evitar contaminações. O primer “tripsina” contém uma região conservada que avalia a expressão de diferentes genes relacionados a família das tripsinas. Segue a sequência dos primers escolhidos:

Tabela 2. Sequencia de nucleotídeos dos primers, sendo fw =forward e rv =reverse.

Primer	Sequência
BETACTINA (AAEL001928) (SERRATO, 2017)	Fw 5' AAGGCTAACCGTGAGAAGATGAC 3' Rv 5' GATTGGGACAGTGTGGGAGAC 3'
TEP2 (AAEL014755) (CHENG <i>et al.</i> , 2011)	Fw 5' CTGGCGAGAAGACCATCACT 3' Rv 5' CGAAGAACGGTAGGAAGACG 3'
AaMCR (AAEL012267) (XI <i>et al.</i> , 2014)	Fw 5' TCCGTCCCGGTCAGATTTACAA 3' Rv 5' TCTACGCCGTCACGGGAGATAC 3'
TRIPSINA (BRACKNEY <i>et al.</i> , 2010)	Fw 5' GATCATCGGCGGTTTTCC 3' Rv 5' ACACGACGCTTGCCCTC 3'

### 3.3.2 TESTE DE ANELAMENTO DOS PRIMERS

O teste de temperatura de anelamento dos primers foi realizado a partir de uma PCR convencional com gradiente de temperaturas (seis temperaturas entre 45°C e 65°C). Foram feitas seis cópias para cada um dos primers, nas quais foram adicionados a amostra (já transformada em cDNA através da RT-PCR), os reagentes e a “Taq DNA Polymerase, from *Thermus aquaticus* – Sigma-Aldrich” nos seguintes parâmetros: 1,2 µL de Buffer 10X; 1,2 µL de MgCl<sub>2</sub> (25 mM); 0,24 µL de dNTP (10 mM), 0,06 µL Tap DNA polimerase, 0,48 de primer forward (10 µM), 0,48 primer reverse (10 µM) e 1,44 µL de cDNA. Os ciclos foram de: 94°C por 1 minuto, 45°C-65°C por 30 segundos, 72°C por 3 minutos (39x), 72 °C por 7 min e 4°C de “hold ∞”. Em seguida, em eletroforese em gel de agarose, visualizou-se qual a temperatura ideal comum para todos os primers para realização da PCR em tempo real. A temperatura definida foi a de 57, 6°C.

### 3.3.3 EXTRAÇÃO DE RNA

A extração de RNA total foi realizada com o kit *SV Total RNA Isolation System* (Promega), seguindo orientações do fabricante. Em seguida, as amostras foram tratadas com DNase I Amplification Grade (AMPD1 SIGMA) utilizando o protocolo da marca. Para confirmar a integridade do RNA das amostras, foi feita a eletroforese em gel de agarose 1%, antes e após o tratamento com DNase. A concentração de RNA foi quantificada em NanoDrop (Espectrofotômetro) e para padronização, as amostras foram diluídas para a menor concentração obtida. Foram obtidos no total 30 pools (24 de campo e seis de laboratório).

### 3.3.4 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 1%

Para analisar a integridade do RNA das amostras e visualizar o teste de anelamento dos primers foi realizada a eletroforese em gel de agarose. Para o preparo do gel, a agarose foi diluída proporcionalmente em tampão TAE 10X (0,600 gramas de agarose para 600 mL de tampão). As amostras foram pipetadas no

seguinte parâmetro: 1 µL da amostra, 3 µL de água miliQ autoclavada e 1,5 de saffer (corante). O gel foi corrido em 80 V por 160 M.A. por meia hora. Em seguida, foi possível visualizar as bandas em leitura no transiluminador.

### 3.3.5 RTPCR (REVERSE TRANSCRIPTASE - PCR)

Utilizando a fita de RNA de cadeia simples, em uma reação de PCR, a enzima transcriptase reversa sintetiza uma cadeia de DNA complementar (cDNA). Foi utilizado o kit “High Capacity cDNA Reverse Transcription” (Applied Biosystem). A reação final apresentou um volume final de 20 µL, sendo 2 µL de RT Buffer (10X), 2 µL de Random Primers (10X), 0,8 µL de dNTP Mix (100mM), 1 µl de MultiScribe Reverse Transcriptase (50 unidades) e 14,2 µL de amostra (29 ng/ µL). O ciclo do termociclador consistiu em: 10 min – 25°C; 120 min – 37°C; 5 min – 85°C; hold-4°C. Depois as amostras foram diluídas em 5x, totalizando um volume final de 100 µL.

### 3.3.6 RT- QPCR (“REVERSE TRANSCRIPTION – QUANTITATIVE REAL TIME PCR”)

O equipamento de qPCR permite acoplar os processos de amplificação, detecção e quantificação do DNA, através da fluorescência emitida pelos ciclos de amplificações da amostra (BUSTIN *et al.*, 2009). A qPCR utilizada foi da marca Rotor-Gene, com o PowerUp SYBR Green Master Mix (Applied Biosystem). Os parâmetros da QPCR foram: 0,3 µl Primer Forward (10uM), 0,3 µl Primer Reverse (10 µM), 5 µL de sybr e 1 µL de amostra (5,8 ng/ µL), utilizando o “standart cycling mode (primer Tm<60°)” do SYBR. Foram realizadas triplicatas para cada amostra, onde o valor de desvio entre as médias dos ciclos de quantificação (“Cq” - equivale ao valor de expressão a partir da emissão de fluorescência) deveria ser menor que um. Também foram feitos três controles negativos (sem amostra) para cada rodada de qRT-PCR para detectar possível contaminação nos reagentes ou primers, que poderiam afetar o resultado.

### 3.3.7 EFICIÊNCIA DOS PRIMERS

O cálculo de eficiência foi baseado no método de Pfaffl (2001). O teste de eficiência foi realizado em RT-qPCR, através da diluição seriada (fator de diluição de 4x) de uma amostra de cDNA, totalizando cinco diluições. Seguiu-se o mesmo padrão de réplicas e controles negativos já citados no tópico anterior. A partir disso, os valores das concentrações foram transformados em log e plotados em um gráfico de regressão linear, contra os valores dos ciclos de quantificação. O valor de slope (coeficiente angular) foi utilizado para aplicação na fórmula a seguir.

$$\text{Eficiência (\%)} = \left( 10^{\frac{-1}{\text{slope}}} - 1 \right) \times 100$$

Os valores aceitáveis para utilização dos primers devem estar entre 90 e 110%.

Tabela 3. Valores de eficiência dos primers utilizados

Primer	Eficiência %
Betactina	101,26
AaMCR	96,69
TEP2	99,98
Tripsina	105,21

### 3.4 ANÁLISE DOS DADOS

O método utilizado para análise dos dados foi o de Expressão Relativa – método  $\Delta\Delta\text{CT}$ , que considera a diferença nas eficiências dos primers (PFAFFL, 2001). Primeiramente, para cada gene, foi feita uma média dos valores de expressão das seis amostras da população Rockefeller (utilizada como controle). Essa média foi então subtraída dos valores de cada uma das 30 amostras. O primeiro delta é o resultado dessa subtração para o gene de interesse e o segundo delta, para o gene referência. Para obtenção do dado bruto da expressão relativa de cada amostra, para cada gene, foi aplicada a fórmula a seguir:

$$\text{Relação da Expressão Gênica} = \frac{(E_{GI})^{\Delta Cq_{GI}}}{(E_{GR})^{\Delta Cq_{GR}}}$$

Na fórmula “EGR” corresponde ao valor de eficiência do gene de referência, “EGI” ao valor de eficiência do gene de interesse, “ $\Delta Cq_{GI}$ ” ao valor de delta para o gene de interesse e “ $\Delta Cq_{GR}$ ” ao valor de delta calculado para o gene referência.

### 3.5 ESTATÍSTICA

Os testes estatísticos foram realizados no programa Prisma 7. Primeiramente, foi realizado o teste de Normalidade (Shapiro-Wilk) e Homogeneidade (teste f). O resultado dos dados foi considerado normal e não homogêneo. Então, foram transformados em escala logarítmica e os testes repetidos, sendo o resultado normal e homogêneo. Seguindo os pressupostos, foi realizado o teste t paramétrico entre população Rock e campo, com significância de  $p < 0.05$ .

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 GENES DAS PROTEÍNAS CONTENDO TIOÉSTER (TEPS)

Os resultados para a análise estatística da expressão relativa dos genes da família das proteínas contendo tioéster foram não significativos, onde os valores de “p” para AaMCR (Figura 3A) e TEP2 (Figura 3B) foram superiores a 0,05. Com isso, não houve uma diferença de expressão relativa significativa entre a população de campo (Paranaguá) e a de laboratório (Rockefeller).

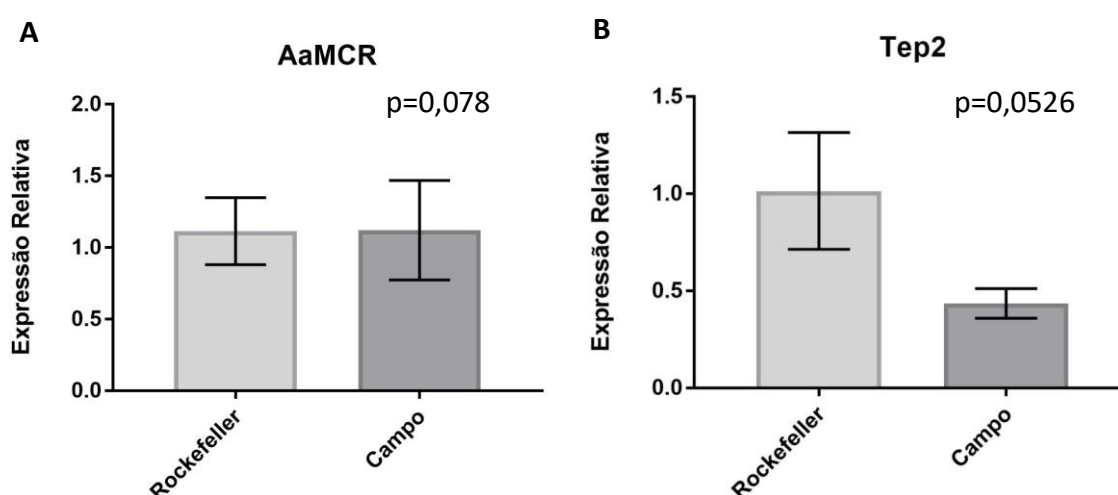


Figura 3. Resultados da comparação da expressão relativa entre população Rockefeller e Campo, para os genes AaMCR (Fig. A) e TEP 2 (Fig. B). Os valores de p estão indicados ao lado, onde  $p < 0,05$  é o nível de significância.

Os genes das proteínas contendo tioéster estão presentes nos mais diversos organismos, formando uma família multigênica de proteínas conservadas evolutivamente (BLANDIN & LEVASHINA, 2004). Sabe-se que as TEPs fazem parte do sistema imune inato, desempenhando papéis importantes na eliminação de patógenos, inclusive de DENV em *Ae. aegypti*.

Dreyer (2015) mostrou que, após a infecção experimental, o gene TEP2 é superexpresso em população refratária de *Ae. aegypti*. Antes de analisar o nível de expressão de genes relacionados à defesa imunológica e competência vetorial, a

maioria dos trabalhos nessa área realiza a inoculação do vírus no vetor (DREYER, 2015; CHENG *et al.*, 2011; DE CARVALHO LEANDRO, 2011; XIAO *et al.*, 2014). Por outro lado, o presente estudo teve o intuito de analisar a expressão relativa entre populações em um cenário sem a circulação viral no inseto, para observar se haveria uma possível pré-disposição.

Podemos supor que por serem genes de uma família de proteínas relacionadas diretamente ao sistema imune, necessita-se do contato com o vírus (ou outro patógeno) para detecção de sua expressão induzida diferencialmente entre populações geneticamente distintas (laboratório e campo). Como ambas as populações foram criadas em ambiente laboratorial até a fase adulta, não houve contato dos insetos com uma gama de microrganismos das quais estariam sujeitos na natureza. Por esse motivo, sugere-se que seria interessante analisar também mosquitos adultos aspirados de campo, apesar da preservação do RNA dificultar esse processo.

Considerando que nem todos os genes da família parecem estar envolvidos no processo de infecção por flavivírus e que alguns possam apresentar respostas específicas a determinados patógenos (ZOU *et al.*, 2011; CHENG *et al.*, 2011), existe a necessidade de avaliar em conjunto a expressão gênica dos diferentes genes da via que já foram identificados em *Ae. aegypti*. Com a possibilidade de inoculação viral, a submissão do vetor a diferentes cepas de DENV e outros patógenos, poderia proporcionar uma melhor compreensão da atuação específica de cada proteína. Além disso, a comparação da expressão desses genes entre os estratos de Paranaguá, que possam possuir micropopulações com genótipos diferenciados do vetor, também seria interessante.

## 4.2 GENES RELACIONADOS AS TRIPSINA DIGESTIVAS

O resultado da análise estatística referente à expressão relativa dos genes associados às tripsinas digestivas foi significativo, com valor de  $p < 0,05$ , indicando uma diferença de expressão significativa entre a população de campo (Paranaguá) e a de laboratório (Rockefeller) (Figura 3).

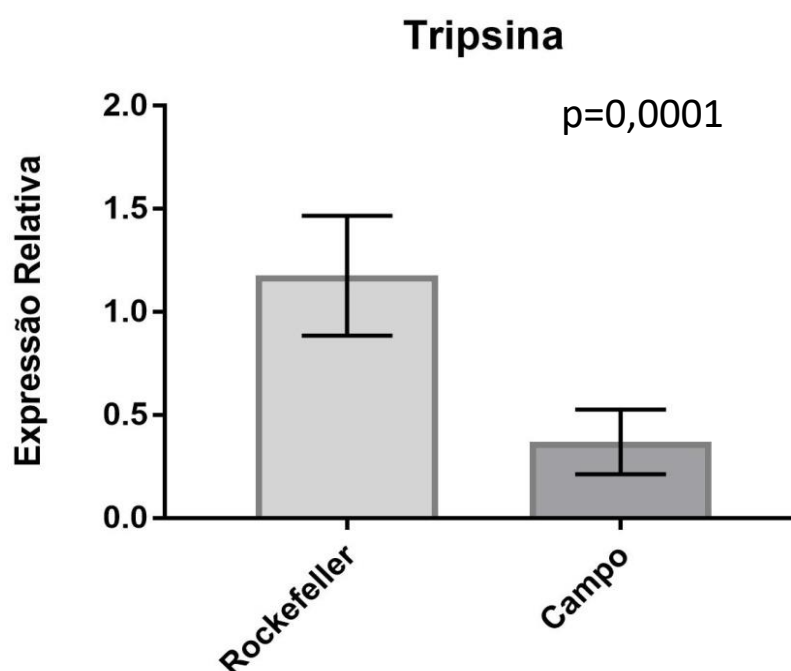


Figura 3. Expressão relativa entre população rockefeller e campo, para o gene da família das tripsinas. O valor de  $p$  está indicado ao lado, onde  $p < 0,05$  é o nível de significância.

Diferentemente das proteínas anteriores, que apontam para uma ligação direta com o processo imunológico, sabe-se que as tripsinas possuem o papel principal de digestão de sangue. Em mosquitos, ainda vem sendo incorporados diferentes genes à via e a classificação dentro do grupo das proteases parece ser um processo complexo e ainda controverso (BRACKENEY *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2013).

Estudos relacionados à infecção viral em *Ae. aegypti* mostraram que essas proteínas possuem uma ligação adicional ao processo proteolítico de DENV, favorecendo sua replicação no vetor. Possivelmente, a mudança gerada no metabolismo do inseto após a digestão do sangue propicia que o vírus atinja níveis

ótimos de infecção no intestino (BENNETT *et al.*; BOSIO *et al.*, 2000; 2002, MOLINA-CRUZ *et al.*, 2002; MOLINA-CRUZ *et al.*, 2005).

Como a cidade de Paranaguá passou por intensa circulação viral em 2015 e 2016, é lógico pensar que essa população possui certo nível de susceptibilidade e de capacidade de transmitir o vírus. A comparação com uma população geneticamente distinta nos permite “quantificar” esses níveis de susceptibilidade, mas não é possível inferir populações susceptíveis e refratárias, já que para isso seria necessário testes de infecção e análises da titulação viral.

A população Rockefeller apresentou uma expressão relativa significativamente maior de tripsina. Considerando que essas proteínas digestivas favorecem a replicação do vírus e que possuem uma ligação mais direta com as barreiras anatômicas do intestino médio (MIB e MEB) (GORROCHOTEGUI-ESCALANTE *et al.*, 2005), existem indícios que essa população seja mais suscetível do que a de campo, ao menos para essas barreiras físicas e esse marcador. Embora seja possível imaginar que uma linhagem de mosquitos estabelecida e criada em laboratório, com menor variabilidade genética, tivesse uma menor susceptibilidade, esse ainda não é um panorama comprovado para essa população. O que se sabe é que a cepa Rockefeller (Rock) é utilizada em muitos trabalhos com inseticidas, por ser referência de susceptibilidade aos mesmos (CAMPOS & ANDRADE, 2001; LUNA *et al.*, 2004) .

Apesar de ser difícil a comparação entre trabalhos que empregam metodologias distintas, é pertinente ressaltar que podem existir alterações no perfil transcricional das tripsinas entre refeições de sangue normal e sangue contaminado. Em Dreyer (2015), sete genes considerados ligados à via das tripsinas tiveram maior expressão em população suscetível e menor expressão em população refratária, após alimentação sanguínea com inoculação de DENV. Brackeney *et al.* (2010), observaram que três desses mesmos genes, tiveram um nível de expressão contínuo antes e após alimentação sanguínea, numa mesma população. Bonizzoni *et al.* (2012) demonstraram que um gene precursor da tripsina teve a expressão elevada em mosquitos alimentados somente com sangue. Por outro lado, um gene associado às serino-proteases, grupo ao qual pertencem as tripsinas, aumentou em resposta à alimentação sanguínea infectada com cepa de DENV. A análise da expressão de diferentes genes associados às vias proteolíticas, em populações

submetidas a diferentes condições, se mostra necessária para esclarecer o real papel dessas enzimas.

Considerando uma possível resposta transcricional da tripsina à alimentação com solução açucarada, sabe-se que embora essas refeições preencham o intestino médio do vetor, não são suficientes para induzir sozinhas a síntese diferencial dessas proteínas (NORIEGA, 1999; BONIZZONI *et al.*, 2011). Com isso, podemos supor que o nível de RNA transcrito dessas proteínas independa da alimentação a base de açúcar. Assim, podemos descartar até certo ponto, que a alimentação açucarada fornecida para a população de laboratório poderia ter influenciado no resultado obtido.

Por fim, contrastando com os trabalhos anteriores, o presente estudo apresentou uma diferença significativa no perfil transcricional de genes relacionados à tripsina tardia, entre campo e Rock, sem a realização de alimentação sanguínea e inoculação viral. Com isso, podemos imaginar que exista uma pré-disposição molecular que favoreça a competência vetorial dessa população.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente estudo foi observado que genes que tinham relação direta com o sistema imunológico não apresentaram diferença significativa de expressão entre as populações. Por outro lado, indícios que a população de laboratório é mais susceptível ao vírus que a de campo, ao menos para o marcador da tripsina, foram apresentados.

Considerando que trabalhos com essa abordagem são relativamente recentes, ainda existem muitos mecanismos para serem elucidados em relação ao funcionamento dessas proteínas e como se relacionam com o vírus. O entendimento de aspectos relacionados à competência vetorial se tornam importantes não só para o conhecimento da fisiologia do vetor, mas podem contribuir significativamente para a vigilância entomológica. Numa perspectiva futura, novas técnicas de controle de arboviroses poderão estar relacionadas a interromper ou alterar esses processos genéticos.

O aprimoramento da metodologia, da técnica de RT-qPCR, adaptações de protocolo e a experiência de trabalhar com algo tão complexo foi de extrema importância para minha formação e para viabilizar próximos estudos relacionados, sendo esta uma área de pesquisa nova no laboratório. Além da parte experimental, a revisão bibliográfica também foi importante para conhecer o que está sendo realizado atualmente, novas abordagens e o que já foi descoberto sobre o assunto.

## REFERÊNCIAS

- AGAISSE, H., & PERRIMON, N. The roles of JAK/STAT signaling in *Drosophila* immune responses. **Immunological reviews**, v. 198, n. 1, p. 72-82, 2004.
- AMARAL, R. J. V.; DANSA-PETRETSKI, M. Interação Patógeno-vetor: Dengue. In: **Tópicos Avançados em Entomologia Molecular. Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular**. Itabajara da Silva Vaz Junior, 2012.
- ANTONOVA, Y., ALVAREZ, K. S., KIM, Y. J., KOKOZA, V., & RAIKHEL, A. S. The role of NF- $\kappa$ B factor REL2 in the *Aedes aegypti* immune response. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 39, n. 4, p. 303-314, 2009
- ARAÚJO, H. R. C. **Caracterização morfológica dos hemócitos do *Aedes aegypti* e do *Aedes albopictus* e a resposta imune dos hemócitos do *Aedes aegypti* após a infecção pelo Dengue Vírus**. Tese de Doutorado - Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, p.191, 2011.
- AVIRUTNAN P., MEHLHOP E., DIAMOND M. S. Complement and its role in protection and pathogenesis of flavivirus infections. **Vaccine** **26**, v. 26, p. 100-107, 2008.
- BAXTER, R. H., CHANG, C. I., CHELLIAH, Y., BLANDIN, S., LEVASHINA, E. A., & DEISENHOFER, J. Structural basis for conserved complement factor-like function in the antimalarial protein *TEP1*. **Proc Natl Acad Sci**, v. 104, n. 28, p. 11615-11620, 2007.
- 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*. **Veterinary parasitology**, 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., OLSON, K. E., DE LOURDES MUÑOZ, M., FERNANDEZ-SALAS, I., FARFAN-ALE, J. A., HIGGS, S., & BEATY, B. J. Variation in vector competence for dengue 2 virus among 24 collections of *Aedes aegypti* from Mexico and the United States. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 67, n. 1, p. 85-92, 2002.
- BLACK, W. C., BENNETT, K. E., GORROCHÓTEGUI-ESCALANTE, N., BARILLAS-MURY, C. V., FERNÁNDEZ-SALAS, I., DE LOURDES MUÑOZ, M., ... & BEATY, B.

J. Flavivirus susceptibility in *Aedes aegypti*. **Archives of medical research**, v. 33, n. 4, p. 379-388, 2002.

BLANDIN, S.; LEVASHINA, E. A. Thioester-containing proteins and insect immunity. **Molecular immunology**, v. 40, n. 12, p. 903-908, 2004.

BLANDIN, S. A. & LEVASHINA, E. A. Phagocytosis in mosquito immune responses. **Immunological reviews**, v. 219, n. 1, p. 8-16, 2007.

BLANDIN, S., SHIAO, S. H., MOITA, L. F., JANSE, C. J., WATERS, A. P., KAFATOS, F. C., & LEVASHINA, E. A. Complement-like protein TEP1 is a determinant of vectorial capacity in the malaria vector *Anopheles gambiae*. **Cell**, v. 116, n. 5, p. 661-670, 2004

BONIZZONI, M.; DUNN, W. A.; CAMPBELL, C. L.; OLSON, K. E.; DIMON, M. T.; MARINOTTI, O.; JAMES, A. A. RNA-Seq analyses of blood-induced changes in gene expression in the mosquito vector species, *Aedes aegypti*. **BMC Genomics**, v.12, n.1, p.82, 2011.

BONIZZONI, M., DUNN, W. A., CAMPBELL, C. L., OLSON, K. E., MARINOTTI, O., & JAMES, A. A. Complex Modulation of the *Aedes aegypti* Transcriptome in Response to Dengue Virus Infection. **PLoS ONE**, v.7, n.11, e50512, 2012.

BOSIO, C. F., FULTON, R. E., SALASEK, M. L., BEATY, B. J., & BLACK, W. C. Quantitative trait loci that control vector competence for dengue-2 virus in the mosquito *Aedes aegypti*. **Genetics**, v. 156, n. 2, p. 687-698, 2000

BRACKNEY, D. E., ISOE, J., BLACK IV, W. C., ZAMORA, J., FOY, B. D., MIESFELD, R. L., & OLSON, K. E. Expression profiling and comparative analyses of seven midgut serine proteases from the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. **Journal of insect physiology**, v. 56, n. 7, p. 736-744, 2010.

BRAGA, I. A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: histórico do controle no Brasil. **Epidemiologia e serviços de saúde**, v. 16, n. 2, p. 113-118, 2007.

BRANDON, M. C., PENNINGTON, J. E., ISOE, J., ZAMORA, J., SCHILLINGER, A. S., & MIESFELD, R. L. TOR signaling is required for amino acid stimulation of early trypsin protein synthesis in the midgut of *Aedes aegypti* mosquitoes. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 38, n. 10, p. 916-922, 2008.

BÜNGER, M. H., LANGDAHL, B. L., ANDERSEN, T., HUSTED, L., LIND, M., ERIKSEN, E. F., & BÜNGER, C. E. Semiquantitative mRNA measurements of osteoinductive growth factors in human iliac-crest bone: expression of LMP splice variants in human bone. **Calcified tissue international**, v. 73, n. 5, p. 446-454, 2003.

BUSTIN, S. A. *et al.* The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611-622, 2009.

CAMPOS, J.; ANDRADE, C. F. S. Susceptibilidade larval de duas populações de *Aedes egypti* a inseticidas químicos. **Revista de Saúde Pública**, v. 35, p. 232-236, 2001.

CHENG, G., LIU, L., WANG, P., ZHANG, Y., ZHAO, Y. O., COLPITTS, T. M., ... & FIKRIG, E. An in vivo transfection approach elucidates a role for *Aedes aegypti* thioester-containing proteins in flaviviral infection. **PLoS one**, v. 6, n. 7, p. e22786, 2011. .

CONSOLI, R. A., & de Oliveira, R. L. (1994). **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. SciELO-Editora FIOCRUZ.

CUMMINGS K. L., WAGGONER S. N., TACKE R., HAHN Y. S. Role of complement in immune regulation and its exploitation by virus. **Viral Immunol**, v. 20, n. 4, p. 505-524, 2007.

DE CARVALHO LEANDRO, D. **Análise da imunidade de *Aedes Aegypti* (Diptera: Culicidae) ao vírus dengue em populações de campo com competência vetorial diferenciada**. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, p.79, 2011.

DE FARIA, I. J. D. S., OLMO, R. P., SILVA, E. G., & MARQUES, J. T. dsRNA sensing during viral infection: lessons from plants, worms, insects, and mammals. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 33, n. 5, p. 239-253, 2013.

DENVER, D. R., MORRIS, K., STREELMAN, J. T., KIM, S. K., LYNCH, M., & THOMAS, W. K. The transcriptional consequences of mutation and natural selection in *Caenorhabditis elegans*. **Nature genetics**, v. 37, n. 5, p. 544, 2005.

DICKSON, L. B., SANCHEZ-VARGAS, I., SYLLA, M., FLEMING, K., & BLACK IV, W. C. Vector competence in West African *Aedes aegypti* is flavivirus species and genotype dependent. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 8, n. 10, p. e3153, 2014.

DIMOPOULOS, G. Insect immunity and its implication in mosquito–malaria interactions. **Cellular microbiology**, v. 5, n. 1, p. 3-14, 2003.

DREYER, C. S. (2015). **Caracterização das respostas transcricionais e microbiomas de populações naturais do mosquito *Aedes aegypti* com diferentes níveis de suscetibilidade ao vírus dengue**. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Biociências de Botucatu, Botucatu, p.144, 2015.

ENDO Y., TAKAHASHI M., FUJITA T. Lectin complement system and pattern recognition. **Immunobiology**, v. 211, n. 4, p. 283-293, 2006.

EPIDEMIOLOGIA DA DENGUE. Organização Mundial de Saúde (OMS)/ World Health Organization (WHO). Disponível em : <http://www.who.int/denguecontrol/epidemiology/en/>.

FANSIRI, T., FONTAINE, A., DIANCOURT, L., CARO, V., THAISOMBOONSUK, B., RICHARDSON, J. H., ...& LAMBRECHTS, L. Genetic mapping of specific interactions between *Aedes aegypti* mosquitoes and dengue viruses. **PLoS genetics**, v. 9, n. 8, p. e1003621, 2013.

FERRANDON, D., IMLER, J. L., HETRU, C., & HOFFMANN, J. A. The Drosophila systemic immune response: sensing and signalling during bacterial and fungal infections. **Nature Reviews Immunology**, v. 7, n. 11, p. 862, 2007.

FORATTINI, O. P. Ecologia, epidemiologia e sociedade. In: **Ecologia, epidemiologia e sociedade**. 1992.

FORATTINI, O.P. Culicidologia médica: identificação, biologia e epidemiologia. In: **Culicidologia médica: identificação, biologia e epidemiologia**. v. 2. 2002.

FRANZ, A. W., SANCHEZ-VARGAS, I., ADELMAN, Z. N., BLAIR, C. D., BEATY, B. J., JAMES, A. A., & OLSON, K. E. Engineering RNA interference-based resistance to dengue virus type 2 in genetically modified *Aedes aegypti*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 11, p. 4198-4203, 2006.

FRANZ, A. W., SANCHEZ-VARGAS, I., RABAN, R. R., BLACK IV, W. C., JAMES, A. A., & OLSON, K. E. Fitness impact and stability of a transgene conferring resistance to dengue-2 virus following introgression into a genetically diverse *Aedes aegypti* strain. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 8, n. 5, p. e2833, 2014.

GHILDIYAL, M., & ZAMORE, P. D. Small silencing RNAs: an expanding universe. **Nature Reviews Genetics**, v. 10, n. 2, p. 94, 2009.

GIBSON, G. Mutation accumulation of the transcriptome. **Nature genetics**, v. 37, n. 5, p. 458, 2005.

GOMES, A. C. "Vigilância entomológica." **Informe epidemiológico do SUS**, v.11. n.2, p.79-90, 2002.

GONÇALVES, C. M. **Diferenças na variação da competência vetorial entre nove populações de *Aedes aegypti* do município de Belo Horizonte, Minas Gerais, ao Dengue virus 2**. Tese (Doutorado Ciências)- Centro de Pesquisas René Rachou. Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde. Belo Horizonte, p.64, 2014.

GORROCHOTEGUI-ESCALANTE, N., LOZANO-FUENTES, S., BENNETT, K. E., MOLINA-CRUZ, A., BEATY, B. J., & BLACKIV, W. C. Association mapping of segregating sites in the early trypsin gene and susceptibility to dengue-2 virus in the mosquito *Aedes aegypti*. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 35, n. 7, p. 771-788, 2005.

GUBLER, D. J. Resurgent vector-borne diseases as a global health problem. **Emerging infectious diseases**, v. 4, n. 3, p. 442, 1998.

GUBLER, D. J. Dengue and dengue hemorrhagic fever. **Clinical microbiology reviews**, v. 11, n. 3, p. 480-496, 1998.

GUBLER, D. J. Dengue/dengue haemorrhagic fever: history and current status. In: **New Treatment Strategies for Dengue and Other Flaviviral Diseases: Novartis Foundation Symposium 277**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, p. 3-22. 2006.

GUBLER, DUANE J.; ROSEN, LEON. Variation among geographic strains of *Aedes albopictus* in susceptibility to infection with dengue viruses. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 25, n. 2, p. 318-325, 1976.

GUEDES, D. R. D. . Tese (Doutorado). Centro de Pesquisas Aggeu **Análise da competência vetorial para o vírus dengue em populações naturais de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* de Pernambuco** Magalhães, Pernambuco, p.102, 2012.

GUZMAN, M. G., HALSTEAD, S. B., ARTSOB, H., BUCHY, P., FARRAR, J., GUBLER, D. J., ... & NATHAN, M. B. Dengue: a continuing global threat. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 12supp, p. S7, 2010.

HOLMES, E. C., & TWIDDY, S. S. The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus. **Infection, genetics and evolution**, v. 3, n. 1, p. 19-28, 2003.

HURST, G. D., & HUTCHENCE, K. J. Host defence: getting by with a little help from our friends. **Current Biology**, v. 20, n. 18, p. R806-R808, 2010.

JOBLING, B. The mosquito *Aedes aegypti*. In: B. Jobling, Anatomical drawings of biting flies; **Welcome Trust: Londres**. 1987.

KANTOR, I. N. Dengue, Zika y chikungunya. **Medicina (Buenos Aires)**, v. 76, n. 2, p. 93-97, 2016.

KYLE, J. L.; HARRIS, E. Global spread and persistence of dengue. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 62, p. 71-92, 2008.

LAVINE, M. D., & STRAND, M. R. Insect hemocytes and their role in immunity. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 32, n. 10, p. 1295-1309, 2002.

LEMAITRE, B., REICHHART, J. M., & HOFFMANN, J. A. *Drosophila* host defense: differential induction of antimicrobial peptide genes after infection by various classes of microorganisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, n. 26, p. 14614-14619, 1997.

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

LEMOS, F. J. A.; CORNEL, A. J.; JACOBS-LORENA, M. Trypsin and aminopeptidase gene expression is affected by age and food composition in *Anopheles gambiae*. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 26, n. 7, p. 651-658, 1996.

LEVASHINA, E. A., MOITA, L. F., BLANDIN, S., VRIEND, G., LAGUEUX, M., & KAFATOS, F. C. Conserved role of a complement-like protein in phagocytosis revealed by dsRNA knockout in cultured cells of the mosquito, *Anopheles gambiae*. **Cell**, v. 104, n. 5, p. 709-718, 2001.

LIMA-CAMARA, T.N., BRUNO, R.V., LUZ, P.M., CASTRO, M.G., LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R., SORGINE, M.H., PEIXOTO, A.A. Dengue infection increases the locomotor activity of *Aedes aegypti* females. **PLoS One**, v. 6, n. 3, p. e17690, 2011.

LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R., VAZEILLE, M., DE FILIPPIS, A. M. B., & FAILLOUX, A. B. *Aedes aegypti* in Brazil: genetically differentiated populations with high susceptibility to dengue and yellow fever viruses. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 98, n. 1, p. 43-54, 2004.

LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R., & COURA, J. R. Principais insetos vetores e mecanismos de transmissão das doenças infecciosas e parasitárias. **Coura JR, In: Koogan G, ed. Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias Rio de Janeiro**, p. 75-97, 2005.

LUNA, J. E. D., MARTINS, M. F., ANJOS, A. F. D., KUWABARA, E. F., & NAVARRO-SILVA, M. A. Susceptibilidade de *Aedes aegypti* aos inseticidas temephos e cipermetrina, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 38, p. 842-843. 2004.

MACIEL-DE-FREITAS, R., KOELLA, J.C., LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. Lower survival rate, longevity and fecundity of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) females orally challenged with dengue virus serotype 2. **Trans R Soc Trop Med Hyg.**, v. 105, n. 8, p. 452-458, 2011.

MEDZHITOV, R., & JANEWAY, C. A. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. **Science**, v. 296, n. 5566, p. 298-300, 2002.

MEISTER, M.; LAGUEUX, M.. *Drosophila* blood cells. **Cellular microbiology**, v. 5, n. 9, p. 573-580, 2003.

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

MENDONÇA, F. D. A., PAULA, E. V. D., & OLIVEIRA, M. M. F. D. Aspectos sócio-ambientais da expansão da dengue no Paraná. In: **Encontro da Associação**

**Nacional de Pós Graduação e Pesquisa em Ambiente e Sociedade**, 2. p. 1-13, 2004.

MILLER, B. R., & MITCHELL, C. J. Genetic selection of a flavivirus-refractory strain of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 45, n.4, p. 399-407, 1991.

MOITA, L. F., WANG-SATTLER, R., MICHEL, K., ZIMMERMANN, T., BLANDIN, S., LEVASHINA, E. A., & KAFATOS, F. C. In vivo identification of novel regulators and conserved pathways of phagocytosis in *A. gambiae*. **Immunity**, v.23, n.1, p.65-73. 2005.

MOLINA-CRUZ, A., GUPTA, L., RICHARDSON, J., BENNETT, K., BLACK IV & BARILLAS-MURY, C. Effect of mosquito midgut trypsin activity on dengue-2 virus infection and dissemination in *Aedes aegypti*. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 72, n.5, p. 631-637, 2005.

MULLER, H. M., C., F., VIZIOLI, J., D., A., & C., A. Constitutive and blood meal-induced trypsin genes in *Anopheles gambiae*. **Experimental parasitology**, v.81, n.3, p.371-385, 1995.

NENE, V., WORTMAN, J. R., LAWSON, D., HAAS, B., KODIRA, C., TU, Z. J., ... & REN, Q. Genome sequence of *Aedes aegypti*, a major arbovirus vector. **Science**. 2007.

NICHOLLS, W. H. A fronteira agrícola na história recente do Brasil: o Estado do Paraná, 1920-65. **Revista Brasileira de Economia**, v. 24, n.4, p.33-63, 1970.

NORIEGA, F. G., PENNINGTON, J. E., BARILLAS-MURY, C., WANG, X. Y., & WELLS, M. A. *Aedes aegypti* midgut early trypsin is post-transcriptionally regulated by blood feeding. **Insect molecular biology**, v. 5, n. 1, p. 25-29, 1996.

NORIEGA, F. G.; WELLS, M. A. A molecular view of trypsin synthesis in the midgut of *Aedes aegypti*. **Journal of insect physiology**, v. 45, n. 7, p. 613-620, 1999.

OBBARD, D. J., et al. The evolution of TEP1, an exceptionally polymorphic immunity gene in *Anopheles gambiae*. **BMC evolutionary biology**, v.8, n.1, p.274, 2008.

OBBARD, D. J., & DUDAS, G. The genetics of host–virus coevolution in invertebrates. **Current opinion in virology**, v.8, p.73-78, 2014.

PFAFFL M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Res.**, v. 29, n. 9, p. e45-e45, 2001.

PINHEIRO F. P., CORBER S. J. Global situation of dengue and dengue haemorrhagic fever, and its emergence in the Americas. **World health statistics quarterly**, v. 50, p. 161-169, 1997.

PONTES R.J.S. & RUFFINO-NETO A. Dengue em localidade urbana da região sudeste do Brasil: aspectos epidemiológicos. **Rev. Saúde Pública**, v.28, n.3, p.218-227, 1994.

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

RHODAIN, F., & ROSEN, L. Mosquito vectors and dengue virus-vector relationship. **Dengue and Dengue Haemorrhagic Fort Collins: Center for Agriculture Bioscience International**, v. 2, p. 26-27, 1997.

RIBEIRO, E. M. **Isolamento E Caracterização Parcial Dos Genes Beta-Actina E Miosina De Cadeia Pesada Do Camarão Rosa *Farfantepenaeus subtilis***. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, p.108, 2009.

ROCCO, I. M., KAVAKAMA, B. B., & SANTOS, C. L. S. First isolation of dengue 3 in Brazil from an imported case. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.43, n.1, p.55-57, 2001.

RODRIGUES J, BRAYNER FA, ALVES LC, DIXIT R, BARILLAS-MURY C. Hemocyte Differentiation Mediates Innate Immune Memory in *Anopheles gambiae* Mosquitoes. **Science**, v. 329, n. 5997, p. 1353-1355, 2010.

SALAZAR, M. I., RICHARDSON, J. H., SÁNCHEZ-VARGAS, I., OLSON, K. E., & BEATY, B. J. Dengue virus type 2: replication and tropisms in orally infected *Aedes aegypti* mosquitoes. **BMC microbiology**, . 7, n. 1, p. 9, 2007.

SANCHEZ-VARGAS, I., TRAVANTY, E. A., KEENE, K. M., FRANZ, A. W., BEATY, B. J., BLAIR, C. D., & OLSON, K. E.. RNA interference, arthropod-borne viruses, and mosquitoes. **Virus research**, v. 102, n.1, p.65-74, 2004.

SANCHEZ-VARGAS, I., SCOTT, J. C., POOLE-SMITH, B. K., FRANZ, A. W., BARBOSA-SOLOMIEU, V., WILUSZ, J., ... & BLAIR, C. D. Dengue virus type 2 infections of *Aedes aegypti* are modulated by the mosquito's RNA interference pathway. **PLoS pathogens**, v. 5, n.2, pe.1000299, 2009.

SCHATXMAYR, H. G., NOGUEIRA, R. M. R., & TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A. An outbreak of dengue virus at Rio de Janeiro-1986. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 81, p. 245-246, 1986.

SCHMID-HEMPEL P. Evolutionary ecology of insect immune defenses. **Annu. Rev. Entomol**, v. 50, p. 529-551, 2005..

SECRETARIA DE SAÚDE DO PARANÁ. Informativo sobre a vacina da dengue. Disponível em :  
<http://www.saude.pr.gov.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=3128>

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE DO PARANÁ. Situação da dengue, chikungunya e zika vírus no paraná – 2015/2016. Informe técnico 37. Disponível em: <http://www.dengue.pr.gov.br>.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Boletim Epidemiológico. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e doença aguda pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 34 de 2018. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/setembro/10/2018-045.pdf>

SERRATO, I. M., CAICEDO, P. A., OROBIO, Y., LOWENBERGER, C., & OCAMPO, C. B. Vector competence and innate immune responses to dengue virus infection in selected laboratory and field-collected *Stegomyia aegypti* (= *Aedes aegypti*). **Medical and veterinary entomology**, v.31, n.3, p.312-319, 2017.

SILVA, C. P., LEMOS, F. J. A., DA SILVA, J. R.. Digestão em Insetos (cap 5). In: **Temas Avançados em Entomologia Molecular: Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular**. Itabajara da Silva Vaz Junior, 2013.

SHIN S.W., KOKOZA V., AHMED A., RAIKHEL A.S. Characterization of three alternatively spliced isoforms of the Rel/NF-kappa B transcription factor Relish from the mosquito *Aedes aegypti*. **Proc Natl Acad Sci**, v.99, p. 9978–9983, 2002.

SHIN S.W., KOKOZA V., LOBKOV I., RAIKHEL A.S. Relish-mediated immune deficiency in the transgenic mosquito *Aedes aegypti*. **Proc Natl Acad Sci**, v. 100, n.2616–2621, 2003.

SHIN SW, KOKOZA V, BIAN G, CHEON HM, KIM YJ, ET AL. REL1, a homologue of *Drosophila* dorsal, regulates toll antifungal immune pathway in the female mosquito *Aedes aegypti*. **J Biol Chem**, v.280, p.16499–16507, 2005.

SIM, S., JUPATANAKUL, N., RAMIREZ, J. L., KANG, S., ROMERO-VIVAS, C. M., MOHAMMED, H., & DIMOPOULOS, G. Transcriptomic profiling of diverse *Aedes aegypti* strains reveals increased basal-level immune activation in dengue virus-refractory populations and identifies novel virus-vector molecular interactions. **PLoS neglected tropical diseases**, v.7, n.7, p.e 2295, 2013.

SLOSEK, J. *Aedes aegypti* mosquitoes in the Americas: a review of their interactions with the human population. **Social science & medicine**, v.23, n.3, p.249-257, 1986.

SOARES, T. S., WATANABE, R. M., LEMOS, F. J., & TANAKA, A. S. Molecular characterization of genes encoding trypsin-like enzymes from *Aedes aegypti* larvae and identification of digestive enzymes. **Gene**, v.489, n.2, p.70-75, 2011.

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

TEIXEIRA, M. D. G., BARRETO, M. L., & Guerra, Z.. Epidemiologia e medidas de prevenção do dengue. **Informe epidemiológico do SUS**, v.8, n.4, p.5-33, 1999.

WATERHOUSE R. M., KRIVENTSEVA E. V., MEISTER S., XI Z, ALVAREZ KS, et al. Evolutionary dynamics of immune-related genes and pathways in disease-vector mosquitoes. **Science**, v.316, p. 1738–1743, 2007.

WOODRING, J. L., HIGGS, S., & BEATY, B. J. Natural cycles of vector-borne pathogens. **The biology of disease vectors**, p. 51-72, 1996.

XIAO, X., LIU, Y., ZHANG, X., WANG, J., LI, Z., PANG, X., ... & CHENG, G.. Complement-related proteins control the flavivirus infection of *Aedes aegypti* by inducing antimicrobial peptides. **PLoS pathogens**, v. 10, n.4, p.e1004027, 2014.

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

ZELLER, H. G. Dengue, arbovirus and migrations in the Indian Ocean. **Bulletin de la Societe de pathologie exotique (1990)**, v. 91, n. 1, p. 56-60, 1998.

ZOU, Z., SOUZA-NETO, J., XI, Z., KOKOZA, V., SHIN, S. W., DIMOPOULOS, G., & RAIKHEL, A. Transcriptome analysis of *Aedes aegypti* transgenic mosquitoes with altered immunity. **PLoS pathogens**, v. 7, n. 11, p. e1002394, 2011.

ZHOU, Y., LIU, Y., YAN, H., LI, Y., ZHANG, H., XU, J., ... & CHEN, X. miR-281, an abundant midgut-specific miRNA of the vector mosquito *Aedes albopictus* enhances dengue virus replication. **Parasites & vectors**, v. 7, n. 1, p. 488, 2014.