

RESPOSTA FISIOLÓGICA DE FÊMEAS DO MOSQUITO *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) À INFECÇÃO PELO FUNGO ENTOMOPATOGÊNICO *Metarhizium anisopliae*

**LAERCIANA PEREIRA VIEIRA**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE  
DARCY RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ  
AGOSTO – 2012



RESPOSTA FISIOLÓGICA DE FÊMEAS DO MOSQUITO *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) À INFECÇÃO PELO FUNGO ENTOMOPATOGÊNICO *Metarhizium anisopliae*

**LAERCIANA PEREIRA VIEIRA**

Tese apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Doutora em Produção Vegetal

Orientador: Prof. Richard Ian Samuels

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ  
AGOSTO – 2012

## FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do **CCTA / UENF** 076/2012

Vieira, Laerciana Pereira

Resposta fisiológica de fêmeas do mosquito *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) à infecção pelo fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* / Laerciana Pereira Vieira. – 2012.

60 f.

Orientador: Richard Ian Samuels

Tese (Doutorado - Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Campos dos Goytacazes, RJ, 2012.

Bibliografia: f. 53 – 60.

1. *Aedes aegypti* 2. Sistema imune 3. *Metarhizium anisopliae* 4. Controle biológico I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. II. Título.

CDD–  
632.92  
595.77

RESPOSTA FISIOLÓGICA DE FÊMEAS DO MOSQUITO *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) À INFECÇÃO PELO FUNGO ENTOMOPATOGÊNICO *Metarhizium anisopliae*

**LAERCIANA PEREIRA VIEIRA**

Tese apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Doutora em Produção Vegetal

Aprovada em 24 de Agosto de 2012

Comissão Examinadora

Dr. Milton Erthal Junior (DS. Produção Vegetal) - UENF

---

Dr. Francisco José Alves Lemos (DS. Bioquímica)- UENF

---

Dr. José Roberto Silva (DS. Biociências e Biotecnologia) - UFRJ

---

Dr. Richard Ian Samuels (Ph.D Patologia de Insetos) – UENF  
(Orientador)

“Ao meu Pai Laer Vieira e meu amado irmão Laerciano Pereira Vieira.”

Dedico

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, meu amigo incondicional;

Ao meu pai, Laer Vieira, e irmão Laerciano Pereira Vieira;

À minha amiga e irmã, Cátia Oliveira de Paula, pela paciência e sabedoria;

Ao querido professor Richard Ian Samuels, por não desistir de mim;

À equipe do Laboratório de Patologia de Insetos, Adriano, Aline, Denise,

Simone, Paulo Anderson, Marina e Carine pelo suporte no laboratório e apoio nos trabalhos além dos momentos divertidos;

A Unidade de Experimentação Animal - Entomologia Molecular, em especial a Evenilton, Daniele, Renato, Mariana e Léo pela paciência e preciosos ensinamentos;

Ao Prof. Carlos Logullo por me acolher e oferecer estrutura para realização de parte desse trabalho;

A Drika, Bárbara, Daniela, Josias pelos momentos agradáveis e companheirismo;

Ao Prof. Álvaro Eiras (Universidade Federal de Minas Gerais) pela atenção e por ceder seu laboratório para realização de testes com auxílio do olfatômetro;

A UENF, pela oportunidade de realizar o curso de Doutorado, e pela concessão da bolsa;

Aos servidores da UENF, Rita e Patrícia, pelos serviços prestados.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>01</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>05</b>
2.1 Biologia do <i>Aedes aegypti</i> .....	05
2.1.1 Ovo.....	05
2.1.2 Larva.....	05
2.1.3 Pupa.....	06
2.1.4 Adulto.....	06
2.1.5 Comportamento.....	06
2.1.6 Hábito alimentar.....	08
2.2 Sistema imune nos insetos.....	11
2.2.1 Sistema imune de <i>A. aegypti</i> .....	12
2.3 Uso de fungos entomopatogênicos para o controle de insetos vetores de doenças.....	15
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>20</b>
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>21</b>
4.1 Criação de mosquitos linhagem Rockefeller.....	21
4.2 Produção de fungos entomopatogênicos.....	22
4.3 Preparo das formulações de fungo.....	22
4.4. EXPERIMENTO 1: Microscopia Eletrônica de Varredura em fêmeas de <i>A. aegypti</i> .....	22
4.5 EXPERIMENTO 2.....	23
A- Preferência alimentar de fêmeas de <i>A. aegypti</i> infectadas com <i>Metarhizium anisopliae</i> por sangue.....	23
B- Análise da influência do <i>M. anisopliae</i> na produção de ovos em fêmeas de <i>A. aegypti</i> .....	24
C- Viabilidade dos ovos.....	24
D- Análise dos dados.....	24
4.6 EXPERIMENTO 3: Resposta imunológica dos mosquitos durante a infecção desencadeada pelo isolado ESALQ 818 do fungo <i>M. anisopliae</i> utilizando como sinalizadores a expressão gênica das proteínas Toll5A e Citocina – Spz1C.....	25
A- Teste de sobrevivência de fêmeas alimentadas com sacarose 10%.....	25
B- Análise molecular de <i>A. aegypti</i> infectados com o fungo <i>M.</i> <i>Anisopliae</i> .....	25

C- Extração e quantificação do RNA total de fêmeas de <i>A. aegypti</i> ....	25
D- Expressão e quantificação de transcritos de Toll5A e Citocina (Spz1C) em fêmeas alimentadas com sacarose 10%.....	26
E- Expressão e quantificação de transcritos de Toll5A em fêmeas alimentadas com sangue 72 horas antes da infecção com <i>M. anisopliae</i> .....	26
4.7 EXPERIMENTO 4: Avaliação da atração de fêmeas pós-infecção com fungo a uma fonte de odor humano.....	27
A- Criação de mosquitos.....	27
B-Avaliação da atração de fêmeas de <i>A. aegypti</i> , infectadas anteriormente com isolado ESALQ 818 do <i>M. anisopliae</i> , ao hospedeiro humano.....	27
<b>5. RESULTADOS</b> .....	31
5.1 EXPERIMENTO 1: Microscopia Eletrônica de Varredura em fêmeas de <i>A. aegypti</i> .....	31
5.2 EXPERIMENTO 2.....	33
A- Preferência alimentar de fêmeas de <i>A. aegypti</i> infectadas com <i>M. anisopliae</i> por sangue.....	33
B- Análise da influência do <i>M. anisopliae</i> na produção e viabilidade dos ovos em fêmeas de <i>A. aegypti</i> .....	33
5.3 EXPERIMENTO 3: Resposta imunológica dos mosquitos durante a infecção desencadeada pelo isolado ESAL818 do fungo <i>M. anisopliae</i> utilizando como sinalizadores a expressão gênica das proteínas Toll5A e Spz1C.....	35
A- Teste de sobrevivência de fêmeas alimentadas com sacarose 10%.....	35
B- Expressão e quantificação de transcritos de Toll5A e Spz1C em fêmeas alimentadas com sacarose 10%.....	36
C- Expressão e quantificação de transcritos de Toll5A em fêmeas alimentadas com sangue 72 horas antes da infecção com <i>M. anisopliae</i> .....	38
5.4 EXPERIMENTO 4: Avaliação da atração de fêmeas pós-infecção com fungo a uma fonte de odor humano.....	39
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	40
1. EXPERIMENTO 1: Microscopia Eletrônica de Varredura.....	41
2. EXPERIMENTO 2.....	42
A- Preferência alimentar de fêmeas de <i>A. aegypti</i> , infectadas com <i>M. anisopliae</i> , por sangue.....	42
B- Análise da influência do <i>M. anisopliae</i> na produção e viabilidade dos ovos em fêmeas de <i>A. aegypti</i> .....	43
3. EXPERIMENTO: Resposta imunológica dos mosquitos durante a infecção desencadeada pelo isolado ESAL818 do fungo <i>M. anisopliae</i> utilizando como sinalizadores a expressão gênica das proteínas Toll5A e Spz1C.....	45
4 EXPERIMENTO 4: Avaliação da atração de fêmeas de <i>A. aegypti</i> , infectadas anteriormente com isolado ESALQ818 do <i>M. anisopliae</i> , ao hospedeiro humano.....	48
<b>7. CONCLUSÕES</b> .....	51
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	53

## RESUMO

VIEIRA, Laerciana Pereira; Produção Vegetal, D.Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Agosto de 2012. Resposta fisiológica de Fêmeas do Mosquito *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) à infecção pelo fungo entomopatogênico *Metarhizium*. Orientador: Richard Ian Samuels

O mosquito *A. aegypti* é o principal vetor urbano dos arbovírus da Febre amarela e Dengue. Recentemente estudos têm revelado a suscetibilidade de larvas e adultos desse vetor à infecção pelo fungo entomopatogênico, *M. anisopliae*. Esse estudo teve como objetivo descrever o processo infeccioso do fungo em fêmeas do mosquito, a influência do patógeno no comportamento alimentar, fecundidade e sobrevivência de fêmeas de *A. aegypti* 48, 72 e 96h pós-infecção e analisar a expressão relativa das proteínas Toll5A e Spz1C, importante nas vias do sistema imune. Os efeitos do patógeno sobre a habilidade do mosquito em procurar hospedeiros também foram investigados com auxílio de um olfatômetro. O fungo foi aplicado diretamente (pulverizado com auxílio da Torre de Potter) sobre as fêmeas na concentração  $1 \times 10^7$  conídios/ml. Foram utilizadas 120 fêmeas distribuídas em três repetições para o teste de alimentação sanguínea, e dessas, dez fêmeas totalmente ingurgitadas de sangue de cada repetição foram separadas para análise de fecundidade e viabilidade dos ovos. Para análise da expressão relativa das proteínas foram extraídos, com trizol, o RNA total das fêmeas e para transcrição reversa foi utilizado kit para síntese de cDNA com “random primers”. Usando imagens do microscópio de varredura foi possível observar a adesão dos conídios no tegumento do mosquito após 12 horas. A germinação dos conídios e colonização ocorreu entre 24 e 48 horas. O crescimento dos micélios foi visualizado com 96 h pós-infecção sobre a superfície

dos adultos. A concentração de fungo usada não interferiu na sobrevivência de fêmeas entre 48 e 96h de infecção, porém foi registrado uma diminuição na preferência alimentar por sangue em fêmeas infectadas, principalmente no grupo com 72h pós-infecção. Fêmeas com 72h de infecção ovipositaram 63,1% menos ovos que os controles, mostrando o potencial desse micro-organismo em reduzir a população de mosquitos. Foi possível observar que a expressão relativa de Spz1C em fêmeas expostas ao fungo aumentou a partir das 24h pós-infecção, alcançando maior nível de expressão com 48 horas, decrescendo entre 72 e 96 horas de infecção. A expressão da proteína Toll5A apresentou-se alta com 24h pós-infecção, diminuindo a partir das 96 h pós-infecção, período em que a taxa de mortalidade aumentou. Esses resultados mostram os efeitos do *M. anisopliae* na fisiologia do mosquito, denegrindo o sistema imune e reduzindo a sobrevivência dos mosquitos. O teste com olfatômetro mostrou que das fêmeas com 48 horas pós-infecção com fungo, 44,4% selecionaram a fonte de odor humano e 10,2% não optaram. O aumento no comportamento de procura pelo hospedeiro em fêmeas 48h pós-infecção pode ter sido estimulado pela infecção promovida pelo fungo, já que o sangue é necessário para manter o equilíbrio entre a formação de radicais livres e a operação de mecanismos antioxidantes, podendo maximizar a sobrevivência das fêmeas quando comparado com mosquitos alimentados somente com sacarose. Das fêmeas com 72 horas pós-infecção 28,9% optaram pelo odor humano e 25% pelo tubo sem fonte de odor. Esses resultados mostram importantes alterações na fisiologia do inseto antes da morte, reduzindo assim a capacidade vetorial do mosquito.

## ABSTRACT

VIEIRA, Laerciana Pereira; Plant Production, D.Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. August 2012. Physiological responses of female *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) mosquitoes to infection by *Metarhizium anisopliae*. Supervisor: Richard Ian Samuels.

The mosquito *A. aegypti* is the principal urban vector of the arboviruses of Dengue and Yellow fever. Recent studies have revealed the susceptibility of larvae and adults of this vector to infection by the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*. This study described infectious process of the fungus in female mosquitoes, the influence of the pathogen on feeding behavior, fecundity and survival of female *A. aegypti* 48, 72 and 96h post-infection. The relative expression of proteins Toll5A and Spz1C, important vias in the mosquito's immune system were studied. The effects of the pathogen on the ability of the mosquitoes host seeking ability were also investigated with the aid of an olfactometer. The fungus was directly applied (sprayed using a Potter Tower) on to the females at a concentration of  $1 \times 10^7$  conidia / ml. One hundred and twenty females were used distributed in three replicates for blood feeding tests, and of these, ten fully blood engorged females from each replicate were separated for analysis of fecundity and egg viability. For analysis of the relative expression of proteins, total RNA was extracted with Trizol and a used for reverse transcription kit for cDNA synthesis whit random primers was used. From Scanning Electron Microscopy it was possible to visualize adhesion and permanence of conidia on the integument of the mosquito after 12 hours. Conidial germination and host colonization occurred between 24 and 48 hours. Growth of mycelia was seen within 96 hours of infection on the surface of the infected adults. The concentration of fungus used here did

not affect the survival of females between 48 and 96 hours, but caused infection, a decrease in blood-feeding of infected females, especially 72 hours post-infection. Females at 72 hours post-infection oviposited 63.1% fewer eggs than the controls, showing the potential of this microorganism to reduce controls of mosquito populations. It was observed that the relative expression of Spz1C in females exposed to the fungus increased at 24 hours post-infection, reaching the highest level of expression after 48 hours, and then declining between 72 and 96 hours. The expression of Toll5A reached a peak at 24 hours post-infection and then declined to a low level at 96 hours, at which time the mortality rate increased. These results shows the effects of *M. anisopliae* on the physiology of the mosquito, deactivating the immune system and thus reducing mosquito survival. The olfactometer tests showed that 44.4% of the females 48 hours post-infection selected a human odor source when compared to 10.2% selecting no odor. This increased host seeking behavior may have been stimulated by infection by the fungus, since blood is necessary to maintain the equilibrium between the formation of free radicals and the action of antioxidants mechanisms, which may enhance mosquito survival when compared to mosquitoes fed only with sucrose. Females 72 hours post-infection could not be distinguished between human odor (28.9%) and no odor (25%). These results show important alternations in the insects physiology before death, thus reducing the mosquitoes vectorial capacity.

## 1. INTRODUÇÃO

As incidências de epidemias de dengue devem-se ao aumento do uso de recipientes não biodegradáveis, sistemas de coleta de lixo deficientes, aumento da densidade populacional em áreas urbanas, má qualidade das habitações e a falta de educação ambiental da população, a fim de conscientizar o não acúmulo de lixo peridomiciliar ou no perímetro urbano. Ademais, pela falta de políticas públicas de saúde e condições precárias de saneamento básico, às quais a maioria da população de países de terceiro mundo está submetida (Tauil, 2002).

Objetos de uso humano lançados no perímetro urbano acumulam água das chuvas e se tornam propícios para a criação dos mosquitos vetores de doenças humanas, principalmente o vetor da dengue, *Aedes aegypti* (Guia Brasileiro de Vigilância Epidemiológica, 2007).

O mosquito *A. aegypti* é um culicídeo holometabólico, ou seja, desenvolve através de metamorfose completa. O adulto é escuro, possuindo faixas brancas nas bases dos segmentos tarsais, e um desenho em forma de lira no mesonoto (FUNASA, 2001). É um inseto hematófago que necessita do sangue de vertebrados para alimentação e reprodução (Edman, 1992). Do sangue provêm nutrientes que irão contribuir para a formação dos ovos, como aminoácidos essenciais (Harrington et al., 2001).

*A. aegypti*, além de vetor da dengue, também é o transmissor da febre amarela, sendo ambas causadas por cepas do vírus *Flavivirus* (Família Flaviridae) (Sim & Dimopoulos, 2010). Atualmente conhecem-se quatro sorotipos distintos do agente etiológico do vírus (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4), que podem se apresentar como: Dengue Assintomática, Clássica, Hemorrágica e

Choque da dengue. Não há vacina para a doença, portanto o controle do vetor é a única maneira de prevenção da doença (Kaur et al., 2003).

Desde o começo do século XX, os agentes químicos têm sido usados para combater as populações de *A. aegypti*, porém apresentaram o efeito tóxico ao homem e provocaram resistência nas populações de mosquitos (Ffrench-Constant, 2005).

Por tais resultados negativos com o uso de inseticidas clorados, deu-se grande importância aos microrganismos biológicos que pudessem controlar mosquitos vetores de doenças humanas. Fungos e bactérias entomopatogênicas, além de apresentar baixa contaminação do ambiente, são específicos dos organismos-alvo como os mosquitos, fazendo com que a probabilidade do inseto apresentar resistência torne-se baixa, e ademais possibilita a autodispersão no caso dos fungos (Alves, 1998).

Os fungos entomopatogênicos têm sido usados para o controle de pragas agrícolas, e diferente das bactérias, sua ação não está restrita somente a uma única fase de desenvolvimento, podendo infectar desde o ovo até o estágio adulto dos insetos (Charnley, 1997).

Pesquisas mostraram que os fungos entomopatogênicos, *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana*, são patogênicos e virulentos contra larvas de diversas espécies de mosquitos (Clark et al., 1967; Daoust et al., 1982; Lacey et al., 1987). Contudo, somente pesquisas recentes observaram que os fungos também são virulentos contra a fase adulta dos mosquitos vetores de doenças humanas (Scholte et al., 2004; Scholte et al., 2005 & Blandford et al., 2005).

Quando não interferem diretamente, matando o mosquito, as toxinas dos fungos entomopatogênicos podem promover sequelas fisiológicas que poderão refletir no fitness do inseto. Mnyone et al. (2011) mostraram que em fêmeas do mosquito *Anopheles gambiae*, o fungo *B. bassiana* interferiu na preferência alimentar por sangue em diferentes tempos de infecção. Scholte, et al. (2006) mostraram que a interferência do *M. anisopliae* refletiu na quantidade de ovos produzidos, sendo, portanto o fungo capaz de interferir na fecundidade de fêmeas de *An. gambiae*.

Como qualquer outro organismo vivo, a tendência do vetor *A. aegypti* é tentar se defender de qualquer invasor, considerando os agentes entomopatogênicos como tal. Por se tratar de invertebrados, os artrópodes

apresentam sistema imune inato composto por mecanismos que estão naturalmente presentes, como peptídeos antimicrobianos, não sendo influenciados por contato prévio com agentes infecciosos (sistema imune adaptativo) (Xi et al.2008).

Apesar de apresentar um sistema imunológico simples, quando comparado aos vertebrados, os insetos apresentam o tegumento, o sistema respiratório, composto pelos espiráculos e traqueias, o trato digestivo, incluindo a membrana peritrófica e o epitélio, como as primeiras linhas de defesa (Dunn, 1986). Já na hemocele, o micro-organismo invasor irá se deparar com a segunda linha de defesa que se inicia com o reconhecimento realizado por células conhecidas como hemócitos (defesa celular). Esse reconhecimento irá gerar, dependendo do invasor, uma série de eventos imunológicos como fagocitose, encapsulamento, formação de nódulos, melanização (sistema profenoloxidase), receptores TOLL e defesas humorais.

A imunidade inata é o “pivô” na interação patógeno – vetor. Estudos sobre a imunidade do vetor e sua interação com os patógenos são essenciais para o desenvolvimento de futuras estratégias de controle. Em *Drosófilas* foram registradas duas importantes vias do sistema imune: Toll, que ativam os fatores de transcrição NF-kB/REL conhecidos como Dorsal e Dif.; e IMD (Immune deficiency), que ativa a via Relish. Segundo Antonova et al. (2009) as espécies *An. gambiae* e *A. aegypti* apresentam fatores de transcrição ortólogos aos encontrados em *Drosófila*, com exceção do fator Dif. Em *A. aegypti* o fator de transcrição Dorsal é conhecido como via REL-1, e o fator Relish como via REL-2. Essas vias estão envolvidas diretamente na defesa contra bactérias, fungos, parasitas e vírus, estimulando a produção de moléculas antimicrobianas. As vias são acionadas quando em contato direto com moléculas microbianas ou com moléculas sinalizadoras da presença desses patógenos (Sim & Dimopoulos, 2010).

Luna et al. (2003) identificaram em seu trabalho três receptores Toll em fêmeas de *A. aegypti* homólogos às proteínas encontradas em *Drosófilas*. Shin, et al. (2006) relataram a existência de respostas imunes desencadeadas pelo fungo *B. bassiana*. A resposta foi sinalizada pela molécula citocina, que ativa o receptor Toll 5A. Esse contato estimula a produção de serpins, proteínas responsáveis por regular as proteases precursoras do processo de melanização em *A. aegypti*.

O presente trabalho teve como objetivo analisar se há influência do fungo entomopatogênico *M. anisopliae* na alimentação sanguínea, capacidade de procura pelo hospedeiro e fecundidade. Também analisar a resposta imunológica dos mosquitos quando infectados com o isolado ESALQ 818 do fungo *M. anisopliae*, utilizando como sinalizadores a expressão gênica das proteínas Toll e citocina.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Biologia do *Aedes aegypti*

*A. aegypti* é um inseto díptero, pertencente à Família Culicidae. Os adultos são alados, possuem pernas e antenas longas, sendo as fêmeas hematófagas (Consoli et al., 1998). O mosquito se desenvolve através de metamorfose completa, e o ciclo biológico compreende as seguintes fases: ovo, larva, pupa e adulto.

#### 2.1.1 Ovo

Os ovos medem, aproximadamente 1mm de comprimento e possuem formato alongado e fusiforme. Logo após a postura os ovos são brancos, mas em poucas horas apresentam cor negra brilhante. Seu desenvolvimento embrionário é completo em 72 horas, em condições favoráveis de umidade e temperatura (FUNASA, 2001).

#### 2.1.2 Larva

A fase larvária é o período de alimentação e crescimento do *A. aegypti*. O período entre a eclosão e a pupação não excede cinco dias, em condições ótimas. Contudo, em baixa temperatura e escassez de alimento, o 4<sup>o</sup> estágio larvário pode prolongar-se por várias semanas, antes de sua transformação em pupa.

A larva do *A. aegypti* é composta de cabeça, tórax e abdômen. O segmento posterior e anal do abdômen tem quatro brânquias lobuladas para regulação osmótica e um sifão ou tubo de ar para a respiração na superfície da água. Para

respirar, a larva se desloca para a superfície, onde fica em posição quase vertical. É sensível a movimentos bruscos na água e, sob feixe de luz, desloca-se com rapidez, buscando refúgio no fundo do recipiente, apresentando fotofobia (FUNASA, 2001).

### 2.1.3 Pupa

Nessa fase o mosquito não se alimenta. A pupa possui cefalotórax com trompetas respiratórias curtas e escuras. O abdome apresenta a cerda nº 1 do primeiro segmento com tufo de pelos simples ou bífidos e cerda nº 9 do oitavo segmento em forma de penacho com poucos pêlos. A palheta natatória tem pelos curtos em sua borda. A fase de pupa tem o ciclo de 2 a 3 dias (Consoli et al., 1998).

### 2.1.4 Adulto

O tamanho de um adulto de *A. aegypti* é de, aproximadamente, 4,5 mm. O macho pode ser identificado macroscopicamente por possuir antenas plumosas, enquanto as fêmeas possuem antenas filiformes. O raio de voo do mosquito adulto é limitado, em torno de 200 metros. O metabolismo energético de machos e fêmeas depende da ingestão de carboidratos, provenientes de seivas de flores e frutos. O repasto sanguíneo, exclusivo das fêmeas, está relacionado primordialmente ao desenvolvimento dos ovos, podendo igualmente contribuir para o aumento de sua longevidade (Clements, 1963 & Consoli et al., 1998). A longevidade de uma fêmea adulta é de, aproximadamente, 45 dias, sendo constatado que o macho vive menos em comparação à correspondente fêmea (Consoli et al., 1998).

### 2.1.5 Comportamento

A fêmea de *A. aegypti* pode selecionar o local de oviposição influenciada pela luz, pela cor do recipiente, pela temperatura, pelo grau de salinidade e por outras características favoráveis. Os criadouros preferenciais são aqueles que acumulam água limpa, pobres em matéria orgânica, sombreados, com fundos e paredes escuras (Vianna, 2001). Porém Bezerra et al. (2010) relataram o desenvolvimento do mosquito em água com elevados níveis de poluição, como esgoto bruto e efluente de reator.

Os ovos são colocados diretamente sobre a água ou na parede dos recipientes próximos à linha d'água. Em ambiente úmido o desenvolvimento embrionário ocorre entre 30 a 40 horas. Entretanto, o ovo pode resistir prolongadamente ao ressecamento até mais de um ano. Assim, se ocorrer a evaporação da água o ovo pode permanecer viável até que tenha condições adequadas para seu desenvolvimento (Vianna, 2001).

O pico de maior atividade de voo das fêmeas situa-se ao amanhecer e pouco antes do crepúsculo vespertino, mas o ataque ao homem e aos animais domésticos pode ocorrer a qualquer hora do dia. O hábito diurno também é o demonstrado pelos machos (Natal, 2002).

O sangue fornece às fêmeas proteínas para o desenvolvimento dos ovos. Embora tal mosquito demonstre certo ecletismo em relação à fonte sanguínea para fins de alimentação, o homem é a sua principal vítima (antropofilia). O ataque a outros animais ocorre quando estes estão próximos aos seus criadouros e abrigos (Hagedorn et al., 1975).

Uma só fêmea de *A. aegypti* infectada com o vírus da dengue pode, para se alimentar satisfatoriamente de sangue, realizar diversas alimentações curtas em diferentes hospedeiros, resultando na disseminação da dengue ou da febre amarela. Saliente-se ainda que, uma vez infectada, a fêmea permanecerá assim até o fim de sua vida (Rodrigues, 2006). O inseto é incapaz de combater a invasão do vírus em todas as partes de seu corpo. Assim, os ovários também podem ser atingidos e não raramente, certas proporções dos ovos resultarão em adultos naturalmente infectados com o vírus. Isto é conhecido como transmissão transovariana ou vertical (Cruz, 2006).

A infecção da fêmea pelo vírus ocorre quando essa pica um hospedeiro em fase de viremia. Após ser picado por um mosquito infectado com o vírus, o homem passa por um período de incubação de 3 a 15 dias. O período de transmissibilidade do homem para o mosquito inicia um dia antes do início da febre, prosseguindo até o sexto dia da doença (Cruz, 2006). No *A. aegypti* o vírus infecta e se replica inicialmente no epitélio do intestino médio. Em seguida ele se espalha através da hemolinfa, se replicando em outros órgãos como o corpo gorduroso, traqueia e finalmente as glândulas salivares em aproximadamente 10-14 dias pós-alimentação sanguínea (Sanchez-Vargas, et al., 2004; Xi, et al. 2008; Sim & Dimopoulos, 2012;).

A dengue encontra-se hoje presente em todos os 27 estados da Federação, distribuída por 3.794 municípios, sendo responsável por cerca de 60% das notificações de doenças nas Américas. A introdução de diferentes sorotipos do vírus da dengue contribui para aumentar a incidência desta doença. Em 1981, os sorotipos DENV-1 e DENV-4 foram os primeiros a serem isolados em uma epidemia de dengue ocorrida em Boa Vista, Estado de Roraima. Após um silêncio epidemiológico, o sorotipo DENV-1 invadiu o Sudeste (Rio de Janeiro) e Nordeste (Alagoas, Ceará, Pernambuco, Bahia, Minas Gerais) em 1986-1987, espalhando pelo país desde então, com as entradas dos sorotipos DENV-2 em 1990-1991, e o DENV-3 em 2001-2002. No momento, estes três sorotipos circulam simultaneamente em 24 estados da Federação, contribuindo para a incidência das formas graves da dengue (dengue hemorrágica e síndrome do choque da dengue) nas cidades onde se registraram epidemias sequenciais por pelo menos dois sorotipos diferentes, embora a virulência da cepa epidêmica possa ser algumas vezes o determinante principal das formas hemorrágicas (Câmara, et al.2007).

#### 2.1.6. *Hábito alimentar*

A hematofagia é um hábito alimentar presente desde o período Cretáceo da Era Mesozoica. O primeiro registro fóssil de mosquito encontrado foi referente ao período Quaternário da Era Cenozoica. O fóssil se tratava da espécie *Aedes ciliaris* (Lukashevich & Mostovski, 2006), percebendo aí que a seleção natural favoreceu, com o passar do tempo, os insetos (Dípteros, anopluras e Heterópteros) com esse hábito alimentar.

Os culicídeos são insetos hematófagos que necessitam do sangue de vertebrados para sintetizar glicogênio e lipídios, embora a alimentação com sacarose seja uma fonte de energia mais eficiente para voo e sobrevivência desses insetos (Edman, 1992). Além de suprir, em partes, a necessidade nutricional, a função do sangue vai além, sendo necessário para o sucesso reprodutivo, pois é dele que também provêm nutrientes que irão contribuir para a formação dos ovos, como aminoácidos essenciais (Harrington et al, 2001).

Fêmeas de *A. aegypti* são capazes de sobreviver e reproduzir somente com alimentação sanguínea, sendo isso epidemiologicamente relevante uma vez que esse mosquito é vetor do vírus Dengue. Scott et al.(1997) ainda relataram,

em testes realizados com fêmeas de *A. aegypti* alimentadas com sangue humano, aumento no *fitness* reprodutivo, uma vez que o tempo entre a alimentação e a oviposição foi menor e número de descendentes foi maior comparado com fêmeas alimentadas com sangue e açúcar, apesar da sobrevivência ter sido menor. Eles relacionam essa menor sobrevivência, de fêmeas alimentadas somente com sangue, à deficiência de carboidratos que são encontrados nas plantas. Apesar disso existe uma grande vantagem reprodutiva nessa estratégia de alimentação baseada no sangue, que é favorecida pela seleção natural. Vantagem essa, que não será encontrada na alimentação baseada somente em sacarose.

Segundo Harrington et al. (2001), *A. aegypti* é um mosquito de vida sedentária, ou seja, evita gastar energia se deslocando atrás de fontes de carboidratos, porém esse comportamento é modificado na ausência de lugares para ovipor. As fêmeas preferem permanecer em repouso no mesmo local de origem, preservando suas reservas de energia adquirida da alimentação de sangue humano, em forma de triglicerídeos, para a reprodução. A energia adquirida em forma de açúcar e glicogênio de carboidratos provenientes de plantas é mais usada no comportamento de fuga e voos a longa distância, o que não confere com o comportamento de *A. aegypti*. A alimentação restrita ao sangue humano requer um desvio menor de parte dos nutrientes para síntese de reserva de energia, que contribui para o aumento da longevidade e tempo de reprodução de descendentes. Apesar da taxa de glicogênio ser menor em fêmeas alimentadas com sangue humano, o contrário foi registrado para os ovos provenientes dessas fêmeas. Harrington et al. (2001) ainda observaram que a concentração de glicogênio foi maior nos ovos.

Styer et al (2007) mostraram que a longevidade de fêmeas de *A. aegypti* foi maior quando alimentadas com sangue + sacarose (54,8 dias), sendo esse oferecido em dias alternados por 15 minutos. Nas fêmeas alimentadas somente com sangue ou sacarose, a longevidade foi de 28,2 e 40,5 dias respectivamente. Foi observado também que a quantidade de ovos foi menor para fêmeas alimentadas com sangue (59,12 ovos) e maior nas alimentadas com sangue+sacarose (79,82 ovos), porém a média diária de descendentes foi de 4,6 e 2,9 respectivamente. Isso mostra que, apesar do baixo número, os ovos de

fêmeas alimentadas somente com sangue apresentam maior viabilidade do que os de fêmeas alimentadas com sacarose+sangue.

Apesar dessa vantagem reprodutiva a hematofagia expõe os mosquitos a vários patógenos provenientes do sangue de vertebrados. Outro problema gerado por essa estratégia de alimentação é o estresse oxidativo gerado pela liberação de grandes quantidades de heme, proveniente da ingestão de hemoglobina presente no sangue, no intestino destes insetos (Alvarenga, 2005). A degradação dessa molécula leva a produção de radicais livres e espécies reativas de oxigênio (ROS). Eles podem ser tóxicos em grande quantidade, promovendo direta ou indiretamente a oxidação de vários componentes celulares como ácidos nucleicos, lipídios, proteínas e desestabilizar membranas biológicas, levando a ruptura, pois a hemoglobina é uma metaloproteína que contém ferro associado ao grupo heme, acentuando o problema.

A capacidade do mosquito em contornar essa desvantagem é que irá garantir seu sucesso reprodutivo e longevidade. Para isso os insetos hematófagos possuem defesas antioxidantes de detoxificação de heme capazes de contrabalancear o estresse oxidativo gerado, que devem ter garantido o sucesso desta prática alimentar. O mosquito *A. aegypti* possui enzimas com função antioxidante como a catalase, superóxido desmutase, tioredoxina redutase e heme-oxigenase. Outra estratégia adotada pelos insetos é a “agregação de heme”, que é a detoxificação do heme liberado durante o processo de digestão na forma de agregados (Alvarenga, 2005).

Em *A. aegypti* a detoxificação do heme dá-se com a união dessa molécula com a membrana peritrófica, porém os mecanismos que fazem essa ligação são desconhecidos. Segundo, Alvarenga (2005) a quantidade de proteína Mucin1 encontrada na membrana peritrófica (MP) desse mosquito, aumenta quando em contato com metais nas larvas, adultos, ou na alimentação com sangue. Na MP a presença de quitina e Mucin1 protege o intestino médio dos efeitos deletérios do heme, formando agregados que são eliminados nas fezes do mosquito.

Oliveira et al. (2011) mostraram que fêmeas de *A. aegypti* alimentadas com sacarose apresentaram maior presença de ROS no intestino médio. Essa concentração diminuiu quando as fêmeas foram alimentadas com sangue e voltou à situação inicial após eliminação das fezes. Eles observaram que a baixa concentração de ROS favorece o desenvolvimento de bactérias que estão em

simbiose com o intestino e estimula o sistema imune do mosquito. Esse resultado mostra que essa estratégia de alimentação vai além da necessidade de obter reservas de energia e reprodução. A alimentação sanguínea é importante na manutenção do equilíbrio entre a formação de radicais livres e a operação de mecanismos antioxidantes de fêmeas de *A. aegypti* quando comparado à dieta de sacarose.

## **2.2 Sistema imune nos insetos**

De modo geral o sistema imune compreende todos os mecanismos pelos quais os organismos se defendem de invasores. Ele também é responsável pela remoção de células mortas, renovação de determinadas estruturas e memória imunológica. É ativo contra células alteradas, que surgem como resultado de mitoses anormais e atua em uma rede de cooperação, envolvendo a participação de muitos componentes estruturais, celulares e também moleculares (Machado et al. 2004).

Qualquer resposta imune envolve, primeiramente, o reconhecimento do antígeno, quer seja um organismo agressor (patógeno) ou outro material estranho e, em segundo lugar, a elaboração de uma reação direcionada a este elemento, com a finalidade de eliminá-lo do organismo. Existem duas categorias de resposta imune: a inata ou não-específica e a adaptativa ou específica (Roitt et al. 2003).

A resposta inata é composta por todos os mecanismos que estão naturalmente presentes nos organismos e não são influenciados pelo contato prévio com agentes infecciosos. Atuam como a primeira linha de proteção e retardam o estabelecimento da manifestação infecciosa (Lee e Söderhäll, 2002). A resposta adaptativa é filogeneticamente mais recente e difere da inata por ser induzida pela exposição prévia a micro-organismos ou aos seus determinantes antigênicos e por ser mediada pela produção de anticorpos das células B e T em vertebrados. Além disso, apresenta memória imunológica. Cada exposição a um agente infeccioso irá estimular uma resposta adaptativa, fazendo com que o sistema fique mais eficiente, evitando que este agente volte a causar doença (Janeway et al., 2002).

Os invertebrados não possuem imunidade adaptativa. Não possuem imunoglobulinas, moléculas que apresentam alta especificidade contra os

invasores, nem receptores de células T. Eles não produzem anticorpos específicos, por isso, não têm um verdadeiro sistema imune adaptativo, embora proteínas semelhantes às imunoglobulinas (*Ig-like proteins*) tenham sido encontradas em alguns insetos (Wu et al., 2002). Assim, a resposta a doenças se baseia no sistema inato de defesa, que inclui uma série de reações celulares e humorais coordenadas (Luo et al., 2003).

Nos insetos, o tegumento, o sistema respiratório, composto pelos espiráculos e as traqueias, o trato digestivo, incluindo a membrana peritrófica e o epitélio, constituem as primeiras linhas de defesa (Dunn, 1986). A estrutura e a composição química da cutícula representam, provavelmente, as principais barreiras .

Dentro da hemocele (cavidade do corpo), micro-organismos como fungos, bactérias, vírus e protozoários encontram vários componentes antimicrobianos, como proteínas, lipídios, hidrocarbonetos, difenóis, carboidratos, quitina e melanina, os quais inibem o crescimento e a penetração desses micro-organismos (Dunn, 1986).

O mecanismo de “vigilância” é um componente essencial no sistema imune dos insetos. Através dele um organismo ou uma molécula estranha pode ser reconhecida. Esse reconhecimento é função de células como hemócitos, encontrados na hemolinfa, que são estimuladas passando de inativos para ativos. Esse reconhecimento irá gerar, dependendo do invasor, uma série de eventos imunológicos como ativação de vias sinalizadoras (receptores Toll, immune deficiency [IMD] e Janus quinase [JAK-STAT]), fagocitose, encapsulamento, formação de nódulos, coagulação da hemolinfa, sistema profenoloxidase e defesas humorais.

### **2.2.1 Sistema imune de *Aedes aegypti***

Nos insetos a resposta imune inata é amplamente regulada por três vias: Toll, immune deficiency (IMD) e Janus quinase (JAK-STAT) transdutor e ativador da transcrição das vias de sinalização (Sim & Dimopoulos, 2010).

Tanto em drosófilas como em mamíferos, os receptores Toll são estimulados quando em contato com moléculas de micro-organismos. Shin et al. (2006) caracterizaram a via Toll5A/REL1 (homólogo ao fator NF- $\kappa$ B dorsal em

drosófilas) como o principal percurso da resposta imunológica em *A. aegypti* a fungos, sendo esta via ativada por uma citocina identificada como Spz 1C. Essa proteína tem se mostrado importante por desencadear a cascata pro-fenoloxidase, na presença de fungos. No trabalho de Shin et al. (2006) ainda foram identificados para a espécie *Aedes* cinco receptores Toll (Toll1A, Toll1B, Toll5A, Toll5B e Toll4). Desses cinco, três apresentaram suas transcrições induzidas, no corpo gorduroso do mosquito, por infecção fúngica, sugerindo assim sua participação na resposta imunológica. Shin et al. (2006) ainda mostraram que a resposta imunológica pode variar nos períodos de desenvolvimento do mosquito. Existem formas de citocinas que são expressas somente em larvas, outras em adultos (Toll1A e Toll5A) ou, até mesmo, no ovo desempenhando papel fundamental no desenvolvimento do embrião (Toll1B).

Além de respostas antifúngicas da via Toll/REL1 também desencadeia resposta imunológica contra bactérias Gram+ e vírus (Bian et al., 2005). O mosquito *A. aegypti* é caracterizado por expressar, na presença de bactérias Gram+, proteínas como as defensinas que podem ser encontradas em diferentes formas A, B e C. A forma C está presente no intestino médio. As defensinas A e B foram encontradas, após a ativação do sistema imune, no corpo gorduroso do mosquito (Lowenberger, 2001).

No *A. Aegypti* a via IMD/REL2 tem um papel importante na produção de peptídeos contra bactérias Gram- (Xi et al., 2008) e protozoário do gênero *Plasmodium* (Antonova et al. 2009). Hillyer (2004) relatou que a resposta imune do *A. aegypti* a oito espécies de bactérias foi a fagocitose e a melanização. Ele registrou que essa resposta é independente do Gram-tipo da bactéria, e que a intensidade da resposta imune irá depender da virulência do micro-organismo.

Segundo Sim & Dimopoulos (2010) a via JAK-STAT está implicada na defesa antiviral de insetos, incluindo defesa contra o DENV em *A. aegypti*. Existem poucas informações, em nível molecular, relacionando a atividade desta via contra viroses. Em mosquitos a defesa contra vírus não está vinculada a moléculas, mas a um mecanismo de ação mais complexo, o RNA de interferência (Sanchez-Vargas et al., 2004).

Os vírus são conjuntos de genes capazes de se transferir de uma célula para outra e de direcionar a atividade das organelas celulares para se multiplicar, infectando assim outras células. Eles reorganizam o maquinário genético das

células hospedeiras em seu favor (Junqueira & Carneiro, 2000). Na defesa contra esses intrusos existe um mecanismo que inibe a expressão gênica na fase de tradução ou por dificultar a transcrição de genes específicos denominado RNA de interferência (RNAi). O RNAi tem papel importante na defesa do patrimônio genético celular contra genes parasíticos, como os vírus, impedindo a ação do RNA mensageiro, portanto, inibindo a produção de proteínas.

Estudos realizados em drosófilas mutantes revelaram os genes responsáveis pela produção de proteínas conhecidas como Argonaute 2 (Ago2), Tudor Staphylococcal nuclease (TSN) e Dicer- 2 (Dcr2). Essas proteínas desencadeiam o mecanismo do RNAi e participam de um complexo silencioso de indução (RISC), desde reorganização, recrutamento e destruição de RNAs viral. Dicer- 2 irá reconhecer a dupla fita de RNA, em seguida rompê-las em pequenos pedaços para que esses possam formar o Complexo proteína-isRNA. Os pedaços de isRNA são extraídos e associados ao Dicer helicase, sendo incorporados ao RISC. O RISC então é guiado pela isRNA, a sequência complementar da molécula de RNA alvo, rompendo-a em seguida (Sanchez-Vargas et al. 2004). O genoma do *A. aegypti* possui ortólogos de todos esses componentes de defesa (Franz et al., 2006). No caso do *Flavivírus*, o mecanismo do RNAi é desencadeado no citoplasma de células do intestino médio do mosquito, pois é o local de replicação do vírus.

Para testar a funcionalidade destes componentes em *A. aegypti*, Campbell et al. (2008), utilizaram um vírus não natural de mosquitos, o vírus Sindbis. Esse vírus também inibiu a ação dos componentes de defesa da RNAi. Nesse trabalho ficou constatado que a proteína Ago2 é o principal mediador da defesa contra o vírus Sindbis. Foi observado ainda que na ausência de Ago2, TSN e Dcr2, a infecção provocada pelo vírus Sindbis no mosquito aumentou em 40%.

No início dos anos 90 foi demonstrado tanto em cultura de células, como em adultos de mosquitos, a ação do RNAi na inibição da atividade do arbovírus. Além disso, em mosquitos transgênicos de *A. aegypti*, Ago2 foi o principal mediador do RNAi na defesa contra o vírus da dengue (Franz et al., 2006).

Além de interferir no patrimônio genético celular, respostas do sistema imunológico a bactérias e fungos podem ser comprometidas durante a infecção provocada por Arbovírus em mosquitos e outros vetores (Campbell et al. 2008). Em *Aedes*, Lin et al. (2004) relataram que a atividade de algumas vias Toll são

suprimidas durante a infecção por Flavivírus. Segundo Sanchez-Vargas et al. (2004) em mosquitos selvagens o período de incubação intrínseco para alguns Alphavirus é curto, menor que quatro dias, sugerindo que o vírus pode replicar no intestino médio e escapar antes da resposta do iRNA. O Arbovírus poderia limitar o número de formas de replicação da dupla fita de RNA necessário para acionar o mecanismo RNAi.

Os vírus podem apresentar a capacidade de codificar RNAi para suprimir a defesa do hospedeiro, pois muitas proteínas do vírus são multifuncionais, podendo assumir assim essa capacidade. Segundo Li et al. (2002), o vírus FHV suprimiu o RNAi em células S2 em Drosófilas.

Em seres humanos, dentre outros estudos, o RNAi tem se apresentado como alternativa viável contra a replicação viral do vírus da Febre Amarela (Severino et al.,2007).

### **2.3 Uso de fungos entomopatogênicos para o controle de insetos vetores de doenças**

Estudos feitos com diferentes microrganismos entomopatogênicos mostram que os fungos são os mais promissores para o controle biológico de mosquitos (Messias, 1989). Diferente das bactérias e vírus, os fungos podem infectar não apenas através do intestino, mas também através da superfície do tegumento. Assim, nota-se que os fungos entomopatogênicos não ficam limitados a insetos mastigadores, atuando igualmente sobre outros insetos, como aqueles dotados de aparelhos bucais tipo sugador (Leathers et al., 1993).

Aproximadamente 80% das doenças de insetos têm como agentes etiológicos fungos pertencentes à cerca de 90 gêneros e mais de 700 espécies. Normalmente, eles apresentam uma grande variabilidade genética, a qual resulta em variados graus de especificidade ao hospedeiro. Os fungos entomopatogênicos são organismos de tamanho e forma variáveis, podendo ser unicelulares ou constituídos por um conjunto filamentosos de micélio, que é composto por células denominadas hifas, cujas paredes são ricas em quitina, celulose e outros açúcares (Alves, 1998). Dentre os gêneros mais importantes de fungos entomopatogênicos encontram-se: *Metarhizium*, *Beauveria*, *Nomuraea*, *Aschersonia* e *Entomophthora* (Ferron,1978). Segundo Goettel et al (1995), estes

gêneros têm apresentado grande potencial para o desenvolvimento de bioinseticidas.

O gênero *Beauveria* pertence à classe dos deuteromicetos e é encontrado, com frequência em todos os continentes. Sua infecção geralmente se dá via tegumento, onde o fungo germina entre 12 a 18 horas. Pode ocorrer também a infecção oral e via sistema respiratório através dos espiráculos. A penetração tegumentar ocorre devido a uma ação física e química (enzimática), tendo a duração de 12 horas. No final do processo de infecção inseto encontra-se totalmente colonizado, com o tecido gorduroso, tecido intestinal e tubos de Malpighi atacados. Nesse estágio ocorre a perda de nutrientes e o acúmulo de substâncias tóxicas, tendo como consequência a morte do inseto. Haverá sobre o cadáver a formação de grande quantidade de conidióforos e conídios característicos da espécie (conidiogênese). Os cadáveres apresentam-se cobertos por micélio branco, o qual esporula em condições adequadas: umidade relativa em torno de 90% e temperatura na faixa de 23 a 28° C (Alves, 1998).

O gênero *Metarhizium* também pertence à classe dos deuteromicetos, sendo facilmente encontrado em solos, onde sobrevive por longo tempo. Os insetos atacados tornam-se duros e cobertos por uma fina camada pulverulenta de conídios. No final da conidiogênese o cadáver apresenta coloração verde, que varia de claro a escuro, e acinzentada ou mais esbranquiçada com pontos verdes. A doença é conhecida como muscardine verde, contrastando com a muscardine branca provocada por *B. bassiana*. Os conídios são geralmente uninucleados, hialinos ou fracamente coloridos e se formam sobre conidióforos simples os quais, justapostos, resultam em uma massa regular sobre o inseto (mononematosa). Os conídios podem formar, sobre o inseto, ramificações compostas de um conjunto de micélio (Alves, 1998).

Os insetos, como moscas, mosquitos e percevejos, além de provocarem incômodo ao homem quando estão se alimentando de sangue, também são vetores de doenças como: Leishmaniose, Chagas, Filariose, Febre amarela, Malária, Encefalites e, entre outros, a Dengue (Costa et al., 1998). Estudos têm mostrado que fungos entomopatogênicos são potenciais agentes no controle do *Phlebotomus papatasi* e *Lutzomyia longipalpis* (Díptera: Psychodidae), insetos vetores da leishmaniose (Reithinger et al., 1997).

A doença de Chagas constitui um sério problema de saúde pública na América Latina, com particular prevalência no Brasil. As causas da infecção devem-se à ação do parasita *Trypanosoma cruzi*, transmitido pelos insetos *Triatoma infestans*, *T. brasilienses*, *Rhodnius prolixus* e *T. dimidiata*. Costa et al. (2003) usaram fungos entomopatogênicos para controlar esses vetores.

Altos níveis de mortalidade foram obtidos quando Luz et al (1999) infectaram *T. infestans* com *B. bassiana* impregnado em papel-filtro. A infecção, por pulverização, de ninfas de primeiro estágio e ninfas de quarto estágio de *T. infestans* e *Panstrongylus megistus* com *Aspergillus giganteus* e *Penicillium corylophilum* mostrou a virulência destes fungos (Costa et al., 2003).

Mosquitos do gênero *Culex* são vetores da filariose humana, doença que acomete muitas pessoas na região nordeste do Brasil. Inseticidas químicos têm sido usados para o controle deste mosquito. No entanto, desde 1970, por causa do demasiado uso dos inseticidas químicos vários casos de resistência têm sido evidenciados em populações desse mosquito. Logo após a observância de casos de resistência dos mosquitos a inseticidas químicos, entomopatógenos como *M. anisopliae* e *Lagenidium giganteum*, e também bactérias do gênero *Bacillus* foram testados visando implantar o controle biológico como meio de combate a estes insetos (Consoli et al., 1986)..

Moraes et al (2001) avaliaram 11 isolados de *Aspergillus* sp. contra larvas de *Aedes fluviatilis* e *Culex quinquefasciatus*. Os isolados de *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus kanagawaensis* e *Aspergillus sulphureus* foram os mais eficientes, causando taxa de mortalidade de 80% nas duas espécies de mosquitos.

O fungo *M. anisopliae* testado por Daoust (1982), foi virulento tanto para larvas de *Culex pipiens*, quanto para larvas de *A. aegypti* e *Anopheles stephens*. De acordo com Riba et al. (1986), o segundo estágio de *A. aegypti* é menos suscetível à infecção pelo fungo, porém, o fungo *Penicillium* spp. foi altamente virulento para as larvas de segundo estágio de *A. aegypti*.

Scholte et al. (2004), em condições de laboratório, observaram, que fêmeas do mosquito *Anopheles gambiae* infectadas com o fungo *M. anisopliae* poderiam contaminar o macho durante a cópula, e que, possivelmente, o macho infectado dissemina o fungo para outras fêmeas.

Blanford et al. (2005) usando *B. bassiana*, infectaram fêmeas de *A. stephensi*, previamente inoculadas com *P. chaboudi*, e constataram que durante a infecção as fêmeas param de alimentar. Com isso, conseqüentemente, ocorre a redução da transmissão do *Plasmodium*, o que, poderia diminuir a transmissão da malária na população humana. Em testes realizados em laboratório o isolado ESALQ 818 do fungo *M. anisopliae* provou 90% de mortalidade em fêmeas de *A. aegypti* três dias após o contato direto (Paula et al., 2008). Paula (2010) registrou mortalidades de 66,7 e 83,3% em larvas de *A. aegypti* ao usar suspensões de *M. anisopliae* nas concentrações de  $10^5$  e  $10^6$ , respectivamente, em laboratório.

A partir de tais pesquisas nota-se grande interesse à procura de fungos entomopatogênicos virulentos que infectem todos os estágios de desenvolvimento de mosquitos vetores de doenças humanas: ovo, larva e adultos.

#### **2.4 Influência de fungos entomopatogênicos na fisiologia de *A. aegypti***

As mudanças na fisiologia do inseto diante de uma infecção dependem do tipo de patógeno infectante, assim como do hospedeiro atacado. Um mesmo patógeno pode ter ação diferente sobre dois hospedeiros diferentes, e os distúrbios fisiológicos causados podem depender da dose do patógeno a qual o hospedeiro foi submetido. Os tipos de interferência causados por esses entomopatógenos podem variar desde distúrbios no tegumento, sistema circulatório, digestivo, reprodutivo, respiratório, nervoso e distúrbios no sistema excretor e no tecido adiposo (Alves, 2008).

Como todos os insetos, os mosquitos estão constantemente expostos a infecções impostas pelo ambiente em que vivem ou pelo hábito alimentar. Para continuação de seus ciclos de vida, fêmeas de culicídeos e anofelinos são obrigadas a se alimentar de sangue para produção de ovos. Este ato de se alimentar de sangue, muitas vezes expõe os mosquitos a patógenos veiculados pelo sangue que visam submeter-se a processos de desenvolvimento, reprodução e / ou migração dentro do mosquito hospedeiro antes que eles possam ser transmitidos durante uma refeição de sangue. Além de correr o risco de infecção através da alimentação de sangue, mosquitos geralmente adquirem patógenos através da alimentação com açúcar, com cortes em sua cutícula que são criados após a lesão física e degradação cuticular via patógeno (Hillyer, 2010).

Paula et al. (2011) observaram aumento da taxa de sobrevivência em fêmeas de *A. aegypti* infectadas com *M. anisopliae* e alimentadas com sangue entre os períodos de 24 e 144 horas de infecção, quando comparadas com fêmeas alimentadas com sacarose.

Mnyone, et al. (2011) mostraram que *B. bassiana* e *M. anisopliae* diminuíram a média de sobrevivência do mosquito *An. gambiae* de acordo com a idade. A sobrevivência diminuiu 50%, comparado ao controle, para mosquitos com 9-12 dias de idade. Eles mostraram também que os fungos interferiram na preferência alimentar por sangue em diferentes tempos de infecção. Scholte, et al. (2006) relataram que após 72 horas de infecção com o fungo *M. anisopliae* fêmeas do mosquito *An. gambiae* se alimentaram 50% menos de sangue que durante os outros períodos de infecção. Eles observaram também que insetos infectados ingeriram menos sangue, quando comparado ao controle. A interferência do entomopatógeno também foi clara na oviposição. O fungo interferiu na fecundidade das fêmeas em todos os tempos de infecção.

No mosquito *A. aegypti* Darbro et al. (2012) relataram que o fungo *B. bassiana* diminuiu a atividade das fêmeas, quando expostas ao alimento. Eles observaram também que 50% das fêmeas, a partir do quarto dia de infecção, perderam o interesse pela alimentação sanguínea. Também concluíram que a expectativa de vida dessas fêmeas foi menor, quando comparadas a fêmeas não infectadas. Foi observado que o fungo interferiu na quantidade de ovos, mas não na viabilidade deles.

O fungo também é capaz de manipular o sistema imunológico do inseto. Segundo Pal et al. (2007), as toxinas produzidas pelo *M. anisopliae* reduziram a expressão de vários peptídeos antimicrobianos como diptericina, cecropina, atacina, drosomicina e metchnikowin em *D. melanogaster*. Esses peptídeos são bactericidas que quando produzidos em pouca quantidade aumentam a vulnerabilidade do mosquito a outros micro-organismos.

Analisando esses trabalhos observou-se que quando os entomopatógenos não promovem a morte do mosquito, certamente promovem o desequilíbrio na homeostase, cujas consequências irão desde a alimentação a reprodução, podendo refletir finalmente no desenvolvimento de uma população.

### 3. OBJETIVOS

- Analisar se há influência de *Metharizium anisopliae*, isolado ESALQ 818, na alimentação sanguínea e fecundidade de fêmeas do mosquito *A. aegypti*;
- Registrar imagens do processo infeccioso do fungo, com o auxílio da técnica de microscopia de varredura;
- Analisar resposta imunológica dos mosquitos quando infectados com o isolado ESALQ 818, utilizando como sinalizadores a expressão gênica das proteínas Toll e citocina;
- Verificar a atratividade de fêmeas ao hospedeiro, quando infectadas com o fungo.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Entomologia e Fitopatologia (LEF), em parceria com a Unidade de Experimentação Animal (UEA), da Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF), Campos dos Goytacazes, Estado do Rio de Janeiro.

### 4.1 Criação de mosquitos da linhagem Rockefeller

Os adultos do mosquito *A. aegypti* (Linhagem Rockefeller) foram criados no insetário do Laboratório de Entomologia e Fitopatologia (CCTA/UENF).

Para a criação, mosquitos machos e fêmeas foram mantidos em uma gaiola de plástico (30 cm x 20 cm x 20 cm) para o acasalamento. Após o acasalamento foi ofertado sangue de um camundongo para maturação dos ovos das fêmeas. O camundongo foi colocado por 1 hora dentro da gaiola de plástico, sendo preso por uma rede de metal para impedir os seus bruscos movimentos enquanto as fêmeas faziam o repasto sanguíneo.

Depois de fecundadas e alimentadas com sangue, copos plásticos de volume de 100 mL, rodeados internamente com papel-filtro e com 50 mL de água, foram colocados dentro da gaiola de plástico, a fim de servir como recipientes propícios para a oviposição das fêmeas.

Logo após a postura, o papel filtro contendo os ovos foi retirado e colocado dentro de uma bandeja (10 cm x 30 cm x 20 cm) com água para a eclosão das larvas. Das larvas que completaram seu ciclo biológico, pupas que emergiram foram colocadas em copos plásticos com 100 mL de água. Estes copos plásticos, com as pupas, ficaram dentro de uma gaiola coberta com tecido

de organza. As pupas ficaram dentro da gaiola até a emergência dos mosquitos adultos. Os mosquitos adultos foram alimentados com uma solução de sacarose (10%). As gaiolas foram mantidas a uma temperatura de 29 °C, 80 ± 10 % UR.

#### **4.2 Produção de fungos entomopatogênicos**

Foi utilizado o isolado de *M. anisopliae* (ESALQ 818) já descrito como de alta virulência para mosquitos *A. aegypti* (Paula et. al, 2008).

Os conídios do isolado de *M. anisopliae* foram cultivados em placas de Petri contendo meio sólido SDA (dextrose 10g; peptona 2,5g; extrato de levedura 2,5g; ágar 20g e água destilada 1L), por duas semanas, a 27° C, em câmara climatizada (marca: FANEM) e depois armazenados a 4 °C.

Para a multiplicação dos isolados cultivados em placas de Petri, foram adotados os seguintes procedimentos: Erlemeyers de 250 mL contendo 25 g de arroz parbolizado cru + 10 mL de água destilada; fechados com algodão. Foram autoclavados durante 15 minutos a 1 atm (121° C). Logo após, com o auxílio de uma colher estéril, os conídios foram retirados da placa de Petri e misturados nos Erlemeyers com o arroz autoclavado. Os Erlemeyers foram mantidos em câmara climatizada, a 27 °C, e a produção dos conídios foi avaliada na câmara de Neubauer por 5, 10 e 15 dias após a mistura do conídio ao arroz autoclavado.

#### **4.3 Preparo das suspensões de fungo**

Todo o processo de coleta de conídios do fungo, crescidos no arroz, foi realizado em câmara de fluxo previamente desinfetada com álcool 70% e 15 minutos de exposição a UV. A quantificação dos conídios foi efetuada em câmara de Neubauer e, uma vez estabelecida, foi realizada diluição consecutiva usando 0,05% de Tween 80 até a obtenção da concentração desejada nas formulações.

#### **4.4 EXPERIMENTO 1: Microscopia Eletrônica de Varredura**

Para obter imagens do processo infeccioso, os mosquitos (fêmeas) foram adormecidos pela exposição a uma corrente de dióxido de carbono durante 30 segundos e acondicionados no interior da placa de Petri onde foram pulverizados, via Torre de Potter, com 1,5 mL da formulação do fungo *M. anisopliae* (ESALQ 818) com concentração  $1 \times 10^7$  conídios/mL. Com auxílio de uma pinça elas foram

retiradas da placa e acondicionadas em grupos de 5 fêmeas em gaiolas de plástico de 9 cm de largura e 7 cm de altura. Foram no total seis gaiolas com 30 mosquitos.

As fêmeas foram retiradas das gaiolas 12, 24, 36, 48, 60, 72 e 96 horas após a inoculação e colocadas em ependorffs de 1,5mL com o fixador Karnovsky (Cacodilato 0,1 M / Paraformaldeído 4% / Glutaraldeído 2,5%). Em seguida elas foram lavadas em solução tampão Cacodilato 0,1M para serem pós-fixadas em solução de Tetróxido de ósmio 1% + Cacodilato 0,1M. Novamente as amostras foram lavadas em Cacodilato 0,1M, e em seguida foram desidratadas em 30, 50, 70, 90 e 100% de acetona em série. Na sequência, as amostras foram levadas para secar no ponto crítico CPD 030, utilizando CO<sub>2</sub>, e montadas em stubs, para metalização com ouro no evaporador por 300 segundos. As fêmeas foram visualizadas no Microscópio Eletrônico de Varredura modelo Zeiss 962, onde foi verificado nas imagens a patogenicidade e a interação do fungo com o tegumento do mosquito após os diferentes períodos de infecção.

## **4.5 EXPERIMENTO 2**

### **A. Preferência alimentar de fêmeas de *A. aegypti* infectadas com *M. anisopliae* por sangue.**

Para testar a preferência alimentar de fêmeas por sangue, infectadas com fungo, foram selecionados mosquitos com três dias de idade.

As fêmeas foram distribuídas em 3 grupos, sendo acondicionadas em gaiolas de plástico (30 cm x 20 cm x 20 cm) com os tempos de 24, 48 e 72 horas pós-infecção. Para melhor manuseio os mosquitos foram adormecidos. Após expostos ao dióxido de carbono durante 30 segundos e, com auxílio de uma pinça fina foram colocados em uma placa de Petri para receber a suspensão fúngica  $1 \times 10^7$  /ml do isolado ESALQ818. Essa suspensão foi aplicada sobre as fêmeas adormecidas com o auxílio de uma Torre de Potter.

Para cada tempo foram utilizadas, em média, 40 fêmeas por tratamento e 40 para controle em três repetições. Após os períodos pós-infecção (48, 72 e 96h de infecção), as fêmeas foram expostas, por um período de uma hora, a um camundongo imobilizado por uma tela metálica.

Para identificar as fêmeas que se alimentaram de sangue, elas foram novamente adormecidas com CO<sub>2</sub>, acondicionadas em placas de Petri e com auxílio de uma pinça foram maceradas em uma folha branca, uma a uma. Esse procedimento serviu para verificar a presença de sangue na fêmea.

### **B. Análise da influência do *M. anisopliae* na produção de ovos em fêmeas de *A. aegypti***

Para esse experimento dez fêmeas totalmente ingurgitadas de cada tempo de infecção proposto no item "A", tanto tratadas como controle, foram acondicionadas em gaiolas de plástico (30 cm x 20 cm x 20 cm). Dentro de cada gaiola foi colocado um recipiente com 200mL de água com papel filtro em sua borda, utilizado como substrato para fêmeas oviporem seus ovos. Três dias depois os ovos foram retirados e quantificados com auxílio de uma lupa e estabeleceu-se uma média de ovos por fêmea para todos os tempos de infecção e controle (três repetições/tempo de infecção). Foi registrada também a sobrevivência dessas fêmeas durante esse teste.

### **C. Viabilidade dos ovos**

Todos os ovos foram colocados em bandejas (30x15cm) com água e ração para peixe. Foram registrados os números de larvas eclodidas diariamente para todos os tempos propostos e repetições.

### **D. Análise dos dados**

Os dados foram transformados. Essa transformação é utilizada quando a variância é proporcional à média, ou seja, quando há uma redução dos valores de média e variância simultaneamente. É frequentemente utilizado em dados biológicos quando amostras são tiradas da distribuição de Poisson (isto é, quando os dados consistem em ocorrências aleatórias de objetos ou eventos). Transformar os dados utilizando suas raízes quadradas resulta em uma amostra cuja distribuição é normal. A equação utilizada foi  $x' = \sqrt{x}$ . Os dados transformados foram os dados de percentagens e contagens (números inteiros).

#### **4.6 EXPERIMENTO 3: Resposta imunológica dos mosquitos durante a infecção desencadeada pelo isolado ESALQ 818 do fungo *M. anisopliae* utilizando como sinalizadores a expressão gênica das proteínas Toll5A e Citocina – Spz1C**

##### **A. Teste de sobrevivência de fêmeas alimentadas com sacarose 10%**

Fêmeas de *A. aegypti* foram coletadas e infectadas, pelos métodos citados acima, para o teste de sobrevivência. Foram coletadas 50 fêmeas a cada três repetições e infectadas, tendo a mortalidade registrada diariamente por um período de sete dias. O mesmo foi realizado para fêmeas do controle. A concentração de fungo utilizada aqui foi de  $1 \times 10^7$  conídios/mL.

##### **B. Análise molecular de fêmeas de *A. aegypti* infectadas**

Foram retiradas da criação 130 fêmeas e para melhor manuseio as mesmas foram adormecidas. Após expostas ao dióxido de carbono durante 30 segundos e com auxílio de uma pinça fina as fêmeas foram quantificadas e acondicionadas inicialmente em uma placa de Petri para receber a suspensão fúngica ( $1 \times 10^7$  conídios/mL). Essa suspensão foi aplicada sobre as fêmeas adormecidas com o auxílio da Torre de Potter. Após a aplicação, os mosquitos foram colocados em uma gaiola de plástico (30 cm x 20 cm x 20 cm), contendo em seu interior um recipiente com sacarose 10%. Para o experimento controle o procedimento foi o mesmo, porém a solução aplicada foi Tween 0,05%. Esse teste constou de três repetições, totalizando 390 fêmeas para formulações a base de fungo e 390 fêmeas para controle. Para análise no Laboratório de Entomologia Molecular, foram retirados das gaiolas (fêmeas infectadas e não infectadas) 10 mosquitos vivos, com auxílio de uma bomba de sucção, a cada 12 horas durante cinco dias. Eles foram acondicionados em microtubos.

##### **C. Extração e quantificação do RNA total de fêmeas de *A. aegypti***

Para extração de RNA total dos insetos cada amostra foi composta de sete fêmeas. Na extração foi utilizado o reagente Trizol de acordo com as instruções do fabricante.

Os precipitados de RNA foram ressuspensos separadamente em 10  $\mu$ l de água DEPC estéril e, seguidamente, alíquotas de cada amostra foram

quantificadas por espectrofotometria a 260nm em um espectrofotômetro Shimadzu U1240. A qualidade da extração total de RNA total foi determinada pela relação entre as leituras nos comprimentos de onda 260nm/280nm. A quantidade de RNA total foi obtida a partir da razão da massa total de RNA quantificada pelo número estimando de fêmeas da extração. As médias e o desvio padrão foram calculados a partir de triplicatas de cada amostra.

#### **D. Expressão e quantificação de transcritos de Toll5a e Citocina (spz1c) em fêmeas alimentadas com sacarose 10%**

Para analisar a expressão gênica das proteínas Toll5A e Spz1C em resposta à infecção fúngica, foram utilizadas alíquotas de RNA total das fêmeas alimentadas com sacarose 10%. Dois microgramas de RNA total foram reversamente transcritos usando o Kit para síntese de cDNA *High-capacity cDNA Reverse transcription* com primers randômicos, seguindo as instruções do fabricante. O cDNA foi utilizado como amostra na reação de PCR em tempo real, junto com primers específicos para genes em questão, e o kit *Master SYBR Green Plus I* (Roche®), seguindo as instruções do fabricante, em reações de 10µl. A amplificação foi realizada em uma plataforma de capilares para PCR em tempo real *LightCycler 1.5* (Roche®). Foram feitas diluições do cDNA para curva de calibração de cada primer utilizado no trabalho.

A sequência dos primers foi adquirida do artigo de Shin et al. 2006 para Toll5A e Spz1C. Os primers utilizados para expressão específica dos genes foram AaSpz1C/qPCR/Forward<sub>g</sub>5'-GAGGAGCTATCCCGGAAC-3'; AaSpz1C/qPCR/Reverse 5'-GCCTAATTGTCTTTTCAGACAC-3' e Toll5A/Forward 5'—GAAGCTTGTCAGAGAAAGC-3'; Toll5A/Reverse 5'—GTGCCACTGAACAGAAAC-3'.

A expressão relativa foi determinada através dos valores Cp em cada corrida no programa *Relative Expression Software Tool-REST*. Como gene referência foi utilizado o gene constitutivo rp49.

#### **E. Expressão e quantificação de transcritos de Toll5a em fêmeas alimentadas com sangue 72 horas antes da infecção com *M. anisopliae*.**

Para analisar a expressão gênica da proteína Toll5A em resposta à infecção fúngica, foram utilizadas alíquotas de RNA total das fêmeas alimentadas

com sangue. O restante do procedimento foi descrito nos tópicos “C e D” desta sessão. A expressão relativa foi determinada através dos valores Cp em cada corrida no programa *Relative Expression Software Tool-REST*. Como gene referência foi utilizado o gene constitutivo rp49.

#### **4.7 EXPERIMENTO 4: Avaliação da atração de fêmeas pós-infecção com fungo a uma fonte de odor humano**

##### **A. Criação de mosquitos**

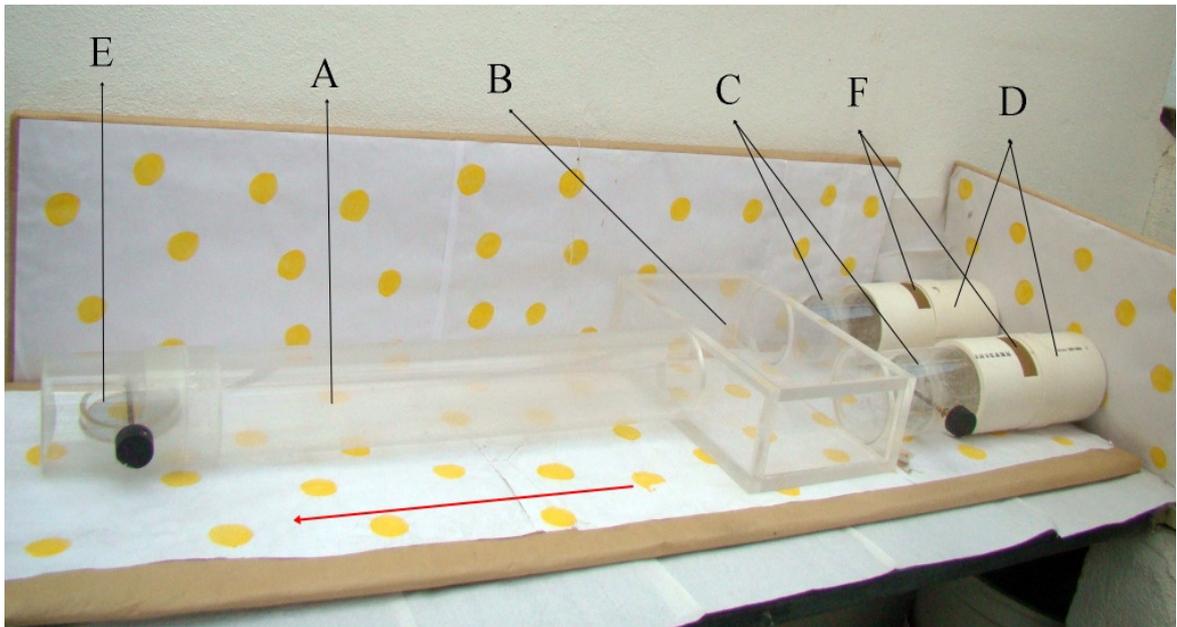
Esse experimento foi realizado na Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB). A colônia utilizada nesse teste tem origem de ovos de *A. aegypti* que foram coletados no Campus Pampulha da UFMG (Belo Horizonte), por meio de armadilhas de oviposição (ovitampa). Para se certificar da ausência do vírus foram realizados pelo Laboratório de Vírus do Departamento de Microbiologia da UFMG testes utilizando a técnica de RT-PCR. Após a confirmação da ausência do vírus deu-se início a criação.

A sala de criação foi mantida a  $27 \pm 1^\circ$  C, 75 a 80% de umidade relativa (UR) e 12L:12E de fotoperíodo (Eiras, 1991). Os mosquitos adultos foram mantidos em gaiolas (30x30x30cm) com tela fina e alimentados com 10% de sacarose. Ratos (*Rattus norvegicus*) anestesiados com 0,6 a 0,8 ml de Tiopental sódico na concentração de 50 mg/ml (1,0 g em 20 ml de solução salina isotônica), via peritoneal foram utilizados para alimentação sanguínea. As larvas foram mantidas em bandejas plásticas com água (aproximadamente 5 cm de profundidade) e alimentadas com ração para peixes ornamentais (Goldfish®) até atingir o estágio de pupa. As pupas foram coletadas diariamente e transferidas para a gaiola de criação (adultos). Somente fêmeas adultas de 3 a 10 dias de idade cronológica foram utilizadas nos experimentos.

##### **B. Avaliação da atração de fêmeas de *A. aegypti*, infectadas anteriormente com isolado ESALQ818 do *M. anisopliae*, ao hospedeiro humano.**

Os testes foram realizados em um olfatômetro de dupla escolha, composto de acrílico transparente formando um tubo principal que se ramifica em dois tubos de escolha à fonte à atração. No tubo principal (Figura1) foi encaixada a gaiola de

liberação de insetos, que possui uma tela giratória permitindo a retenção e liberação dos mosquitos. A tela giratória também está presente nos dois tubos de escolha. Dedos de humanos foram introduzidos na abertura para introdução dos estímulos olfativos presentes no tubo de liberação de estímulos.



**Figura 1.** Olfatômetro de dupla escolha: (A) tubo principal; (B) caixa; (C) tubo de escolha; (D) tubos de liberação de estímulos; (E) gaiola de liberação de insetos; (F) abertura para introdução dos estímulos olfativos; a seta vermelha indica o sentido do fluxo de ar. Foi colocado nas laterais e embaixo dos tubos um papel com manchas amarelas para servir de referência para o deslocamento (voo) dos mosquitos.

O olfatômetro possui um fluxo de ar gerado por um sistema de purificação de ar externo composto por um exaustor, um filtro de carvão ativado para retirar moléculas orgânicas e água quente para umidificar o ar (Mota, 2003) Fig.14. Os testes foram realizados em uma sala climatizada  $28,0 \pm 2$  °C e  $70 \pm 10\%$  UR.

Os mosquitos utilizados no teste permaneceram inicialmente 15 minutos na gaiola de liberação recebendo apenas ar purificado para climatização antes de utilizarem dedos humanos como estímulo olfativo. Os dedos foram expostos cinco segundos antes do início do experimento. O teste teve início com a abertura da gaiola de liberação e apresentou período de duração de um minuto. Para evitar resultados tendenciosos a posição do estímulo olfativo foi invertida a cada repetição (Mota, 2003).

Foram realizadas 12 repetições. Cada repetição constou de 15 fêmeas de *A. aegypti* com idades a partir de três dias. Elas foram acondicionadas dentro de potes pequenos que continham panos pretos impregnados com isolado ESALQ 818 do fungo *M. anisopliae*. Elas permaneceram em contato com o entomopatógeno 24, 48 e 72 horas. A concentração utilizada foi de  $1 \times 10^8$  conídios/ml.

Depois da infecção os mosquitos foram liberados no olfatômetro (Figura 2). O tratamento controle foi realizado da mesma maneira, entretanto os mosquitos foram tratados com Tween 0,05% (TW). Na abertura que não recebeu dedos humanos como estímulo, foi ofertado apenas o ar previamente filtrado.



**Figura 2.** Olfatômetro horizontal de dupla escolha e sistema de purificação e umidificação do ar: (A) tubo para a sucção do ar externo; (B) exaustor; (C) filtro de carvão ativado; (D) banho-Maria adaptado; (E) climatizador; (F) aquecedor; (G) termo-higrômetro; (H) arenas.



**Figura 3:** Três dedos de um voluntário humano foram colocados na abertura para introdução dos estímulos olfativos do olfatômetro.

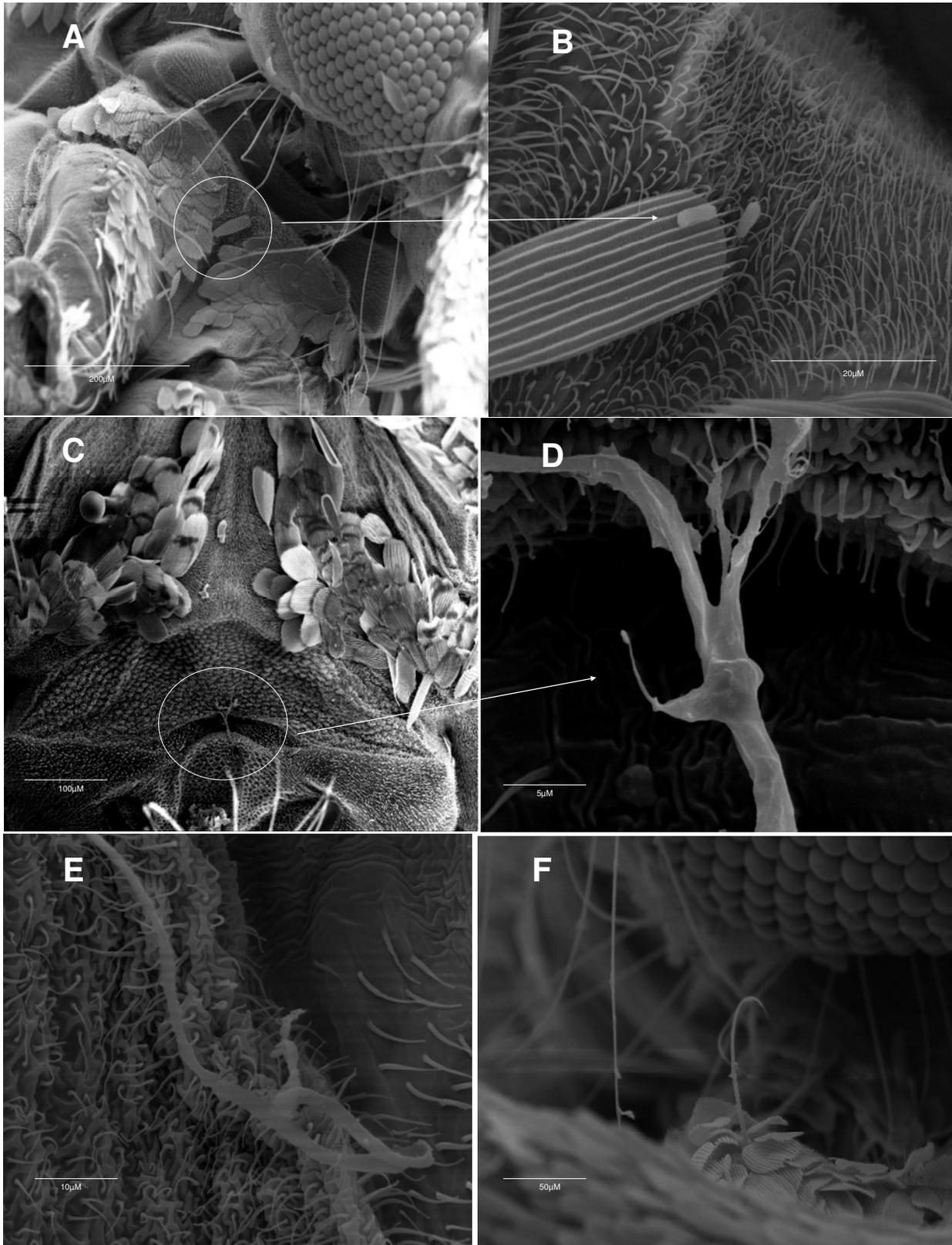
A avaliação foi feita quantificando as porcentagens: de fêmeas inativas ou que não foram atraídas para fonte de estímulos, fêmeas atraídas para uma fonte de odor humano e de fêmeas atraídas para uma fonte de ar, sem odor humano

A análise estatística foi realizada convertendo inicialmente os valores de captura dos insetos em porcentagem para se calcular os percentuais médios juntamente com o erro padrão. Posteriormente, os dados sofreram transformação para arco-seno [transformação angular (presença-ausência de fêmea)] (Sokal & Rohlf, 1981). Esses dados foram analisados utilizando os testes t e ANOVA quando paramétricos ou Mann-Whitney e Kruskal-Wallis quando não-paramétricos. As análises foram realizadas utilizando o programa estatístico BioEstat 5.0 (Ayres et al., 2005).

## RESULTADOS

### 5.1. **EXPERIMENTO 1**: Microscopia Eletrônica de Varredura em fêmeas de *A. aegypti*

Nas imagens foi possível confirmar a presença dos esporos do fungo entomopatogênico com 12 h pós-infecção, como mostram as imagens (Figura 4: A-B). O início da germinação e penetração dos conídios ocorreu entre 36 e 48 horas (Figura 4: C-D) na região ventral do tórax do mosquito. Nesse período é provável que tenha ocorrido formação de apressórios, que são dilatação das hifas na extremidade do tubo germinativo. Nessa fase ocorre a migração do conteúdo citoplasmático para o tubo germinativo na parte interna do inseto, transformando esse local em um centro de elevada atividade metabólica (Alves, 2008). Encontrando condições de umidade, temperatura, pH, oxigênio e nutrição, o fungo, na maioria das vezes, germina sobre o mosquito, resultando na colonização, como podem ser observados nas imagens da Figura 4 (E-F).

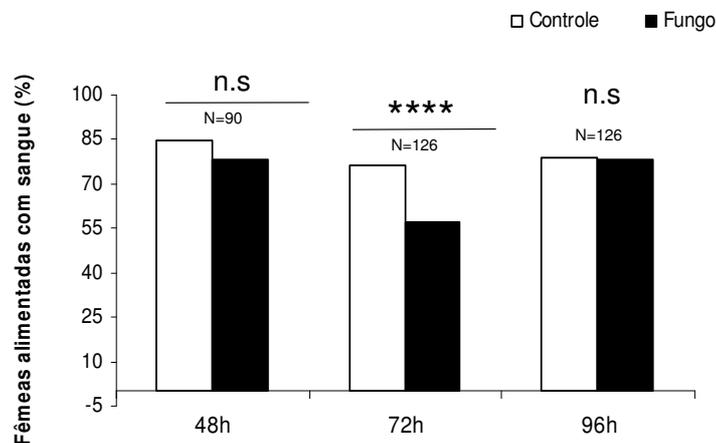


**Figura 4.** Adultos de *Aedes aegypti* inoculados com *M. anisopliae* e observados por microscopia eletrônica de varredura. A e B) Presença dos conídios 12 h após a inoculação do entomopatôgeno; C e D) Germinação com penetração do tubo germinativo, após 48h (tórax ventral); E) Processo de colonização após 72h (Tórax ventral); F) Extrusão do micélio sobre o tegumento após 96h. Barra = 5 µm, E = 200 µm.

## 5.2 EXPERIMENTO 2

### A) Preferência alimentar de fêmeas de *A. aegypti*, infectadas com *M. anisopliae*, por sangue.

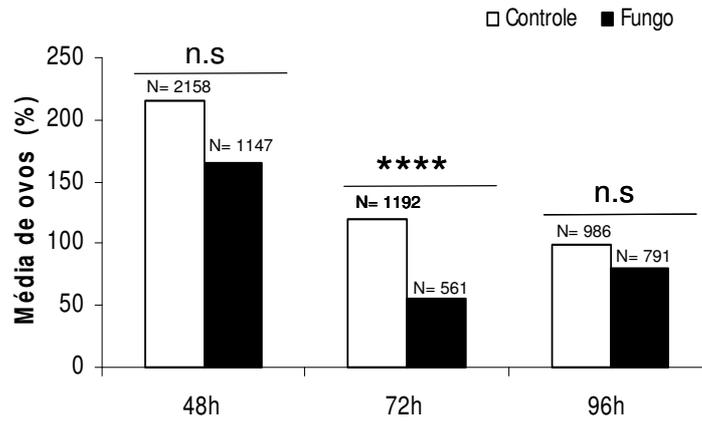
Nesse teste foram oferecidos camundongos para fêmeas de *A. aegypti* com três dias de idade, alimentadas anteriormente com sacarose 10%. Não houve diferença significativa entre fêmeas com 48 e 96h de infecção e controle. Foi observado diferença significativa ( $F_{(5,10)} = 7,48$ ;  $p = 0,003667$ ) no tempo de 72h de infecção (Figura 5), onde as fêmeas doentes se alimentaram 20% menos de sangue, quando comparado ao controle.



**Figura 5.** Atividade alimentar de fêmeas *A. aegypti* após 48, 72 e 96 horas de infecção. Teste Duncan,  $0,05 \leq P$ .

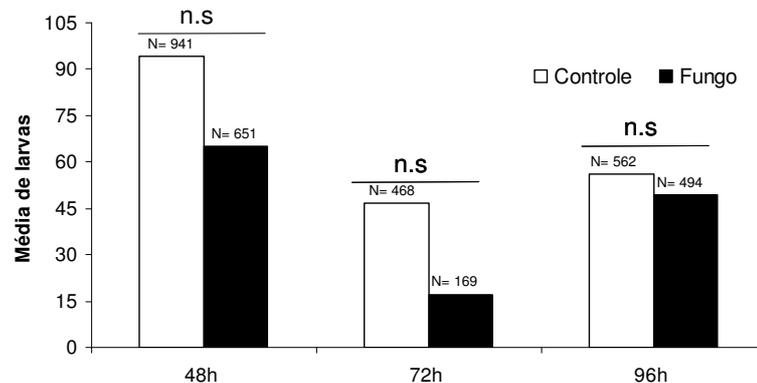
### B) Análise da influência do *M. anisopliae* na produção e viabilidade dos ovos em fêmeas de *A. aegypti*

Os dados não apresentaram diferença significativa na quantidade de ovos produzidos por fêmeas com 48 e 96 horas de infecção. Porém as fêmeas com 72 horas de infecção apresentaram menor quantidade de ovos ( $F_{(5,10)} = 10,86$ ;  $p = 0,00087$ ) (Figura 6). A diferença entre fêmeas tratadas e controle foi de 63,1%.



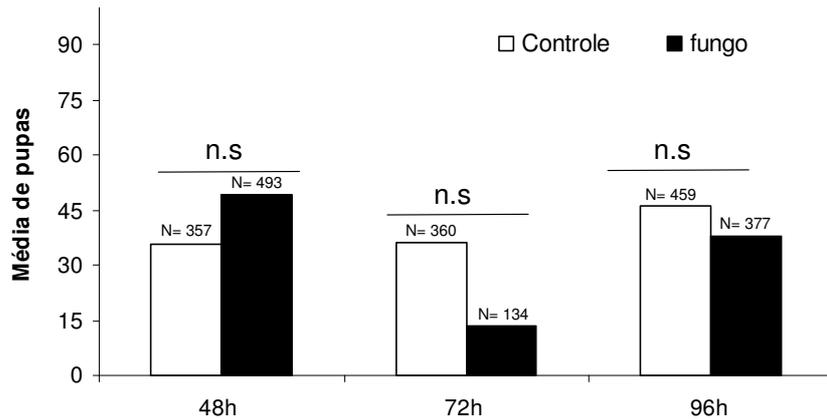
**Figura 6.** Quantidade de ovos produzidos por fêmeas *A. aegypti* em diferentes tempos pós-infecção. Teste Duncan,  $0,05 \leq .P$ .

Os mosquitos com 48h de infecção apresentaram oviposição tardia, com uma diferença de 24h para o controle. Isso também foi observado para fêmeas com 72h de infecção. As fêmeas com 96h de infecção apresentaram comportamento de oviposição oposto aos demais tempos. Cinquenta por cento dos ovos foram ovipostos no segundo dia de avaliação, enquanto fêmeas do controle ovipositaram 47% de seus ovos no quinto dia.



**Figura 7.** Quantidade de larvas eclodidas de ovos produzidos por fêmeas de *A. aegypti* a diferentes tempos de pós-infecção. Teste Duncan,  $0,05 \leq .P$ .

Embora as fêmeas com 72 e 96h de infecção tenham apresentado menor número de larvas eclodidas, estatisticamente a diferença não foi significativa ( $F_{(5,10)} = 2,509$ ;  $p = 0,10121$ ) (Figura 7) apesar da quantidade no controle, de fêmeas do período 72h pós-infecção, sobressair em 299 larvas, quando comparada às infectadas.



**Figura 8.** Quantidade de pupas oriundas de ovos produzidos por fêmeas *A. aegypti* a diferentes tempos pós-infecção. Teste Duncan,  $0,05 \leq$ .

Foi observada menor quantidade de larvas com 72h pós-infecção que seguiram para o estágio de pupa (Figura 8), provavelmente isso esteja relacionado à atividade do entomopatógeno no organismo da larva. A diferença estatística foi significativa nesse teste.

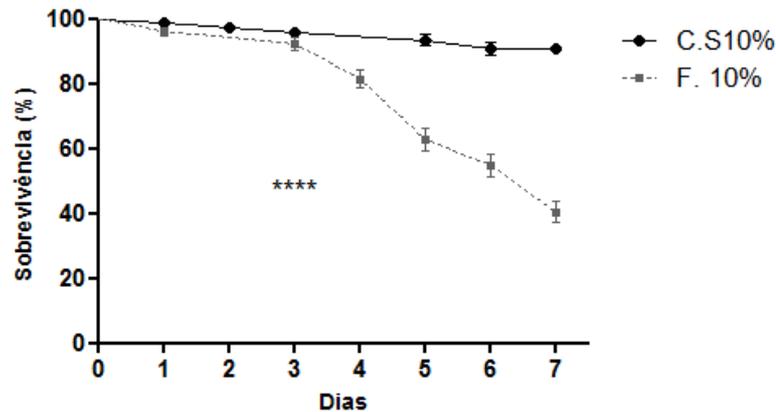
De modo geral, os resultados mostraram que 30% dos ovos do controle chegaram à fase adulta, comparado com 18% dos ovos de fêmeas infectadas. A sobrevivência das fêmeas infectadas de *A. aegypti* utilizadas nesse experimento variou entre 87,5 e 80%. Todas as fêmeas do controle (100%) sobreviveram.

### **4.3 EXPERIMENTO 3: Resposta imunológica dos mosquitos durante a infecção desencadeada pelo isolado ESALQ 818 do fungo *M. anisopliae* utilizando como sinalizadores a expressão gênica das proteínas Toll5A e Citocina – Spz1C**

#### **A. Teste de sobrevivência de fêmeas alimentadas com sacarose 10% (S.10%)**

São observadas nos entomopatógenos, antes de qualquer experimento, a patogenicidade e virulência contra o inseto alvo, nesse caso, *A. aegypti*. O isolado ESALQ 818, segundo Paula et al. (2008), apresentou todas as características necessárias, citadas anteriormente, para realização deste trabalho. No teste de sobrevivência de fêmeas alimentadas com sacarose 10%, foi observada uma mortalidade acentuada a partir do quarto dia, usando uma concentração de  $1 \times 10^7$

conídios/mL, aplicada de forma direta (Figura 10). A diferença significativa entre o controle e as tratadas foi estabelecida com uso do teste Log Rank. Através desse resultado foi estabelecido o período de análise da expressão das proteínas em questão.



**Figura 09.** Sobrevivência de fêmeas de *A. aegypti* alimentadas com sacarose e infectadas com isolado ESALQ 818. C= controle e F= fêmeas tratadas com fungo. \*\*\*\* Grau de significância.

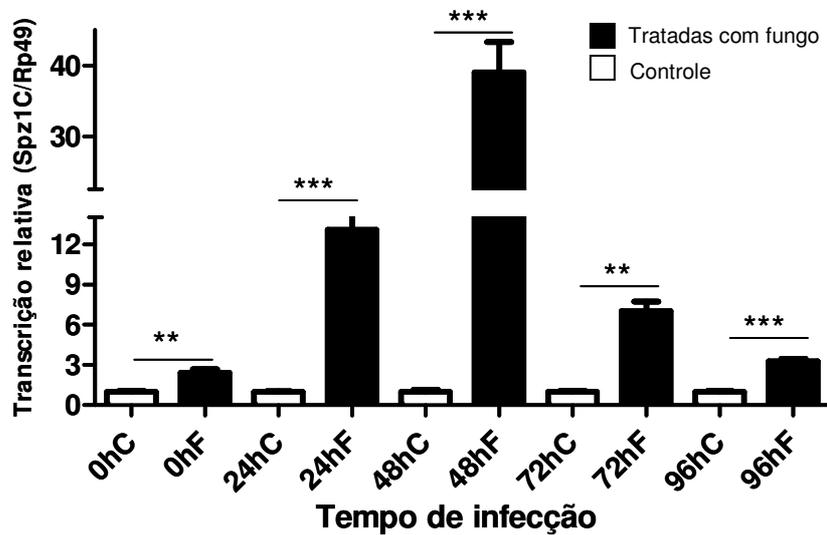
### **B- Expressão e quantificação de transcritos de Toll5a e Citocina (spz1c) em fêmeas alimentadas com sacarose 10%**

Inicialmente o produto da reação de PCR foi monitorado por eletroforese de DNA em gel de agarose mostrando bandas com tamanho esperado em torno de (200 pb) relativas a um fragmento de DNA dos genes Toll5A, Spz1C e gene constitutivo.

Rp49 SpZ1C Toll5A

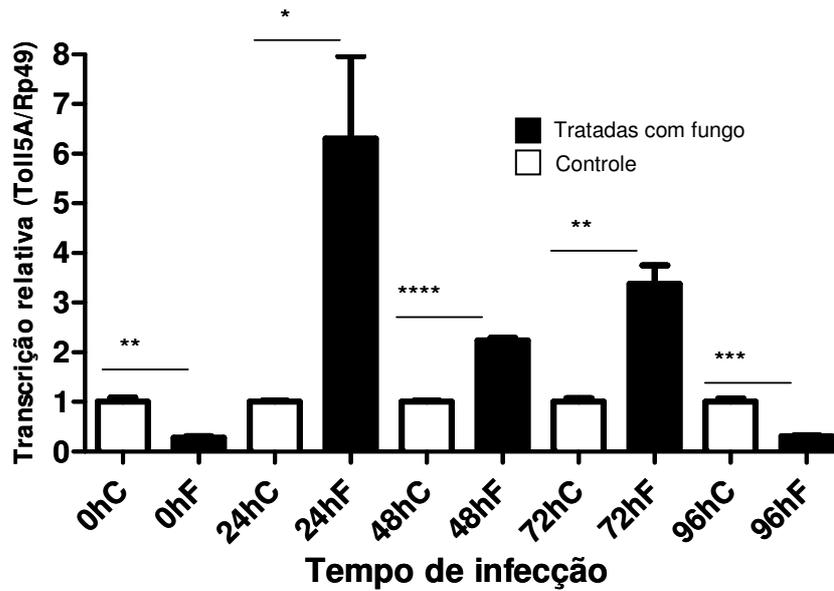
**Figura 10.** Produto de RT-PCR de fêmeas de *A. aegypti* para os genes Toll5A, Spz1C e constitutivo.

Confirmada a presença das proteínas foram realizadas extrações de RNA total das fêmeas para contagem relativa no PCR real-time.



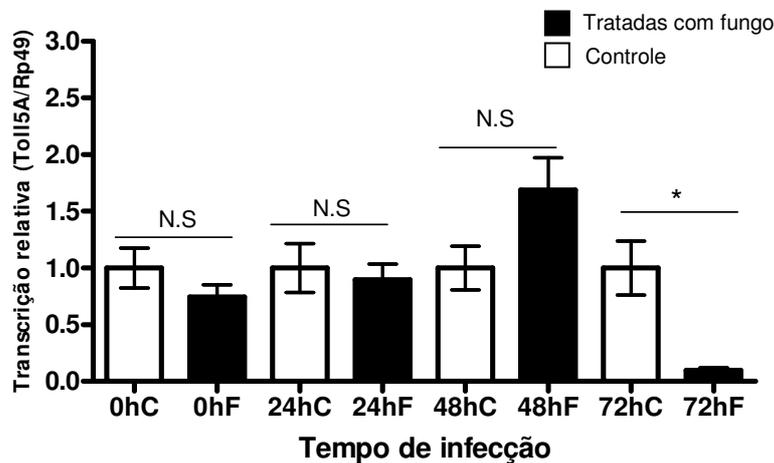
**Figura 11.** Transcrição relativa da proteína sinalizadora Spz1c em fêmeas de *A. aegypti* infectadas com *M. anisopliae* a diferentes períodos pós-infecção.

É possível observar que a diferença entre os níveis de citocina em fêmeas tratadas com fungo e não tratadas aumenta após 24 horas de infecção (Figura 11), apresentando o maior nível de expressão com 48 horas, decrescendo entre o terceiro e quarto dia. O mesmo pode ser observado para a proteína Toll5A em fêmeas com 24h pós-infecção, porém o decréscimo ocorreu a partir do segundo dia, aumentando novamente no terceiro dia (Figura 12).



**Figura 12.** Transcrição relativa da proteína Toll5A em fêmeas de *Ae. aegypti* infectadas com *M. anisopliae* a diferentes períodos pós-infecção.

**C. Expressão e quantificação de transcritos de Toll5a em fêmeas alimentadas com sangue 72 horas antes da infecção com *M. anisopliae*.**



**Figura 13.** Transcrição relativa de fêmeas alimentadas com sangue 72h horas antes da infecção com *M. anisopliae*.

Os resultados obtidos nesse experimento com fêmeas com 72 de infecção sugerem que o fungo além de interferir na reprodução, interferiu também na resposta imune, como mostra a Figura 13. A transcrição da proteína Toll5A apresentou-se baixa quando comparada ao controle, ou seja, regulação negativa.

#### **4.4 EXPERIMENTO 4: Avaliação da atração de fêmeas pós-infecção com fungo a uma fonte de odor humano**

Nesse teste foi utilizada uma concentração de conídios maior, quando comparado aos experimentos anteriores, por se tratar de uma metodologia de contato indireto, com um pano preto impregnado com fungo. Nesse caso o mosquito pode optar em pousar ou não sobre o pano. Deve-se considerar que a quantidade de conídios em contato com mosquito foi menor que a pulverizada com a Torre de Potter, maximizando as chances de infecção com temperatura e umidade favoráveis (27°C e 80% Umidade relativa). O contato indireto não diminui a capacidade do fungo de interferir na sobrevivência do mosquito.

No tratamento na qual as fêmeas foram liberadas no olfatômetro 24h pós-infecção fúngica (Quadro 1) foi observado que a taxa de insetos inativos foi de 47%, não sendo significativamente diferente comparado com tratamento controle, 47,9% ( $P > 0,01$ ). No mesmo tratamento, as taxas de insetos que entraram no tubo com fonte de odor humano (35,5%) foi maior e significativamente diferente da porcentagem de insetos que entraram no tubo sem fonte de odor [16,3% ( $F_{(2,35)} 7,53$ ;  $P < 0,01$ )]. O tratamento controle (fêmeas tratadas com TW) resultou em 34,9% de insetos que entraram no tubo com fonte de odor humano e 17,1% de insetos que entraram no tubo sem fonte de odor humano, sendo significativamente diferentes entre si ( $F_{(2,35)} 9,18$ ;  $P < 0,01$ ), entretanto não foi diferente comparado com o tratamento fungo ( $P > 0,01$ ).

No experimento na qual as fêmeas foram liberadas no olfatômetro 48h pós-infecção fúngica foi verificado que a porcentagem de insetos considerados inativos (45,2%) foi menor e significativamente diferente da taxa de mosquitos inativos no controle [74% ( $F_{(2,35)} 8,51$ ;  $P < 0,01$ )]. No mesmo tratamento, a porcentagem de insetos que entraram no tubo com fonte de odor humano (44,4%) foi maior e significativamente diferente da porcentagem de insetos que entraram no tubo sem fonte de odor humano [10,2% ( $F_{(2,35)} 10,3$ ;  $P < 0,01$ )]. Os testes estatísticos mostraram que as fêmeas expostas por 48 horas ao pano preto impregnado com o fungo foram mais ativas, 54,6%, (fonte de odor humano + fonte de ar), comparado com o controle (26,9%), e comparado com a taxa de procura por uma fonte sem odor humano (10,2%).

**Quadro 1 - Avaliação da atração de fêmeas pós-infecção com fungo a uma fonte de odor humano.**

Liberação dos mosquitos pós-infecção fúngica ou tratamento TW.	24 horas		48 horas		72 horas	
	Fungo	TW	Fungo	TW	Fungo	TW
Insetos inativos	47 ± 2,77Aa	47,9 ± 2,62 Aa	45,2 ± 2,42 Aa	74 ± 2,50 Ab	46 ± 2,93 Aa	81,4 ± 3,16 Ab
Entrou no tubo com fonte de odor humano	35,5 ± 1,50 Aa	34,9 ± 2,17 Aa	44,4 ± 2,49 Aa	15,9 ± 1,46 Bb	28,9 ± 2,14 Ba	12,8 ± 1,16 Bb
Entrou no tubo sem fonte de odor humano	16,3 ± 2,04 Ba	17,1 ± 1,50 Ba	10,2 ± 1,19 Ba	10 ± 1,50 Ba	25 ± 2,03 Ba	5,7 ± 0,77 Bb

\* Os valores seguidos de mesma letra indicam que os resultados não foram estatisticamente diferentes quando comparados usando o teste *post-hoc* de Duncan (5% probabilidade). O teste estatístico foi feito dentro do grupo 24 ou 48 ou 72 horas pós-infecção com fungo. Letras maiúsculas representam estatística na coluna. Letras minúsculas representam estatística na linha. Concentração da suspensão fúngica  $1 \times 10^8$  conídios/ml. TW = Tween.

## 6. DISCUSSÃO

### 1. EXPERIMENTO 1: Microscopia Eletrônica de Varredura

A adesão representa um evento complexo sendo o primeiro do ciclo das relações fungo-hospedeiro, que ocorre após a deposição do fungo sobre o inseto e visa à preparação do local para a fase de penetração, como foi observado em fêmeas 48h pós-infecção. Essa fase é facilitada pela produção de enzimas. As enzimas majoritárias são proteases e quitinases (Alves, 2008). *M. anisopliae* produz a enzima quimoelastase (Pr1), cujas funções são dissolução da cutícula do inseto para estabelecimento da doença, a supressão do sistema imunológico, a interferência com os canais de íons e outras funções celulares nos hospedeiros (Alves, 2008).

Durante o processo de colonização interna dos órgãos, os fungos produzem enzimas que apresentam a capacidade de converterem os tecidos e cutículas dos insetos em nutrientes para seu crescimento. Para isso ocorrer é necessário o processo de germinação e penetração do fungo com formação do tubo germinativo. As imagens C e D da Figura 4 mostraram tal atividade em fêmeas do mosquito *A. aegypti* com 48 h pós-infecção.

Moino Jr. et al. (2002) registraram imagens do desenvolvimento do *M. anisopliae* e *B. bassiana* infectando *Heterotermes tenuis* (Isoptera). Suas imagens mostraram germinação do conídio e penetração do tubo germinativo após 24h de infecção, utilizando a concentração de  $1 \times 10^9$  conídios/mL. Eles concluíram que as fases de penetração, colonização e conidiogênese em cupins infectados com *M. anisopliae* são relativamente mais rápidas que para *B. bassiana*, o que resultou em uma taxa de mortalidade mais rápida dos insetos.

Em *Rhipicephalus sanguineus* a penetração do tubo germinativo foi observada após 18 horas em 67% dos ovos infectados com o fungo (concentração de  $1 \times 10^8$  conídios/mL). A extrusão do *M. anisopliae* foi observada após quatro e cinco dias de infecção (Garcia et al. 2005).

Foi visualizado o crescimento de micélios do fungo *M. anisopliae* em fêmeas de *A. aegypti* entre a cabeça e o tórax com 96h pós-infecção (Figura 4-E eF).

Goettel (1988) descreveu o processo de infecção do Hyphomyceto *Tolyposcladium cylindrosporium* colonizando larvas do mosquito *A. aegypti*. Ele observou que em larvas de *A. aegypti* o fungo colonizou inicialmente o canal alimentar e exocutícula, por último a hemocele. Depois a colonização do fungo foi visível em partes da larva como mandíbulas, maxilas e ânus. Vieira et al. (2011) registraram imagens do *M. anisopliae* colonizando as cerdas da cutícula de larvas de *A. aegypti* do terceiro instar. A germinação do tubo germinativo foi observada após 12h de infecção. Não foi visualizada a presença do fungo em outras partes do inseto.

Lacey, et al. (1988) constataram um bloqueio da traqueia de larvas de *C. quinquefasciatus*, através do crescimento de micélios de *M. anisopliae*. A mortalidade foi provocada por asfixia. Eles também observaram, através de imagens, o início da germinação no intestino médio das larvas, com mortalidade entre seis e vinte e quatro horas de infecção.

## **2. EXPERIMENTO 2**

### **A) Preferência alimentar de fêmeas de *A. aegypti*, infectadas com *M. anisopliae*, por sangue.**

Em relação à preferência alimentar resultados semelhantes foram registrados por Scholte et al. (2006) para fêmeas de *An. gambiae* infectadas com *M. anisopliae*, porém em nosso trabalho em menor concentração ( $1 \times 10^7$  conídios/ml) quando comparado à por Scholte et al. ( $1,6 \times 10^9$  conídios/ml). Os mosquitos estavam confinados em gaiolas 30x30x30cm. O fato de algumas fêmeas não se alimentarem de sangue pode estar relacionado ao tempo de ação do fungo no organismo, podendo estar associado à degradação de tecidos, produção de metabólicos secundários e paralisia do sistema digestivo.

Darbro et al. (2012) registraram redução de 30% no contato com humanos por fêmeas de *A. aegypti* infectadas com *B. bassiana*. Esse comportamento foi mais intenso com o passar dos dias, em condições de laboratório. Já no semicampo, a busca por hospedeiro foi reduzida somente após seis dias de infecção.

A baixa preferência pode ser considerada um ponto positivo para o controle do *A. aegypti*, uma vez que são insetos que estão intimamente associados a humanos e pouco se alimentam de sacarose, encontrada no néctar de plantas e frutas. As fêmeas são capazes de sobreviver e reproduzir somente com alimentação sanguínea, sendo isso epidemiologicamente relevante uma vez que esse mosquito é vetor do vírus da Dengue (Scott, 1997).

### **B) Análise da influência do *M. anisopliae* na produção e viabilidade dos ovos em fêmeas de *A. aegypti***

Além de suprir, em partes, a necessidade nutricional, a função do sangue vai além, sendo necessário para o sucesso reprodutivo. Pois é do sangue que provêm nutrientes que irão contribuir para a formação dos ovos, como aminoácidos essenciais.

Scholte et al. (2006) mostraram em seu trabalho que o fungo foi capaz de interferir na quantidade de ovos produzidos por fêmeas de *A. gambiae* com 72h de infecção. Segundo Sikura et al. (1972) *fitness* reprodutivo em fêmeas de *A. gambiae* foi reduzido devido a injúrias histológicas e citológicas nos ovários provocadas pelo *M. anisopliae*. O fungo interferiu nos recursos ou fontes necessárias para a reprodução, como, por exemplo, o corpo gorduroso.

O resultado encontrado para fêmeas com 72 horas de infecção pode estar relacionado ao “limite do custo da defesa”. Quando o sistema imunológico é altamente ativado existe a possibilidade de déficit em algumas funções do organismo do inseto, como por exemplo, a reprodução. Quando não há uma redução, pode ocorrer atraso em algum dos processos fisiológicos do organismo. A natureza destes custos é desconhecida, porém pode ser resultado de vias bioquímicas compartilhadas, ou o receptor que está envolvido na resistência à infecção também está participando do desenvolvimento de instares larvais (Schmid-Hempel, 2005). Price et al. (2011) sugeriram que os genes expressos a

partir do corpo gorduroso são direcionados para produção de proteínas que estão envolvidas no acúmulo de nutrientes importantes na vitelogênese.

Segundo Pal et al. (2007), os insetos podem ter vias responsáveis pela biotransformação da destruxina. Estudos com a destruxina “E” em gafanhotos sugeriram a existência de vias que metabolizam a toxina e produzem componentes secundários. Isso poderia ser um indicativo da história coevolucionária entre as toxinas produzidas pelo fungo e envolvimento de vias bioquímicas de insetos na desintoxicação. Talvez essa informação possa justificar o resultado para fêmeas com 96 horas de infecção, onde não houve diminuição na produção e viabilidade dos ovos.

Schmid-Hempel (2005) relatou que menores taxas de fecundidade são resultados de uma resposta imune ativa. Os resultados obtidos nesse experimento com fêmeas 72 pós-infecção sugerem que o fungo além de interferir na reprodução interferiu também na resposta imune, como mostra a Figura 13. A transcrição da proteína Toll5A apresentou-se baixa quando comparado ao controle. Talvez isso seja indício de compartilhamento de algumas vias bioquímicas como relatado por Schmid-Hempel (2005).

Price et al. (2011) analisaram o transcriptoma do corpo gorduroso de fêmeas de *A. aegypti* antes e 24h após alimentação sanguínea. O corpo gorduroso é o principal órgão do metabolismo intermediário, funcionando como uma unidade de armazenamento de lipídios, carboidratos e proteínas em insetos em geral. Eles observaram uma grande alteração na expressão dos genes quando o sangue é ingerido como aumento do nível de aminoácidos na hemolinfa, hormônios peptídicos secretados pelo intestino, ativados pelo sistema nervoso central, e ecdisteroides dos ovários. Tudo foi modificado em função da reprodução. Proteínas não expressas normalmente passaram a ser sintetizadas e outras deixaram de ser produzidas.

O mesmo aconteceu com o sistema imune das fêmeas. Peptídeos antimicrobianos como defensinas, cecropinas e algumas proteínas Toll, importantes na defesa contra bactérias e fungos entomopatógenos, tiveram suas taxas de transcrição reduzidas abaixo da metade, quando comparados com fêmeas não alimentadas com sangue. Isso foi observado exatamente no período de 0 a 48h após alimentação sanguínea e antes de excretar as fezes.

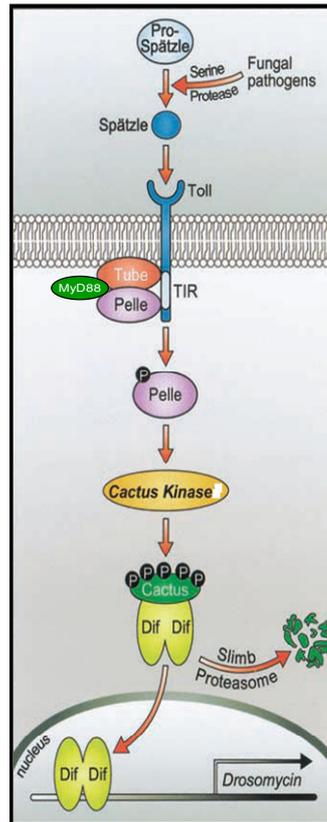
### **3. EXPERIMENTO 3: Resposta imunológica dos mosquitos durante a infecção desencadeada pelo isolado ESALQ 818 do fungo *M. anisopliae* utilizando como sinalizadores a expressão gênica das proteínas Toll5A e Citocina – Spz1C**

Toll é uma proteína que funciona como receptor de membrana e apresenta um domínio extracelular, contendo regiões ricas em leucinas e um domínio intracelular similar ao receptor interleucina-1 em mamíferos. A ativação da via Toll em *Drosophilas* requer uma citocina (Spz), proteína que é membro do grupo de cisteínas da família de fatores de crescimento. A via depende dessa proteína extracelular, cuja síntese é estimulada por patógenos, e de sua forma clivada ligada ao receptor para que a via seja acionada (Figura14; Silvermen & Maniatis, 2001).

Segundo Shin et al. (2006), o mosquito *A. aegypti* apresenta uma citocina específica, capaz de sinalizar a presença de  $\beta$ -glucanas de fungos como *M. anisopliae* e *B. bassiana*. Foi classificada como Spz1c. Através da expressão relativa dessa proteína, nesse experimento foi possível identificar o período, entre os dias avaliados, de maior expressão e comparar com os dados de sobrevivência de fêmeas do mosquito para então compreender como parte da via imunológica reage perante uma infecção.

No presente trabalho foi observada alta taxa de expressão relativa tanto da proteína Toll5A como de Spz1C 24h pós-infecção em fêmeas de *A. aegypti*, sendo a primeira mais expressa que a segunda. Porém, não há registros na literatura sobre a quantidade de Spz1C necessária para estimular, especificamente, a via Toll5A em *A. aegypti*.

Hillyer (2010) relata que com o passar dos dias o *A. aegypti* perde hemócitos naturalmente e esses não são repostos pelo organismo do inseto. Os hemócitos são responsáveis por se diferenciarem em células fagocitárias e produzirem proteínas sinalizadoras, como a citocina, que permanece circulante na hemolinfa. A dextruxina, produzida pelo fungo, além de paralisar o intestino, agindo na despolarização celular, também destrói os hemócitos. Com a destruição dessas células a tendência das proteínas sinalizadoras é diminuir, acompanhada pela baixa sobrevivência a partir do quarto dia (Figura 7).



**Figura 14.** Via de sinalização Toll/antifúngica descrita em *Drosophila* (Silverman & Maniatis, 2001).

Outro ponto a se considerar é a quantidade de ROS (espécies de oxigênio reativo) no organismo do mosquito. Ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e radical OH são produtos intermediários da redução do  $O_2$  a duas moléculas de água (Alvarenga, 2005) e são altamente tóxicos quando produzidos desordenadamente. A ROS tem uma função importante no sistema imune inato do inseto. Segundo Bae et al. (2010), são uma importante arma contra microorganismos invasores, juntamente com células fagocíticas. Quando a concentração de ROS está muito elevada, vários genes de desintoxicação são acionados para contornar essa explosão oxidativa. A catalase é uma importante enzima antioxidante, regulada pelo sistema imune (Ryu et al. 2006) além da membrana peritrófica, onde grande parte das ROS ficam aderidas e são eliminadas posteriormente (Barbehenn & Stannard, 2004).

Então a paralisia intestinal, provocada pela toxina do fungo, não só promove inanição como também faz com que o sistema digestivo deixe de eliminar ROS, promovendo assim injúrias em células, principalmente no DNA, na

produção de lipídios e proteínas (Bae et al. 2010) contribuindo para morte do mosquito. Isso pode estar relacionado ao declínio da expressão da Spz1C no terceiro e quarto dia e da via de sinalização Toll5A no quarto dia (Figuras 11 e 12). Deve-se considerar o fato de que fêmeas não alimentadas com sangue apresentam taxas de ROS superior, quando comparadas com fêmeas alimentadas com sangue (Oliveira et al. 2011).

O Toll e alguns outros genes desta via foram identificados como componente chave no padrão dorso-ventral na embriogênese em *Drosophila* (Weber et al. 2003) e posteriormente por estar envolvidos na resposta imune (Leclerc & Reichhart, 2004). É através de sinais emitidos a essa via, que é controlada por fosforilação, que ocorre a ativação e translocação nuclear dos fatores Rel-1 e Rel-2 em *A. aegypti*. Essa reação estimula a síntese de peptídeos antimicrobianos contra fungos, bactérias, protozoários e vírus através da transcrição de genes alvos no núcleo (Shin et al. 2006 & Souza-Neto et al. 2010). A via Toll5A é acionada, especificamente, na presença de fungos entomopatogênicos como *B. bassiana* e *M. anisopliae* (Shin et al. 2006), e ativa o fator NFK- $\beta$ /REL-1. Foi possível observar um alto nível de expressão após 24 horas e o contrário pode ser observado com 96 horas, período em que a taxa de sobreviventes começa a decrescer (Figura 13). Provavelmente isso reflete na baixa sobrevivência mostrada anteriormente após o quarto dia.

Outra hipótese pode estar relacionada ao fato do mosquito ter sua via imunológica estimulada pela infecção (Dong et al. 2012), mas não ter como manter essa atividade por muito tempo, já que o inseto está com o sistema digestivo comprometido. Segundo Dong et al. (2012), a infecção causada por *B. bassiana* em *A. aegypti* estimula a produção de peptídeos antimicrobianos e reduz a replicação viral do vírus da Dengue através das vias Toll e JAK/STAT. Ou seja, o fungo reduz o tempo de vida e a taxa de replicação do vírus. Em nosso trabalho a ação do *M. anisopliae* foi maior, pois apenas 40% dos indivíduos estavam vivos no sétimo dia contra a mesma percentagem encontrada por Dong et al. (2012), porém no décimo quarto dia. A alta taxa de mortalidade é muito importante quando se trata de programas de controle de pragas urbanas e transmissoras de doenças importantes para saúde pública.

#### **4. EXPERIMENTO 4: Avaliação da atração de fêmeas de *A. aegypti*, infectadas anteriormente com isolado ESALQ818 do *M. anisopliae*, ao hospedeiro humano**

Panos pretos ou papel filtro impregnado com fungo têm sido utilizados para reduzir a sobrevivência do mosquito *A. aegypti* (Paula et al. 2008; Paula et al. 2011). Scholte, et al. (2006) mostraram que a infecção com *M. anisopliae* reduziu a alimentação sanguínea de *An. gambiae*, e conseqüentemente as fêmeas produziram menos ovos quando comparados ao controle.

Farenhorst et al. (2011) em testes com *An. gambiae*, utilizaram panos impregnados com *B. bassiana* e relataram mortalidades de 60 e 80% entre o sétimo e décimo segundo dias após o contato. Howard et al. (2010) utilizaram mosquiteiros impregnados com fungos ou esses associados com a permetrina (Piretroide) em cabanas na África. Eles observaram redução da sobrevivência do mosquito *Culex quinquefasciatus* quando em contato com os fungos *M. anisopliae* e *B. bassiana* associados ou não ao piretroide.

Provavelmente 24 horas não foi suficiente para que os conídios do fungo desenvolvessem no mosquito formando o tubo germinativo, processo invasivo que terá como consequência a produção de toxinas. Além do tempo, talvez a quantidade de conídios em contato com o mosquito não tenha sido suficiente para uma resposta mais imediata. Moino Jr. et al. (2002) registraram, através de imagens de microscopia de varredura, germinação e penetração do tubo germinativo após 24 horas de infecção com *M. anisopliae* em *H. tenuis* (Isoptera), ressaltando dados observados.

Esse comportamento de maior procura por sangue de fêmeas 48h pós-infecção pode ter sido aguçado pelo fungo, já que o período de infecção foi maior e elas haviam sido alimentadas anteriormente somente com sacarose 10%, fonte de nutriente insuficiente (Harrington et al., 2001; Styer et al., 2007). Segundo Harrington et al. (2001) não é característica obrigatória do mosquito *A. aegypti*, em ambiente natural, se alimentar de fontes de carboidratos provenientes de plantas. Ao contrário de *Culex* e *Anopheles*, *A. aegypti* está intimamente associado a humanos, transformando o sangue adquirido em reservas de triglicerídeos para a reprodução. Nesse período de 48 h pós-infecção é provável

que o tubo germinativo do fungo esteja crescente internamente dando início ao processo de intoxicação.

Um recente trabalho do nosso grupo mostrou que fêmeas de *A. aegypti* alimentadas com sangue foram menos suscetíveis à infecção do fungo, comparado com fêmeas alimentadas com sacarose (Paula et al., 2011), portanto o sangue aumenta a longevidade das fêmeas, tornando-as menos suscetíveis ao fungo (Paula et al. , 2011 & Mnyone et al., 2011). Nos testes feitos com olfatômetro foi verificado que 48 horas de exposição ao fungo não inibiu a atração das fêmeas por uma fonte de odor humano.

Talvez o odor liberado pelas substâncias que compõem o suor humano possa ter estimulado tal comportamento em fêmeas com 48 horas de infecção. A alimentação sanguínea é necessária para manter o equilíbrio entre a formação de radicais livres e a operação de mecanismos antioxidantes, podendo maximizar a sobrevivência das fêmeas de *A. aegypti* quando comparado à dieta de sacarose (Oliveira et al. 2011).

Comportamento semelhante foi verificado no ensaio onde as fêmeas foram expostas ao fungo por 72 horas e depois liberadas no olfatômetro, onde 54% optaram pelos estímulos quando comparado ao controle, 18,6% ( $F_{(2,35)} 5,68$ ;  $P < 0,01$ ). No total 28,9% optaram pela fonte de odor humano e 25% pela fonte de ar. É possível que, após um período maior de infecção, a ação do fungo tenha comprometido a atividade sensorial do mosquito (antenas e palpos) interferindo na atividade de escolha e não na atividade de voo.

Esses resultados são contraditórios quando comparados com os trabalhos de Blanford et al. (2011) e Geroge et al. (2011), que verificaram que fêmeas de *A. stephens* infectadas com fungo reduziram significativamente a capacidade de voo dos mosquitos fato que provavelmente diminuiria o repasto sanguíneo. Em testes eletrofisiológicos realizados em neurônios olfativos encontrados nas antenas e palpos maxilares, Geroge et al. (2011) verificaram que a capacidade de procura por alimento (sangue humano) diminuiu após infecção fúngica. No presente estudo foi possível mostrar que fêmeas liberadas no olfatômetro 72 horas pós-infecção reduziram a procura por uma fonte de repasto sanguíneo.

Nesse presente trabalho foi possível observar interação do fungo entomopatogênico com o hospedeiro *A. aegypti* através das interferências do micro-organismo no contexto fisiológico, que variaram desde reprodução,

comportamento olfativo, incluindo expressão de proteínas que participam da via imunológica do mosquito. Resultados importantes para melhor compreensão do sistema fisiológico de um dos mais importantes vetores de arboviroses no cenário mundial. Trabalhos como esse podem contribuir para futuros programas de controle dessa praga urbana, sem o uso de inseticidas ou com auxílio deles, porém em menor percentagem, não prejudicando o meio ambiente.

## 7. CONCLUSÕES

- Foi visualizado aderência e permanência dos conídios de *M. anisopliae* sobre a superfície do mosquito após 12 horas. A germinação dos conídios ocorreu entre 24 e 48 horas. O crescimento dos micélios foi visualizado com 96 horas de infecção;
- No teste de preferência alimentar foi observada diferença significativa no tempo de 72h de infecção, onde as fêmeas doentes se alimentaram 20% menos de sangue, quando comparado ao controle. A não preferência de algumas fêmeas por sangue pode estar relacionado à ação do fungo no organismo, podendo estar associado à degradação de tecidos, produção de metabólitos secundários e paralisia do sistema digestivo, resultado considerado positivo para o controle do *A. aegypti*, uma vez que são insetos que estão intimamente associados a humanos e pouco se alimentam de sacarose;
- A quantidade de ovos ovipostos por fêmeas com 48 e 96 horas de infecção não apresentou diferença significativa. Porém, as fêmeas com 72 horas de infecção apresentaram menor quantidade de ovos. Isso sugere “limite do custo da defesa”. Quando o sistema imunológico é ativado existe a possibilidade de déficit em algumas funções do organismo do inseto, como, por exemplo, a reprodução. Outra hipótese seria o compartilhamento de vias bioquímicas durante o processo de reprodução e defesa;

- Foi possível observar que a diferença de Spz1C entre fêmeas tratadas com fungo e não tratadas aumentou após 24 horas de infecção, apresentando o maior nível de expressão com 48 horas, decrescendo entre o terceiro e quarto dia;
- Um alto nível de expressão de Toll5A foi observado após 24 horas e o contrário pode ser observado com 96 horas, período em que a taxa de sobreviventes começa a decrescer. Esse resultado pode estar relacionado ao fato do mosquito ter sua via imunológica estimulada pela infecção, mas não ter como manter essa atividade por muito tempo já que o sistema digestivo e outros componentes fisiológicos possivelmente estariam comprometidos nesse período de infecção.
- No tratamento na qual as fêmeas foram liberadas no olfatômetro 24h pós-infecção fúngica não foi registrado diferença estatística quando comparado ao controle;
- No teste com olfatômetro verificou-se que das fêmeas com 48 horas de infecção com fungo, 44,4% optaram pela fonte de odor humano e 10,2% não. Comportamento esse que pode ter sido aguçado pela infecção promovida pelo fungo;
- Fêmeas com 72 horas de infecção fúngica, apesar de ativas, apresentaram redução na procura por uma fonte de odor humano.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alves S.B. (1998) Controle Microbiano de Insetos. 2 ed. Piracicaba. 1163p.
- Alvarenga, P.H. (2005) Estudo dos mecanismos de ligação de heme à matriz peritrófica de *Aedes aegypti*. Tese. Pós-graduação em Química Biológica. Universidade Federal do Rio de Janeiro. pa.20-25.
- Antonova, Y., Alvarez, K.S., Kim, Y.J., Kokoza, V., Raikhel, A.S. (2009) The role of NF- $\kappa$ B factor REL2 in the *Aedes aegypti* immune response. Elsevier ed. 39: 303-314.
- Bae, W.S., Choi, M.K. and Lee, W-J. (2010) Dual oxidase in mucosal immunity and host–microbe homeostasis. *Cell*. 31 (2010) 278–287.
- Barbehenn, R.V. & Stannard, J. (2004) Antioxidant defense of the midgut epithelium by the peritrophic envelope in caterpillars. *Journal of Insect Physiology*. Vol.50, pa:783–790.
- Blanford, S., Shi, W., Christian, R., Marden, J.H. Koekemoer, L.L. (2011) Lethal and Pre-Lethal Effects of a Fungal Biopesticide Contribute to Substantial and Rapid Control of Malaria Vectors. *Plos one*. 6 (8): e23591.
- Blanford, S., Chan, B. H. K., Jenkins, N. Sim, D. Turner, R. J., Read, A. F. Thomas, M. B. (2005) Fungal pathogen reduces potential for malaria transmission. *Science* 308: 1638–1641.
- Câmara, F.P., Theophilo, R.L.G., Dos Santos, G.T., Pereira. S.R.F.G., Câmara, D.C.P. & Matos, R.R.C. de (2007) Estudo retrospectivo (histórico) da dengue no Brasil: Características regionais e dinâmicas. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. Ed.40 (2): 192-196.
- Campbell, C.L., Keene. K.M., Branckney, D.E., Olson, K.E., Blair, C.D., Wilusz, J., Foy, B.D. (2008) *Aedes aegypti* uses RNA interference in defense against Sindbis vírus infection. *BMC Microbiology*. ed 47: 1-12.

- Charnley, A.K. (1997) Entomopathogenic fungi and their role in pest control,' in The Mycota IV, eds C.P. Kubicek and I.S. Druzhinina, Berlin: Springer-Verlag pp.185-201.
- Clark, T. B., Kellen, W. R., Fukuda, T., Lindegren. (1968) Field and laboratory studies on the pathogenicity of the fungus *Beauveria bassiana* to tree genera of mosquitoes. Journal of Invertebrate Pathology. 11: 1-7.
- Clements, A.N. (1963) The physiology of mosquitoes. International series of monographs on pure and applied biology. The Macmillan Company – NY. 393p.
- Consoli, R. A. G. B., Pereira, J.P., Da Silveira, J.N., De Castro, M.T.M. (1986) Suscetibilidade de adultos de *Culex quinquefasciatus* Say e *Aedes fluviatilis* (Lutz) (Díptera, Culicidae) a diversos inseticidas em laboratório. Revista Brasileira de Entomologia. 30:79-85.
- Consoli, R. A. G. B., Oliveira R. L. (1998) Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Rio de Janeiro: Fiocruz, 225p.
- Costa, G. L., Moraes, A.M.L., Oliveira, P.C. (1998) Pathogenic action of *Penicillium* species on mosquito vectors of humn tropical diseases. Journal of Microbiology, 38: 337-341.
- Costa, G. L., Moraes, A.M.L., Galvão, C. (2003) Entomopathogenic effect of *Aspergillus giganteus* and *Penicilium corylophilum* on two triatomine vectors of Chagas disease. Journal Basic Microbiology, 43 (1):3-7.
- Cruz, C.R. (2006) Comitê Infectologia Sociedade Paranaense de Pediatria. Publicado no (a): [www.spp.org.br/dengue.asp](http://www.spp.org.br/dengue.asp). Acessado: 04/10/10
- Daoust, R. A., Roberts, D. W. (1982) Virulence of Natural and Insect-Passaged strains of *Metarhizium anisopliae* to Mosquito Larvae. Journal of Invertebrate Pathology, 40: 107-117.
- Darbro, J., Johnson, P., Thomas, M., Ritchie, S., Kay, B & Ryan, P. (2012) Effects of *Beauveria bassiana* on Survival, Blood-Feeding Success and Fecundity of *Aedes aegypti* in Laboratory and Semi-field Conditions. *American Journal of Tropical Medicine & Hygiene*.
- Dong, Y., Morton Jr. J.C., Ramirez, J.L., Souza-Neto, J.A. & Dimopoulos, G. (2012) The entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* activate toll and JAK-STAT pathway-controlled effector genes and anti-dengue activity in *Aedes aegypti*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* .42 (2012) 126e132
- Dunn, P.E. (1986) Biochemical aspects of insect immunity. Annual. Review of Entomology, 31: 321-339.

- Edman, J.D., Strickman, D., Kittayapong, P., Scott, T.W. (1992) Female *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Thailand rarely feed on sugar. *J. Med. Entomol.*, 29: 1035–1038.
- Eiras, A.E. & Jepson, P.C. (1991) Host-location by *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): a wind tunnel study of chemical cues. *Bull Entomol Res*; 81:151-60.
- Ferron. P. (1978) Biological control of insect pests by entomogenous fungi. *Annual Review of Entomology*, 23:409-442.
- French-Constant, R. H. (2005) Something old, something transgenic, or something fungal for mosquito control. *Ecology and Evolution* 20: 577-579.
- Franz, A.W., Sanchez-Vargas, I., Adelman, Z.N., Blair, C.D., Beaty, B.J., James, A.A., Olson, K.E. (2006) Engineering RNA interference-based resistance to dengue virus type 2 in genetically modified *Aedes aegypti*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103 (11): 4198-4203.
- Fundação Nacional de Saúde (2001) Dengue Instruções de Combate ao vetor. Manual de Normas Técnicas. Ministério da Saúde, Brasília, Brasil.
- Garcia, M.V., Monteiro, A.C., Szabo, M.J.P., Prette, N. & Bechara, G.H. (2005) Mechanism of infection and colonization of *Rhipicephalus sanguineus* eggs by *Metharizium anisopliae* as revealed by scanning electron microscopy and histopathology. *Brazilian Journal of Microbiology*. 36: 368-372.
- George, J., Blanford, S., Domingue, M.J., Thomas, M.B., Read, A.F. & Baker, T.C. (2011) Reduction in host-finding behaviour in fungusinfected mosquitoes is correlated with reduction in olfactory receptor neuron responsiveness. *Malaria journal*. 10:219.
- Goettel, M.S., Johnson, D.L., Inglis, G.D. (1995) The role of fungi in the control of grasshoppers. *Canadian Journal of Botany*, 73:71-75.
- Goettel, M.S. (1988) Pathogenesis of the Hyphomycete *Tolypocladium cylindrosporum* in the mosquito *Aedes aegypti*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 51, 259-274.
- Guia Brasileiro de Vigilância Epidemiológica (2007). Brasília: Fundação Nacional de Saúde.
- Hagedorn, H.H., O'Connort, J.O., Fuchst, M.S.;Becky, S., Schlaegers, D.A., Bohn, M.K. (1975) The ovary as a source of  $\alpha$ -ecdysone in an adult mosquito. *Science*. 72: (8) 3255-3259.
- Harrington, L.C., Edman, J.D. & Scott, T.W. (2001) Why do female *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) feed preferentially and frequently on human blood? *Soc. Entomol. Of Am.v.38*. pa: 411-422.
- Hillyer, J.F. (2010) Mosquito Immunity. *Invertebrate Immunity*, Vol.1, pa. 218-238.

- Hillyer, J.F & Christensen, B.M. (2005) Mosquito phenoloxidase and defensin colocalize in melanization innate immune responses. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, Vol. 53(6): 689–698.
- Janeway, C.A., Travers, P., Walport, M., Shlomchik, M. (2002) *Imunobiologia. O sistema imune na saúde e na doença*. 5.ed. Porto Alegre: Artmed, 762p
- Junqueira, L.C. & Carneiro, J. (2000) *Biologia Celular e Molecular*. Guanabara Koogan. Ed. 7: 302-315.
- Kaur, J. S., Lai, Y. L., Giger, A. D. (2003) Learning and memory in the mosquito *Aedes aegypti* shown by conditioning against oviposition deterrence. *Medical and Veterinary Entomology*, 17: 457-460.
- Lacey, C. M., Lacey, L. A., Roberts, D. R. (1987) Route of invasion and histopathology of *Metharizium anisopliae* in *Culex quinquefasciatus*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 52: 108-118.
- Lee, S.Y. & Söderhäll, K.; (2002) Early events in crustacean innate immunity.
- Leathers, T.D., Subhash, C.G. & Alexander, N.J. (1993) Mycopesticides: Status, challengers and potencial. *Journal of Microbiology*, 12:69-75.
- Li, H., Li, W.W., Ding, S.W. (2002) Induction and suppression of RNA silencing by an animal virus. *Science* 296, 1319-1321.
- Lin, C.C., Chou, C.M., Hsu, Y.L., Lien, J.C., Wang, Y.M., Chen S.T., Tsai, S.C., Hsiao, P.W., Huang, C.J. (2004) Characterization of two mosquito STAT, AaSTAT e CtSTAT, differential regulation of tyrosine phosphorylation and DNA binding activity by lipopolysaccharide treatment and by Japanese encephalitis virus infection. *Biol Chem*. 279 (5): 3308-3317.
- Lowenberger, C. (2001) Innate immune response of *Aedes aegypti*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 31 (2001) 219–229
- Lukashevich, E. D. & Mostovski, M. B. (2001) Hematophagous Insects in the Fossil Record. *Paleontological Journal*, Vol. 37, pp. 153–161.
- Luna, C., Hoa, N.T., Zhang, J., Kanzok, S.M., Brown †, J., Imlert‡, J.-L., Knudson†, D.L. & Zheng, L. (2003) Characterization of three Toll-like genes from mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Molecular Biology*. Ed.12 (1): 67-74.
- Luo, T., Zhang, X., Shao, Z., Xu, X. (2003) PmAV, a novel gene involved in virus resistance of shrimp *Penaeus monodon*. *FEBS Letters*, v.551, p.53-57.
- Luz, C., Silvia, I.G., Magalhães, B. P., Cordeiro, C.M.T., Tigano, M.S. (1999) Control of *Triatoma infestans* (Krug) (Reduviidar: Triatominae) with *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill.: Preliminary Assays on Formulation and Application in the Field. *Anais Sociedade de Entomologia Brasileira* 28:101-110.
- Machado, P.R.L., Araújo, M.I.A.S., Carvalho, L., Carvalho, E.M. (2004) Mecanismos de resposta imune às infecções. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v.79, n.6, p.647-664.

- Messias, C.L. (1989) Fungos: sua utilização para controle de insetos de importância médica e agrícola. Instituto Oswaldo Cruz, 84: 57-59.
- Mnyone, L.L., Kirby, M.J., Mpingwa, M.W., Lwetoijera, D.W., Knols, B.G.J., Takken, W., Koenraadt, C.J.M. & Russel, T.L. (2011) Infection of *Anopheles gambiae* mosquitoes with entomopathogenic fungi: effect of host age and blood-feeding status. *Parasitol Res.* 108:317-322.
- Moinho Jr., A., Alves, S.B., Lopes, R.B., Neves, P.M.O.J., Pereira, R.M. & Vieira, S.A. (2002) External development of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in the subterranean Termite *Heterotermes tenuis*. *Scientia Agricola*, v.59, n.2, p.267-273.
- Moraes, A.G.M.L., Costa, G.L., Barcelos, M.Z.C., Oliveira, R.L., Oliveira, P.C (2001) The entomopathogenic potential of *Aspergillus* ssp, In mosquitoes vectors of tropical diseases. *Journal of Basic Microbiology*, 1:45-49.
- Mota, R.N. (2003) Construção de um olfatômetro de dupla escolha para estudos de orientação de fêmeas grávidas de *Aedes Aegypti* (Linnaeus, 1792) (Díptera: Culicidae) à atraentes de oviposição. MSc Dissertation, Universidades Federal de Minas Gerais, Brazil.
- Oliveira, J.H.M., Renata, Renata, R.L.S., Lara, F.A., Dias, F.A., Gandara, A.C.P., Menna-Barretos, R.F.S., Edwards, M.C., Laurindo, F.R.M., Silva-Neto, M.A.C., Sorgine, M.H.F., Oliveira, P.L. (2011) Blood meal-derived heme decreases ROS levels in the midgut of *Aedes aegypti* and allows proliferation of intestinal microbiota. *Plos pathogens*. 7(3), pa. 1-14.
- Pal, S., Leger, R.J.St. & Wu, L.P. (2006) Fungal peptide Destruxin A plays a specific role in suppressing the innate immune response in *Drosophila melanogaster*. *J. Biol. Chem.* v.282, pa. 8969-8976.
- Paula, A.R. Brito, E.S., Pereira, C.R., Carrera, M.P. Samuels, R.I. (2008) Susceptibility of adult *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) to infection by *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*: Prospects for Dengue vector control. *Biocontrol Science and Technology* 18, 1017-1025.
- Paula, A. R., Carolino, A. T., Silva, C. P., Samuels, R. I. (2011) Susceptibility of adult females *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) to the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* is modified following blood feeding. *Parasites & Vectors* 4 (91): 2-7.
- Paula, C.O. (2010). Resistência de larvas de *Aedes Aegypti* ao temefos e interação do larvicida com o fungo Entomopatogenico *Metarhizium Anisopliae*. *Dissertação mestrado – UENF*, 74 pa.
- Price, D.P., Nagarajan, V., Churbanov, A., Houde, P., Milligan, B., Drake, L. L., Gustafson, J. E. & Hansen, I. A. (2011) The fat body transcriptomes of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*, pre- and post- blood meal. *Plos one*. V.6. pa. 1-13.

- Reithinger, R., Davies, C.R., Cadena, H., Alexander, B. (1997) Evaluation of the fungus *Beauveria bassiana* as a potential biological control agent against Phebotomine sand flies in Colombian coffee plantations. *Journal of Invertebrate Pathology*, 70: 131-135.
- Riba, G.; Keita, A., Soares, G.G. Jr. And Ferron, P. (1986) Comparative studies for *Metarhizium anisopliae* and *Tolypocladium cylindrosporum* as pathogens of mosquito larvae. *Journal of Mosquito Control*, 2:469-473.
- Rodrigues, P.M.M. (2006) Escola de Saúde pública do Ceará. [www.esp.ce.gov.br/espce/paginas/saude/dengue/index.asp](http://www.esp.ce.gov.br/espce/paginas/saude/dengue/index.asp).
- Roitt, I., Brostoff, J., Male, D. (2003) *Imunologia* 6.ed. Barueri: Manole,. 481p.  
Sabin AB. Research on dengue during World War II. *Am J Trop Hyg* 1952; 1: 30-50.
- Ryu, J-H., Ha, E-M., Oh, C-T., Seol, J-H., Brey, P.T., Jin, I., Lee, D.G., Kim, J., Lee, D. and Lee, W-J. (2006) An essential complementary role of NF- $\kappa$ B pathway to microbicidal oxidants in *Drosophila* gut immunity. *The EMBO Journal*. 25, 3693–3701.
- Sanchez-Vargas, I., Travanty, E.A., Keene, K.M., Franz, A.W.E., Beaty, B.J., Blair, C.D. & Olson, K.E. (2004) RNA interference, arthropod-borne viruses, and mosquitoes. *Elsevier/Virus Research*. Vol.102, pa: 65–74.
- Scott, T.W., Naksathit, A., Day, J.E., Kittayapong, P., Edman, J. (1997) A fitness advantage for *Aedes aegypti* and the viruses it transmits when females feed only on human blood. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 57(2), pa :235-239.
- Schmid-Hempel, P. (2005) Evolutionary ecology of insect immune defenses. *Annu. Rev. Entomol.* 50:529–51
- Scholte, E. J., Takken, W., Knols, B. G. J. (2007) Infection of adult *Aedes aegypti* and *Ae. Albopictus* mosquitoes with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Acta Tropica*. 102:151-158.
- Scholte, E., Knols, B. G., Takken, W. (2004) Autodissemination of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* amongst adults of the Malaria vector *Anopheles gambiae*. *Malaria Journal* 3: 1-6.
- Scholte, E., Ng`habi, K., Kihonda, J., Takken, W., Paaijmans, K., Abdula, S., Killeen, G. F., Knols, B. G. J. (2005) An entomopathogenic fungus for control of adult African malaria mosquitoes. *Science*, 308: 1641– 642.
- Souza-Neto, J.A., Sim, S. & Dimopoulos, G. (2009) An evolutionary conserved function of the JAK-STAT pathway in anti-dengue defense. *PNAS*. Vol.106, nº42, pa: 17841-17846.

- Styer, L.M., Minnick, S.L., Sun, A.K. & Scott, T.W. (2007) Mortality and reproductive dynamics of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) fed human blood. *Vector-borne and Zoonotic diseases*. v.7, 1:86-99.
- Severino, A.A., Pacca, C.C., Bronzoni, R.V.M., Nogueira, M.L. (2007) Interferência de RNA inibe a replicação do vírus da Febre Amarela *in vitro* e *in vivo*. 53° Congresso Brasileiro de Genética. V. 53, p.60.
- Shin, S.W. Bian, G. & Raikhel, A.S. (2006) A Toll Receptor and a Cytokine, Toll5A and Spz1C, Are Involved in Toll Antifungal Immune Signaling in the Mosquito *Aedes aegypti*. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 281: 39388-39395.
- Silverman, N. & Maniatis, T. (2001) NF- $\kappa$ B signaling pathways in mammalian and insect innate immunity. *Genes & Development*. Vol.15, pa: 2321-2348.
- Sim, S. & Dimopoulos, G. (2012) Dengue Virus Infection of the *Aedes aegypti* Salivary Gland and Chemosensory Apparatus Induces Genes that Modulate Infection and Blood-Feeding Behavior. *Plos Pathogens*. V.8, p. 1-13.
- Sim, S. & Dimopoulos, G. (2010) Dengue Virus Inhibits Immune Responses in *Aedes aegypti* Cells. *Plos one*, v.5, p.1-9.
- Tauil, P.L. (2002) Aspectos críticos do controle do dengue no Brasil. *Cad Saúde Pública*, v.18, n.3, p.867-871
- Vianna, M. S. R. (2001) A transmissão urbana da febre amarela e dengue. *Saúde Rio*. Rio de Janeiro. 5p.
- Vieira, L.P, Samuels, R.I., Paula, C.O., Paula, A.R. & Da Mata, R.A. (2011) Desenvolvimento externo do fungo entomopatógeno *Metarhizium Anisopliae* em larvas e adultos do mosquito *Aedes Aegypti*. *Simpósio de Controle Biológico*.
- Xi, Z., Ramirez, J.L., Dimopoulos, G. (2008) The *Aedes aegypti* Toll Pathway Controls Dengue Virus Infection. *Plos pathogens*, v.4, p.1-12.
- Weber, A.N.R., Tauszig-Delamasure, S., Hoffmann, J.A., Lelievre, E., Gascan, H., Ray, K.P., Morse, M.A., Imler, J.L. & Gay, N.J. (2003) Binding of the *Drosophila* Cytokine SpTzlle to Toll is direct and establishes signaling. *Nature immunology*. Vol.4, nº8, pa: 794-800
- Wu, J.L., Nishioka, T., Mori, K., Nishigawa, T., Muroga, K. (2002) A time-course study on the resistance of *Penaeus japonicus* induced by artificial infection with white spot syndrome virus. *Fish & Shellfish Immunology*, v.13, p.391-403.