

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA – INPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENTOMOLOGIA

**“Distribuição e diversidade de *Wolbachia* (Rickettsiales, Rickettsiaceae)
em mosquitos (Diptera, Culicidae) no Estado do Amazonas e o efeito do
tratamento com tetraciclina em populações de *Aedes albopictus* Skuse,
1894 mantidas em laboratório”**

Ricardo Augusto dos Passos

Ricardo Augusto dos Passos

**“Distribuição e diversidade de *Wolbachia* (Rickettsiales, Rickettsiaceae)
em mosquitos (Diptera, Culicidae) no Estado do Amazonas e o efeito do
tratamento com tetraciclina em populações de *Aedes albopictus* Skuse,
1894 mantidas em laboratório”**

Orientador: Dr. Wanderli Pedro Tadei

Tese apresentada ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Ciências Biológicas - Área de Concentração em Entomologia.

MANAUS – AMAZONAS

Abril/2011

BANCA EXAMINADORA

Dr. Luciano Andrade Moreira

Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas René Rachou, Laboratório de Malária – FIOCRUZ/CPRR.

Dra. Vera Margarete Scarpassa

Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Coordenação de Pesquisas em Entomologia, Laboratório de Genética e Evolução de Anofelinos Neotropical – INPA/CPEN.

Dr. Delsio Natal

Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública, Departamento de Epidemiologia – USP/FSP.

Dra. Beatriz Ronchi Teles

Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Coordenação de Pesquisas em Entomologia. Laboratório de Entomologia Agrícola – INPA/CPEN.

Dra. Roseli La Corte dos Santos

Universidade Federal de Sergipe, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde – UFS/CCBS.

Dr. Mauro Toledo Marrelli

Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública, Departamento de Epidemiologia – USP/FSP.

Dr. Sergio Luiz Bessa Luz

Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Leônidas Maria Deane, Laboratório de Biodiversidade – FIOCRUZ/CPLMD.

FICHA CATALOGRÁFICA

P2889 Passos, Ricardo Augusto dos
Distribuição e diversidade de *Wolbachia* (Rickettsiales, Rickettsiaceae) em mosquitos (Diptera, Culicidae) no Estado do Amazonas e o efeito do tratamento com tetraciclina em populações de *Aedes albopictus* Skuse, 1894 mantidas em laboratório/ Ricardo Augusto dos Passos. ---Manaus: [s.n.], 2012.
XV, 78 f.: il. color.

Tese (doutorado) --- INPA, Manaus, 2012
Orientador: Wanderli Pedro Tadei
Área de concentração: Entomologia

1. *Wolbachia*. 2. Mosquitos. 3. Culicidae – Amazônia. 4. Distribuição. 5. Diversidade. 6. *Aedes albopictus*. I. Título.

CDD 19. ed. 595.77

SINOPSE

Para nortear a falta de conhecimento sobre a presença de *Wolbachia* em culicídeos distribuídos no Brasil, foram examinados diferentes taxa de mosquitos encontrados na região Amazônica, para a infecção destes por *Wolbachia* por meio da PCR. Foi dado enfoque aos taxa de importância primária como vetor ou espécie praga. Foi registrada pela primeira vez a infecção no gênero *Anopheles*. *Aedes albopictus* é considerado vetor secundário do vírus do dengue e em relação à infecção por *Wolbachia* e, se mostrou altamente infectado. O efeito do tratamento com tetraciclina em colônias de laboratório mostrou alterações em parâmetros adaptativos da espécie.

Palavras-chave: 1. *Wolbachia* 2. Mosquitos 3. Culicidae 4. Distribuição 5. Diversidade 6. *Aedes* 7. Amazônia

DEDICATÓRIA

"À minha Mãe,

María Lúcia (in memoriam),

Todo meu amor e apreço,

Toda glória divina,

A tí, agradeço"

"Ao meu Pai Sr. Didi e à minha família

Que sempre

Incentiva-me a lutar

e conquistar os meus

Ideais"

"À minha esposa

Elizabete

Pelo amor dedicado e

Incentivo constante.

Te amo!"

AGRADECIMENTOS

- 👉 Ao Dr. Wanderli Pedro Tadei pela orientação, pela amizade dispensada, pela confiança depositada e por tornar possível a realização deste estudo.
- 👉 Ao CNPq pela bolsa de estudo concedida durante o primeiro ano do curso, tornando possível a realização desta pesquisa.
- 👉 Às entidades financiadoras CNPq/FAPEAM/PRONEX REDE MALÁRIA, PIATAM, CTPETRO, PETROBRAS;
- 👉 A Fundação de Vigilância em Saúde do Amazonas – FVS/AM pela liberação do trabalho e incentivo ao término desta tese.
- 👉 Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA, por ceder toda a sua estrutura para a realização deste trabalho.
- 👉 Ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia (DCEn -INPA), pelo aprendizado de excelente qualidade e, pela oportunidade de conviver com excelentes pesquisadores, professores, funcionários e amigos.
- 👉 À Coordenação de Pesquisas em Ciências da Saúde – (CPCS -INPA) pela atenção deliberada durante a realização das atividades no Laboratório de Malária e Dengue.
- 👉 À Dra. Izeni Pires Farias, do LEGAL/UFAM, por permitir e tornar possível o sequenciamento das amostras no seu laboratório.
- 👉 Aos amigos e pesquisadores Flávio Augusto “Guto” e Victor Landeiro “Vitão” pelo auxílio nas análises estatísticas sempre enriquecendo a discussão do trabalho.
- 👉 Ao compadre Mario Henrique pelo auxílio na elaboração e correção do abstract.
- 👉 A Dra. Iléa Brandão Rodrigues pela ajuda nas atividades de laboratório e de campo, e pela amizade sincera.
- 👉 A todos os funcionários do Laboratório de Malária e Dengue, pelo auxílio nos momentos necessários durante a realização das atividades.
- 👉 Ao Carlos, Rosely e Gervilane por prontamente esclarecer dúvidas relacionadas aos mosquitos e pela identificação dos espécimes, e ao Juraci pelo auxílio com as substâncias químicas.
- 👉 Em especial a Adelina e Zilá, por tornar os dias difíceis em simples momentos de alegria.

- 👉 Ao amigo Renato Ramos, da Fundação de Vigilância em Saúde (FVS/AM) pelo auxílio na confecção do mapa e fotos de satélite com os pontos de coleta.
- 👉 À Waléria, Monique e Joaquim pelo auxílio nas atividades moleculares, além dos momentos de alegrias e tristezas.
- 👉 À Jussara, minha estagiária voluntária, que se dedicou em me ajudar e com certeza sem essa ajuda não teríamos alcançado os resultados esperados.
- 👉 Aos amigos da república que Letícia, Mário e Gordo pelo excelente convívio durante os anos em que convivemos, dividindo os momentos sempre com muita cultura, conhecimento e muitos momentos familiares.
- 👉 Aos meus familiares, que mesmo distante sempre me enviaram energias positivas, rezaram e nunca perderam a Fé em Deus de que no final todo sacrifício valeria a pena.
- 👉 À minha esposa, pelo auxílio no sequenciamento das amostras, discussões sobre o trabalho, pelo incentivo constante e incansável (muitas madrugadas no laboratório) e, principalmente pelo amor dedicado, mesmo quando eu estava ausente. Amo-te sempre!
- 👉 Ao Criador, Deus, de todos os seres que fazem da VIDA um enigma, apaixonante e ao mesmo tempo desconcertado, mas que fascina aos olhos dos mais atentos.
- 👉 À todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para o meu aperfeiçoamento profissional (antes, durante e sempre).

*“Só quero decifrar
o mistério da
transmissão da vida
de uma geração
para outra”*

Gregor Mendel

RESUMO

Passos, R. A. **Distribuição e diversidade de *Wolbachia* (Rickettsiales, Rickettsiaceae) em mosquitos (Diptera, Culicidae) no Estado Amazonas e o efeito do tratamento com tetraciclina em populações de *Aedes albopictus* Skuse, 1894 mantidas em laboratório.** Manaus 2011. [Tese de Doutorado – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia]

O principal objetivo foi determinar a ocorrência da infecção por *Wolbachia* em diversos taxa de mosquitos coletados no Estado do Amazonas, e analisar o efeito do tratamento com tetraciclina nas características de vida de *Aedes albopictus* em condições de laboratório. Os mosquitos foram coletados nos municípios de Manaus, Rio Preto da Eva, São Gabriel da Cachoeira, Presidente Figueiredo e nas áreas de monitoramento do Projeto PIATAM, Gasoduto – Coari-Manaus, Gasoduto – Juruá-Urucu e BR 319. As coletas foram realizadas utilizando-se armadilhas luminosas tipo CDC e, coletas de larvas em ambiente urbano. A análise dos mosquitos infectados por *Wolbachia* foi realizada por meio da técnica molecular de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e as amostras positivas foram sequenciadas para confirmação da infecção pela bactéria e identificação dos subgrupos. Foi analisado um total de 1.056 indivíduos representando 39 espécies e 11 gêneros de culicídeos. Do total de indivíduos analisados, 25,18% foram positivos para a infecção por *Wolbachia*. Considerando o total de espécies examinadas, 61,5% foram positivas para *Wolbachia*, sendo que 22 destas espécies não foram descritas anteriormente infectadas pela bactéria e este é o primeiro registro destas espécies infectadas por *Wolbachia* no Brasil. Este também é o primeiro registro de espécies de *Anopheles* infectadas por *Wolbachia*. A positividade média de infecção foi de 30,4%, com uma variação entre as espécies de 1,2% a 100%. Entre as espécies, *A. albopictus* e *C. quinquefasciatus* foram as que apresentaram as maiores frequências dentre as infectadas, com 79,1% e 64,6%, respectivamente. A classificação de *Wolbachia* dentro dos maiores grupos A e B mostraram que 19 das 24 espécies positivas foram infectados somente com bactérias do grupo A, seis espécies com bactérias do grupo B e uma com ambos os grupos A e B, representada pela espécie *A. albopictus*. Analisando o efeito do tratamento com tetraciclina em *A. albopictus* verificou-se uma redução na frequência de fêmeas ovipositoras. As fêmeas tratadas com antibiótico produziram menos ovos do que não tratadas. Verificou-se um percentual baixo de taxa de eclosão das larvas. A mortalidade das larvas foi maior entre as fêmeas não tratadas. O tempo de desenvolvimento até pupa foi similar em todas as comparações entre os cruzamentos, sendo ligeiramente maior no cruzamento entre fêmeas e machos tratados. A proporção de fêmeas e machos sobreviventes foi muito semelhante em todos os cruzamentos realizados. Os dados indicam a ocorrência de incompatibilidade citoplasmática na população de *A. albopictus* de Manaus.

ABSTRACT

Passos, R. A. **Distribution and diversity of *Wolbachia* (Rickettsiales, Rickettsiaceae) in mosquitoes (Diptera, Culicidae) in Amazonas State and the effect of treatment with tetracycline in populations of *Aedes albopictus* Skuse, 1894 reared in the laboratory.** Manaus 2011. [PhD Thesis - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA]

The main objective was to estimate the occurrence of *Wolbachia* in mosquitoes from several places of the Amazonas State, and to analyze the effect of bacteria on the life characteristics of *Aedes albopictus* under laboratory conditions. The mosquitoes were collected in Manaus, Rio Preto da Eva, São Gabriel da Cachoeira, Presidente Figueiredo cities and along of the Coari-Manaus and Coari-Juruá Pipeline and BR 319 highway areas. Mosquitoes samples were collected using CDC light traps and larvae were collected in urban environment. The analysis of *Wolbachia*-infected mosquitoes was done by Polymerase Chain Reaction (PCR). To confirm infection by bacteria and identification of subgroups positive samples were sequenced. A total of 1,056 individuals representing 39 species and 11 genera of mosquitoes were analyzed. *Wolbachia* was found in 25.18% of the individuals and in 61.5% of the species. This is the first record of *Wolbachia* in 22 species of mosquitoes from Brazil. Furthermore, this is the first record of *Anopheles* infected species by *Wolbachia*. The infection rate was 30.4%, varying among species from 1.2% to 100%. *A. albopictus* and *C. quinquefasciatus* showed the highest frequencies of the infected species, 79.1% and 64.6% respectively. The classification of *Wolbachia* into major groups A and B showed that 19 of species were infected just with bacteria of group A, six with group B, and one with both groups A and B. Analyzing the effect of treatment with tetracycline in *A. albopictus* there was a reduction in the female ovipositor frequency. The antibiotic-treated females produced fewer eggs than untreated. There were a low percentage of larvae hatching rate. Larval mortality was higher among the untreated females. Pupal development time was similar in all crosses, being slightly higher in crosses between females and males treated. The female and male proportion was similar in all the crosses. The occurrence of cytoplasmic incompatibility in *A. albopictus* populations from Manaus was verified.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	XIII
LISTA DE FIGURAS	XIV
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. MOSQUITOS DE IMPORTÂNCIA MÉDICA	3
1.1.1. PRINCIPAIS ESPÉCIES DO GÊNERO <i>Aedes</i> MEIGEN.....	3
1.1.2. PRINCIPAIS ESPÉCIES DO GÊNERO <i>Anopheles</i> (MEIGEN)	6
1.2. BIOLOGIA DE <i>Wolbachia</i> (RICKETTSIALES).....	8
1.3. DISTRIBUIÇÃO E DIVERSIDADE DE <i>Wolbachia</i>	9
1.4. EFEITOS DE <i>Wolbachia</i> EM DIPTERA (CULICIDAE)	11
2. OBJETIVOS	14
2.1. GERAL.....	15
2.2. ESPECÍFICOS	15
3. MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1. DISTRIBUIÇÃO E DIVERSIDADE DE <i>Wolbachia</i> EM MOSQUITOS.....	17
3.1.1. DESCRIÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO.....	17
3.1.2. ANÁLISE DOS MOSQUITOS PELA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR).....	21
3.1.3. EXTRAÇÃO DO DNA	21
3.1.4. REAÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO.....	23
3.1.5. INICIADORES DE SEQUÊNCIA UTILIZADOS	24
3.1.6. VISUALIZAÇÃO	25
3.1.7. PURIFICAÇÃO DO PRODUTO AMPLIFICADO DA PCR.....	25
3.1.8. REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO.....	26
3.1.9. PRECIPITAÇÃO DO PRODUTO DE REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO	26
3.1.10. ALINHAMENTO E EDIÇÃO DAS SEQUÊNCIAS.....	27

3.1.11. ANÁLISE DOS DADOS.....	27
3.2. EFEITO DO TRATAMENTO COM TETRACICLINA NA INFECÇÃO POR <i>WOLBACHIA</i> EM <i>AEDES ALBOPICTUS</i>	27
3.2.1. MANUTENÇÃO DE COLÔNIA DE <i>A. ALBOPICTUS</i> NÃO INFECTADA POR <i>WOLBACHIA</i>	27
3.2.2. MANUTENÇÃO DE COLÔNIA DE <i>A. ALBOPICTUS</i> INFECTADA POR <i>WOLBACHIA</i>	28
3.2.3. DESENHO EXPERIMENTAL	29
3.2.4. COLETA E ANÁLISE DOS DADOS	30
4. <i>RESULTADOS</i>	31
4.1. DISTRIBUIÇÃO E DIVERSIDADE DE <i>WOLBACHIA</i> EM MOSQUITOS.....	32
4.2. EFEITO DO TRATAMENTO COM TETRACICLINA EM <i>AEDES</i> <i>ALBOPICTUS</i>	41
4.2.1. FECUNDIDADE.....	42
4.2.2. LONGEVIDADE.....	45
4.2.3. FREQUÊNCIA SEXUAL.....	48
5. <i>DISCUSSÃO</i>	50
6. <i>CONCLUSÃO</i>	64
7. <i>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</i>	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Componentes da reação de PCR.....	23
Tabela 2. Iniciadores de sequência utilizados para reação de PCR.....	25
Tabela 3. Componentes da reação de sequenciamento.	26
Tabela 4. Desenho esquemático do experimento de cruzamentos entre fêmeas e machos infectados e não infectados por <i>Wolbachia</i>	29
Tabela 5. Presença de <i>Wolbachia</i> determinada pela amplificação do gene <i>wsp</i> de <i>Wolbachia</i> via PCR, em espécies de mosquitos adultos coletados no Estado do Amazonas, Brasil.	35
Tabela 6. Relação do primeiro registro de espécies de mosquitos infectadas por <i>Wolbachia</i> , determinada pela amplificação do gene <i>wsp</i> grupo <i>A</i> e <i>B</i> por meio do semi-nested PCR, coletados no estado do Amazonas, Brasil.	40
Tabela 7. Dados descritivos da média de ovos por fêmea em cada cruzamento realizado..	44
Tabela 8. Resultados da análise de variância (ANOVA) sobre o efeito do cruzamento entre indivíduos tratados e não tratados na frequência média de ovos por fêmea.	44
Tabela 9. Resultados da análise de variância (ANOVA) sobre o efeito do cruzamento entre indivíduos tratados e não tratados no número total de pupas.....	47
Tabela 10. Frequência média de ovos e pupas resultante dos diferentes cruzamentos realizados. Legenda: FT = fêmeas tratadas; FNT = fêmeas não tratadas; FMNT = fêmeas e machos tratados; FMT = fêmeas e machos tratados; MNT = machos não tratados; MT = machos tratados.	47

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Mapa do estado do Amazonas com a localização geográfica das áreas de coleta. 20
- Figura 2. Gel de agarose 1% para verificação de extração do DNA genômico. 22
- Figura 3. Gel de agarose (1%) dos produtos de PCR para o gene *wsp* nas diferentes espécies de mosquitos. Legenda: M – marcador de peso molecular (100pb, Invitrogen); 1 – *A. serratus*; 2 – *A. hortator* ; 3 – *A. squamipennis*; 4 – *C. coronator* ; 5 – *C. juxtamansonia*; 6 – *C. quinquefasciatus*; 7 – Controle negativo ; 8 – Controle positivo (*A. albopictus*). 33
- Figura 4. Gel de agarose (1%) dos produtos de PCR para o gene *wsp* nas diferentes espécies de mosquitos. Legenda: M – marcador de peso molecular (100pb, Invitrogen); 1 – *C. venezuelensis*; 2 – *M. amazonensis*; 3 – *M. humeralis*; 4 – *M. titilans*; 5 – *P. albipes*; 6 – *P. cingulata*; 7 – *P. circumflava*; 8 – *P. ferox*; 9 – *U. calosomata*; 10 – Controle negativo; 11 – Controle positivo (*A. albopictus*). 33
- Figura 5. Gel de agarose (1%) dos produtos de PCR para o gene *wsp* nas diferentes espécies de *Anopheles*. Legenda: M – marcador de peso molecular (100pb, Invitrogen); 1 – *A. darlingi*; 2 – *A. oswaldoi*; 3 – Controle negativo; 4 – *A. albitarsis*; 5 – Controle positivo (*A. albopictus*); 6 – *A. matogrossensis*; 7 – *A. nimbus*; 8 – *A. triannulatus*; 9 – *A. shannoni*; 10 – *A. nuneztovari*; 11 – *A. squamifemur*; 12 – *A. medipunctatus*. 34
- Figura 6. Gel de agarose (1%) dos produtos de PCR para o gene *wsp* A e B em *Aedes albopictus*. Legenda: M – marcador de peso molecular (100pb, Invitrogen); 1 e 2 – amplificação dos grupos A e B (infecção dupla); 3 e 4 – amplificação do grupo A; 5 e 6 – amplificação do grupo B. 34
- Figura 7. Gráfico da porcentagem de infecção de *Wolbachia* nas diferentes espécies de mosquitos, por local de coleta. 38

Figura 8. Efeito do cruzamento entre indivíduos tratados e não tratados na frequência de fêmeas ovipositoras após os cruzamentos realizados entre: fêmeas tratadas (FT) e machos não tratados com tetraciclina; fêmeas não tratadas (FNT) e machos tratados; fêmeas e machos não tratados (FMNT) e, fêmeas e machos tratados (FMT).	42
Figura 9. Efeito do cruzamento entre indivíduos tratados e não tratados na frequência média de ovos por fêmea. Legenda: FT = cruzamento entre fêmeas tratadas com tetraciclina e machos não tratados; FNT = cruzamento entre fêmeas não tratadas e machos tratados com tetraciclina; FMNT = cruzamento entre fêmeas e machos não tratados; FMT = cruzamento entre fêmeas e machos tratados com tetraciclina.....	43
Figura 10. Efeito do cruzamento entre indivíduos tratados e não tratados no percentual de viabilidade dos ovos nos diferentes cruzamentos.	45
Figura 11. Efeito do cruzamento entre indivíduos tratados e não tratados na mortalidade de larvas.	46
Figura 12. Efeito do cruzamento entre indivíduos tratados e não tratados no número total de pupas.....	46
Figura 13. Efeito do cruzamento entre indivíduos tratados e não tratados no tempo de desenvolvimento de larvas até pupa.	47
Figura 14. Efeito do cruzamento entre indivíduos tratados e não tratados na frequência sexual.....	48
Figura 15. Número de alados emergidos nos diferentes cruzamentos, segundo o sexo e em função do tempo. A – Cruzamento de fêmeas tratadas e machos não tratados (FT); B – Cruzamento de fêmeas não tratadas e machos tratados (FNT); C – Cruzamento de fêmeas e machos não tratados (FMNT); D – Cruzamento de fêmeas e machos tratados (FMT).....	49

1. Introdução

Os insetos constituem o maior e o mais bem sucedido grupo dentre os artrópodes. Razão para este sucesso é atribuído à alta taxa de reprodução, à habilidade de se adaptar em diversas condições ambientais e à acessibilidade destes a uma variada fonte de alimentação (Forattini, 2002). Muitos estudos em entomologia têm focado diferentes campos de pesquisa como genética, biologia evolutiva, sistemática, ecologia e zoologia aplicada devido à grande importância médico-veterinária e agrícola de diversas espécies (Scott, 1980).

Alguns grupos de insetos são conhecidos pela maioria das pessoas como causadores de incômodo. Eles sugam sangue e podem transmitir aos humanos e outros animais vários patógenos causadores de doenças. Dentro da temática da entomologia médica, certamente são os mosquitos (Diptera, Culicidae) os que mais têm atraído atenção da saúde pública. Provavelmente, pelo fato destes organismos estarem envolvidos na transmissão de múltiplas infecções ao homem e aos animais domésticos, incluindo vírus, bactérias, protozoários e nematódeos (Forattini, 2002). Além disso, em situações frequentes, atuam como insetos particular e persistentemente irritantes. Sua sistemática foi estudada não somente em nível morfológico tradicional, mas também com a utilização em alguns grupos para análises genéticas de técnicas moleculares e citológicas (Bullini e Coluzzi, 1978).

Os mosquitos pertencem à ordem Diptera, subordem Nematocera e família Culicidae. Na atualidade, se conhece cerca de 3.200 espécies, distribuídas por todo o mundo, divididas em três subfamílias: Anophelinae, Culicinae, e Toxorhynchitinae (Scott, 1980; Forattini, 2002). Eles ocorrem ao longo do mundo excluindo-se os lugares que estão permanentemente congelados (Clements, 1992).

Nos impactos à saúde humana destacam-se, além das doenças como a dengue, a malária e a filariose entre outras, também, as novas doenças que poderão surgir em função do homem adentrar a floresta e fazer parte do complexo de manutenção destes patógenos, no meio ambiente. A infecção ocorre devido às modificações produzidas no habitat natural, em que circula o agente patogênico, fazendo parte dele. Além desse fator, destacamos as condições de vida nas periferias das cidades. As atuais condições de saneamento básico, alimentação e acesso à assistência e à saúde propiciam e ampliam o surgimento de surtos epidêmicos de novas doenças (Tadei, 2001).

1.1. Mosquitos de importância médica

1.1.1. Principais espécies do gênero *Aedes* Meigen

O gênero *Aedes* compreende mais de 900 espécies distribuídas por 44 gêneros. Esses culicíneos apresentam distribuição mundial. No que tange à região neotropical, nota-se relativa pobreza de representantes e somente nove subgêneros foram encontrados até o momento nas Américas, a saber: *Ochlerotatus* Lynch-Arribálzaga, 1891; *Stegomyia* Theobald, 1901; *Aedimorphus* Theobald, 1903; *Howardina* Theobald, 1903; *Gymnometopa* Coquillett, 1905; *Protomacleaya* Theobald, 1907; *Kompia* Aitken, 1941; *Abraedes* Zavortink, 1970 e *Aztecaedes* Zavortink, 1972. Os que encerram, até o momento, pelo menos alguma significância epidemiológica, estão incluídos em *Ochlerotatus* e *Stegomyia* (Guimarães, 1997).

O subgênero *Stegomyia* constitui amplo, compacto e característico grupo cuja distribuição está restrita às regiões do Velho Mundo. Devido ao desenvolvimento das comunicações comerciais, até agora duas espécies foram introduzidas na região neotropical: *Aedes aegypti* Linnaeus e *Aedes albopictus* Skuse, que apresentam maior importância médica, pois, são considerados os principais vetores da dengue e febre amarela (Consoli e Lourenço-de-Oliveira, 1994; Forattini, 2002).

Aedes aegypti é uma espécie natural da região afro-tropical e atualmente encontra-se distribuído nas regiões tropicais e subtropicais, compreendidas principalmente entre 45° de latitude Norte e 35° de latitude Sul, e dentro das zonas isotermais de 20° (Consoli e Lourenço-de-Oliveira, 1994; Forattini, 2002; Pinheiro e Tadei, 2002).

Os mosquitos adultos são considerados essencialmente domiciliados, e as formas imaturas se desenvolvem em criadouros artificiais e naturais localizados, principalmente, em ambiente urbano, dentro das casas e no peridomicílio. É considerado o principal transmissor do vírus da dengue e do dengue hemorrágico, nas Américas e em diversas partes do Mundo (Forattini, 2002). Trabalho realizado em Manaus, sobre a detecção do vírus em *A. aegypti*, evidenciou que de 82 *pools* analisados, 17,1% foram positivos para DENV3, provendo uma taxa mínima de infecção de 2,1% do total de fêmeas estudadas de diferentes áreas da cidade (Pinheiro *et al.*, 2005).

No Amazonas, foram detectados os primeiros focos de *A. aegypti* em meados de novembro de 1996, na Praça 14 e no bairro São José, em Manaus. Sua dispersão se deu por todo o centro da cidade, atingindo em dezembro de 1997 um total de 15 bairros e, por conseguinte, em maio de 1998, sua presença foi registrada em 21 bairros da cidade e a primeira epidemia de dengue com aproximadamente 14.000 casos clinicamente detectados (FUNASA/CRDA, 1999; Pinheiro e Tadei, 2002). Em 2011, além da capital Manaus, 25 municípios do interior do Estado já estão infestados pelo vetor e passíveis de desenvolverem epidemias de dengue de grande magnitude (Fundação de Vigilância em Saúde/AM – comunicação pessoal).

Aedes albopictus é originária da Ásia e sua distribuição ocorre em áreas de clima temperado e tropical (Hawley, 1998). É principalmente uma espécie silvestre, que se adaptou aos ambientes rurais, suburbanos e urbanos. A postura e o desenvolvimento dos ovos ocorrem nos ocos de árvores ou de bambu, nas axilas das folhas, nas margens das florestas e em criadouros artificiais, nas zonas urbanas (OPAS, 1991).

Nas Américas, *A. albopictus* foi encontrado pela primeira vez em 1985 e, no Brasil, a presença desta espécie foi registrada em 1986 no Estado do Rio de Janeiro (Forattini, 1986), sendo encontrado também em Minas Gerais e São Paulo (Consoli e Lourenço-de-Oliveira, 1994). Em apenas um ano após sua introdução no Brasil, *A. albopictus* foi encontrado em todos os Estados da região sudeste (Santos, 2003). Estima-se que em 2011 esta espécie esteja amplamente distribuída em todas as regiões do país, porém, os registros de sua ocorrência ainda não foram publicados e/ou atualizados (Ministério da Saúde, comunicação pessoal).

Segundo os dados da FUNASA/CRDA (1999) e os registros da Secretaria Municipal de Saúde de Tabatinga, citados em Tadei (2002), *A. albopictus* foi encontrado, pela primeira vez no Estado do Amazonas, em maio de 1995 nas imediações de Tabatinga. Os dados revelam também que a infestação se expandiu às margens do Igarapé Santo Antônio, atingindo o município de Letícia, Colômbia, em 1996.

Com a implementação de um programa de vigilância entomológica para essa espécie, por meio da instalação de armadilhas de pneus no município de Letícia, fronteira entre Brasil e Colômbia, *A. albopictus* foi encontrado novamente em 1997, tanto em

Tabatinga quanto no Distrito de Letícia, na fronteira entre Brasil e Colômbia (Vélez *et al.*, 1998).

Em Manaus, de acordo com as informações da FUNASA/CRDA (1999) e do Laboratório de Malária e Dengue do INPA (Tadei, 2002), sua presença foi registrada em setembro de 1997 na periferia da cidade (Terra Nova) e, em 2000, no Bairro Tarumã. Fé *et al.* (2003), registraram a ocorrência de *A. albopictus* a partir de um exemplar adulto coletado em agosto de 2002, na área externa da Fundação de Medicina Tropical do Amazonas.

Sá e Tadei (2004), estudando as áreas de ocorrência e os criadouros preferenciais de *A. albopictus* em Manaus, encontraram larvas e pupas desta espécie, tanto no centro como na periferia da cidade, e em locais de mata urbana e periurbana. Nestas últimas, foram constatadas alterações antrópicas e grande quantidade de recipientes artificiais disponíveis. *Aedes albopictus* foi registrado em 12 das 21 áreas de mata inspecionadas e em 30 pontos a partir da análise das fichas de visitas domiciliares dos Agentes de Endemias (FAD), totalizando 42 pontos de ocorrência do vetor.

A utilização de ações de controle para *A. albopictus* na região Amazônica, nos moldes do efetuado para *A. aegypti*, devido a sua amplitude ecológica e presença em diversas áreas, poderá torná-la mais receptiva à emergência de arboviroses, principalmente em áreas de constantes alterações ambientais (Santos, 2003).

A introdução de *A. albopictus* no continente americano tem potencialmente sérias implicações. Ele é vetor secundário de dengue e dengue hemorrágico particularmente em áreas rurais no sudeste da Ásia, atuando também na manutenção do vírus na natureza (Gratz, 2004), e contribuindo como um fator determinante na epidemiologia de outras viroses como a encefalite Japonesa, Sant Louis, San Angelo, La Crosse entre outras (Mitchell *et al.*, 1987; Raí, 1991).

Aedes albopictus foi incriminado como vetor responsável pela dengue e dengue hemorrágica em vários pontos do mundo: Japão, Indonésia, Tailândia, Singapura e Malásia (Moore e Mitchell, 1997). Segundo os autores, nas Américas, até o momento, foi encontrado com infecção natural para vírus da encefalite equina do leste, mas em laboratório demonstrou competência à infecção para 22 arbovírus.

Ibáñez-Bernal *et al.* (1997) estudando o isolamento viral em mosquitos durante a epidemia de dengue de 1995 em Reynosa, México, encontraram em uma amostra com 10 machos, *A. albopictus* naturalmente infectado pelo vírus da dengue, sorotipo 2 e 3, identificados por anticorpo monoclonal sorotipo-específico e confirmados por RT-PCR. Este é o primeiro registro de *A. albopictus* naturalmente infectado com vírus da dengue na América, comprovando a transmissão vertical do vírus na natureza.

Miller e Bellinger (1988) testaram a competência vetorial de *A. albopictus* coletados no município de Cariacica, Espírito Santo, para transmitir os quatro sorotipos do vírus da dengue e o vírus da febre amarela silvestre. Este mosquito foi considerado vetor competente para transmitir os 4 sorotipos do vírus da dengue, porém, o mesmo não foi considerado eficiente vetor do vírus da febre amarela. Isto se justifica, segundo os autores, por apenas terem examinado uma população de *A. albopictus*, ressaltando que outras populações podem diferir quanto ao seu potencial na transmissão deste vírus no Brasil.

Serufo *et al.* (1993) registraram o isolamento do vírus da dengue, sorotipo 1, em duas amostras de larvas (n = 60) de *A. albopictus* coletados em dois locais em pneus descartados em área urbana no município de Campos Altos, MG. O vírus foi isolado novamente das amostras originais e sua identificação foi confirmada por isolamento viral e PCR. Este registro representa o primeiro isolamento do vírus da dengue em larvas de *A. albopictus* naturalmente infectadas no Brasil.

Entretanto, no Brasil, a distribuição de *A. albopictus* superposta à de *A. aegypti*, não permitiu determinar a sua contribuição na transmissão desta doença. Embora amplamente disseminado, até o momento, não há evidências de que o *A. albopictus* seja um transmissor do vírus da dengue no país. Na cidade de Tabatinga, AM, registrou-se três casos de dengue em 2001. O fato causou apreensão, pois, se fossem autóctones, a transmissão seria por *A. albopictus*. No entanto, a investigação dos casos indicou tratar-se de importados e também inquérito entomológico realizado na época não registrou *A. aegypti* na cidade (Tadei, 2002).

1.1.2. Principais espécies do gênero *Anopheles* (Meigen)

Os mosquitos do gênero *Anopheles* são encontrados em todas as regiões biogeográficas, principalmente, nas zonas tropicais. Atualmente são registradas 57 espécies

de *Anopheles*, pertencendo a cinco subgêneros – *Anopheles* Meigen, 1818; *Nyssorhynchus* Blanchard, 1902; *Stethomyia* Theobald, 1902; *Kerteszia* Theobald, 1905; *Lophopodomyia* Antunes, 1937. No Brasil as espécies reportadas como vetoras de malária pertencem aos subgêneros *Nyssorhynchus* e *Kerteszia* (Deane, 1986; Consoli e Lourenço-de-Oliveira, 1994).

As principais espécies do subgênero *Nyssorhynchus*, envolvidas na transmissão da malária são *Anopheles darlingi* Root, 192; *Anopheles aquasalis* Curry, 1932; *Anopheles albitarsis* Lynch-Arribalzaga, 1878 (incluindo *Anopheles marajoara* Galvão e Amaral, 1942; *Anopheles deaneorum* Rosa-Freitas, 1989); *Anopheles oswaldoi* Peryassú, 1922; *Anopheles nuneztovari* Gabaldón, 1940 e *Anopheles triannulatus* Neiva e Pinto, 1922 (Deane, 1986; Tadei *et al.*, 1988; Lourenço-de-Oliveira *et al.*, 1989; Tadei e Dutary-Thatcher, 2000).

No entanto, com o desenvolvimento dos testes de imunoenzimático ELISA, radioimunoensaio IRMA, com anticorpos monoclonais e com teste de infecção experimental, o número das espécies de *Anopheles* detectadas com *Plasmodium* aumentou na Amazônia Brasileira, sendo listadas 14 espécies de anofelinos infectadas com *Plasmodium* spp. – *A. darlingi*; *A. nuneztovari*; *Anopheles galvaoi* Causey, Deane e Deane, 1943; *A. deaneorum*, *A. triannulatus*, *Anopheles braziliensis* Chagas, 1907; *A. oswaldoi*, *Anopheles mediopunctatus* Lutz, 1903; *A. aquasalis*, *A. albitarsis s.l.*, *A. marajoara*, *Anopheles mattogrossensis* Lutz e Neiva, 1911; *Anopheles peryassui* Dyar e Knab, 1908 e *Anopheles strodei* Root, 1926. Conforme a região considerada estas espécies mostram diferentes graus de infecção pelas diferentes espécies de *Plasmodium* (Tadei e Dutary-Thatcher, 2000).

Na Amazônia algumas espécies de mosquitos têm ampla distribuição, (Tadei *et al.*, 1993), as espécies *A. darlingi*, *A. albitarsis*, *A. nuneztovari* e *A. oswaldoi*, são espécies de ampla distribuição na região enquanto que, *Anopheles apicimacula* Dyar e Knab, 1906; *Anopheles squamifemur* Antunes, 1937; *Anopheles rondoni*, Neiva e Pinto, 1922 e *Anopheles nimbus* Theobald, 1902, por exemplo, tem sua distribuição mais restrita (Tadei *et al.*, 1993; 1998).

1.2. Biologia de *Wolbachia* (Rickettsiales)

Diversos insetos são conhecidos por apresentar infecção com a bactéria do gênero *Wolbachia* (Hoshizaki e Shimada, 1995). A bactéria pertence à Ordem Rickettsiales, tribo Wolbachiae e família Rickettsiaceae. Este grupo de bactéria, amplamente distribuído, é encontrado nos tecidos reprodutivos dos artrópodes. Esta bactéria é transmitida pelo citoplasma dos ovos e tem envolvido vários mecanismos de manipulação da reprodução de seus hospedeiros, incluindo indução da incompatibilidade reprodutiva, partenogênese e feminização. A *Wolbachia* é também transmitida horizontalmente entre espécies de artrópodes (Werren, 1997). Avanços significativos foram feitos nos estudos deste interessante organismo e têm atraído muita atenção em virtude de sua habilidade em manipular a reprodução de seus hospedeiros (Hurst *et al.*, 2000; Jiggins *et al.*, 2001).

Dentre todos os gêneros de insetos conhecidos, estima-se que por volta de 15-20% contém *Wolbachia* a qual é maternalmente herdada (Tai-Min e Benzer, 1997; Rasgon e Scott, 1999). Elas são simbioses intracelulares obrigatórios e estão universalmente presentes em muitas espécies de invertebrados, incluindo mosquitos do gênero *Culex* Linnaeus, *Aedes* e *Armigeres* Theobald (Clements, 1992; Jammongluk *et al.*, 2000).

As infecções por *Wolbachia* foram primeiramente observadas nos ovários e testículos de *Culex pipiens* Linnaeus através de microscopia de luz e, foi nomeado e descrito no mesmo inseto por Hertig (1936) como *W. pipientis*. O gênero *Wolbachia* é encontrado não somente nos insetos hospedeiros, porém, estes já foram observados em certos grupos de invertebrados como os miriápodes, os crustáceos e carrapatos (Zimmer, 2001). Além disso, já foram observadas nos Nematoda (Stouthamer *et al.*, 1999). A espécie de *Wolbachia* encontrada nos nematódeos forma um clado irmão separado dos outros artrópodes por serem mutualistas ao invés de parasitos reprodutivos (Sironi *et al.*, 1995; Bandi *et al.*, 1998; Taylor e Hoerauf, 1999; Hoerauf *et al.*, 2000).

A frequência estimada de espécies de mosquitos adultos infectados varia de 20 (Werren *et al.*, 1995) a 76% (Jeyaprakash e Hoy 2000). A infecção por *Wolbachia* está associada a diversas alterações reprodutivas do hospedeiro, incluindo incompatibilidade citoplasmática (IC) (Stouthamer *et al.*, 1999). Com a IC, machos infectados são reprodutivamente incompatíveis com fêmeas não infectadas (eles são parcialmente ou completamente estéreis). As fêmeas infectadas são reprodutivamente compatíveis com

ambos os machos infectados e não infectados (Stouthamer *et al.*, 1999). O fenômeno de IC dá uma vantagem reprodutiva a *Wolbachia* em infectar as fêmeas, pois permite se espalhar rapidamente entre as populações hospedeiras (Turelli e Hoffmann 1999). A habilidade da *Wolbachia* em se expandir tem gerado grande interesse no uso deste simbionte como um mecanismo para direcionar a introdução de características transgênicas dentro de populações de vetores visando o controle de doenças transmitidas por mosquitos (Pettigrew e O'Neill, 1997; Turelli e Hoffmann, 1999; Rasgon e Scott, 2003).

O conhecimento sobre qual cepa de *Wolbachia* está presente nas populações de mosquitos é de crucial importância antes de liberar indivíduos infectados na natureza, devido à preexistência de infecção natural que pode interagir e alterar a dinâmica de cepas introduzidas. Como exemplo, a dinâmica de expansão da *Wolbachia* pode se tornar mais complicada com o número de cepas incompatíveis presentes no aumento da população (Hoffmann e Turelli, 1997).

Similaridades entre cepas infectando diferentes mosquitos são indicativos de como facilmente os mosquitos encontram e adquirem novas infecções. Este tipo de informação tem implicações importantes para o desígnio e sucesso de introduções artificiais de *Wolbachia* em populações naturais de mosquitos para controlar a doença, pois pode prover com perspicácia que após a introdução da bactéria, as infecções provavelmente serão mantidas (Rasgon e Scott, 2004).

1.3. Distribuição e diversidade de *Wolbachia*

A diversidade de *taxa* de mosquitos com infecção por *Wolbachia* foi investigada no Sudeste da Ásia (Kittayapong *et al.*, 2000), na Europa e África (Ricci *et al.*, 2002), porém pouco se sabe sobre a variação na infecção em mosquitos nas Américas. Pesquisando mosquitos na Tailândia para a infecção por *Wolbachia* usando PCR, Kittayapong *et al.* (2000) encontraram que de 89 espécies, 28% revelaram a presença da bactéria, incluindo os gêneros *Aedes*, *Culex*, *Armigeres*, *Coquillettidia* Dyar, *Hodgesia* Theobald, *Mansonia* Blanchard, *Tripteroides* Giles e *Uranotaenia* Lynch Arribalzaga, entretanto, nenhuma espécie de *Anopheles* Meigen foi encontrada infectada.

Nos mosquitos da Califórnia, a infecção por *Wolbachia* foi somente caracterizada em espécies do complexo *Culex pipiens* (Barr 1980, 1982; Rasgon e Scott 2003), que consiste das subespécies *C. pipiens pipiens* e *C. pipiens quinquefasciatus* (Say) (Cornel *et al.*, 2003). Contudo, não há informações sobre a infecção em outros taxa de mosquitos. O conhecimento da variação biogeográfica das taxas de infecção por *Wolbachia* e a inferência da susceptibilidade a infecção em diferentes taxa de mosquitos tem implicações fundamentais para o desígnio e aplicação próspera em estratégias de controle de vetores de doenças (Rasgon e Scott, 2004).

Muitas riquetsias não podem ser cultivadas fora das células do hospedeiro, desafiando os estudos tradicionais em microbiologia (Weiss e Moulder, 1984). Entretanto, avanços nos métodos moleculares, particularmente o desenvolvimento da reação da polimerase em cadeia (PCR), onde se utilizam iniciadores de sequência específicos para a amplificação do DNA dessa α -proteobactéria, auxiliaram os estudos com a *Wolbachia* (Meer e Stouthamer, 1999, Braig *et al.*, 1998). O uso de sequências do rDNA 16S, *ftsZ* e *wsp* para filogenia microbiana tem facilitado grandemente os estudos desta bactéria (Higgins e Azad, 1995; Weisburg *et al.*, 1991; Weisburg *et al.*, 1989; Woese, 1987).

A filogenia baseada nas sequências do rDNA 16S mostrou que a *Wolbachia* é um grupo monofilético em relação a outras riquetsias (Breeuwer *et al.*, 1992; O'Neill *et al.*, 1992; Stouthamer *et al.*, 1993). O gênero *Wolbachia* contém duas maiores subdivisões que mostram divergência em cerca de 2% na sequência do rDNA 16S. As duas divisões (A e B) também foram confirmadas por meio da filogenia de genes que codificam proteínas específicas da bactéria (Werren *et al.*, 1995). *Wolbachia pipientis* que induz a IC é a espécie tipo para o gênero, pertencendo à divisão B (Breeuwer *et al.*, 1992; Stouthamer *et al.*, 1993). O sequenciamento de um gene de superfície de proteína, chamado de *wsp*, tem melhorado o entendimento da filogenética de *Wolbachia*, sendo possível dividir o clado em 12 subgrupos (Zhou *et al.*, 1998).

Infecções envolvendo mais de uma cepa de *Wolbachia* no mesmo hospedeiro, denominada de superinfecção, foi relatada em mais de 10 espécies de insetos incluindo 5 ordens, citadas anteriormente (Kittayapong *et al.*, 2000). Nas pesquisas de insetos neotropicais utilizando PCR, Werren *et al.* (1995), encontraram uma frequência de infecção por *Wolbachia* de 16,9% e as superinfecções ocorreram significativamente mais do que

frequentemente se esperava. A superinfecção pode ajudar a explicar alguns padrões complexos da incompatibilidade citoplasmática observada nos mosquitos do gênero *Culex* (Barr, 1980; Subbarao, 1982; O'Neill e Paterson, 1992) e *Aedes* (Kambhampati *et al.*, 1993; Sinkins *et al.*, 1995).

1.4. Efeitos de *Wolbachia* em Diptera (Culicidae)

A incompatibilidade citoplasmática (IC) pode ser observada no cruzamento entre mosquitos infectados por diferentes tipos de *Wolbachia*. Embriões resultantes do cruzamento com IC exibem um fracasso na cariogamia, ou seja, fusão de cariogametas ou do núcleo sexual, além de apresentar um desenvolvimento precoce (Tram e Sulivam, 2002). Em populações de mosquitos que apresentam ambos os indivíduos infectados e não infectados, as fêmeas infectadas podem acasalar prosperamente com todos os machos da população. Em contraste, fêmeas não infectadas na população apresentam uma desvantagem reprodutiva, pois seus ovos não são fecundados se elas se acasalam com machos infectados. A vantagem reprodutiva disposto pela IC às fêmeas infectadas pode promover a expansão da infecção por *Wolbachia* na população hospedeira (Islam e Dobson, 2006).

Múltiplos modelos foram desenvolvidos para descrever a dinâmica de infecção por *Wolbachia* que induz a incompatibilidade citoplasmática (Hoffmann e Turelli, 1997; Dobson *et al.*, 2002a; Telschow *et al.*, 2002). O parâmetro chave citado anteriormente do impacto na dinâmica de infecção por *Wolbachia* inclui a fidelidade da transmissão maternal, nível de IC (fertilização dos ovos resultante do cruzamento incompatível), e os efeitos da *Wolbachia* nas habilidades do hospedeiro. Modelos prévios fizeram uma suposição simplificada para considerar somente os efeitos de *Wolbachia* na fecundidade do hospedeiro como um indicador dos efeitos nas habilidades do hospedeiro (Islam e Dobson, 2006).

Modelos subsequentes estenderam a definição dos efeitos da *Wolbachia* no hospedeiro incluindo os impactos na sobrevivência do mesmo (Brownstein *et al.*, 2003; Rasgon e Scott, 2003). Modelos desenvolvidos posteriormente demonstraram que a redução na sobrevivência do hospedeiro pela *Wolbachia* é semelhante à demora da fecundidade

associada a esta bactéria. Este fato aumenta a frequência da entrada da infecção para iniciar o evento de substituição da população, reduzindo a velocidade da taxa no qual a bactéria invade e reduz, também, o equilíbrio da frequência da infecção, após a invasão (Islam e Dobson, 2006).

O foco de vários estudos empíricos tem definido as taxas de infecção, níveis de IC e os efeitos nas habilidades em adultos de *A. albopictus* (Dobson *et al.*, 2001, 2002b, 2004; Kittayapong *et al.*, 2002a, b, c). Em contraste, os efeitos de *Wolbachia* nos imaturos de *A. albopictus* não foram bem caracterizados (Islam e Dobson, 2006). Estes mesmos autores examinaram os efeitos da *Wolbachia* na sobrevivência e desenvolvimento dos imaturos, tamanho dos adultos e o efeito da nutrição das larvas no nível de IC. Eles observaram uma alta sobrevivência nas larvas não infectadas, principalmente devido à redução na sobrevivência de machos infectados. Porém, a diferença observada na taxa de desenvolvimento não pode ser atribuída à infecção pela bactéria e os autores, não observaram efeito da infecção no tamanho dos adultos.

Pesquisas sobre mosquitos são de fundamental importância na revelação de verdadeiras e fascinantes interações entre *Wolbachia* e seus hospedeiros, o qual agora abrange uma grande diversidade de artrópodes. A bactéria *Wolbachia* é considerada promissora como um sistema de condução de genes para modificações genéticas em mosquitos, e os parâmetros observados em populações naturais mostram ser altamente favoráveis a esse respeito (Sinkins, 2004).

Uma nova abordagem para o controle da dengue que tem sido proposto envolvendo a introdução de *W. pipiens* em populações de campo de *A. aegypti* (Moreira *et al.*, 2009). A infecção provocada por *Wolbachia* pode limitar a transmissão de dengue por meio de dois mecanismos distintos. O primeiro por meio da introdução de cepas de *Wolbachia*, que reduzem a taxa de sobrevivência e está associada à capacidade vetorial da população de mosquito (Sinkins e O'Neill, 2000; Cook *et al.*, 2008). O segundo mecanismo depende da capacidade de algumas cepas de *Wolbachia* em interferir com a capacidade do vírus de RNA para formar infecções produtivas em insetos (Hedges *et al.*, 2008; Teixeira *et al.*, 2008) e, potencialmente, modulam a competência vetorial do *A. aegypti* para o vírus da dengue (Bian *et al.*, 2010).

O interesse por esse tema de pesquisa está se ampliando, cada vez mais, no sentido da procura de microrganismos que possam desempenhar o papel de veiculadores de genes a serem introduzidos na população vetora alvo do controle. Para guiar a falta de conhecimento sobre a presença de *Wolbachia* em diferentes espécies de culicídeos distribuídas no Brasil, neste trabalho foi realizada a inspeção de diferentes taxa de mosquitos encontrados na região Amazônica, para verificar a infecção destes por esta bactéria. Foi dado enfoque aos taxa de importância primária como vetor ou espécie praga.

Aedes albopictus é considerado vetor secundário do vírus do dengue, atuando na manutenção do mesmo em áreas rurais na Ásia. Considerando a importância deste aspecto e a susceptibilidade da mesma à infecção por *Wolbachia*, esta espécie foi determinada para o estudo de parâmetros adaptativos em colônias experimentais, considerando os efeitos da infecção por *Wolbachia*.

2. Objetivos

2.1. Geral

Determinar a ocorrência da infecção por *Wolbachia* em diversos taxa de mosquitos coletados no Estado do Amazonas, incluindo todos os gêneros dos principais vetores de doenças na região Amazônica, indicando a extensão da infecção natural, e analisar o efeito do tratamento com tetraciclina nas características adaptativas de *Aedes albopictus*, em condições de laboratório.

2.2. Específicos

Determinar a taxa de infecção natural por *Wolbachia* em diferentes espécies de mosquitos, utilizando a reação em cadeia da polimerase (PCR);

Determinar a diversidade de *Wolbachia* quanto aos diferentes grupos e subgrupos da bactéria, pela análise das sequências do gene *wsp*;

Avaliar o efeito do tratamento com tetraciclina na infecção por *Wolbachia* em colônias experimentais de *A. albopictus*, considerando os parâmetros adaptativos – fecundidade, longevidade e razão sexual.

3. Material e Métodos

3.1. Distribuição e diversidade de *Wolbachia* em mosquitos

3.1.1. Descrição da área de estudo

Para a detecção de *Wolbachia* os mosquitos foram coletados em áreas urbanas nos municípios de Manaus, Presidente Figueiredo, Rio Preto da Eva, São Gabriel da Cachoeira, e em áreas de monitoramento de culicídeos do Projeto PIATAM, nos empreendimentos Gasoduto Coari-Manaus, Gasoduto Juruá, Base Petrolífera de Urucu (Coari) e BR319 que liga Manaus a Porto Velho (RO), no Estado do Amazonas, Brasil (Figura 1).

A cidade de Manaus está situada no encontro dos rios Negro e Amazonas, localizada no centro geográfico da Amazônia (S 3° 08' 07" e W 60° 01' 34") numa área de 11.485 Km², com uma população estimada no censo 2010, de 1.802.525 habitantes (IBGE, 2011). Possui clima classificado como Equatorial Quente e Úmido, segundo o qual corresponde a Clima Tropical, com temperatura média variando entre os meses do ano de 26,0°C a 27,6°C e as médias mínima e máxima entre 22,7°C e 32,9°C, respectivamente, e umidade relativa do ar média de 85%. Ao redor da cidade, a Floresta é Tropical Úmida e os índices pluviométricos mostram que as médias mensais acumuladas entre os meses variam de 57,9 mm em agosto a 313,5 mm em março (Ministério da Agricultura e Reforma Agrária, 2010).

A expansão da cidade de Manaus se caracteriza pela ocorrência de invasões na periferia da cidade e este tipo de expansão, ocasiona o surgimento e o crescimento de áreas urbanizadas em ambientes, até então, naturais. Nestas áreas, a falta de serviços essenciais de saneamento básico, a precariedade das residências e a proximidade da mata propiciam o acúmulo de artefatos de uso humano descartados no ambiente, contribuindo para proliferação de mosquitos, aumentando desta maneira, o contato homem-vetor, possibilitando a transmissão de doenças nesses locais (Tadei, 2001).

O município de Presidente Figueiredo está localizado na região nordeste do Estado, e é cortado pela rodovia BR 174 que liga Manaus a Boa Vista/RR, integrando a Amazônia Setentrional ao Caribe e América do Norte. O clima da região é tropical, chuvoso, úmido e quente, na região a temperatura é uniforme, (raramente ocorrem temperaturas inferiores a 20°), ao longo do ano. Com a população de aproximadamente, de 28.000 habitantes distribuídos em sua sede, o distrito de Balbina, Vila do Pitinga e Comunidades Rurais. O

município é muito novo e sua população é miscigenada em razão do seu processo de povoamento causado pela migração dos povos do nordeste, do sudeste e do norte em geral, atraídos pela mineração, pela abertura da BR 174, pela construção da Hidrelétrica de Balbina.

O município de Rio Preto da Eva está situado no vale do Rio Preto da Eva, à altura do km 80 da AM 010 (Manaus – Itacoatiara). A população atual do município é de 25.758 habitantes, sendo 40% concentrado em Zona Urbana 60% em Zona Rural. A maioria dos imigrantes são: nordestinos, cearenses, piauienses, paraibanos e outros.

São Gabriel da Cachoeira está localizado a noroeste do Estado do Amazonas na fronteira geopolítica da Amazônia brasileira. Apresenta clima tropical, chuvoso e úmido, com temperatura oscilante entre 21,5°C e 32,6°C; acima do nível do mar 132m. Situa-se a 0° 7'12'' de latitude sul e a 67° 4'55'' de longitude a oeste de Greenwich. Tem população estimada em 37.300 habitantes. Faz limites com os municípios de Santa Isabel do Rio Negro, Japurá, e com as Republicas da Colômbia e Venezuela. A cidade está localizada as margens da sub-bacia hidrográfica do Rio Negro que nasce na Colômbia e deságua na margem esquerda do Rio Amazonas, próximo à cidade de Manaus, tendo os cursos de seus rios marcados por inúmeras corredeiras e cachoeiras.

O Município de Coari pertence a 7ª sub-região Rio Negro-Solimões, está localizado a 363 km de Manaus em linha reta e a 463 Km por via fluvial, situado à margem direita do Rio Solimões. O clima equatorial (tropical, chuvoso e úmido) é predominante em Coari. A umidade relativa do ar é sempre alta, em especial nos meses de maior incidência de chuvas. A taxa pluviométrica anual é em torno de 2.500mm. A temperatura média anual oscila entre 31° C e 35°C. A população de Coari, segundo IBGE de 2010, é de 75.909 habitantes, sendo distribuídos nas zonas rural e urbana, sendo que 67% residem em área urbana e 33% área rural. Sua densidade demográfica é de 2,69 habitantes por km². Em 1986 foi descoberto petróleo na região e em 1988, o primeiro poço foi aberto e, desde então, o município recebe royalties da Petrobras pela extração de petróleo e gás natural na província de Urucu.

A Província Petrolífera de Urucu está localizada a 650 quilômetros a sudoeste de Manaus no estado do Amazonas. Em Urucu, existem 740 quilômetros de gasoduto, sendo 600 quilômetros terrestres e mais 140 quilômetros submersos. Esses dutos ligam os poços até o Pólo Arara, onde é realizado o processamento do petróleo, gás natural e GLP (gás de

cozinha). Diariamente são produzidos 55 mil barris de petróleo. A operacionalização das indústrias de petróleo e gás natural é realizada de forma padronizada, visando um fluxo de atividades dependente de ações humanas que, por sua vez, têm que se adequar aos procedimentos exploratórios e de logística inerentes às atividades desse tipo de indústria. As adequações humanas a esses procedimentos impõem riscos à saúde humana. Esses riscos têm origens conforme a região geográfica de atuação.

O Pólo Juruá situa-se a 750 km a sudoeste de Manaus e o campo de Araracanga fica às margens do Rio Tefé e é mais próximo ao Pólo Arara. O empreendimento trata-se de um duto de transferência destinado a escoar a produção de gás e de condensado dos Campos de Juruá e de Araracanga até o Pólo Arara (Urucu), localizado na cidade de Coari. Os estudos de monitoramento de culicídeos ocorreram em áreas de clareiras remotas existentes em áreas de exploração de petróleo pela Petrobrás.

O PIATAM é um projeto interinstitucional e interdisciplinar que envolve instituições de ensino e pesquisa e tem como principal meta a caracterização socioambiental da área de atuação da Petrobras no Estado do Amazonas. Essa caracterização se dá por meio da construção de séries históricas, necessárias ao monitoramento ambiental, aprimorando o conhecimento e o entendimento sobre a região. O projeto possui uma base de dados de natureza ambiental e socioeconômica, constituída de dados de trabalho de campo, coletados por pesquisadores de várias áreas temáticas, assim como arquivos de imagens de satélites, de radares, mosaicos georreferenciados, mapas, croquis, fotografias, etc.

As ações de monitoramento e controle de vetores em áreas de empreendimentos instalados na região Amazônica ocorrem normalmente durante ou após a consolidação das obras de construção. Este é um fato constatado ao longo da história de ocupação e do desenvolvimento desta região. A experiência vem mostrando que estudos de impacto ambiental, além de monitoramento dessas áreas a serem ocupadas na Amazônia precisam ocorrer antes da instalação como medida preventiva de surtos epidêmicos de doenças como malária que se manifesta inicialmente em áreas desmatadas. Neste sentido, o estudo da diversidade de mosquitos vetores de doenças é muito importante para se entender a dinâmica de transmissão em cada área em estudo bem como a elaboração de um plano de controle efetivo respeitando as características de cada região específica.

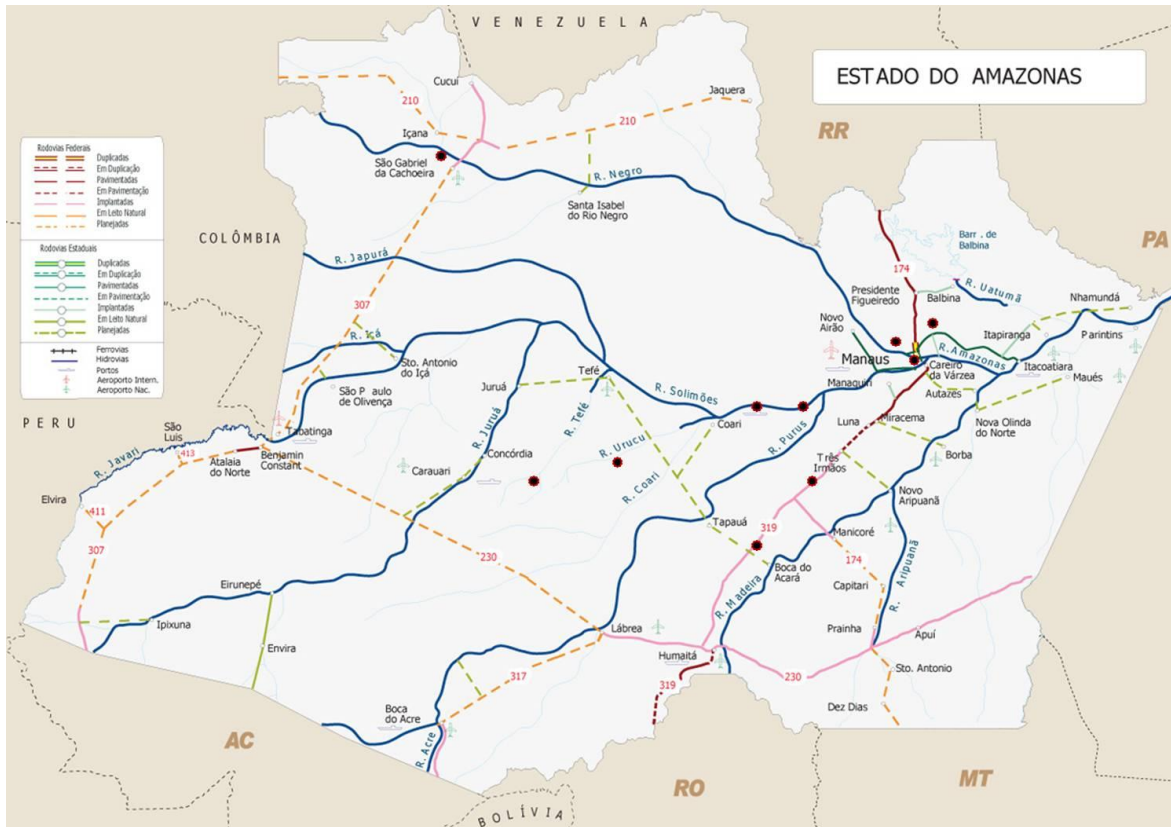


Figura 1. Mapa do estado do Amazonas com a localização geográfica das áreas de coleta.

As coletas foram realizadas no período entre janeiro de 2008 e junho de 2010, sendo que para análise foram retiradas subamostras das amostras coletadas no monitoramento realizado nestas áreas pela equipe do Laboratório de Malária e Dengue do INPA.

As coletas foram realizadas utilizando-se armadilhas luminosas, tipo CDC. Foram também capturados mosquitos no intra e peridomicílio em animais, com auxílio de aparelhos elétricos de aspiração, bem como com aspirador manual de Castro (Forattini, 2002). Foram feitas coletas de anofelinos em residências nas áreas com malária e em áreas com risco de transmissão. Após a captura, os espécimes foram colocados em copos parafinados (500 ml) e cobertos com filó, contendo a identificação do local, data e horário de captura. O período de coleta foi fixado entre 18 e 22 horas, pois este é considerado o

maior pico de densidade de mosquitos. Também ocorreu a coleta de larvas em criadouros naturais e artificiais, estes localizados em área urbana de Manaus, São Gabriel da Cachoeira e Presidente Figueiredo. As larvas foram levadas ao laboratório de Malária e Dengue (INPA) e permaneceram em ambiente climatizado até a emergência dos adultos. Para a população coletada em Manaus, os mosquitos foram mantidos em gaiolas.

As amostras foram encaminhadas ao laboratório de Malária e Dengue do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) para identificação em nível específico, com base nas chaves dicotômicas para Culicidae de Forattini (1962), Faran (1980) e Consoli e Lourenço-de-Oliveira (1994). Os espécimes coletados foram mantidas a -20°C para posterior processamento e análise das amostras por PCR.

3.1.2. Análise dos mosquitos pela reação em cadeia da polimerase (PCR)

A análise dos mosquitos infectados por *Wolbachia* foi realizada por meio da técnica molecular de reação de polimerase em cadeia (PCR). Devido ao grande número de espécimes analisadas, a extração de DNA foi realizada utilizando-se o mosquito inteiro, individualmente.

3.1.3. Extração do DNA

A extração do DNA foi realizada por meio da homogeneização dos indivíduos em 100 µl de STE *buffer* (100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8), fazendo modificações no método descrito por O'Neill *et al.* (1992). O homogeneizado foi aquecido a 95°C por 10 minutos e centrifugado a 14.000 rpm por 1 minuto. Um microlitro do sobrenadante foi utilizado como molde do DNA na reação da PCR.

A extração de DNA de *A. albopictus* de colônias tratadas com tetraciclina por *Wolbachia* foi usada como controle positivo. O controle negativo na PCR, que consiste de uma reação da PCR sem a adição de DNA molde, foi incluído aleatoriamente para checar possível contaminação.

Outra metodologia utilizada para extração de DNA foi a aplicação do protocolo com a resina Chelex 100 BioRad que segundo Loxdale e Lushai (1998) mostrou excelentes

resultados em estudos de amostras muito pequenas, como as forenses e os microorganismos de modo geral. Este método apresenta grande vantagem em relação aos protocolos tradicionais de extração de DNA, pois, ele é rápido, de fácil aplicação e tem se mostrado muito eficaz, além disso, não envolve solventes orgânicos e a quantidade de amostra final de até seis vezes comparada a outros métodos. Devido sua propriedade quelante, essa resina retira o magnésio do meio que é o responsável pela ativação de endonucleases, por consequência, resulta em um DNA mais íntegro. O procedimento realizado foi:

- Preparação de 300µl de solução Chelex (5%) distribuída em tubos de 1,5ml.
- Maceração dos indivíduos inteiros nos tubos com a solução da resina.
- Agitação desse material em vortex por 10-15s.
- Centrifugação rápida (20 seg) a alta velocidade (13000 rpm).
- Incubação por 20 min a 90°C.
- Nova agitação em vortex por 10-15s.
- Nova centrifugação rápida (20 seg) a alta velocidade (13000 rpm).
- Amostra pronta para o uso (DNA se encontra no sobrenadante).

Para verificação do material extraído, 3µl do corante *GelRed* (marca) misturado a 2µl do DNA total foram aplicados em gel de agarose a 1% e levado a cuba de eletroforese horizontal com tampão Tris-Borato-EDTA 1X onde a corrida do material foi feita a 70 V iniciais, passados para 90 V. Posteriormente a corrida eletroforética, o gel de agarose levado a um transluminador de luz UV para visualização do DNA (Figura 2).

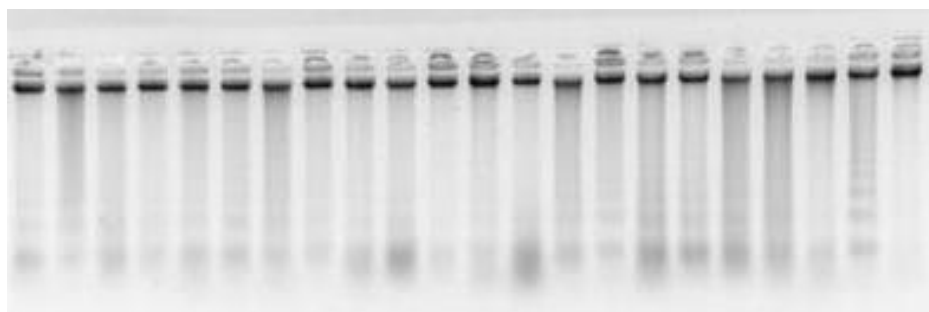


Figura 2. Gel de agarose 1% para verificação de extração do DNA genômico.

3.1.4. Reações de amplificação

A amplificação por PCR do DNA de *Wolbachia* foi realizada em um termociclador com o seguinte protocolo de reação: Tampão 10× *buffer* (Invitrogen), MgCl₂ 25 mM, dNTPs (10 mM cada), iniciadores de sequência *forward* e *reverse* 20 µM, e 1 unidade da polimerase *Taq* DNA (Invitrogen), conforme apresentado na tabela 1.

Cada conjunto de reação foi colocado em tubo de 0,2 ml e levado a um termociclador *Eppendorf* onde se processou a reação de amplificação que se deu conforme os passos descritos abaixo:

- Desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos (uma única vez);

38 ciclos de:

- Desnaturação a 94 °C por 1 minuto;
- Anelamento a 57 °C por 1 minuto;
- Extensão a 72 °C por 1 minuto;
- Extensão final a 72 °C por 10 minutos (uma única vez).

Tabela 1. Componentes da reação de PCR.

Reagentes	Concentração	Volumes (µl)
Tampão	10X	2,0
MgCl	25 mM	2,0
dNTP	10 mM	0,5
Primer1	20 µM	0,5
Primer2	20 µM	0,5
Taq polimerase	1 U	0,5
DNA (amostra)	--	1,0
Água <i>miliq</i>	--	13,0
TOTAL		20,0

3.1.5. Iniciadores de sequência utilizados

Inicialmente, o ensaio de PCR foi conduzido utilizando-se os iniciadores de sequência universal para o DNA mitocondrial de inseto (12S) e que amplifica um fragmento de 400pb. Este procedimento foi usado como controle para checar a qualidade de cada extração de DNA.

Espécies positivas usando iniciadores de sequência 12S foram caracterizadas para cepas de *Wolbachia* usando iniciadores de sequência desenhados a partir de genes *wsp* de proteínas de superfície de *Wolbachia* (Zhou *et al.*, 1998). O par de iniciadores utilizado foi *wsp* 81F/691R de 590-632 bp (Zhou *et al.*, 1998).

Todos os indivíduos em que ocorreu a amplificação dos genes 12S e *wsp* foram considerados positivos. As amostras que amplificaram somente o gene 12S foram consideradas negativas e excluídas das análises, e as que amplificaram somente o gene *wsp* foram consideradas como falso-positivo.

As amostras consideradas positivas no PCR foram submetidas a uma reação de *semi-nested PCR*, onde iniciadores de sequência *wsp* grupo-específico foram utilizados para classificar a *Wolbachia* dentro dos maiores grupos A (iniciadores de sequência - *wsp* 136F/691R – 556pb) e B (iniciadores de sequência - *wsp* 81F/599R – 442pb). Das amostras consideradas positivas na segunda reação de PCR, tanto para o grupo A, quanto para o grupo B, cinco foram submetidas ao sequenciamento para caracterizar os diferentes subgrupos *wsp* específicos – grupo A: subgrupos *Mel*, *AlbA*, *Mors*, *Uni*, *Riv*, *Haw*, *Pap* e *Aus*; grupo B : subgrupos *Com*, *Dei*, *CauB* e *Pip* (Kittayapong *et al.*, 2000).

Tabela 2. Iniciadores de sequência utilizados para reação de PCR.

Iniciadores de sequência	Sequência	Referência
<i>I2SF</i>	5'-CTAGGATTAGATACCCTATT-3'	O'Neill <i>et al.</i> 1992
<i>I2SR</i>	5'-AAGAGCGACGGGCGATG-3'	O'Neill <i>et al.</i> 1992
<i>wsp81F</i>	5'-TGGTCCAATAAGTGATGAAGAAAC-3'	Zhou <i>et al.</i> , 1998
<i>wsp691R</i>	5'-AAAAATTAAACGCTACTCCA-3'	Zhou <i>et al.</i> , 1998
<i>wsp136F - A</i>	5'-TGAAATTTTACCTCTTTTC-3'	Zhou <i>et al.</i> , 1998
<i>wsp552R - B</i>	5'-ACCAGCTTTTGCTTGATA-3'	Zhou <i>et al.</i> , 1998

3.1.6. Visualização

De cada amostra, 05 µl dos produtos da PCR foram aplicados em um gel de agarose 1%, em tampão TBE contendo ETBr e a separação dos fragmentos ocorreu por eletroforese a 100V, por cerca de 60 minutos. Em cada gel foi incluído marcador molecular DNA de 100pb *ladder* (Invitrogen) como padrão para determinar a presença e o tamanho do DNA amplificado (peso molecular). As amostras foram aplicadas no gel de agarose 1% juntamente com o corante *GelRed* e após a eletroforese, foram visualizados em luz ultravioleta e fotografados.

3.1.7. Purificação do produto amplificado da PCR

A purificação do produto da PCR foi feita via solução de PEG (polyethylene glycol), que em temperatura ideal (com o uso da estufa) eliminaram da reação amplificada resíduos de baixo peso molecular tais como sais, iniciadores de sequência e dNTPs. Para cada 10µl do produto da PCR foi utilizado 10µl de PEG (10 u/µl).

3.1.8. Reação de sequenciamento

A reação de sequenciamento foi feita em uma placa específica (para eletroinjeção no sequenciador automático), para um volume final, por amostra, de 10 µl, contendo: DNA amplificado e purificado; iniciador de sequência (*wsp136F* – grupo A e *wsp81F* grupo B – *forward*) (Tabela 2); *Big Dye* – uma solução contendo DNA polimerase, dNTPs e dideoxinucleotídeos (que possuem a fluorescência a ser captada no sequenciador automático); tampão do *Big Dye*; e água autoclavada deionizada.

Tabela 3. Componentes da reação de sequenciamento.

Reagentes	Volumes (µl)
Tampão	2,5
Iniciador de sequência	2,0
Água <i>miliq</i>	2,2
Big Dye	0,3
Produto da PCR purificado	3,0
TOTAL	10,0

Em seguida, as amostras foram submetidas ao termociclador *Eppendorf* com ciclos programados para desnaturação das fitas complementares; anelamento dos iniciadores de sequência e extensão da região a ser sequenciada:

35 ciclos de:

- Desnaturação a 96 °C por 10 segundos;
- Anelamento a 50 °C por 15 segundos;
- Extensão a 60 °C por 4 minutos.

3.1.9. Precipitação do produto de reação de sequenciamento

Após a reação de sequenciamento, as amostras de DNA resultantes foram precipitadas. Para isso foi utilizado 2,5µl de ETDA (125 mM); 27,5 µl de etanol (100%), e 30 µl de etanol (70%). Seguindo protocolo de centrifugação e temperaturas adequadas.

A ressuspensão das amostras foi feita com 10 µl de Hi-Di Formaldeído. Em seguida, a placa contendo o DNA foi submetida a eletroinjeção no sequenciador automático ABI 3130XL (*Applied Biosystems*), de acordo com a metodologia padrão do fabricante.

3.1.10. Alinhamento e edição das sequências

As sequências do gene *wsp* foram conferidas e editadas no programa BioEdit Version 5.0.6. (Hall, 1999). O alinhamento das sequências foi feito com o auxílio da ferramenta Clustal W (Thompson *et al.*, 1996). Após a edição manual das sequências, aos sítios que apresentaram deleções ou inserções (*indels*) foram acrescentados *gaps* com a finalidade de manter a homologia entre os sítios. Posteriormente, foram comparadas com outras sequências disponíveis no GenBank e identificadas utilizando-se o BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

3.1.11. Análise dos dados

Foi determinada a porcentagem de infecção pela bactéria *Wolbachia* para cada gênero de mosquito analisado. Comparações das frequências de infecção entre os gêneros de mosquitos foram realizadas utilizando-se o teste estatístico χ^2 (Qui-quadrado).

3.2. Efeito do tratamento com tetraciclina na infecção por *Wolbachia* em *Aedes albopictus*

Para a realização do experimento, inicialmente foram estabelecidas colônias de *A. albopictus*, sendo (1) tratada com o antibiótico tetraciclina (T) e outra, (2) não tratada (NT), fazendo adaptações da metodologia descrita por Islam e Dobson (2006).

3.2.1. Manutenção de colônia de *A. albopictus* tratadas com tetraciclina

A colônia de *A. albopictus* tratada com antibiótico permaneceu no insetário com fotoperíodo de 12 horas, temperaturas de $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade relativa de 70 a 80%. Inicialmente os ovos foram colocados para a eclosão das larvas em água destilada e mantidos em densidade baixa. As larvas foram alimentadas com uma mistura de farinha de

peixe e pó de fígado. As pupas foram retiradas diariamente e colocadas dentro da gaiola para a emergência dos adultos. Para obtenção de ovos, os mosquitos adultos, machos e fêmeas, foram alimentados com solução açucarada a 10% e, como fonte sanguínea às fêmeas, foi utilizado um hamster (*Mesocricetus auratus* Waterhouse). A postura dos ovos se deu em recipiente plástico com papel filtro umedecido com água. Os ovos foram coletados semanalmente e mantidos em câmara úmida por um período de 3 a 5 dias, garantindo dessa forma o período de desenvolvimento embrionário. Para eliminar a infecção pela bactéria foi realizado o tratamento com antibiótico tetraciclina.

O tratamento com tetraciclina para remoção da infecção por *Wolbachia* foi realizado com larvas e adultos originados de mosquitos coletados em campo e infectados pelo grupo A e B da bactéria. Inicialmente, testou-se o tratamento de larvas conforme descrito por Otsuka e Takaoka (1997), onde os ovos foram colocados para eclosão das larvas em solução de tetraciclina de 1,0; 2,0 e 2,5 mg/ml (pH = 2,7) por 24 horas.

O tratamento dos mosquitos adultos com tetraciclina consistiu na adição do antibiótico (1.0 mg/ml) dissolvido na solução açucarada 10% (pH = 7) oferecida aos adultos dentro da gaiola e, estes foram alimentados continuamente com esta solução de tetraciclina, seguindo-se a metodologia descrita por Dobson e Rattanadechakul (2001). O tratamento dos mosquitos adultos foi realizado até a 6ª geração (F₆) e amostras dos mosquitos foram analisadas por PCR para verificar o status da infecção por *Wolbachia*.

3.2.2. Manutenção de colônia de *A. albopictus* não tratada com tetraciclina

Para o estabelecimento e a manutenção de colônia de *A. albopictus* infectada por *Wolbachia*, ou seja, não tratada com tetraciclina, inicialmente foram coletadas larvas em armadilhas de pneu instaladas nas localidades que apresentaram positividade para a detecção de *Wolbachia* nas análises de campo. As larvas foram então transportadas ao laboratório de Malária e Dengue (INPA) e criadas até a emergência dos adultos. Para tanto, as pupas foram removidas das cubas de criação e colocadas em gaiolas. Para comprovar o status de infecção por *Wolbachia*, amostras dos mosquitos recém-emergidos foram utilizadas em reações de PCR para a detecção da bactéria. Após a confirmação da infecção por *Wolbachia* foi estabelecida a colônia conforme descrito por Islam e Dobson (2006).

Segundo os autores, a densidade da bactéria aumenta com a passagem de geração para geração. Em cada geração de mosquito, amostras foram retiradas para confirmar a infecção.

3.2.3. Desenho experimental – Determinação de Incompatibilidade Citoplasmática

O desenho experimental para o cruzamento consistiu de acasalamento entre fêmeas e machos tratados e não tratados com tetraciclina. As fêmeas e os machos com 24h após emergência foram alimentados com solução açucarada a 10%. Seguindo a metodologia adaptada de Islam e Dobson (2006), foram estabelecidas quatro gaiolas de cruzamento, a saber: 1 – fêmeas tratadas (FT) foram cruzadas com machos não tratados (MNT); 2 – fêmeas não tratadas (FNT) foram cruzadas com machos tratados (MT); 3 – cruzamento entre fêmeas e machos não tratados (FMNT), utilizados como controle; 4 – cruzamento entre fêmeas e machos tratados (FMT) (Tabela 5).

Tabela 4. Desenho esquemático do experimento de cruzamentos entre fêmeas e machos infectados e não infectados por *Wolbachia*.

Sexo	90 ♀ FNT	90 ♀ FT
90 ♂ MNT	X	X
90 ♂ MT	X	X

Legenda: FNT = fêmeas não tratadas; FT = fêmeas tratadas.
MNT = machos não tratados; MT = machos tratados.

Após permitir dois dias de cruzamento, as fêmeas foram alimentadas em hamster (*M. auratus*) permitindo apenas uma alimentação sanguínea. Após o período de 48h as fêmeas foram individualmente transferidas para copos plásticos contendo papel filtro umedecido com água e identificados de acordo com a gaiola de cruzamento de origem, para que ocorresse a postura dos ovos. Ao final de sete dias, os copos de postura foram vistoriados para a presença de ovos e posteriormente, permaneceram em câmara úmida por 5 dias para a maturação dos mesmos. Após a contabilização do número de ovos por fêmea, os ovos foram colocados para eclosão em água destilada contendo alimento para estimular a eclosão das larvas, nos copos individuais.

3.2.4. Coleta e análise dos dados

Os copos do experimento foram examinados diariamente para se determinar o estágio de desenvolvimento das larvas. Quando surgiram as primeiras pupas, estas foram removidas para pequenos copos plásticos com água para a emergência dos adultos. Utilizaram-se três parâmetros para quantificar o efeito dos diferentes cruzamentos: fecundidade, longevidade (taxa de eclosão, sobrevivência das larvas e tempo de desenvolvimento) e frequência sexual.

A fecundidade foi estabelecida pelo número médio de ovos colocados por cada fêmea; a longevidade foi estimada considerando a taxa de eclosão dos ovos, a sobrevivência das larvas calculada para cada recipiente como uma proporção do número de pupas pelo número inicial de larvas e o tempo de desenvolvimento estimado em número de dias, computando desde a eclosão da larva até o dia da emergência do alado.

A frequência de ovopositores, viabilidade dos ovos e mortalidade das larvas, dos tratamentos (FT, FNT, FMNT, FMT) foi obtida através da frequência percentual apresentados em gráficos de coluna. A frequência de eclosão entre os tratamentos foi apresentada em função do tempo (dias) em gráfico de linha.

A fecundidade e a frequência de pupas entre os tratamentos (FT, FNT, FMNT, FMT) foi comparada por análise de variância simples (ANOVA), após os valores terem sido considerados homocedásticos pelo teste de Levene. Em seguida, os valores médios das fecundidades foram comparados pelo teste de DMS para amostras de tamanho desigual. Em todas as análises o nível de significância foi de 5% ($p < 0,05$). Também foram descritos os parâmetros estatísticos da fecundidade de cada tratamento. Foi utilizado o programa estatístico BioEstat versão 5.0.

4. Resultados

4.1. Distribuição e Diversidade de *Wolbachia* em mosquitos

Os indivíduos que foram positivos para infecções por *Wolbachia* exibiram faixas referentes ao fragmento de *Wolbachia* específicos *wsp* de aproximadamente 610pb (Figuras 3-5), e os fragmentos do DNA mitocondrial de controle de inseto de 400pb. Nos exemplares considerados negativos para *Wolbachia* apenas a banda de controle de 400pb do DNA mitocondrial foi detectada. Os fragmentos para os grupos A e B amplificaram um fragmento de aproximadamente 555pb e 441pb, respectivamente (Figura 6).

No total, 1.056 indivíduos representando 39 espécies e 11 gêneros de culicídeos (Tabela 6), coletados em campo foram examinados para a presença de *Wolbachia* pela reação da polimerase em cadeia (PCR), utilizando os iniciadores de sequência *wsp* específicos para a bactéria. O detalhamento dos resultados quanto à condição de infecção para cada espécie e o número de indivíduos examinados são apresentados na Tabela 6.

Considerando o total de indivíduos analisados – 1.056, 25,18% foram positivos para a infecção por *Wolbachia*, por meio do PCR. Considerando o total de 39 espécies examinadas, 24 (61,5%) foram positivas para *Wolbachia*, sendo que 22 destas espécies não foram descritas anteriormente infectadas pela bactéria e este é o primeiro registro destas espécies infectadas por *Wolbachia* no Brasil. Estas espécies pertencem aos gêneros *Anopheles*, *Aedes*, *Aedeomyia*, *Coquillettidia*, *Culex*, *Mansonia*, *Psorophora* e *Uranotaenia* (Tabela 6).

Dentre as 39 espécies testadas e as 24 positivas, em quatro exemplares dentre as examinadas e dois positivos, não foi possível realizar a identificação a nível específico e, por isso, foi mencionado somente pelo maior nível taxonômico. Por isso, o número de espécies que foram positivas para *Wolbachia* pode ser ligeiramente maior do que o relatado. Indivíduos infectados foram encontrados em 72,7% dos 11 gêneros examinados.

No gênero *Aedes*, 42,8% das sete espécies examinadas foram encontradas infectadas, no gênero *Culex*, 100% das espécies analisadas foram positivas. Foram detectadas espécies de *Anopheles* positivas dentre as 10 espécies examinadas, porém, mesmo tendo analisado grande número de indivíduos (n = 115), somente verificou-se positividade em cinco espécies (Tabela 7). Este é o primeiro registro de espécies de *Anopheles* infectadas por *Wolbachia*. Os três gêneros acima citados incluem as espécies de mosquitos de maior

importância médica, *A. aegypti*, *C. quinquefasciatus* e *A. darlingi*, por serem os principais vetores da dengue, filariose humana e malária, respectivamente.

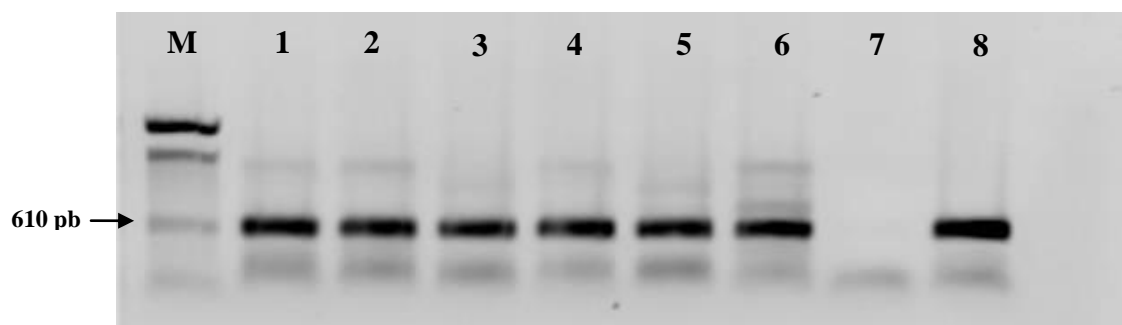


Figura 3. Gel de agarose (1%) dos produtos de PCR para o gene *wsp* nas diferentes espécies de mosquitos. Legenda: M – marcador de peso molecular (100pb, Invitrogen); 1 – *A. serratus*; 2 – *A. hortator*; 3 – *A. squamipennis*; 4 – *C. coronator*; 5 – *C. juxtamansonia*; 6 – *C. quinquefasciatus*; 7 – Controle negativo; 8 – Controle positivo (*A. albopictus*).

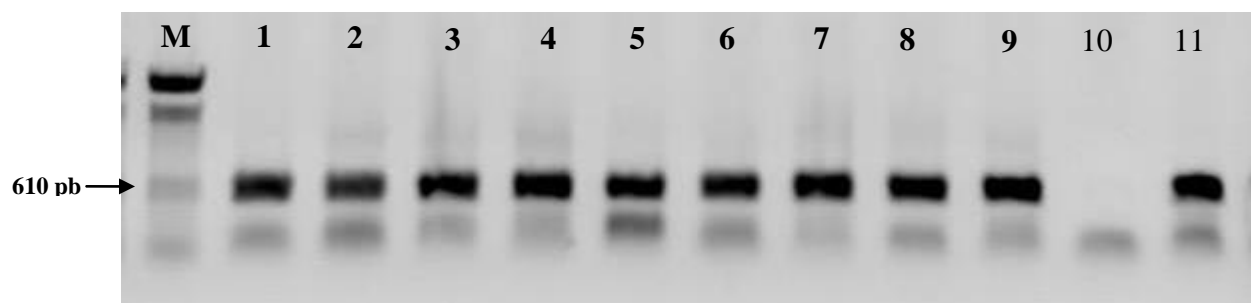


Figura 4. Gel de agarose (1%) dos produtos de PCR para o gene *wsp* nas diferentes espécies de mosquitos. Legenda: M – marcador de peso molecular (100pb, Invitrogen); 1 – *C. venezuelensis*; 2 – *M. amazonensis*; 3 – *M. humeralis*; 4 – *M. titilans*; 5 – *P. albipes*; 6 – *P. cingulata*; 7 – *P. circumflava*; 8 – *P. ferox*; 9 – *U. calosomata*; 10 – Controle negativo; 11 – Controle positivo (*A. albopictus*).

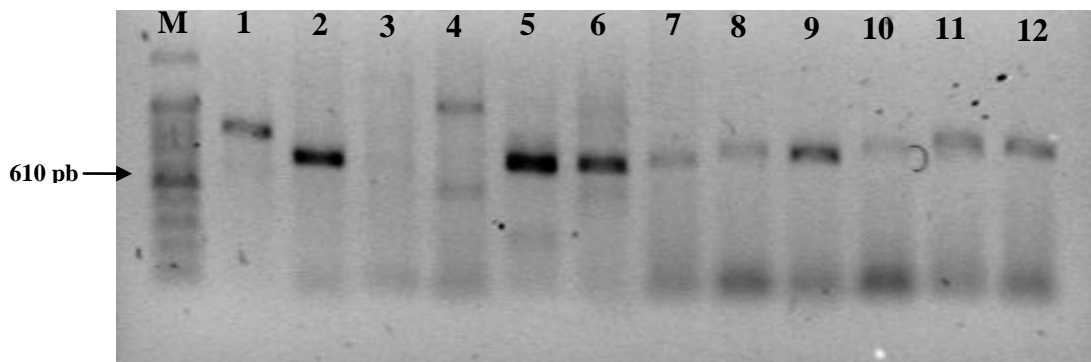


Figura 5. Gel de agarose (1%) dos produtos de PCR para o gene *wsp* nas diferentes espécies de *Anopheles*. Legenda: M – marcador de peso molecular (100pb, Invitrogen); 1 – *A. darlingi*; 2 – *A. oswaldoi*; 3 – Controle negativo; 4 – *A. albitarsis*; 5 – Controle positivo (*A. albopictus*); 6 – *A. matogrossensis*; 7 – *A. nimbus*; 8 – *A. triannulatus*; 9 – *A. shannoni*; 10 – *A. nuneztovari*; 11 – *A. squamifemur*; 12 – *A. medipunctatus*.

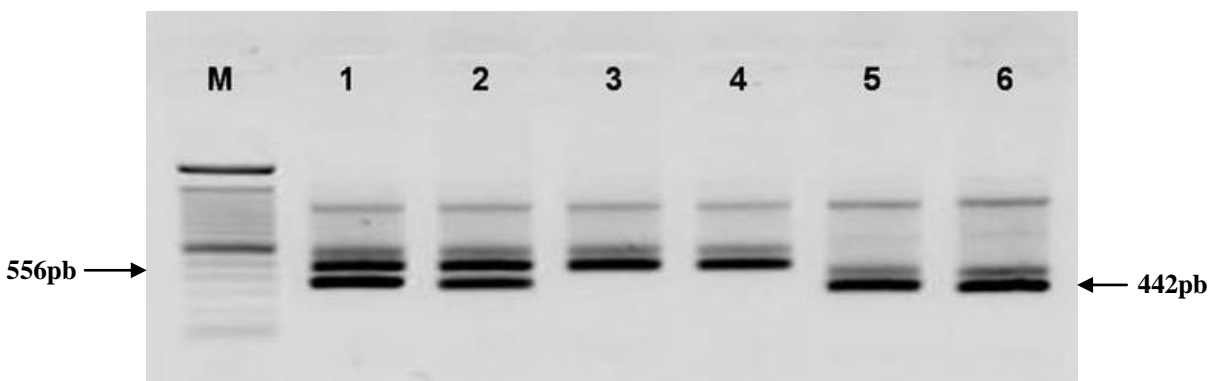


Figura 6. Gel de agarose (1%) dos produtos da semi-nested PCR para o gene *wsp* A e B em *Aedes albopictus*. Legenda: M – marcador de peso molecular (100pb, Invitrogen); 1 e 2 – amplificação dos grupos A e B (infecção dupla); 3 e 4 – amplificação do grupo A; 5 e 6 – amplificação do grupo B.

Tabela 5. Presença de *Wolbachia* determinada pela amplificação do gene *wsp* de *Wolbachia* via PCR, em espécies de mosquitos adultos coletados no Estado do Amazonas, Brasil.

Gênero (Subgênero) Espécie	Número examinado	Status da Infecção
<i>Aedeomyia (Aedeomyia)</i>		
<i>A. squamipennis</i> Lynch-Arribalzaga, 1878	62	+
<i>Aedes (Stegomyia)</i>		
<i>A. albopictus</i> Skuse, 1894	86	+
<i>A. aegypti</i> Linnaeus, 1762	52	-
<i>Aedes (Ochlerotatus)</i>		
<i>A. fluviatilis</i> Lutz	1	-
<i>A. fulvus</i> Wiedemann, 1828	3	-
<i>A. hortator</i> Dyar e Knab, 1907	2	+
<i>A. serratus</i> Theobald, 1901	59	+
<i>A. scapularis</i> Rondani, 1848	1	+
<i>Anopheles (Anopheles)</i>		
<i>A. matogrossensis</i> Lutz e Neiva, 1911	9	+
<i>A. mediopunctatus</i> Theobald, 1903	2	+
<i>A. shannoni</i> Davis, 1931	1	+
<i>Anopheles (Lophopodomyia)</i>		
<i>A. squamifemur</i> Antunes, 1937	1	+
<i>Anopheles (Nyssorrhynchus)</i>		
<i>A. albitarsis</i> Lynch-Arribalzaga, 1878	11	-
<i>A. darlingi</i> Root, 1926	48	-
<i>A. nuneztovari</i> Gabaldón, 1940	29	-
<i>A. oswaldoi</i> Peryassú, 1922	2	+
<i>A. triannulatus</i> Neiva e Pinto, 1922	10	-
<i>Anopheles (Stethomyia)</i>		
<i>A. nimbus</i> Theobald, 1902	2	-
<i>Coquillettidia (Rhynchotaenia)</i>		
<i>C. venezuelensis</i> Theobald, 1912	55	+

* Continuação da tabela 5.

<i>C. juxtamansonia</i> Chagas, 1907	8	+
<i>C. shannoni</i> Lane e Antunes, 1937	8	-
<i>Culex (Culex)</i>		
<i>C. coronator</i> Dyar e Knab, 1906	41	+
<i>C. quinquefasciatus</i> Say, 1823	127	+
<i>Culex (Culex)</i> spp.	14	+
<i>Culex (Melanoconion)</i>		
<i>C. (Melanoconion)</i> spp.	85	+
<i>Limatus</i>		
<i>L. durhamii</i> Theobald, 1901	3	-
<i>L. flavisetosus</i> Oliveira Castro, 1935	1	-
<i>Mansonia (Mansonia)</i>		
<i>M. amazonensis</i> Theobald, 1901	40	+
<i>M. humeralis</i> Dyar e Knab, 1916	22	+
<i>M. titillans</i> Walker, 1848	42	+
<i>Psorophora (Grabhamia)</i>		
<i>P. cingulata</i> Fabricius, 1805	9	+
<i>P. dimidiata</i> Cerqueira, 1943	1	-
<i>Psorophora (Janthinosoma)</i>		
<i>P. albipes</i> Theobald, 1907	92	+
<i>P. circumflava</i> Cerqueira, 1943	6	+
<i>P. ferox</i> Humboldt, 1819	41	+
<i>Trichoproposopon (Trichoproposopon)</i>		
<i>T. digitatum</i> Rondani, 1848	5	-
<i>Uranotaenia (Uranotaenia)</i>		
<i>U. calosomata</i> Dyar e Knab, 1907	29	+
<i>U. (Uranotaenia)</i> spp.	40	+
<i>Wyeomyia (Dendromyia)</i>		
<i>W. (Dendromyia)</i> spp.	6	-
TOTAL	1056	

O gênero *Aedeomyia* foi representado somente pela espécie *A. squamipennis* e observou-se uma taxa de infecção de 45,1%. Para o gênero *Anopheles* a frequência de infecção foi de 4,3%. A frequência observada de infecção por *Wolbachia* para o gênero *Coquillettidia* foi 18,3%, enquanto que, para os gêneros *Mansonia*, *Psorophora* e *Uranotaenia* foram 16,3%, 11,4% e 24,6%, respectivamente.

Considerando o total de indivíduos dentre os gêneros positivos, a positividade média foi de 30,4% (266/874), com uma variação entre as espécies de 1,2% a 100% conforme apresentado na Tabela 7. Em relação à variação da positividade entre as espécies, *A. albopictus* e *C. quinquefasciatus* foram as que apresentaram as maiores frequências dentre os infectados, com 79,1% e 64,6%, respectivamente. A comparação entre os gêneros no qual foram testados mais de um indivíduo, a frequência de espécies infectadas difere estatisticamente entre os gêneros ($\chi^2 = 238,23$ gl = 17, $P < 0,0001$).

Em relação ao local de coleta dos mosquitos, as maiores frequências de positividade ocorreram em São Gabriel da Cachoeira, Manaus e Presidente Figueiredo (Figura 7). Nestes locais as espécies de mosquitos predominantes foram *C. quinquefasciatus* e *A. albopictus*, comumente encontradas em ambiente urbano e que apresentaram alta taxa de infecção por *Wolbachia*. Nas demais localidades, as amostras analisadas são de espécies de mosquitos silvestres, que por serem encontradas em locais de mata, normalmente apresentam maior diversidade de espécies em menor abundância.

A classificação de *Wolbachia* dentro dos maiores grupos A e B por meio da *semi-nested PCR* mostraram que 19 das 24 espécies positivas foram infectados somente com bactérias do grupo A, com quatro bactérias do grupo B somente, e uma com ambos os grupos A e B, representada pela espécie *A. albopictus*. Com base no número total de espécies infectadas, 79,1% foram positivas para o grupo A (19/24) e 16,6% para o grupo B (4/24) de *Wolbachia*, sendo que a frequência observada de infecção dupla (5,2%) foi estatisticamente menor do que a esperada ($\chi^2 = 15,04$, gl = 1, $P = 0,0001$).

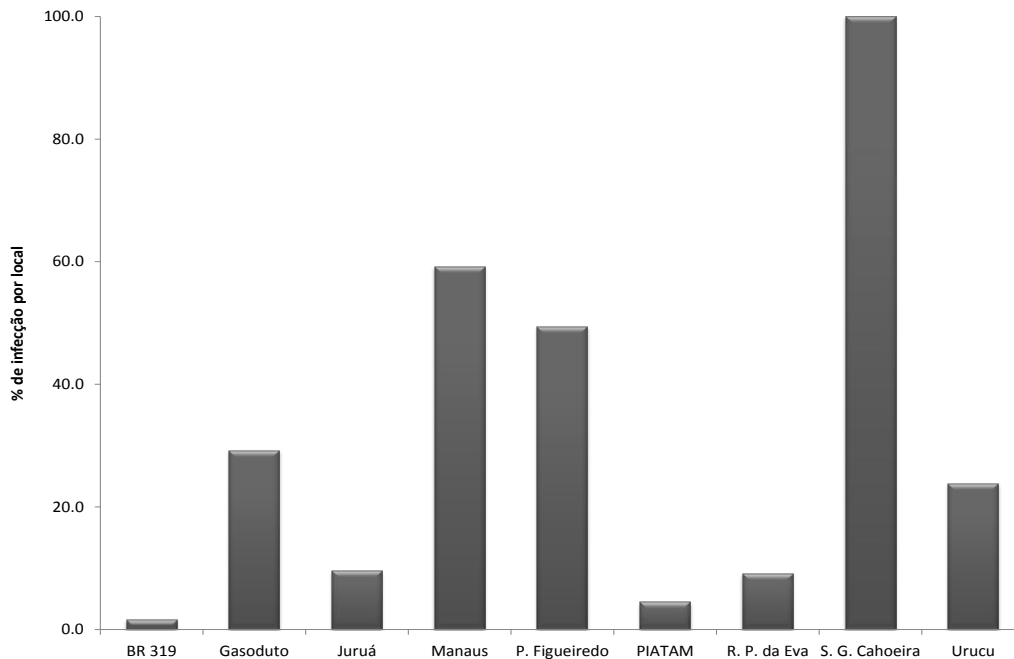


Figura 5. Gráfico da porcentagem de infecção de *Wolbachia* nas diferentes espécies de mosquitos, por local de coleta.

A classificação nos subgrupos realizada a partir da comparação das sequências por meio do *blast n* com sequências previamente depositadas no *GenBank* mostrou que cinco subgrupos descritos anteriormente foram representados (Tabela 7). Não foram detectados superinfecção com múltiplas estirpes da bactéria tanto do grupo A quanto do B.

O alinhamento das sequências do gene *wsp* obtida da espécie *C. quinquefasciatus* mostrou 99% de identidade com a sequência AM9998871 (*Wolbachia* endosymbiont of *Culex quinquefasciatus* Pel strain *wPip*) depositada no banco de dados do NCBI, confirmando se tratar do gene *wsp wPip*.

Para a espécie *A. albopictus* o alinhamento das sequências mostrou identidade de 99% com a sequência AF020058 (Phylogeny and PCR-based classification of *Wolbachia* strains using *wsp* gene sequences) confirmando se tratar do subgrupo *wAlbA*, e 99% com a sequência AF020059 (Phylogeny and PCR-based classification of *Wolbachia* strains using *wsp* gene sequences) confirmando se tratar do subgrupo *wAlbB*.

Das outras espécies consideradas positivas, foi obtida apenas uma sequência para as espécies *A. hortator*, *A. squamipennis*, *A. oswaldoi*, *C. venezuelensis*, *Culex* (*Culex*) spp. e

C. coronator. Para as demais espécies positivas não foi possível à obtenção de sequências que permitissem realizar o alinhamento com as sequências depositadas no banco de dados do NCBI.

Para a espécie *A. hortator* o alinhamento da sequência mostrou indentidade de 99% com a sequência AF521150 (*Wolbachia* endosymbiont of *Pegoscapus herrei* strain A1 outer surface protein (wsp) gene, partial cds), confirmando se tratar de *Wolbachia*.

O alinhamento da sequência obtida da espécie *A. squamipennis* mostrou identidade de 99% com a sequência de *Aedes fluviatilis*, cepa *wFlu*, sequência GQ9171081 (*Wolbachia pipientis* strain *wFlu* outer surface protein gene, partial cds), confirmando a identificação deste subgrupo.

A sequência obtida da espécie de *A. oswaldoi* mostrou 99% de similaridade com as sequências de *A. albopictus* EU7271391 (*Wolbachia* symbiont *wAlbA* of *Aedes albopictus* outer surface membrane protein (wsp) gene, partial cds) e de *Culex gelidus* HM0078311 (*Wolbachia* endosymbiont of *Culex gelidus* surface protein A-like (*wspA*) gene, partial sequence).

Para a espécie *C. venezuelensis* a sequência obtida mostrou 99% de identidade com as sequências AF3974111 (*Wolbachia* endosymbiont of *Aedes albopictus* *Wolbachia* outer surface protein Wsp gene, partial cds) e AY4628581 (*Wolbachia* endosymbiont of *Culex minor bicornutus* outer surface protein precursor (wsp) gene, partial cds), confirmando a identificação de *Wolbachia*, porém, não identificando o grupo e subgrupo.

O alinhamento da sequência obtida da espécie de *C. coronator* mostrou 99% de similaridade com a com a sequência de *Culex gelidus* HM0078311 (*Wolbachia* endosymbiont of *Culex gelidus* surface protein A-like (*wspA*) gene, partial sequence), confirmando a identificação do subgrupo *wspA*.

Da mesma maneira como foi registrado para a espécie *A. hortator* o alinhamento da sequência obtida de *Culex* (*Culex*) spp. mostrou indentidade de 99% com as sequências GU0135501 (*Wolbachia* endosymbiont of *Conotrachelus nenuphar* strain *wCnel* *Wolbachia* surface protein (wsp) gene, partial cds), e com a sequência AY5664221 (*Wolbachia pipientis* strain *wCalt2* outer surface protein (wsp) gene, partial cds) confirmando se tratar de *Wolbachia*.

Tabela 6. Relação do primeiro registro de espécies de mosquitos infectadas por *Wolbachia*, determinada pela amplificação do gene *wsp* grupo A e B por meio do semi-nested PCR, coletados no estado do Amazonas, Brasil.

Espécies	N. Examinados	N. Positivos	% positividade	Classificação	
				Grupo	Subgrupo
<i>A. serratus</i>	58	7	12,1	A	n.i.
<i>A. albopictus</i> *	86	68	79,1	A, B	wAlbA, wAlbB
<i>A. hortator</i>	2	1	50	A	n.c.1
<i>A. squamipennis</i>	62	28	45,2	B	wFlu
<i>A. matogrossensis</i>	9	1	11,1	A	n.i.
<i>A. mediopunctatus</i>	2	1	50	A	n.i.
<i>A. shannoni</i>	1	1	100	A	n.i.
<i>A. squamifemur</i>	1	1	100	A	n.i.
<i>A. oswaldoi</i>	2	1	100	A	n.c.2
<i>C. (Culex) spp.</i>	14	6	42,9	A	n.c.3
<i>C. (Mel.) spp.</i>	85	1	1,2	A	n.i.
<i>C. coronator</i>	41	4	9,8	A	wspA
<i>C. juxtamansonia</i>	8	1	12,5	A	n.i.
<i>C. quinquefasciatus</i> *	127	82	64,6	B	Pip
<i>C. venezuelensis</i>	55	12	21,8	A	n.c.4
<i>M. amazonensis</i>	40	7	17,5	B	n.i.
<i>M. humeralis</i>	22	2	9,1	B	n.i.
<i>M. titillans</i>	42	8	19	B	n.i.
<i>P. albipes</i>	92	2	2,2	A	n.i.
<i>P. cingulata</i>	9	4	44,4	A	n.i.
<i>P. circumflava</i>	6	2	33,3	A	n.i.
<i>P. ferox</i>	41	9	22	A	n.i.
<i>U. (Uranotaenia) spp.</i>	40	16	40	A	n.i.
<i>U. calosomata</i>	29	1	3,4	A	n.i.
TOTAL	874	266	30,4		

* Primeiro registro para Amazônia. Legenda: n.i. = não identificado; n.c. = nova cepa.

4.2. Efeito do tratamento com tetraciclina em *Aedes albopictus*

Os experimentos realizados para a observação do efeito de *Wolbachia* nas características de vida de *A. albopictus* foram realizados considerando duas populações de mosquitos, uma gaiola originada com indivíduos coletados no campo e positivos para *Wolbachia* e outra, originada a partir de exemplares coletados no campo e tratados com o antibiótico tetraciclina, para que a cura da infecção pela bactéria fosse possível, permitindo a manutenção de colônia de mosquitos não infectados por *Wolbachia*. Todos os ensaios dos experimentos foram realizados em ambiente controlado à temperatura média de 28°C e umidade relativa em torno de 90%.

Inicialmente, para a obtenção da colônia de indivíduos não infectados, ou seja, tratados com tetraciclina, os testes do tratamento de larvas com o antibiótico não foram eficazes nas três concentrações testadas (1,0; 2,0 e 2,5 mg/ml), gerando elevada mortalidade das larvas. Além disso, as larvas que sobreviveram foram criadas até a emergência dos adultos que foram cruzados, porém, tanto a produção de ovos, quanto a taxa de eclosão das larvas foram muito baixa. Este experimento foi finalizado na geração F₄, pois, os poucos mosquitos adultos que sobreviveram (n = 10) 100% foram considerados positivos para *Wolbachia* pela amplificação do gene *wsp* via PCR. Desta forma foram considerados infectados e, ficou evidenciada a ineficiência do tratamento das larvas para a cura da infecção, não permitindo a obtenção de colônia não infectada pela bactéria.

Devido a grande dificuldade de obter colônia de *A. albopictus* não infectada via tratamento das larvas com antibiótico tetraciclina, foi realizado o tratamento dos mosquitos adultos, onde a solução de tetraciclina (1,0 mg/ml; pH = 7,0) foi oferecida aos adultos juntamente com a solução açucarada, normalmente utilizada para alimentação dos mosquitos. Neste experimento, o tratamento dos mosquitos adultos resultou em elevada taxa de sobrevivência, o que possibilitou realizar o mesmo tratamento até a 6ª geração (F₆).

Nas amostras dos mosquitos da colônia de cada geração analisadas por PCR para verificar o status da infecção por *Wolbachia* verificou-se que até a F₃, 100% (n = 20) dos mosquitos foram considerados positivos para a infecção pela bactéria. A taxa de infecção das gerações seguintes, F₄, F₅ e F₆ foram de 60%, 80% e 90%, respectivamente. Deste modo, não foi possível a obtenção de colônia de *A. albopictus* 100% livre da infecção por

Wolbachia. Mesmo não sendo possível a obtenção da colônia dos mosquitos 100% livres da infecção pela *Wolbachia*, foram realizados os experimentos de cruzamentos considerando as colônias tratadas com antibiótico e as colônias obtidas com mosquitos não tratados.

4.2.1. Fecundidade

Primeiramente, considerando que, em cada cruzamento realizado foram colocadas 90 fêmeas para ovipor individualmente, foi observado que nos grupos tratados um maior número de fêmeas não realizaram a postura dos ovos. Verificou-se uma menor frequência de fêmeas ovipositoras nos cruzamentos entre machos não tratados com fêmeas tratadas (FT) e, entre o cruzamento de machos e fêmeas tratadas (FMT), em comparação com os cruzamentos entre fêmeas não tratadas e machos tratados (FNT) e fêmeas e machos não tratados (FMNT), conforme demonstrado na figura 8. Este resultado sugere que o tratamento com tetraciclina em ambos os cruzamentos parece ter afetado a produção de ovos pelas fêmeas tratadas.

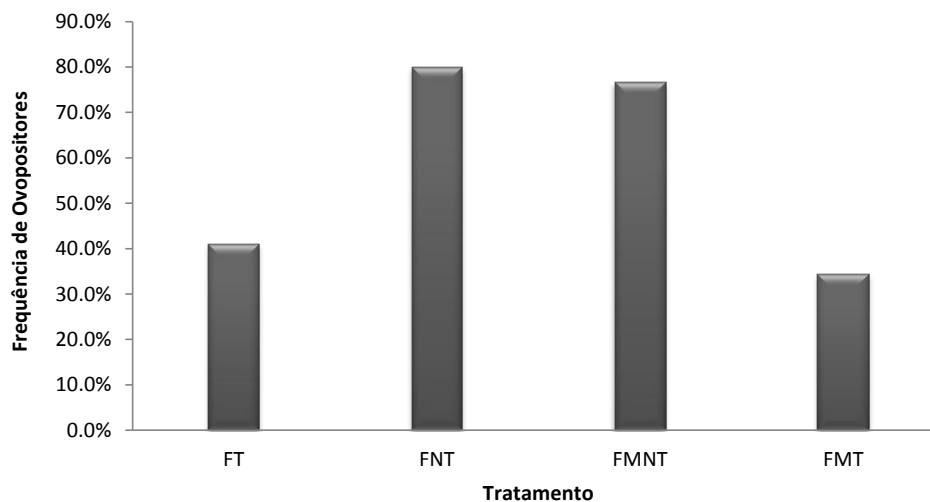


Figura 7. Efeito do cruzamento entre indivíduos tratados e não tratados na frequência de fêmeas ovipositoras após os cruzamentos realizados entre: fêmeas tratadas (FT) e machos não tratados com tetraciclina; fêmeas não tratadas (FNT) e machos tratados; fêmeas e machos não tratados (FMNT) e, fêmeas e machos tratados (FMT).

O tratamento FMT apresentou a menor fecundidade, bem como a maior variação, isto é, a fecundidade foi a mais heterogênea entre os demais tratamentos. Este mesmo tratamento foi simétrico na distribuição do número de ovos, isto é a frequência de fêmeas decresce de forma semelhante quando os valores de fecundidade se afastam da média (Tabela 8). Nos demais tratamentos, a assimetria é negativa, o que indica a existência de um menor número de fêmeas com baixa fecundidade. Em todos os tratamentos, a distribuição dos ovos foi platicúrtica, caracterizando que as fêmeas com diferentes fecundidades apresentaram frequências semelhantes na população.

Nas comparações realizadas entre as frequências de ovos, considerando os quatro cruzamentos entre os indivíduos tratados e não tratados, foi observada diferença significativa entre o número médio de ovos por fêmea. Porém, esta diferença foi observada somente para os ovos obtidos da colônia em que fêmeas e machos receberam o tratamento com antibiótico, sendo a média de ovos menor do que nos demais cruzamentos (Figura 9; Tabelas 9 e 11).

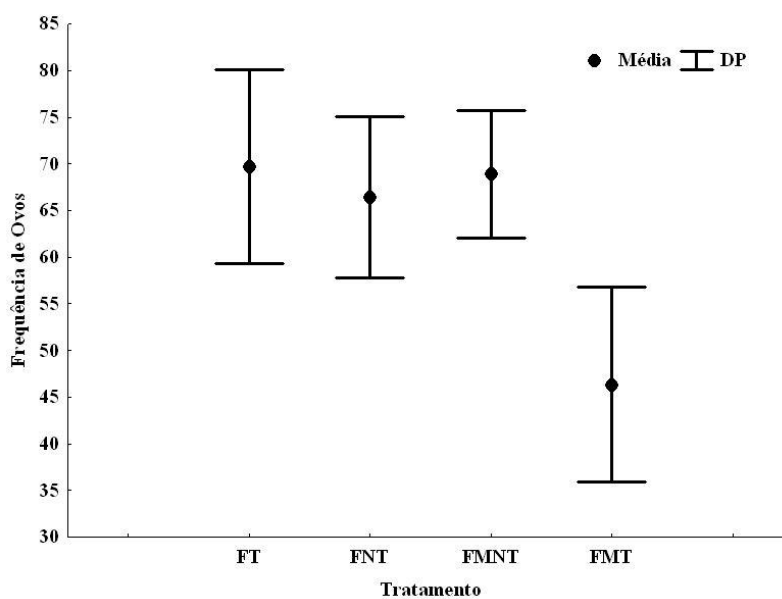


Figura 8. Efeito do cruzamento entre indivíduos tratados e não tratados na frequência média de ovos por fêmea. **Legenda:** FT = cruzamento entre fêmeas tratadas com tetraciclina e machos não tratados; FNT = cruzamento entre fêmeas não tratadas e machos tratados com tetraciclina; FMNT = cruzamento entre fêmeas e machos não tratados; FMT = cruzamento entre fêmeas e machos tratados com tetraciclina.

Tabela 7. Dados descritivos da média de ovos por fêmea em cada cruzamento realizado.

Parâmetros Descritivos	FT	FNT	FMNT	FMT
Tamanho da Amostra	37	71	68	30
Mínimo	6	4	7	1
Máximo	127	161	138	101
Amplitude Total	121	157	131	100
Mediana	71	74	72.5	46
Média Aritmética	69,70	66,42	68,88	46,33
Desvio Padrão	31,21	36,51	28,12	28,01
Coefficiente de Variação	44,78%	54,97%	40,82%	60,46%
Assimetria	-0,40	-0,06	-0,23	0,04
Curtose	-0,60	-0,64	-0,56	-0,67

Tabela 8. Resultados da análise de variância (ANOVA) sobre o efeito do cruzamento entre indivíduos tratados e não tratados na frequência média de ovos por fêmea.

Origem de variação	SS	GL	MS	F Calculado	F Tabelado	<i>p</i>
Entre grupos	12438,080	3	4146,027	4,103	2,649	0,0075
Dentro de grupos	204114,779	202	1010,469			
Total	216552,859	205				

Os resultados sobre a viabilidade dos ovos mostrou um percentual baixo de taxa de eclosão das larvas em todos os tratamentos não atingindo um valor mínimo de 50% de eclosão dos ovos, porém, não verificou-se diferença estatística entre a taxa média de eclosão nos diferentes cruzamentos. Foi observado que as menores taxas ocorreram nos cruzamentos entre fêmeas tratadas e machos não tratados e, entre fêmeas e machos tratados (Figura 10).

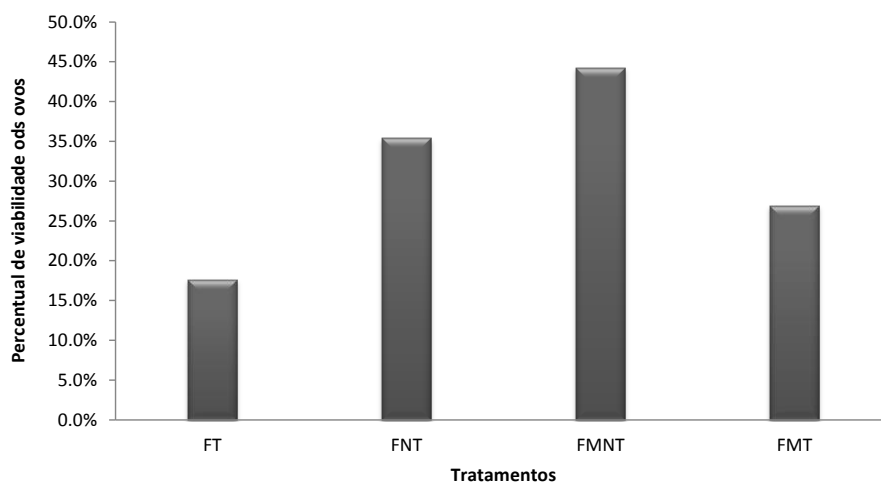


Figura 9. Efeito do cruzamento entre indivíduos tratados e não tratados no percentual de viabilidade dos ovos nos diferentes cruzamentos. **Legenda:** FT = cruzamento entre fêmeas tratadas com tetraciclina e machos não tratados; FNT = cruzamento entre fêmeas não tratadas e machos tratados com tetraciclina; FMNT = cruzamento entre fêmeas e machos não tratados; FMT = cruzamento entre fêmeas e machos tratados com tetraciclina.

4.2.2. Longevidade

Para a análise da longevidade foram considerados os parâmetros de mortalidade e tempo de desenvolvimento das larvas.

Nas comparações realizadas entre os cruzamentos de indivíduos tratados e não tratados foram observadas diferenças entre a mortalidade das larvas (ANOVA, $F = 3.1$; $gl = 3$; $p = 0.002$). A mortalidade das larvas foi maior nos cruzamentos de fêmeas não tratadas com machos tratados e entre, fêmeas e machos não tratados (Figura 11). Não houve diferença significativa entre o número total de pupas em cada tratamento (Figura 12; Tabelas 10-11). O tempo de desenvolvimento até pupa foi similar em todas as comparações entre os cruzamentos, exceto no cruzamento entre fêmeas e machos tratados (FMT).

O pico de maior frequência das pupas ocorreu entre os dias 9 e 10 após a eclosão das larvas no dia 1, para os cruzamentos FT, FNT e FMNT. A maior frequência de pupas foi observada no cruzamento entre fêmeas e machos não tratados (FMNT). Para o cruzamento de fêmeas e machos tratados (FMT), verificou-se um maior tempo de

desenvolvimento das larvas, sendo que o pico de maior frequência das pupas ocorreu entre os dias 14 e 15, conforme demonstrado na figura 13.

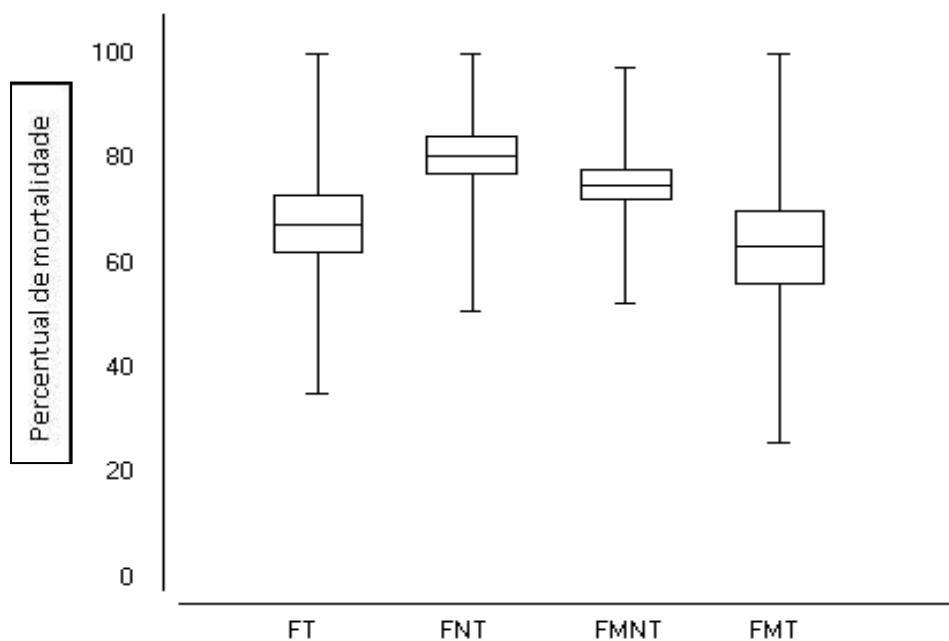


Figura 10. Efeito do cruzamento entre indivíduos tratados e não tratados na mortalidade de larvas.

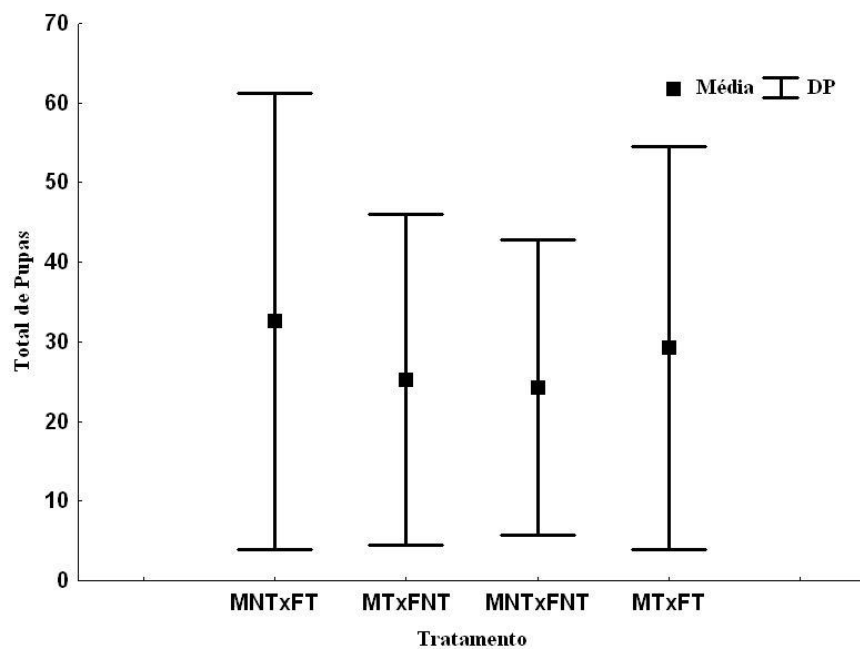


Figura 11. Efeito do cruzamento entre indivíduos tratados e não tratados no número total de pupas.

Tabela 9. Resultados da análise de variância (ANOVA) sobre o efeito do cruzamento entre indivíduos tratados e não tratados no número total de pupas.

Origem de variação	SS	GL	MS	F		<i>p</i>
				Calculado	Tabelado	
Entre grupos	1482.108	3	494.036	0.8758	2.6738	0.4555
Dentro de grupos	73891.773	131	564.059			
Total	75373.881	134				

Tabela 10. Frequência média de ovos e pupas resultante dos diferentes cruzamentos realizados. Legenda: FT = fêmeas tratadas; FNT = fêmeas não tratadas; FMNT = fêmeas e machos tratados; FMT = fêmeas e machos tratados; MNT = machos não tratados; MT = machos tratados.

Variável	FT	FNT	FMNT	FMT
Ovos	69,70 ± 31,21 ^a	66,42 ± 36,51 ^a	69,27 ± 28,15 ^a	46,33 ± 28,01 ^b
	MNTxFT	MTxFNT	MNTxFNT	MTxFT
Pupas	32,61 ± 30,16 ^a	25,29 ± 21,88 ^a	24,25 ± 19,47 ^a	29,29 ± 26,63 ^a

Letras diferentes na horizontal indicam diferença ($p < 0,05$) entre as médias para o teste de MDS com N diferente.

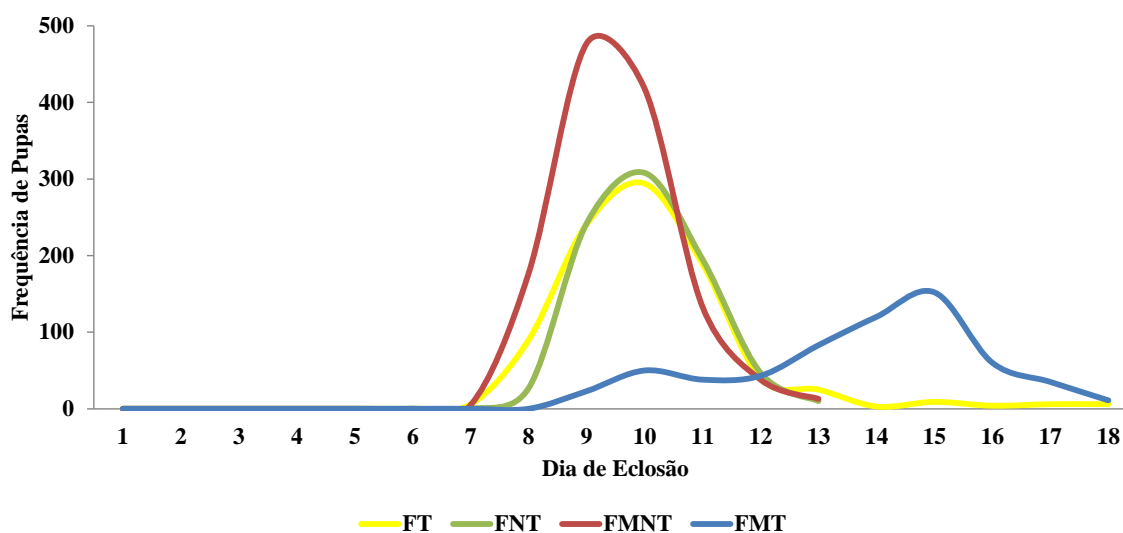


Figura 12. Efeito do cruzamento entre indivíduos tratados e não tratados no tempo de desenvolvimento de larvas até pupa.

4.2.3. Frequência sexual

Na análise da frequência sexual a proporção de fêmeas e machos sobreviventes foi muito semelhante em todos os cruzamentos realizados, sendo as diferenças não significativas. Foi observada a predominância de fêmeas no cruzamento entre fêmeas não tratadas e machos tratados (FNT) e, nos demais cruzamentos ocorreu predominância de machos (Figura 14).

Além das frequências finais observadas, foi analisado também o comportamento na emergência dos mosquitos adultos, como mostram as figuras 15A a D. Nos gráficos pode-se observar que ocorreu primeiramente um pico de emergência de adultos machos e, posteriormente, de fêmeas em todos os cruzamentos. Além disso, verificou-se que o pico de maior frequência, tanto para os machos, quanto para as fêmeas, foram entre os dias 3 e 5 (Figuras 15A a C), exceto para os indivíduos do cruzamento entre fêmeas e machos tratados (FMT) onde o pico de maior frequência variou entre os dias 5 e 9 (Figura 15D).

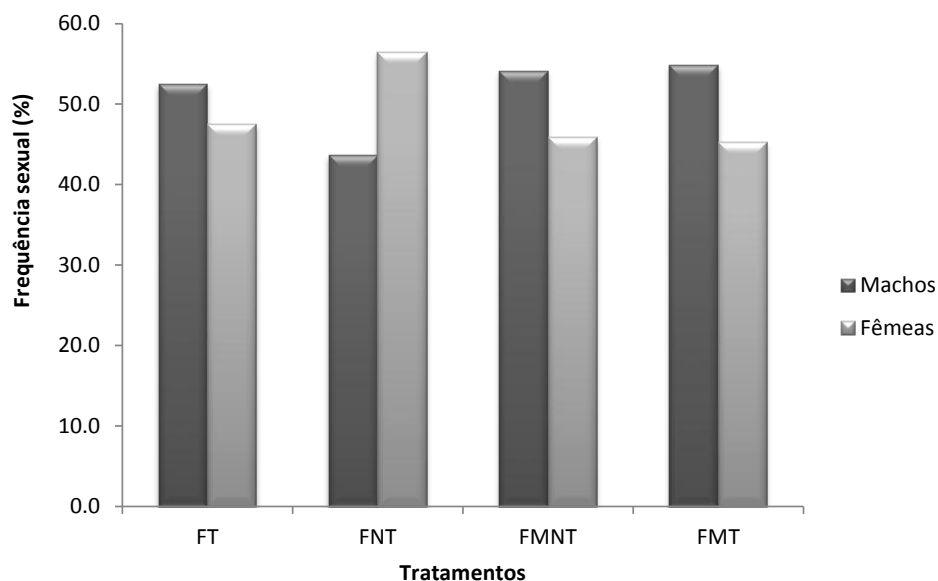


Figura 13. Efeito do cruzamento entre indivíduos tratados e não tratados na frequência sexual. **Legenda:** FT = cruzamento entre fêmeas tratadas com tetraciclina e machos não tratados; FNT = cruzamento entre fêmeas não tratadas e machos tratados com tetraciclina; FMNT = cruzamento entre fêmeas e machos não tratados; FMT = cruzamento entre fêmeas e machos tratados com tetraciclina.

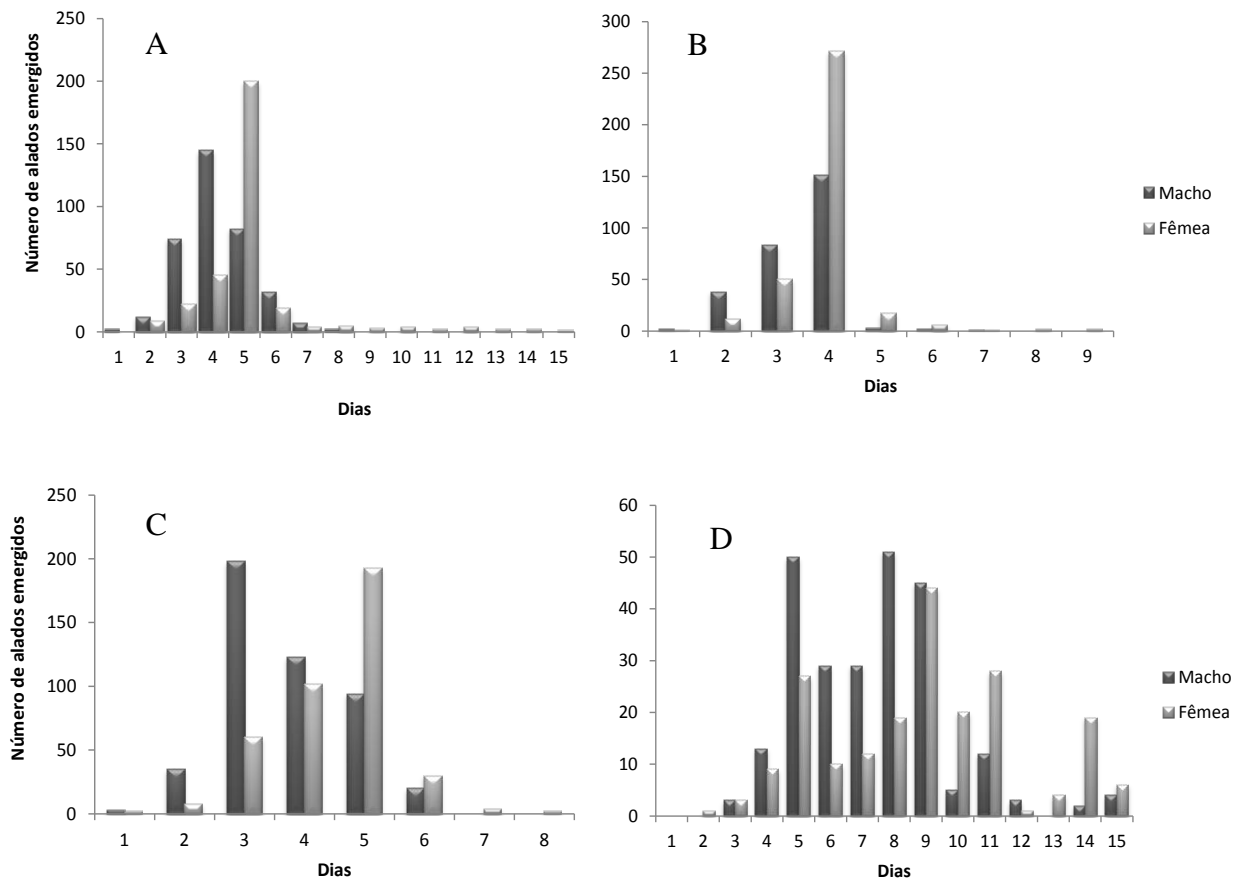


Figura 14. Número de alados emergidos nos diferentes cruzamentos, segundo o sexo e em função do tempo. A – Cruzamento de fêmeas tratadas e machos não tratados (FT); B – Cruzamento de fêmeas não tratadas e machos tratados (FNT); C – Cruzamento de fêmeas e machos não tratados (FMNT); D – Cruzamento de fêmeas e machos tratados (FMT).

5. Discussão

Wolbachia é considerado um grupo de bactéria amplamente distribuído que induz alterações reprodutivas em diversos artrópodes. Neste estudo, 22 espécies de mosquitos que não tinham sido previamente descritas como infectadas pela bactéria, foram detectadas como positivas para *Wolbachia*, com base em análises por PCR do gene *wsp*, sendo o primeiro registro mais amplo em nível mundial. As espécies *A. albopictus* e *C. quinquefasciatus* também foram encontradas infectadas na Amazônia, igualmente ao descrito anteriormente por diversos autores em outros países (Kittayapong *et al.*, 2000; Ricci *et al.*, 2002, Rasgon e Scott, 2004).

Este é o primeiro trabalho realizado no Brasil com o intuito de verificar a distribuição de *Wolbachia* em diferentes taxa de mosquitos neotropicais. A taxa de infecção encontrada neste estudo mostrou que 25,18% dos indivíduos analisados foram positivos e, dentre as espécies, 61,5% estavam infectadas por *Wolbachia*. Pesquisas realizadas em outras partes do mundo relataram uma frequência de infecção menor de 16,9% em espécies de insetos neotropicais (Werren *et al.*, 1995a), entre 11,3% e 15% em insetos da região temperada (Werren *et al.*, 1995b) e mais de 46% em isópodos terrestres (Bouchon *et al.*, 1998).

A taxa de infecção observada entre as espécies analisadas neste estudo foi a mais elevada do que as taxas de infecção relatadas por outros autores. No levantamento da distribuição e diversidade de *Wolbachia* em mosquitos, Kittayapong *et al.* (2000), no Sudeste da Ásia, encontraram que 28,1% das espécies de mosquitos analisadas estavam infectadas e na Europa, 19% das espécies estavam positivas (Ricci *et al.*, 2002). Em contraste, na Califórnia (EUA) somente 7% das espécies analisadas foram encontradas infectadas (Rasgon e Scott, 2004).

Uma explicação que pode ser aventada para esta alta frequência de infecção por *Wolbachia* trata-se do número de indivíduos analisados em cada inspeção. Os trabalhos normalmente relatam a análise de um número reduzido de espécimes, exceto os dados deste trabalho assim como o de Kittayapong *et al.*(2000). Este fato pode estar relacionado ao elevado número de indivíduos analisados por espécie, ou seja, das 39 espécies analisadas, em 20 delas, mais de 10 indivíduos foram examinados por PCR para a presença da bactéria. Diferentemente das observações de Werren *et al.* (1995b) que testaram somente um

indivíduo por espécie examinada, e desta forma, eles podem de ter subestimado a infecção por *Wolbachia*.

Outra explicação pode estar relacionada à distribuição geográfica destes mosquitos analisados, uma vez que, neste estudo, as amostras foram coletadas na região amazônica, inserida em uma região tropical. A prevalência de *Wolbachia* deve variar ente os insetos em diferentes regiões do mundo. Os relatos anteriores sobre a frequência de infecção foram realizados, principalmente, na América do Norte e na Europa (Werren *et al.*, 1995a; Werren *et al.*, 1995b; Ricci *et al.*, 2002). Os dados obtidos neste estudo se assemelham mais aos dados relatados por Kittayapong *et al.* (2000), que realizaram suas observações no sudeste Asiático.

Além disso, a infecção por *Wolbachia* pode ser mais comum nos mosquitos do que em outros insetos. Werren *et al.* (1995b) não incluem os mosquitos em sua pesquisa de insetos neotropicais, mas eles notaram uma taxa de infecção de 35,7% entre os Diptera. Desta maneira, a ordem Diptera pode ser mais suscetível à infecção por *Wolbachia*, portanto, o presente estudo em mosquitos não reflete a real taxa de infecção entre os insetos em geral na região amazônica.

Os dados obtidos neste trabalho mostram uma ampla distribuição entre os diferentes gêneros de mosquitos que ocorrem na região amazônica. Dos 11 gêneros analisados, oito foram encontrados infectados por *Wolbachia*. Embora não tenha sido objeto de estudo analisar a riqueza e abundância das espécies nos diferentes locais de coleta, muito se discute sobre a existência de variação espacial e temporal na distribuição desses mosquitos na região amazônica, principalmente para espécies que são considerados vetores de patógenos transmitidos ao homem.

A diversidade de espécies é maior na estação chuvosa e, o padrão de abundância espécie-específica fundamenta a ideia de que a sazonalidade é o principal mecanismo da variação na composição e estrutura da fauna de mosquitos na floresta tropical na Amazônia. (Consoli e Lourenço-de-Oliveira, 1994; Lourenço-de-Oliveira e Luz, 1996; Luz e Lourenço-de-Oliveira, 1996; Tadei *et al.*, 1998; Forattini, 2002; Julião *et al.*, 2010; Tadei *et al.*, 2010). Além desse aspecto, deve-se ressaltar que as amostras deste trabalho, procedem de áreas com elevado nível de antropização, como as áreas urbanas das cidades, áreas moderadamente alteradas, como as margens da rodovia (BR 319) e de áreas altamente

conservadas como as procedentes da área do Juruá. Esta diversidade de habitat deve ter contribuído para a variação de *Wolbachia* nas espécies analisadas.

O resultado surpreendente neste trabalho foi o primeiro registro da infecção por *Wolbachia* em espécies de *Anopheles*, porém, mesmo tendo analisado um grande número de exemplares, somente foi detectada a infecção nas espécies *A. matogrossensis* (1/9), *A. mediopunctatus* (1/2), *A. shannoni* (1/1), *A. squamifemur* (1/1) e *A. oswaldoi* (1/2) (Tabela 7). A confirmação foi realizada pelo alinhamento da sequência obtida para a espécie *A. oswaldoi* com sequências depositadas no NCBI. Outro aspecto importante a ser considerado deste registro neste gênero trata-se do fato de que estas espécies são predominantemente silvestres. Se este parâmetro tem alguma influência é algo que necessita ser ampliado para se obter informações mais consistentes que venham fundamentar estes resultados.

Até o presente momento, não houve registro da infecção de mosquitos anofelinos em qualquer parte do mundo. Muito se discute sobre a possibilidade destes mosquitos serem fisiologicamente incapazes de suportar a infecção por *Wolbachia* e que a investigação das semelhanças e diferenças nos padrões de infecção é de fundamental importância para entender os processos que governam as interações entre mosquito-*Wolbachia* (Kittayapong *et al.*, 2000, Ricci *et al.*, 2002).

Os resultados deste trabalho mostram uma frequência elevada de infecção de *Wolbachia* de 79,1% na população natural do mosquito vetor *A. albopictus*. Como podemos observar na figura 7, a distribuição dessa infecção variou nos três municípios onde foram realizadas as coletas em ambiente urbano, Manaus, Presidente Figueiredo e São Gabriel da Cachoeira. Neste último município, a taxa de transmissão natural de *Wolbachia* nessa população foi tão elevada quanto a prevalência de 100% de infecção encontrada por Kittayapong *et al.* (2002) em uma população de *A. albopictus* da Tailândia. Em contraste, nas demais populações de Manaus e Presidente Figueiredo, as frequências foram menores variando entre 50% e 60%. Neste caso, esta baixa frequência poderia estar relacionada aos adventos da transmissão da bactéria para prole face às condições ambientais que afetam o desenvolvimento larval e resultam na diminuição da infecção na prole, como foram demonstradas por Hoffmann e Turelli (1997) em *Drosophila simulans*.

Outro fato que também poderia contribuir para a diminuição da eficiência da transmissão maternal de *Wolbachia* em *A. albopictus*, em seu ambiente natural, está

relacionado com a criação desses mosquitos em altas densidades. Sinkins e Dutton (2004) demonstraram acentuada diminuição da densidade bacteriana quando as larvas foram criadas em altas densidades. Neste sentido, estudos sobre a abundância de larvas em populações naturais de *A. albopictus* e a infecção por *Wolbachia* poderiam esclarecer se a alta densidade do vetor estaria correlacionada com a baixa frequência de infecção.

Foi observado neste trabalho que em relação às taxas de infecção dos diferentes grupos A e B de *Wolbachia* em *A. albopictus*, ocorreu uma predominância da superinfecção pelos grupos A e B da bactéria (55,8%) quando comparada com a frequência de infecção simples pelo grupo A (16,1%) e grupo B (27,9%). Estes dados corroboram os dados relatados por Nogueira (2006) com populações de *A. albopictus* no município de Botucatu/SP, onde foi observada uma alta frequência (84,4%) de superinfecção com as duas linhagens de *Wolbachia* (A e B) em relação a simples infecção (15,6%).

A elevada frequência de superinfecção observada neste trabalho também foi relatada por Kittayapong *et al.* (2002) e por Tsai *et al.* (2004). Os autores sugerem que ambas as linhagens (A e B) estão presentes nas populações do mosquito a um considerável tempo e, por isso, estejam perto da fixação. Outro fato que explicaria esta condição está relacionado ao fenômeno da incompatibilidade citoplasmática, desencadeada pela superinfecção, que apresenta uma vantagem em relação às simples infecções.

Vale ressaltar ainda que nos experimentos realizados por Sinkins e Dutton (2004) ficou demonstrado que a linhagem A é mais sensível a influência de condições externas, fato este que explicaria a baixa frequência encontrada neste estudo. Além disso, a presença de antibióticos naturais no hábitat desse mosquito poderia reduzir a densidade bacteriana, e deste modo, afetar a transmissão da infecção por *Wolbachia*, alternando as infecções pelos diferentes grupos encontrados nesse hospedeiro (Stevens & Wicklow, 1992). Vale ressaltar ainda que deve ser considerada a heterogeneidade dos criadouros desta espécie em ambientes urbanos, em Manaus, por exemplo, os dados apresentados por Sá e Tadei (2004) mostraram uma ampla distribuição de *A. albopictus* em ambientes modificados e em áreas de mata urbana, sendo encontrada em uma diversidade de criadouros artificiais e naturais. Certamente, este fato influencia na dispersão do mosquito gerando uma variação em sua densidade e, por consequência, afetaria diretamente nas frequências naturais de *Wolbachia*.

Os dados deste estudo revelam uma frequência de infecção em 100% dos mosquitos do gênero *Culex* analisados, sendo esta frequência mais elevada em comparação aos dados obtidos por Kittayapong *et al.* (2002) que encontraram uma frequência de 42,1%. As maiores taxas de infecção foram registradas para as espécies *C. quinquefasciatus* (64,6%) e *C. (Culex) spp.* (42,9%), enquanto que, as menores taxas para *C. coronator* (9,8%) e *C. (Mel.) sp.* (1,2%). Registros anteriores da infecção por *Wolbachia* foram demonstrados principalmente para o complexo de espécies *Culex pipiens* – *C. p. pipiens* e *C. p. quinquefasciatus* (Barr,1980; 1982; Rasgon e Scott 2003), revelando uma variação na frequência de infecção de 99,4% a 100%. Em estudo realizado em parques urbanos localizados no município de São Paulo/SP, também foi encontrada uma taxa de infecção de 100% em populações de *C. quinquefasciatus* (Almeida, 2008). A taxa de infecção para *C. quinquefasciatus* obtida neste trabalho foi relativamente menor do que as relatadas pelos autores acima citados.

Para as demais espécies este é o primeiro registro da infecção pela bactéria *Wolbachia*. Conforme apresentado na tabela 7, os resultados mostram uma variação dentro do gênero, revelando que as espécies do subgênero *Culex* apresentaram maiores taxas de infecção em comparação ao subgênero *Melanoconion*, considerando o grande número de exemplares analisados de ambos os subgêneros.

Poucos são os trabalhos disponíveis sobre a dinâmica de infecção por *Wolbachia* em populações naturais do mosquito do gênero *Culex*. Rasgon e Scott (2003) indicam que a dinâmica de infecção por *Wolbachia* e os de níveis de equilíbrio pode ser estimada com precisão a partir de dados coletados de campo. Os autores sugerem que as elevadas taxas de infecção indicam que a *Wolbachia* está fixada ou próxima a se fixar nas populações do complexo *C. pipiens*. Os dados obtidos neste trabalho corroboram essa hipótese pois a taxas de infecção se mostraram elevadas.

Dentre os demais gêneros analisados neste estudo verificou-se que este foi também o primeiro registro de infecção por *Wolbachia* para os gêneros *Aedeomyia*, *Coquillettidia*, *Mansonia*, *Psorophora* e *Uranotaeni*. Os dados mostram que as frequências observadas para estes gêneros foram menores do que para os gêneros *Aedes* e *Culex*. Comparando os dados obtidos para *Mansonia* com o levantamento realizado por Kittayapong *et al.* (2002), os dados deste estudo mostraram uma taxa de infecção menor do que a encontrada por

aqueles autores, 16,3% e 50,0%, respectivamente. Para os demais gêneros acima citados, na literatura foram encontrados somente o registro sobre o status de infecção, porém, não há inferências sobre as frequências encontradas em populações naturais desses mosquitos.

Padrões consistentes, como a complexa ausência de infecção em *Anopheles*, citado por outros autores, podem revelar os diferentes eventos que estariam envolvidos na transferência horizontal em um tempo evolutivo maior, nas possíveis diferenças fisiológicas na capacidade dos mosquitos em alojar a infecção ou, pode ser uma relíquia biogeográfica da evolução entre *Wolbachia* e os mosquitos (Rasgon e Scott, 2004). Segundo os autores, o conhecimento da variação geográfica no âmbito das infecções naturais por *Wolbachia* nos mosquitos é essencial para a concepção de estratégias de controle de doenças, fundamentadas na incompatibilidade citoplasmática.

Pesquisas sobre a infecção por *Wolbachia* em mosquitos, as taxas em uma variedade de locais geográficos e escalas temporais irão fornecer informações básicas necessárias para ajudar a resolver estas questões. Embora neste estudo o número de indivíduos da espécie *Anopheles* positivos para *Wolbachia* seja pequeno, estes dados revelam uma grande oportunidade para novas pesquisas sobre a dinâmica de infecção por *Wolbachia* em vetores.

Neste trabalho optou-se por não utilizar os iniciadores de sequência específicos para cada subgrupo conforme descrito por Zhou *et al.* (1998) por se tratar de um número expressivo de indivíduos analisados, considerando que foram realizadas para todos os exemplares reações de amplificação com o par de iniciadores de sequência *wsp* geral 81F e 691R, além do 12SAI e 12SBI utilizado para verificar a qualidade da extração de DNA, conforme descrito por O'Neill *et al.* (1992), excluindo desta maneira, a possibilidade de se obter resultados falso negativos.

Para a classificação dos maiores grupos foi realizada um segundo PCR com os iniciadores de sequência específicos para o grupo A (136F/691R) e B (81F/599R) e, posteriormente, as amostras foram submetidas ao sequenciamento. Desta forma, a classificação dos subgrupos foi realizada pela análise do alinhamento das sequências obtidas com as sequências depositadas no banco de dados do NCBI.

Os resultados da classificação por PCR dos grupos A e B de *Wolbachia* revelaram a diversidade genética da bactéria encontrada nos mosquitos hospedeiros. Foi observado que entre as 24 espécies infectadas houve predominância do grupo A (79,1%) em relação ao

grupo B (25%) e a superinfecção pelos dois grupos A e B (4,1%). Em relação à classificação dos subgrupos, quatro dos 12 subgrupos de *Wolbachia* previamente descritos por Zhou *et al.* (1998), foram representados conforme apresentado na tabela 7.

Inicialmente nas sequências obtidas para *A. albopictus* a partir do produto do primeiro PCR com o *primer wsp81F* revelou o aparecimento de bases imprecisas indicando a presença de múltiplas cepas *Wolbachia*. Posteriormente, foram obtidas sequências para a espécie utilizando os iniciadores de sequência específicos para os grupos A e B e todas as sequências obtidas foram idênticas. A comparação das sequências por homologia com os dados do GenBank confirmou o subgrupo *wAlbA* e *wAlbB*, espécie tipo de *Wolbachia* associado com *A. albopictus* (Zhou *et al.*, 1998).

A similaridade da sequência obtida para a espécie *C. coronator* confirmou o subgrupo *wspA* encontrada no hospedeiro *C. gelidus* (dados não publicados, Acesso HM007831), enquanto que para *C. quinquefasciatus*, todas as sequências foram idênticas e a homologia confirmou a estirpe *wPip*, espécie tipo encontrada ao complexo *C. pipiens* – *C. p. pipiens* e *C. p. quinquefasciatus* (Klasson *et al.*, 2008).

Para a espécie *A. squamipennis* foi confirmada por PCR a infecção pelo grupo B e por homologia da sequência foi confirmada a identificação do subgrupo *wFlu* associada ao hospedeiro *A. fluviatilis* (Moreira *et al.*, 2009).

A sequência da espécie *A. hortator* foi obtida a partir da amplificação do gene *wsp* do subgrupo A, por isso, os dados mostram que esta espécie está infectada por este subgrupo. Foi encontrada similaridade com duas sequências obtidas de hospedeiros não dípteros, confirmando a infecção por *Wolbachia*. Porém, não foi possível determinar o subgrupo e, além disso, como não houve similaridade com sequências de outros hospedeiros mosquitos, sugere-se que esta espécie de mosquito esteja infectada por uma cepa de *Wolbachia* ainda não identificada (*n.c.1* – Tabela 7).

Da mesma maneira, para a espécie *A. oswaldoi* foi encontrada similaridade da sequência com a de outros dois hospedeiros, não pertencentes à ordem Diptera. Além disso, considerando que este é o primeiro registro em uma espécie de *Anopheles* infectada por *Wolbachia* e, que a sequência obtida foi a partir da amplificação do gene *wsp* subgrupo A, sugere-se que *A. oswaldoi* esta infectado por este subgrupo, podendo ser considerada uma nova cepa da bactéria (*n.c.2* – Tabela 7).

O sequenciamento para a espécie *C. venezuelensis* foi realizado a partir da PCR positiva para o gene *wsp* grupo A, indicando que a espécie está infectada com este grupo de *Wolbachia*. Porém, a sequência apresentou homologia com duas sequências de mosquitos, uma de *A. albopictus* e outra de *C. minor*, podendo-se tratar de uma cepa ainda não identificada (*n.c.4* – Tabela 7). Para a espécie *C.(Culex) spp.* a sequência também foi obtida a partir da amplificação do gene *wsp* do grupo A, admite-se que esta espécie está infectada por este grupo. Além disso, como não houve similaridade com sequências de outros hospedeiros mosquitos, sugere-se tratar de uma nova cepa de *Wolbachia* (*n.c.3* – Tabela 7).

Para as demais espécies positivas não foi possível obter as sequências para que as mesmas fossem submetidas ao alinhamento por meio do *Blast n*. Contudo, as amostras foram positivas na PCR, permitindo desta maneira, classificar a infecção dentro dos grupos A e B. Os iniciadores de sequência utilizados foram eficientes para a amplificação do gene *wsp* geral e específico (A ou B), porém, eles não foram eficientes para realizar o anelamento na reação de sequenciamento.

Segundo Zhou *et al.* (1998) a cepas que não puderam ser amplificadas ou sequenciadas podem pertencer a um subgrupo que acumulou substituições na região de anelamento dos iniciadores de sequência do gene *wsp*. Esta infecção provavelmente pertence a um subgrupo que não foi descrita anteriormente na filogenia existente utilizando o gene *wsp*. Além disso, o autor relata que quanto mais cepas de *Wolbachia* forem sequenciadas, é de se esperar que o número de subgrupos de *Wolbachia* aumente.

A classificação da infecção pelos subgrupos de *Wolbachia* podem fornecer informações sobre relações evolutivas entre a bactéria e o hospedeiro. Porém, neste trabalho não foi possível identificar todos os subgrupos presentes nos mosquitos, somente foi realizada a classificação entre os maiores grupos A e B. Os dados apresentados por Kittayapong *et al.* (2002), mostram diferentes espécies infectadas pelo mesmo subgrupo de bactéria. Segundo os autores, esta observação seria explicada pela transmissão horizontal entre os diferentes taxa.

Análises filogenéticas de *Wolbachia* utilizando sequências dos genes *16S rRNA*, *ftsZ* e *wsp* sustentam fortemente a existência de transferência horizontal entre os artrópodes (O'Neill *et al.* 1992; Rousset *et al.*, 1992; Werren *et al.*, 1995a; Zhou *et al.*, 1998). Os dados deste trabalho indicam que a maioria dos mosquitos está infectada pelo grupo A. Em

contraste, Kittayapong *et al.* (2002), mostram que diferentes espécies que compartilham o mesmo subgrupo estão infectados pelo grupo B da bactéria. Stouthamer *et al.* (1993) e Werren *et al.* (1995a) também relatam que o grupo B mostram mais concordância filogenética com os taxa dos hospedeiros do que o grupo A, baseado nas análises das sequencias dos genes *ftsZ* e 16S rRNA, respectivamente.

Outra observação interessante está relacionada à ocorrência de infecção dupla pelo grupo A e B, e neste trabalho a frequência observada foi 4,1%, somente na espécie *A. albopictus*. As superinfecções, como são chamadas, foram observadas em *D. simulans* (Rousset e Solignac, 1995), *A. albopictus* (Sinkins *et al.*, 1995) e em mais 10 espécies de insetos (Werren *et al.*, 1995a, b), detectados por PCR usando os iniciadores de sequência 16S rRNA ou *ftsZ*. Werren *et al.* (1995b) e Kittayapong *et al.* (2002), também relatam uma frequência elevada da infecção dupla AB entre os artrópodes neotropicais e os mosquitos no sudeste da Ásia (5,7% e 3,4%, respectivamente). Entretanto, não foi possível determinar neste trabalho, a ocorrência de dupla infecção por diferentes subgrupos do mesmo grupo (A ou B).

O fenômeno da incompatibilidade citoplasmática produzida pela *Wolbachia* tem atraído a atenção de diversos pesquisadores pelo seu potencial como um condutor de modificações nos insetos vetores, de forma que eles não possam mais transmitir a doença. Os dados deste trabalho mostram que a infecção natural por *Wolbachia* está presente em frequências mais elevadas em alguns gêneros de mosquitos do que em outros grupos de insetos. Esses dados indicam que os mosquitos são competentes para alojar a infecção por *Wolbachia* e estão susceptíveis a adquirir infecções no ambiente silvestre.

Embora muitos mosquitos, incluindo alguns vetores de doenças, estão infectados com *Wolbachia*, o principal vetor da dengue, *A. aegypti*, e da malária, *A. darlingi*, não foram encontrados infectados. Esta é, potencialmente, uma vantagem para a aplicação de *Wolbachia* para o controle genético dos vetores dessas doenças, pois estas espécies representam um nicho vazio em que *Wolbachia* poderia ser introduzida experimentalmente e em seguida se espalhar dentro da população (Sinkins *et al.*, 1997). Neste sentido, trabalho realizado recentemente tem demonstrado a efetividade da *Wolbachia* no bloqueio da transmissão do vírus dengue (DENV2), Chikungunya e do plasmódio causador da malária aviária (Moreira *et al.*, 2009).

Com o intuito de verificar os efeitos de *Wolbachia* em *A. albopictus* foi realizado em laboratório experimento de cruzamento entre colônias de *A. albopictus* tratadas com tetraciclina e não tratadas. Vale ressaltar a dificuldade encontrada para obtenção de colônia livre de *Wolbachia* a partir de indivíduos coletados em campo, em função da elevada taxa de superinfecção (grupo A/B) que foi detectada na população deste mosquito de Manaus. Embora não se tenha conseguido uma colônia 100% livre de *Wolbachia* após o tratamento com o antibiótico tetraciclina, foram feitas observações sobre alguns parâmetros adaptativos do mosquito a partir destes cruzamentos.

Considerando a frequência de fêmeas que realizaram a postura dos ovos em todos os cruzamentos realizados, ficou evidenciado que as fêmeas que receberam o tratamento com antibiótico, ou seja, consideradas aqui livres de *Wolbachia*, apresentaram uma menor frequência em comparação às fêmeas que não foram tratadas, conforme demonstrado na figura 8. Este dado sugere que a eliminação da *Wolbachia* influenciou negativamente no número de fêmeas que realizaram a postura de ovos.

Para analisar a fecundidade, foi comparada a frequência média de ovos por fêmea em cada cruzamento. Os dados mostram que esta frequência foi significativamente menor entre o cruzamento de fêmeas e machos tratados, porém, este fato não foi observado no cruzamento entre fêmeas tratadas e machos não tratados, como era de se esperar (Figura 9). Em relação à taxa de eclosão dos ovos, também ficou demonstrado que o menor percentual de viabilidade ocorreu nas colônias que receberam o tratamento, considerados livres de *Wolbachia* (Figura 10).

De acordo com estes dados, sugere-se que a fecundidade de fêmeas em cruzamentos compatíveis é maior em fêmeas infectadas, do que em não infectadas. Estes dados corroboram os dados apresentados por diversos trabalhos (Kambhampati *et al.*, 1993; Sinkins *et al.*, 1995b; Otsuka e Takaoka, 1997; Dobson *et al.*, 2001, 2002, 2004) que relataram que a fecundidade é maior em fêmeas com infecção simples ou a superinfecção. Nos cruzamentos realizados neste trabalho, as colônias não tratadas foram consideradas superinfectadas, pois, não foi possível a obtenção de colônias infectadas somente por um grupo de *Wolbachia*.

Em experimento realizado com populações de *A. albopictus* do município de Botucatu/SP por Nogueira (2006) foi demonstrado também a dificuldade para obtenção de

colônias com simples infecção e colônia não infectada por *Wolbachia*. Neste caso, a taxa de eclosão referente à postura das fêmeas superinfectadas pelas duas linhagens de *Wolbachia* variou de 65 a 96%, mostrando que as fêmeas infectadas com as duas linhagens possuem uma vantagem sobre as fêmeas não infectadas.

Em relação à análise da mortalidade de larvas, os dados deste trabalho mostraram que o percentual de mortalidade foi maior nos cruzamentos entre fêmeas infectadas e machos não infectados e, entre fêmeas e machos infectados. Islam e Dobson (2006) também demonstraram que a sobrevivência dos imaturos é maior quando as larvas não estão infectadas. Esta diferença no percentual de mortalidade observada neste trabalho pode ser explicada pelo mecanismo de competição por recurso que normalmente ocorre entre diferentes densidades larvais.

Embora não tenho sido objeto deste trabalho analisar o fenômeno da competição na presença da *Wolbachia*, sugere-se que a mortalidade das larvas também foi influenciada pela densidade de larvas, pois, as larvas foram criadas de acordo com cada postura individual e, neste caso, o número de ovos obtidos de fêmeas infectadas foi maior do que pelas fêmeas tratadas, conforme discutido anteriormente. Este fato pode ter contribuído para o aumento da mortalidade larval, pois quanto maior a densidade de larvas por recipiente de criação, maior é a mortalidade observada (Passos, 2006).

Neste trabalho ficou demonstrado que o tempo de desenvolvimento de larvas até pupa foi semelhante nos diferentes cruzamentos. Entretanto, foi observado que o tempo de desenvolvimento para as larvas obtidas do cruzamento de fêmeas e machos não infectados, ou seja, tratados, foi mais extenso do que nos demais cruzamentos, conforme demonstrado na figura 12. Sugere-se que o tratamento das fêmeas e machos com o antibiótico tenha produzido um efeito negativo, prolongando o tempo de desenvolvimento das larvas neste cruzamento. Dados semelhantes aos encontrados neste trabalho foram também relatados por Islam e Dobsn (2006), que não encontraram diferenças no tempo de desenvolvimento entre indivíduos infectados e não infectados. Nogueira (2006) e Kamimura *et al.* (2002), assim como os dados deste trabalho sobre a longevidade larval, mostraram que o tempo médio de vida para as larvas foi de 6 dias.

Não foi observada diferença entre os cruzamentos pela análise da proporção de machos e fêmeas. Somente foi constatada uma predominância de fêmeas nos dados obtidos

do cruzamento entre fêmeas infectadas e machos não infectados, conforme apresentado na figura 13. Em relação ao tempo de emergência verificou-se que em todos os cruzamentos, os machos emergiram primeiro do que as fêmeas (Figura 14). Neste sentido, não foi observado este mesmo padrão para o cruzamento entre fêmeas e machos não infectados.

Em contraste aos dados observados neste trabalho, Nogueira (2006) observou que os mosquitos em tratamento com antibiótico mostraram um perfil diferente de emergência de adultos quanto ao sexo, comparado com a colônia infectada. O autor relata a existência de um pico anterior do nascimento de machos seguido por outro de fêmeas que não foi encontrado em *A. albopictus* infectado com *Wolbachia*. Diante disso, ele sugere que talvez, para *Wolbachia* seja mais interessante que muitas fêmeas hospedeiras já estejam à espera do macho no ambiente para cópula, uma vez que mediante a incompatibilidade citoplasmática a condição do hospedeiro feminino seja determinante para o sucesso dos cruzamentos.

O sucesso evolutivo da *Wolbachia* pode ser atribuído, em parte, devido aos mecanismos pelo qual a bactéria manipula a reprodução do hospedeiro, promovendo a invasão e manutenção dentro da população. Um destes mecanismos é conhecido como a incompatibilidade citoplasmática (IC) e tem sido observado em muitas espécies de mosquitos, incluindo *A. albopictus* (O'Neill *et al.*, 1997). Os dados deste trabalho são indicativos da ocorrência de incompatibilidade citoplasmática na população de *A. albopictus* de Manaus.

Esta incompatibilidade pode ser observada entre mosquitos infectados por diferentes grupos de *Wolbachia*. Embriões resultantes dos cruzamentos de incompatibilidade citoplasmática apresentam uma falha no início do processo de desenvolvimento na cariogamia (Tram e Sullivan, 2002). Em populações de mosquitos que incluem ambos os indivíduos infectados e não infectados, as fêmeas infectadas podem cruzar com sucesso com todos os machos da população.

Em contraste, fêmeas não infectadas na população apresentam uma desvantagem reprodutiva, pois, não ocorre fecundação, caso elas se acasalem com um macho infectado por *Wolbachia*. A vantagem reprodutiva oferecida pela IC para as fêmeas infectadas podem promover a disseminação da infecção por *Wolbachia* na população via herança materna,

podendo haver substituição da população não infectada pela infectada (Dobson *et al.*, 2004).

Os principais parâmetros previstos para impactar a dinâmica da infecção por *Wolbachia* incluem a fidelidade da transmissão materna, o nível de IC (número de ovos resultantes de um cruzamento incompatível) e efeitos de *Wolbachia* na adaptabilidade da população. Os efeitos da infecção por *Wolbachia* na sobrevivência de *A. albopictus* são relevantes para o entendimento da evolução de populações naturalmente superinfectadas e para propor estratégias que usariam a *Wolbachia* para substituir populações de vetores de importância médica por populações refratárias a transmissão de patógenos (Sinkins e O'Neill, 2000; Dobson, 2003).

6. Conclusão

Foram encontradas 24 espécies de culicídeos infectados por *Wolbachia* sendo que em 22 destas, trata-se do primeiro registro dessas espécies infectadas pela bactéria.

As espécies infectadas foram: *A. serratus*, *A. albopictus*, *A. hortator*, *A. squamipennis*, *A. matogrossensis*, *A. mediopunctatus*, *A. shannoni*, *A. squamifemur*, *A. oswaldoi*, *C. (Culex) spp.*, *C. (Mel.) spp.*, *C. coronator*, *C. juxtamansonia*, *C. quinquefasciatus*, *C. venezuelensis*, *M. amazonenses*, *M. humeralis*, *M. titillans*, *P. albipes*, *P. cingulata*, *P. circumflava*, *P. ferox*, *U. (Uranotaenia) spp.* e *U. calosomata*.

Este é o primeiro registro destas espécies infectadas por *Wolbachia* e também é o primeiro registro de espécies de *Anopheles* infectadas por esta bactéria. Não foi detectada a infecção em *A. aegypti*.

A positividade média de infecção foi de 30,4% e as espécies, *A. albopictus* e *C. quinquefasciatus*, foram as que apresentaram as maiores frequências dentre os infectados, com 79,1% e 64,6%, respectivamente.

As maiores frequências de positividade ocorreram em São Gabriel da Cachoeira, Manaus e Presidente Figueiredo, pois as espécies de mosquitos predominantes foram *C. quinquefasciatus* e *A. albopictus*, comumente encontradas em ambiente urbano e que apresentaram alta taxa de infecção por *Wolbachia*.

As demais localidades apresentaram as menores taxas de infecção e maior diversidade de espécies em menor abundância.

A classificação de *Wolbachia* dentro dos maiores grupos A e B mostraram que 19 das 24 espécies positivas foram infectados somente com bactérias do grupo A, com quatro bactérias do grupo B somente, e uma com ambos os grupos A e B, representada pela espécie *A. albopictus*.

A comparação das sequências mostrou que cinco subgrupos de *Wolbachia* descritos anteriormente foram representados, porém não foram detectados superinfecção com múltiplas estirpes da bactéria tanto do grupo A quanto do B.

Analisando o efeito de *Wolbachia* em *A. albopictus* verificou-se uma redução na frequência de fêmeas ovipositoras e que as fêmeas não infectadas produziram menos ovos do que as infectadas. A viabilidade dos ovos mostrou um percentual baixo de taxa de eclosão das larvas.

A mortalidade das larvas foi maior entre as fêmeas infectadas. O tempo de desenvolvimento até pupa foi similar em todas as comparações entre os cruzamentos, sendo ligeiramente maior no cruzamento entre fêmeas e machos não infectados.

A proporção de fêmeas e machos sobreviventes foi muito semelhante em todos os cruzamentos realizados.

Os dados deste trabalho indicam a ocorrência de incompatibilidade citoplasmática na população de *A. albopictus* de Manaus.

7. Referências Bibliográficas

- Almeida, F. 2008. Análise comparativa de *Culex quinquefasciatus* infectados e não infectados por *Wolbachia pipientis*. [Dissertação de mestrado – Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Médicas. 45p].
- Armbruster, P.; Hutchinson, R. A. 2002. Pupal mass and wing length as indicator of fecundity in *Aedes albopictus* and *Aedes geniculatus* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol*, 39 (4): 699-704.
- Bandi, C.; Anderson, T. G., Genchi, C.; Blaxter, M. L. 1998. Phylogeny of *Wolbachia* in filarial nematodes. *Proc. R. Soc. Lond. Biol. Sci.* 265: 2407-2413.
- Barr, A. R. 1980. Cytoplasmic incompatibility in natural populations of a mosquito, *Culex pipiens* L. *Nature* 283:71–72.
- Barr, A. R. 1982. Symbiont control of reproduction in *Culex pipiens*. In: *Recent Developments in the Genetics of Insect Disease Vectors* (EDS W. W. M. Steiner, W. J. Tabachnick, K. S. Rai and S. Narang), Stipes Publishing Co., Champaign, Illinois, 153-158 p.
- Bian, G.; Xu, Y.; Lu, P.; Xie, Y.; Xi, Z. 2010. The Endosymbiotic Bacterium *Wolbachia* Induces Resistance to Dengue Virus in *Aedes aegypti*. *PLoS Pathog* 6(4): e1000833.
- Bouchon, D.; Rigaud, T.; Juchault, P. 1998. Evidence for widespread *Wolbachia* infection in isopod crustaceans: molecular identification and host feminization. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 265: 1081-1090.
- Braig, H. R.; Zhou, W.; Dobson, S. L.; O’Neill, S. L. 1998. Cloning and characterization of a gene encoding the major surface protein of the bacterial endosymbiont *Wolbachia pipientis*. *J Bacteriol* 180: 2373–2378.
- Breeuwer, J. A. J.; Stouthamer, R.; Burns, D. A.; Pelletier, D. A.; Weisburg, W.G.; Werren, J. H. 1992. Phylogeny of cytoplasmic incompatibility microorganisms in the parasitoid wasp genus *Nasonia* (Hymenoptera: Pteromalidae) based on 16s ribosomal DNA sequences. *Insect. Mol. Biol.* 1:25–36.
- Brownstein, J. S.; Hett, E.; S. L. O’Neill. 2003. The potential of virulent *Wolbachia* to modulate disease transmission by insects. *J. Invertebr. Pathol.* 84: 24-29.
- Bullini, L.; Coluzzi, M. 1978. Applied and theoretical significance of electrophoretic studies in mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Parasitologia* 20: 7-21.

- Clements, A. N. 1992. *Rickettsiae in mosquitoes*. The Biology of mosquitoes. London: Chapman and Hall. 509 p.
- Consoli, R. A. G. B.; Lourenço-de-Oliveira, R. 1994. *Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil*. Fiocruz, Rio de Janeiro. 225 p.
- Cornel, A. J.; McAbee, R. D.; Rasgon, J.; Stanich, M. A.; Scott, T. W.; Coetzee, M. 2003. Differences in extent of genetic introgression between sympatric *Culex pipiens* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) in California and South Africa. *J. Med. Entomol.* 40, 36–51.
- Cook, P. E.; McMeniman, C. J.; O’Neill, S. L. 2008. Modifying insect population age structure to control vector-borne disease. *Adv Exp Med Biol.* 627: 126– 140.
- Deane, L.M, 1986. Malaria vectors in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*: 81(suppl. II): 5-14.
- Dieng, H.; Mwandawiro, C.; Boots, M.; Morales, R.; Satho, T.; Tuno, N.; Tsuda, Y.; Takagi, M. 2002. Leaf litter decay process and the growth performance of *Aedes albopictus* larvae (Diptera: Culicidae). *J. Vector Ecol.* 27: 31-38.
- Dobson S. L.; Marsland E. J.; Rattanadechakul, W. 2001. *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility in single and superinfected *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* 38(3): 382-387.
- Dobson S. L.; Rattanadechakul, W. 2001. A Novel Technique for Removing *Wolbachia* Infections from *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* 38(6): 844-849.
- Dobson, S. L.; Fox, C. W.; Jiggins, F. M. 2002a. The effect of *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility on host population size in natural and manipulated systems. *Proc. R. Soc. Lond. Biol.* 269: 437-445.
- Dobson, S. L.; Marsland, E. J.; Rattanadechakul, W. 2002b. Mutualistic *Wolbachia* infection in *Aedes albopictus*: accelerating cytoplasmic drive. *Genetics* 160: 1087-1094.
- Dobson, S. L. 2003. Reversing *Wolbachia*-based population replacement. *Trends Parasitol.* 19: 128-133.
- Dobson, S. L.; Rattanadechakul, W.; Marsland, E. J. 2004. Fitness advantage and cytoplasmic incompatibility in *Wolbachia* single- and superinfected *Aedes albopictus*. *Heredity*: 1-8.

- Faran, M. E. 1980. Mosquito studies (Diptera, Culicidae) XXXIV. A revision of the *albimanus* section of the subgenus *Nyssorhynchus* of *Anopheles*. *Contr. An. Ent. Inst.* 15: 1-215.
- Forattini, O. P. 1962. *Entomologia Médica*. Vol. 1. Edusp. 662 p.
- Forattini, O. P. 1986. *Aedes* (Stegomyia) *albopictus* (Skuse) indentification in Brazil. *Rev. Saúde Públ.*, 20 (3): 244-245.
- Forattini, O. P. 2002. *Culicidologia Médica*. Vol. 2. Edusp. 860 p.
- FUNASA/CRDA. 1999. Fundação Nacional de Saúde, Coordenadoria Regional do Amazonas. *Relatório de atividade-Planejamento de Febre Amarela e Dengue. Manaus*, 18pp.
- Gratz, N. G. 2004. Critical review of the vector status of *Aedes albopictus*. *Medical and Veterinary Entomology*. 18 (3), 215-227.
- Guimarães, J. H. 1997. *Systematic database of Diptera of the Americas South of the United States (Family Culicidae)*. São Paulo, Editora Plêiade/FAPESP.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser*, 95: 95-98.
- Hawley WA. 1988. The biology of *Aedes albopictus*. *Journal of the American Mosquito Control Association* 4 (Suppl): 1-39.
- Hedges, L. M.; Brownlie, J. C.; O'Neill, S. L.; Johnson, K. N. 2008. *Wolbachia* and virus protection in insects. *Science*. 322: 702.
- Hertig, M. 1936. The rickettsia, *Wolbachia pipientis* and associated inclusions of the mosquito, *Culex pipiens*. *Parasitology* 28: 453-490.
- Higgins J. A.; Azad, A. F. 1995. Use of polymerase chain-reaction to detect bacteria in arthropods—a review. *J. Med. Entomol.* 32: 213–22.
- Hoerauf, A.; Volkmann, L.; Hamelmann, C.; Adjei, O.; Autenrieth, L. B.; Fleischer, B.; Buttner, D. W. 2000. Endosymbiotic bacteria in worms as targets for a novel chemotherapy in filariasis. *Lancet* 355: 1242-1243.
- Hoffmann, A. A.; Turelli, M. 1997. Cytoplasmic incompatibility in insects, pp. 42-80. In S. L. O'Neill, A. A. Hoffmann, and J. H. Werren [eds.], *Influentia passengers: inherited microorganisms and arthropod reproduction*. Oxford University Press, Oxford, England.

- Holden, P. R.; Jones, P.; Brookfield, J. F. 1993. Evidence for a *Wolbachia* symbiont in *Drosophila melanogaster*. *Genet Res.* 62: 23-29.
- Hoshizaki, S.; Shimada, T. 1995. PCR-based detection of *Wolbachia*, cytoplasmic incompatibility microorganisms, infected in natural populations of *Laodelphax striatellus* (Homoptera: Delphacidae) in Central Japan: Has the distribution of *Wolbachia* spread recently? *Insect Mol. Biol.* 4: 237-243.
- Hurst G. D.; Jiggins F.; M., Schulenburg, J.; Bertrand, D.; West Stuart, A.; Goriacheva, I.; Zakharov, I. A.; Werren, J. H.; Stouthamer, R.; Majerus, M. 2000. Male-killing *Wolbachia* in two species of insect. *Proc. R. Soc. Bio. Sci. Series B.* 266: 735-740.
- Ibáñez-Bernal, S.; Briseño, B.; Mutebi, J. P.; Argot, E.; Rodríguez, G.; Martínez-Campos, C.; Paz, R.; Román, P. de L. F. S.; Tapia-Conyer, R. & Flisser, A. 1997. First Record in América of *Aedes albopictus* naturally infected with dengue virus during the 1995 outbreak at Reynosa, México. *Med. Vet. Entomol*, 11: 305-309.
- Islam, M. S.; Dobson, S. L. 2006. *Wolbachia* effects on *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) immature survivorship and development. *J. Med. Entomol.* 43: 689-695.
- Jammongluk, W.; Kittayapong, P.; Baisley, K.; O'Neill Scott, L. 2000. *Wolbachia* infection and expression of cytoplasmic incompatibility in *Armigeres subalbatus* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entom.* 37: 53-57.
- Jeyaprakash, A.; Hoy, M. A. 2000. Long PCR improves *Wolbachia* DNA amplification: *wsp* sequences found in 76% of sixty-three arthropod species. *Insect Mol. Biol.* 9: 393-405.
- Jiggins, F. M.; Hurst, G. D. D.; Majerus, M. E. N. 1998. Sex ratio distortion in *Acaea encedon* is caused by a male-killing bacterium. *Heredity.* 81:87-91.
- Julião, G. R.; Abad-Franch, F.; Lourenço-de-Oliveira, R.; Luz, S. L. B. 2010. Measuring Mosquito Diversity Patterns in an Amazonian Terra Firme Rain Forest. *J. Med. Entomol.* 47(2): 121-128
- Kambhampati, S.; Rai, K. S.; Burgun, S. J. 1993. Unidirectional cytoplasmic incompatibility in the mosquito, *Aedes albopictus*. *Evolution* 47: 673-677.
- Kamimura, K.; Matsuse, I. T.; Takahashi, H.; Komukai, J.; Fukuda, T.; Suzuki, K.; Aratani, M.; Shirai, Y.; Mogi, A. 2002. Effect of temperature on the development of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *Med Entomol Zool*, 53(1): 53-58.

- Kittayapong, P.; Baisley, K. J.; Baimai, V.; O'Neill, S. L. 2000. Distribution and diversity of *Wolbachia* infections in southeast Asian mosquitoes (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* 37: 340-345.
- Kittayapong, P.; Baimai, V.; O'Neill, S. L. 2002a. Field prevalence of *Wolbachia* in the mosquito vector *Aedes albopictus*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 66: 108-111.
- Kittayapong, P.; Mongkalangoon, P.; Baimai, V.; O'Neill, S. L. 2002b. Host age effect and expression of cytoplasmic incompatibility in field populations of *Wolbachia*-superinfected *Aedes albopictus*. *Heredity* 88: 270-274.
- Kittayapong, P.; Baisley, K. J.; Sharpe, R. G.; Baimai, V.; O'Neill, S. L. 2002c. Maternal transmission efficiency of *Wolbachia* superinfections in *Aedes albopictus* populations in Thailand. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 66: 103-107.
- Lourenço-de-Oliveira, R.; Guimarães, A.E.G.; Arlé, M.; Silva, T.F.; Castro, M.G.; Motta, M.A.; Deane, L. M. 1989. Anopheline species, some of their habits and relation to malaria in endemic areas of Rondonia State, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 84(4): 501- 514.
- Lourenço-de-Oliveira, R.; Luz, S. L. B. 1996. Simian malaria at two sites in the Brazilian Amazon. Vertical distribution and frequency of anopheline species inside and outside the forest. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 91:687-694.
- Loxdale, H.D.; Lushai, G. 1998. Molecular markers in entomology (review). *Bulletin of Entomological Research*, 88: 577-600.
- Luz, S. L. B.; Lourenço-de-Oliveira, R. 1996. Forest Culicinae mosquitoes in the environs of Samuel Hydroelectric Plant, state of Rondonia, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 91: 427-432.
- Meer, M. M.; Stouthamer, R., 1999. Cross-order transfer of *Wolbachia* from *Muscidifurax uniraptor* (Hymenoptera: Pteromalidae) to *Drosophila simulans* (Diptera: Drosophilidae). *Heredity* 82, 163–169.
- Miller, B. R. & Ballinger, M. E. 1988. *Aedes albopictus* mosquitoes introduced into Brazil: vector competence for yellow fever and dengue viruses. *Trans. R. Society Trop. Med. Hyg.*, 82: 476-477.

- Mitchell C. J.; Miller, B. R. & Gubler, O. J. 1987. Vector competence of *Aedes albopictus* from Houston, Texas, for dengue serotypes 1 to 4, yellow fever and Ross River viruses. *J. Am. Mosq. Control Assc.*, 3: 460-465.
- Moore, C. G. & Mitchell, C. J. 1997. *Aedes albopictus* in the United States: ten-year presence and public health implications. *Emerging Infectious Diseases*, 3 (3): 329-334.
- Moreira, L. A.; Iturbe-Ormaetxe, I.; Jeffery, J. A.; Lu, G.; Pyke, A. T.; *et al.* 2009. A *Wolbachia* symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with dengue, chikungunya and Plasmodium. *Cell*. 139: 1268–1278.
- Nogueira, L. A. 2006. Detecção e dinâmica da infecção da bactéria *Wolbachia* em mosquitos *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). [Dissertação de mestrado – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu].
- O'Neill, S.; Giordano, R.; Colbert, A. M. E.; Karr, T. L.; Robertson, H. M. 1992. 16S rRNA phylogenetic analysis of the bacterial endosymbionts associated with cytoplasmic incompatibility in insects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 2699-2702.
- O'Neill, S. L.; Paterson, H. E. H. 1992. Crossing type variability associated with cytoplasmic incompatibility in Australian populations of the mosquito *Culex quinquefasciatus* Say. *Med. Vet. Entomol.* 16: 209-216.
- O'Neill, S. L.; Pettigrew, M.; Sinkins, S. P.; Braig, H. R.; Andreadis, T. G.; Tesh, R. B. 1997. In vitro cultivation of *Wolbachia pipientis* in an *Aedes albopictus* cell line. *Insect Mol Biol.* 6: 33–39.
- O'Neill, S. L. 1999. *Wolbachia*: why these bacteria are important to genome research. *Microb Comp Genomics.* 4: 159.
- OPAS. Organização Pan-Americana de Saúde. Washington, DC. 1991. *Diretrizes relativas à prevenção e ao controle da dengue e da dengue hemorrágica nas Américas.*
- Otsuka, Y.; H. Takaoka. 1997. Elimination of *Wolbachia pipientis* from *Aedes albopictus*. *Med. Entomol. Zool.* 48: 257-260.
- Passos, R. A. 2006. Parasitismo de *Ascogregarina taiwanensis* e *Ascogregarina culicis* (Apicomplexa: Lecudinidae) em larvas de *Aedes albopictus* e *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) em Manaus – AM e seu efeito na coexistência das duas espécies, em condições experimentais. Dissertação (Mestrado) – INPA/UFAM, Manaus.

- Pettigrew, M. M.; O'Neill, S. L. 1997. Control of vectorborne disease by genetic manipulation of insect vectors: technological requirements and research priorities. *Aust. J. Entomol.* 36: 309-317.
- Pinheiro, V. C. S. & Tadei, W. P. 2002. Frequency, diversity, and production study on the *Aedes aegypti* most preferred containers in the city of Manaus, Amazonas, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 44 (5) 245-250.
- Pinheiro, V. C. S.; Tadei, W. P.; Barros, P. M. S. S.; Vasconcelos, P. F. C. & Cruz, A. C. R. 2005. Detection of dengue virus serotype 3 by reverse transcription-polymerase chain reaction in *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) captured in Manaus, Amazonas. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 100 (8): 833-839.
- Raí, K. S. 1991. *Aedes albopictus* in the Américas. *Annu. Rev. Entomol.*, 36: 459-484.
- Rasgon, J.; Scott, T. 1999. *Evaluation of a dot-blot assay for detecting Wolbachia infection in mosquitoes*. Mosquito control annual research. University of California Press. 81-84 pp.
- Rasgon, J. L.; Scott, T. W. 2003. *Wolbachia* and cytoplasmic incompatibility in the California *Culex pipiens* mosquito species complex: parameter estimates and infection dynamics in natural populations. *Genetics* 165: 2029-2038.
- Rasgon, J. L.; Scott, T. W. 2004. Na initial survey for *Wolbachia* (Rickettsiales: Rickettsiaceae) infections in selected California mosquitoes (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* 41: 255-257.
- Rice, W. R. 1989. Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* 43: 223-225.
- Ricci, I.; Cancrini, G.; Gabrielli, S.; D'Amelio, S.; Favi, G., 2002. Searching for *Wolbachia* (Rickettsiales: Rickettsiaceae) in mosquitoes (Diptera: Culicidae): large polymerase chain reaction survey and new identifications. *J. Med. Entomol.* 39: 562-567.
- Rousset, F.; Bouchon, D.; Pintureau, B.; Juchault, P.; Solignac, M. 1992. *Wolbachia* endosymbionts responsible for various alterations of sexuality in arthropods. *Proc R Soc Lond (Biol)*. 250: 91-98.
- Rousset, F.; Solignac, M. 1995. Evolution of single and double *Wolbachia* symbiosis during speciation in the *Drosophila simulans* complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92: 6389-6393.

- Sá, E. L. R. e Tadei, W. P. 2004. Áreas de ocorrência de *Aedes albopictus* Skuse, 1894 (Díptera: Culicidae) em Manaus-Amazonas, Brasil. *Rev. Soc. Bras. Med. Tropical*, 37: 164-165.
- Santos, R. L. C. 2003. Updating of the distribution of *Aedes albopictus* in Brasil (1997-2002). *Rev. Saúde Públ.*, 37 (5): 671-673.
- Serufo, J. V.; Montes de Oca, H.; Tavares, V.; Souoza, A. M.; Rosa, R. V. & Jamal, M. C. 1993. Isolation of dengue virus type 1 from larvae of *Aedes albopictus* in Campos Altos City, State of Minas Gerais, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 88: 503-504.
- Scott, F. 1980. *Biology*. Scott, Foresman and Company, Glenview, Illinois. 689 pp.
- Sinkins, S. P.; Braig, H. R.; O'Neill, S. L. 1995. *Wolbachia* superinfections and the expression of cytoplasmic incompatibility. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 261: 325-330.
- Sinkins, S. P.; O'Neill, S. L. 2000. *Wolbachia* as a vehicle to modify insect populations. In: Handler, A. M.; James, A. A. Eds. *Insect Transgenesis: Methods and Applications*. London, UK: CRC Press. pp 271-287.
- Sinkins, S. P. 2004. *Wolbachia* and cytoplasmic incompatibility in mosquitoes. *Ins. Bio. Mol. Biology*. 34: 723-729.
- Sinkins, S. P.; Dutton, S. T. 2004. Strain-specific quantification of *Wolbachia* density in *Aedes albopictus* and effects of larval rearing conditions. *Ins Mol Biol*, 13(3): 317-322.
- Sironi, M.; Bandi, C.; Sacchi, L.; Di Sacco, B.; Damiani, G.; Genchi, C. 1995. Molecular evidence for a close relative of the arthropod endosymbiont *Wolbachia* in a filarial worm. *Mol Biochem Parasitol*. 74: 223-227.
- Stevens, L.; Wicklow, D. T. 1992. Multispecies interactions affect cytoplasmic incompatibility in *Tribolium flour* beetles. *Am Nat*, 140: 642-653.
- Stouthamer, R.; Breeuwer, J. A. J.; Luck, R. F.; Werren, J. H. 1993. Molecular identification of microorganisms associated with parthenogenesis. *Nature* 361:66-68.
- Stouthamer R.; Breeuwer, J. A.; Hurst, G. D. 1999. *Wolbachia pipientis*: microbial manipulator of arthropod reproduction. *Annu Rev Microbiol*. 53: 71-102.
- Subbarao, S. 1982. Cytoplasmic incompatibility in mosquitoes, pp. 313-342. In W. M. Steiner, W. J.; Tabachnick, K. S.; Rai, S.; Narang, [eds.], *Recent developments in the genetics of disease vectors*. Stipes, Champaign, IL.

- Tadei, W.P.; Santos, J.M.M.; Costa, W.L.S.; Scarpassa, V.M. 1988. Biologia de anofelinos amazônicos. XII. Ocorrência de espécies de *Anopheles*, dinâmica da transmissão e controle da malária na zona urbana de Ariquemes (Rondônia). *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 30(3): 221-251.
- Tadei, W.P.; Santos, J.M.M.; Scarpassa, V.M.; Rodrigues, I.B. 1993. Incidência, distribuição e aspectos ecológicos de espécies de *Anopheles* (Diptera: Culicidae), em regiões naturais e sob impacto ambiental da Amazônia Brasileira. In: *Bases científicas para estratégias de preservação e desenvolvimento da Amazônia*. Ferreira, E.J.G.; Santos, G.M.; Leão, E.L.M.; Oliveira, L.A, (Eds). Vol. 2. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus. p. 167- 196.
- Tadei, W.P.; Dutary-Thatcher, B.; Santos, M. M. J.; Scarpassa, V.M.; Rodrigues, I.B.; Rafael, M.S. 1998. Ecologic observations on anopheline vectors of malaria in the brazilian amazon. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 59(2): 325-335.
- Tadei, W. P., Dutary-Thatcher, B. 2000. Malaria vectors in the Brazilian Amazon: of the subgenus *Nyssorhynchus* (1). *Rev. Inst. Med. Trop S. Paulo*, 42: 87-94.
- Tadei, W.P. 2001. *Controle da malária e dinâmica dos vetores na Amazônia*. 7^a. Reunião Especial da SBPC. (CD-ROM). Manaus: Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, p. 1-6.
- Tadei, W.P. 2002. Investigação de criadouros de *Aedes albopictus* na área urbana do Município de Tabatinga – Registro de casos suspeitos de Dengue, março de 2002. Relatório, INPA. 18pp.
- Tadei, W. P.; Santos, J. M. M.; Rodrigues, I. B.; Rafael, M. S. 2010. Malária e Dengue na Amazônia: vetores e estratégias de controle. In: *Pesquisas e Ações e Saúde nos Institutos de Pesquisa do Ministério da Ciência e Tecnologia*. MCT – Subsecretaria de Coordenação das Unidades de Pesquisa, Brasília/DF, 283p.
- Tai Min, K.; Benzer, S. 1997. *Wolbachia*, normally a symbiont of *Drosophila*, can be a virulent, causing degeneration and early death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 94: 10792-10796.
- Taylor, M. J.; Hoerauf, A. 1999. *Wolbachia* bacteria of filarial nematodes. *Parasitology Today* 15: 437-442.

- Teixeira, L.; Ferreira, A.; Ashburner, M. 2008. The bacterial symbiont *Wolbachia* induces resistance to RNA viral infections in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Biol* 6: e1000002.
- Telschow, A.; Hammerstein, P.; Werren, J. H. 2002. The effect of *Wolbachia* on genetic divergence between populations: models with two-way migration. *Am. Nat.* 160: S54-S66.
- Thompson, J. D.; Higgins, D. G. & Gibson, T. J. 1996. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22, 4673-4680.
- Tram, U.; Sullivan, W. 2002. Role of delayed nuclear envelope breakdown and mitosis in *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility. *Science* (Wash., DC) 296: 1124-1126.
- Tsai, K. H.; Lien, J. C.; Huang, C. G.; Wu, W. J.; Chen, W. J. 2004. Molecular (sub) grouping of the endosymbiont *Wolbachia* infection among mosquitoes of Taiwan. *J Med Entomol*, 41(4): 677-683.
- Tun-Lin, W.; Burkot, T. R.; Kay, B. H. 2000. Effects of temperature and larval diet on development rates and survival of the dengue vector *Aedes aegypti* in north Queensland, Australia. *Med. Vet. Entomol.* 14: 31-37.
- Turelli, M.; Hoffmann, A. A. 1999. Microbe-induced cytoplasmic incompatibility as a mechanism for introducing genes into arthropod populations. *Insect Mol. Biol.* 8, 243–255.
- Vélez, I. D.; Quinones, M. L.; Suarez, M.; Olano, V.; Murcia, L. M.; Correa, E. et al. 1998. Presencia de *Aedes albopictus* en Leticia Amazonas, Colombia. *Biomédica*, 18: 192-198.
- Weiss, E.; Moulder, J. W. 1984. Order I. Rickettsiales Gieszczykiewicz. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 1, ed. NR Krieg, JG Holt, pp. 687–729. Baltimore: Williams e Wilkins.
- Weisburg, W. G.; Dobson, M. E.; Samuel, J. M.; Dasch, G. A.; Mallavia, L.P. et al. 1989. Phylogenetic diversity of Rickettsiae. *J. Bacteriol.* 171:4202–6.
- Weisburg, W.G.; Barns, S. M.; Pelletier, D. A.; Lane, D. J. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 173:697–703.
- Werren, J. H.; Zhang, W.; Guo, L. R. 1995. Evolution and phylogeny of *Wolbachia*: reproductive parasites of arthropods. *Roc R Soc Lond B Biol Sci.* 261: 55-63.

- Werren, J. H. 1997. Biology of *Wolbachia*. *Ann. Review of Entomology*. 42: 587-609.
- Woese, C. R. 1987. Microbial evolution. *Microbiol. Rev.* 51:221–71.
- Zimmer, C. 2001. *Wolbachia*: A tale of Sex and Survival. *Science*. 292: 1093-1095.
- Zhou, W.; Rousset, F.; O'Neill, S. L. 1998. Phylogeny and PCR based classification of *Wolbachia* strains using *wsp* gene sequences. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 265: 509-515.