



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
CAMPUS BOTUCATU



Análises da competência vetorial e associação global do genoma em mosquitos *Aedes aegypti* da cidade de Botucatu infectados com Dengue vírus

Letícia Tiemi Egami Oda

**Botucatu-SP
2018**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"Júlio de Mesquita Filho"

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

Análises da competência vetorial e associação global do genoma em mosquitos *Aedes aegypti* da cidade de Botucatu infectados com Dengue vírus

ALUNA: Leticia Tiemi Egami Oda

ORIENTADOR: Prof. Dr. Jayme Augusto de Souza Neto

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Genética) Genética

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Oda, Leticia Tiemi Egami.

Análises da competência vetorial e associação global do genoma em mosquitos *Aedes aegypti* da cidade de Botucatu infectados com Dengue vírus / Leticia Tiemi Egami Oda. - Botucatu, 2018

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu
Orientador: Jayme Augusto de Souza Neto
Capes: 20202008

1. *Aedes aegypti*. 2. Dengue. 3. Vetores artrópodes. 4. Inseto como transmissor de doenças. 5. Genômica.

Palavras-chave: *Aedes aegypti*; Competência vetorial; Dengue; GWAS.

Agradecimentos

À Deus pela vida, pela força e saúde.

Ao meu orientador Jayme pelos quatros anos de convivência do doutorado, pelos ensinamentos diários e pelas inesquecíveis e enriquecedoras oportunidades profissionais e pessoais que pude ter ao longo desses anos.

A cada um do grupo Vectomics com quem pude compartilhar diariamente os desafios, alegrias e tristezas do que é ser um pós-graduando. Em especial Jaque, Lê Gushi, Bruno e Bianca que estiveram desde o início dessa caminhada. E ao Rafael Coan pela ajuda e paciência com a bioinformática.

Ao Professor Jeffrey Powell pela oportunidade de passar o período do doutorado sanduíche em seu laboratório, sua humildade e conhecimento são admiráveis. À Andrea e Luciano pelos ensinamentos e convivência durante o curto, porém intenso período em Yale. Foi uma honra conhece-los e trabalhar junto.

Imensamente à minha família. É por ela que enfrento e enfrentarei todos os obstáculos, e é com ela que compartilho minhas vitórias.

Especialmente ao Humberto, pela sua paciência, ajuda, cuidado e principalmente convivência. Sua companhia se tornou imprescindível em minha vida.

À Capes pela bolsa concedida durante o doutorado.

À Capes pela bolsa PDSE (Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior) – N°
88881.134265/2016-01

Sumário

Lista de Figuras.....	VI
Lista de Tabelas.....	VIII
Abstract	2
1. Introdução.....	3
1.1 Dengue	3
1.2 <i>Aedes aegypti</i>	4
1.3 Competência Vetorial.....	7
1.3.1 Mecanismos de defesa ao DENV	10
1.3.2 Mecanismos mediados por fatores genéticos do mosquito.....	12
1.3.3 Mecanismos mediados pela microbiota intestinal do mosquito	14
1.4 Genotipagem de Polimorfismos de Base Única (SNP – Single Nucleotide Polymorphism).....	15
1.5 Estudo da Associação Global do Genoma (GWAS – Genome Wide Association Study)	15
2. Objetivos	17
2.1 Geral.....	17
2.2 Específicos	17
3. Material e Métodos	18
3.1 Obtenção dos mosquitos <i>Aedes aegypti</i>.....	18
3.2 Replicação, isolamento e titulação viral	19
3.2.1 DENV-2	19
3.2.2 DENV-4	21
3.3 Infecção dos mosquitos	21
3.4 Dissecção dos mosquitos infectados	22
3.5 Extração de DNA/RNA	22
3.6 Quantificação do RNA Viral.....	23
3.7 Seleção dos diferentes fenótipos disseminado (D), resistente (R) e barreira de escape do intestino médio (MEB) dos mosquitos	24
3.8 Análises de genotipagem	26
3.9 Estudo da Associação Global do Genoma	27
3.9.1 Controle de qualidade.....	27
3.9.2 Análises de Associação.....	30
4. Resultados.....	33
4.1 Padronizações do isolamento viral e quantificação de DENV-4.....	33
4.2 Quantificação Absoluta de DENV-4	35
4.3 Competência Vetorial ao DENV-4 e Seleção dos fenótipos Disseminado (D), Resistente (R) e MEB (<i>Midgut Escape Barrier</i>)	36
4.4 Competência Vetorial ao DENV-2 e Seleção dos fenótipos Disseminado (D), Resistente (R)	40
4.5 Análises do Estudo de Associação Global do Genoma (GWAS)	45
5. Discussão.....	61
6. Conclusão	69
7. Referências.....	70

Lista de Figuras

Figura 1. Mosquito <i>Aedes aegyti</i> adulto, mostrando no lado dorsal do tórax a forma de "lira". (CDC/Howell; Collins, 2007)	5
Figura 2. Esquema representando o ciclo de desenvolvimento do mosquito.	6
Figura 3. Esquema anatômico do mosquito <i>Aedes aegypti</i>	8
Figura 4. Esquema das três vias de imunidade presentes nos mosquitos, Toll, IMD e JAK-STAT, e a via de RNA de interferência. Sim et al, 2014.....	11
Figura 5. Análise da suscetibilidade de populações naturais do mosquito <i>Aedes aegypti</i> ao vírus dengue 4 (DENV4).....	13
Figura 6. Repostas transcricionais de populações naturais do <i>Aedes aegypti</i> ao DENV4.....	14
Figura 7. Foto da armadilha para coleta de ovos de mosquitos, chamada ovitrampa (IOC/Fiocruz).	18
Figura 8. Esquema de uma placa utilizada no ensaio de placa.	20
Figura 9. Fórmula para calcular a quantidade de unidades formadoras de placas para a titulação vira. (Cooper, 1962).	20
Figura 10. Esquema representando as etapas para a seleção das linhagens com DENV2.....	25
Figura 11. Esquema representando as etapas para a seleção das linhagens com DENV-4.....	26
Figura 12. Gráfico da Tab. 6 representando os dias após infecção com DENV-4 e seus respectivos valores das médias dos Cts.	34
Figura 13. Gráfico da Tab. 7 representando os dias após infecção com DENV-4 e seus respectivos valores das médias dos Cts.	35
Figura 14. Gráfico de curva padrão.....	36
Figura 15. Gráfico com as porcentagens de infecção dos mosquitos de Botucatu infectados com DENV-4.....	37
Figura 16. Gráficos com valores de Ct para cada parte dissecada tanto da réplica 1 (R1) e réplica 2 (R2) com resultado da análise estatística de Mann-Whitney.	38
Figura 17. Estão representados os três gráficos com as taxas de infecção da progênie dos mosquitos com os mesmos fenótipos nas duas réplicas.....	39
Figura 18. Gráfico com as porcentagens de infecção dos mosquitos de Botucatu infectados com DENV-2.....	41
Figura 19. Gráfico com as porcentagens de infecção dos mosquitos da linhagem Rockefeller utilizados como controle e infectados com DENV-2.	42
Figura 20. Gráfico representando as porcentagens das taxas de infecção das partes dissecadas com DENV-2 da geração F1 de mosquitos D.....	43

Figura 21. Gráfico representando as porcentagens das taxas de infecção das partes dissecadas com DENV-2 da geração F1 de mosquitos R.	43
Figura 22. Gráfico representando as porcentagens das taxas de infecção com DENV-2 das partes dissecadas na geração F2 de mosquitos D.	44
Figura 23. Gráfico representando as porcentagens das taxas de infecção com DENV-2 das partes dissecadas da geração F2 de mosquitos R.....	45
Figura 24. Representação gráfica da Análise do Componente Principal (PCA).....	47
Figura 25. Gráfico <i>Manhattan plot</i> , no qual estão representados os resultados das associações dos SNPs devido aos seus valores de <i>P</i> , e suas localizações nos cromossomos do mosquito <i>Aedes aegypti</i>	49
Figura 26. Representação gráfica da análise Quantil-Quantil.	49
Figura 27. Representação gráfica da Análise do Componente Principal (PCA).....	50
Figura 28. Gráfico <i>Manhattan plot</i> , no qual estão representados os resultados das associações dos SNPs devido aos seus valores de <i>P</i> , e suas localizações nos cromossomos do mosquito <i>Aedes aegypti</i>	51
Figura 29. Representação gráfica da análise Quantil-Quantil.	52
Figura 30. Representação gráfica da Análise do Componente Principal (PCA).....	53
Figura 31. Gráfico <i>Manhattan plot</i> , no qual estão representados os resultados das associações dos SNPs devido aos seus valores de <i>P</i> , e suas localizações nos cromossomos do mosquito <i>Aedes aegypti</i>	54
Figura 32. Representação gráfica da análise Quantil-Quantil.	54
Figura 33. Representação gráfica da Análise do Componente Principal (PCA).....	56
Figura 34. Gráfico <i>Manhattan plot</i> , no qual estão representados os resultados das associações dos SNPs devido aos seus valores de <i>P</i> , e suas localizações nos cromossomos do mosquito <i>Aedes aegypti</i>	56
Figura 35. Representação gráfica da análise Quantil-Quantil.	57
Figura 36. Representação gráfica da Análise do Componente Principal (PCA).....	58
Figura 37. Gráfico <i>Manhattan plot</i> , no qual estão representados os resultados das associações dos SNPs devido aos seus valores de <i>P</i> , e suas localizações nos cromossomos do mosquito <i>Aedes aegypti</i>	59
Figura 38. Representação gráfica da análise Quantil-Quantil..	59

Lista de Tabelas

Tabela 1. Números do Índice Predial do LIRAA no mês de outubro e casos confirmados nos últimos quatro anos da cidade de Botucatu e São José do Rio Preto. Dados reportados ao município de Botucatu (VIGILÂNCIA AMBIENTAL EM SAÚDE, 2018) e dados do Ministério da Saúde.	7
Tabela 2. Sequências de iniciadores utilizados para quantificação viral.	23
Tabela 3. <i>Primers</i> e sonda utilizado para reações de com DENV-2.	24
Tabela 4. Descrição dos fenótipos e siglas utilizadas nas análises para o estudo de associação.	32
Tabela 5. Valores de Ct de três amostras diferentes para a quantificação do RNA viral de DENV-4 utilizando o kit GoTaq [®] 1-Step RT-qPCR (Promega).....	33
Tabela 6. Dias após a infecção com DENV-4 em células da linhagem Vero e seus respectivos valores das médias dos Ct.	33
Tabela 7. Dias após a infecção com DENV-4 em células da linhagem C6/36 e seus respectivos valores médios de Ct.....	34
Tabela 8. Associações dos números correspondentes aos valores de concentração em PFU/ml e valores de Ct,	36
Tabela 9. Número de indivíduos distribuído em cada réplica biológica, para cada fenótipo estudado (disseminado, resistente e MEB) e suas porcentagens.....	37
Tabela 10. Números de indivíduos para todos os três grupos de fenótipos de origem, fenótipos da progênie e a porcentagem.....	39
Tabela 11. Número de indivíduos distribuído em cada réplica biológica, para cada fenótipo estudado (disseminado, resistente e MEB) e suas porcentagens.....	41
Tabela 12. Números de indivíduos para todos os dois grupos de fenótipos de origem, fenótipos da progênie e a porcentagem.....	43
Tabela 13. Números de indivíduos para todos os três grupos de fenótipos de origem, fenótipos da progênie das duas gerações F1 e F2, e as porcentagens relativas aos fenótipos.	45
Tabela 14. Número das associações realizadas e os fenótipos dos mosquitos utilizados como caso e controle nas análises.	46
Tabela 15. Parâmetros para o controle de qualidade das amostras e dos SNPs. Números iniciais dos e finais após o controle de qualidade.	47
Tabela 16. Grupo de genes com o menor <i>P</i> -valor e suas características.....	50
Tabela 17. Parâmetros para o controle de qualidade das amostras e dos SNPs. Números iniciais dos e finais após o controle de qualidade.	50
Tabela18. Grupo de genes com o menor <i>P</i> -valor e suas características.....	52

Tabela 19. Parâmetros para o controle de qualidade das amostras e dos SNPs. Números iniciais dos e finais após o controle de qualidade.....	53
Tabela 20. Grupo de genes com o menor <i>P</i>-valor e suas características.....	55
Tabela 21. Parâmetros para o controle de qualidade das amostras e dos SNPs. Números iniciais dos e finais após o controle de qualidade.....	55
Tabela22. Grupo de genes com o menor <i>P</i>-valor e suas características.....	57
Tabela 23. Parâmetros para o controle de qualidade das amostras e dos SNPs. Números iniciais dos e finais após o controle de qualidade.....	58
Tabela 24. Grupo de genes com o menor <i>P</i>-valor e suas características.....	60

Resumo

Dengue é a arbovirose de maior crescimento nos últimos anos, repercutindo em impactos sociais e econômicos devido às altas taxas de morbidade e mortalidade desencadeadas pela infecção. O vírus dengue tem como principal vetor o mosquito *Aedes aegypti*. Por apresentar hábito hematofágico, antropofílico, de rápido desenvolvimento, é um excelente transmissor do vírus. Medidas de controle estão restritas à eliminação do mosquito vetor, uma vez que um tratamento específico ou uma vacina não estão disponíveis à população. É uma característica que determina a disseminação de doenças é a alta competência vetorial de seus mosquitos vetores, a qual tem sido associada à fatores genéticos do mosquito e ambientais. Sabe-se que a variabilidade genética dos mosquitos é um dos fatores que pode determinar o sucesso da relação mosquito-patógeno específico. Com isso, no presente trabalho foram estudadas as competências vetoriais de mosquitos *Aedes aegypti* da cidade de Botucatu infectados com DENV-2 e DENV-4 a fim de entender melhor a competência vetorial desses mosquitos. Além disso, foram feitas tentativas para selecionar linhagens resistentes e susceptíveis desses mosquitos infectados com ambos os sorotipos. Os mosquitos infectados com DENV-2 foram genotipados pela metodologia de SNP chip e posteriormente foram realizadas análises de estudo global do genoma (GWAS) afim de encontrar fatores genéticos relacionados com os diferentes fenótipos susceptível e resistente dos mosquitos. Como resultados observou-se diferentes competências vetoriais dos mesmos mosquitos infectados com diferentes sorotipos. Os mosquitos infectados com DENV-2 foram aproximadamente 70% susceptíveis, e mosquitos infectados com DENV-4 aproximadamente 70% foram resistentes, possuindo assim competências vetoriais opostas. Já no estudo da seleção dos fenótipos foi possível uma seleção de 80% até a geração F3 de mosquitos infectados com DENV-2, apesar do número baixo de indivíduos nas seleções. Os mosquitos infectados com DENV-4 não obtiveram uma taxa de seleção muito elevada, visto que as seleções foram feitas só até a geração F-2. Os resultados das análises de GWAS mostraram possíveis associações dos SNPs com os fenótipos estudados, apesar de não serem estatisticamente significantes para a correção de Bonferroni. Com isso, concluímos que a diferença vetorial é bastante dependente do sorotipo viral; para as análises de seleção e formação de linhagem é necessário um maior número de indivíduos nas primeiras infecções; e no estudo GWAS apesar da associação não ter sido significativa, devido ao baixo número de indivíduos, e dos parâmetros de correção estatística não serem ideais para indivíduos de uma única população, acredita-se que as associações encontradas de alguns SNPs com os fenótipos estudados sejam verdadeiras.

Abstract

Dengue is the arboviruses with the greatest growth in recent years, with social and economic impacts due to the high morbidity and mortality rates triggered by the infection. Dengue has as main vector the mosquito *Aedes aegypti*. Because of the haematophagic habit, been antropophilic, fast development, *Aedes aegypti* mosquitoes are excellent transmitter of the dengue virus. Control measures are restricted to vector mosquito elimination since a specific treatment or vaccine is not available to the population. The characteristic that determinates the diseases dissemination is the high vector competence of the mosquitoes, which has been associated with mosquito genetic and environmental factors. It is known that the genetic variability of mosquitoes is one of the factors that can determine the success of the specific mosquito-pathogen relationship. In the present study, the vector competence of *Aedes aegypti* mosquitoes from Botucatu city infected with DENV-2 and DENV-4 were compared in order to understand the vector competence of these specific mosquitoes. In addition, we tried to do resistant and susceptible strains selections of these mosquitoes infected with both serotypes. And mosquitoes infected with DENV-2 were genotyped by the SNP chip methodology and later analyzes were carried out to study the genome (GWAS) in order to find genetic factors related to the different susceptible and resistant phenotypes of them. As results we observed different vector competence of the same mosquitoes infected with different serotypes. Mosquitoes infected with DENV-2 were approximately 70% susceptible, and mosquitoes infected with DENV-4 were approximately 70% resistant, thus the opposing vector competence. In the selection study it was possible to select 80% up to the F3 generation of mosquitoes infected with DENV-2, despite the low number of individuals in the selections. Mosquitoes infected with DENV-4 did not obtain a very high selection rate, since the selections were made only up to the F-2 generation. The results of the GWAS analysis showed possible associations of the SNPs with the studied phenotypes, although they were not statistically significant for the Bonferroni correction. With this, we conclude that the vector competence difference is quite dependent on the viral serotype; for the analysis of selection and formation of lineage is necessary a greater number of individuals in the first infections; and in the GWAS study, although the association was not significant because of the low number of individuals, and the statistical correction parameters are not ideal for individuals from the same population, it is believed that the association of some SNPs with the studied phenotypes is true.

1. Introdução

1.1 Dengue

A dengue é uma doença causada pelo vírus Dengue (DENV), da família *Flaviviridae*, transmitido por mosquitos vetores do gênero *Aedes*, majoritariamente pela picada do mosquito vetor *Aedes aegypti* e em menor escala pelo *Aedes albopictus*. Estima-se que 390 milhões de pessoas sejam infectadas por ano, sendo que apenas 96 milhões possuem manifestação clínica da doença (BHATT et al., 2013). A doença é endêmica em mais de 100 países, sendo que as regiões mais afetadas são as Américas Central e do Sul, o Sudeste Asiático e o Pacífico Ocidental (WHO 2017).

Os sintomas causados pelas infecções dos vírus podem variar de sintomas brandos, como febre e dores no corpo até manifestações mais graves da doença, como dengue hemorrágica (DHF) ou choque de síndrome de dengue (DSS) as quais podem levar à morte (WHO 2009). Aproximadamente 2 a 5% dos casos de dengue evoluem para dengue severa (DS), que pode levar à morte (2,5% dos afetados) se não tratada em tempo adequado (HALSTEAD, 2007; WHO, 2014). A dengue é causada por quatro sorotipos antigenicamente distintos do vírus, DENV-1, 2, 3 e 4 (GUBLER, 1998a).

A transmissão de dengue normalmente depende de um ciclo que envolve um indivíduo infectado, um agente vetor e um indivíduo susceptível à infecção. Os DENVs multiplicam-se nos tecidos dos mosquitos, que se infectam e podem transmitir o vírus depois de sugarem o sangue de hospedeiros em período de viremia (RIGAU-PÉREZ, 2001). Existem relatos de transmissões verticais de DENV, em que a fêmea infectada transmite os vírus diretamente aos seus descendentes por passagem transovariana. Entretanto, isso ocorre em baixíssimas taxas tanto para *Aedes spp.* como para quase todos vetores de outros arbovírus e sua significância epidemiológica ainda não é claramente compreendida (GUNTHER et al., 2007).

A transmissão é iniciada quando a fêmea do mosquito *Aedes* suga o sangue de um indivíduo infectado durante sua alimentação. De 1 a 2 dias pós-infecção (dpi), os vírus invadem o epitélio do intestino médio e iniciam sua replicação. Cerca de 7 a 10 dpi é atingido o pico máximo de vírus no intestino do mosquito. Através do sistema traqueal do inseto, os vírus se disseminam por todo o corpo. As glândulas salivares são infectadas com 7 dpi e a concentração máxima de vírus nelas pode ser encontrada de 12 a 18 dpi. Finalmente, o mosquito infectado finaliza o ciclo de

transmissão ao inocular sua saliva contendo DENV em um indivíduo susceptível à infecção (SALAZAR et al., 2007).

Os primeiros relatos de epidemias com quadro clínico compatíveis com a dengue estão registrados em uma enciclopédia chinesa datada de 610 D.C. (GUBLER, 1998b). Surtos epidêmicos de doença febril aguda no oeste da Índia Francesa, em 1635, e no Panamá, em 1699, têm sido relacionados à dengue, porém sem muito consenso quanto a ser por esse agente etiológico ou pelo vírus Chikungunya (MARTINEZ-TORRES, 1990). Atualmente, até o começo de abril de 2018 foram registrados aproximadamente 103.918 mil casos de dengue, e 61 casos de dengue severa na região designada pela Organização de Saúde Pan-Americana de Cone Sul, a qual compreende Argentina, Brasil, Chile, Paraguai e Uruguai (PAHO 2018).

No Brasil, a transmissão vem ocorrendo de forma continuada desde 1986, intercalando-se com a ocorrência de epidemias. Geralmente estes fatores estão associados com a introdução de novos sorotipos em áreas anteriormente não ocupadas ou alteração do sorotipo predominante. Segundo o Boletim Epidemiológico do ano de 2017, o qual corresponde desde a semana 1 até a semana 52, foram registrados 251.711 casos prováveis de dengue, sendo a região Nordeste mais afetada. Isso corresponde a uma queda de aproximadamente 85% dos casos registrados quando comparados no mesmo período do ano de 2016. O ano de 2018 iniciou-se com 66.425 registro de casos prováveis até a semana 12 a qual corresponde até o dia 24 de março, sendo a região Sudeste com mais de 38% do total de casos até agora registrados. (SVS, 2018). O estado de São Paulo possui um grande número de casos registrados durante todos os anos de epidemias registradas. A última grande epidemia ocorreu no ano de 2015, a qual registrou mais de 700 mil casos de dengue confirmados (Secretaria da Saúde, 2017).

1.2 *Aedes aegypti*

O *Aedes aegypti* é um artrópode pertencente à ordem Díptera, subordem Nematocera, família Culicidae, e subfamília Culicinae (GLUBER, 1998a). Sua alimentação quando adulto (machos e fêmeas) é baseada em néctar de frutas. No entanto, além disso as fêmeas se alimentam de sangue, necessário para a maturação dos ovos. De hábito diurno, este mosquito é considerado hematófago voraz, sendo muito eclético quanto ao hospedeiro, sugando o sangue de uma grande variedade de animais e apresentando predileção pelo homem (antropofilia) (MATTINGLY, 1957; SCOTT et al., 1993; SCOTT et al., 2000).

Sua morfologia é facilmente determinada por ser um mosquito de coloração castanha com anelações prateadas no abdômen e pernas, e por marcações no tórax que formam um desenho com aspecto de “lira” (NEVES, 2009) (Fig. 1).



Figura 1. Mosquito *Aedes aegypti* adulto, mostrando no lado dorsal do tórax a forma de "lira". (CDC/Howell; Collins, 2007).

Destaca-se por ser o principal vetor de arbovírus, tal como a febre amarela urbana (GLUBER,1998a), dengue (DENV, gênero *Flavivirus*), chikungunya (CHIKV, gênero *Alphavirus*) e Zika (ZIKV, gênero *Flavivirus*) (RÜCKERT, et al., 2016). O habitat desta espécie está intimamente ligado às condições domiciliares ou peridomiciliares decorrentes da ação antropofílica. Sua preferência pelos depósitos artificiais como locais de ovoposição faz com que a concentração populacional advinda com a urbanização, ao lado da larga utilização de recipientes artificiais, seja fator determinante na sua crescente proliferação nos centros urbanos das regiões tropicais e subtropicais do planeta. Como exemplo de criadouros artificiais pode-se citar: pneus, latas, caixas d'água e piscinas. Nesses criadouros, as fêmeas depositam seus ovos, isoladamente, em um substrato úmido, próximo à água ou em local inundável, os quais podem resistir a secas por mais de um ano, o que facilita a sobrevivência e dispersão, dificultando o controle do mosquito (FIGUEIREDO; FONSECA, 1966).

O ciclo de desenvolvimento do *Ae. aegypti* compreende quatro estádios: ovo, larva (4 estádios: L1, L2, L3 e L4), pupa e inseto adulto (Fig. 2). O desenvolvimento deste ciclo geralmente ocorre em um curto espaço de tempo, podendo variar entre 10 e 15 dias, o que contribui para o rápido aumento da densidade populacional da espécie (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994).

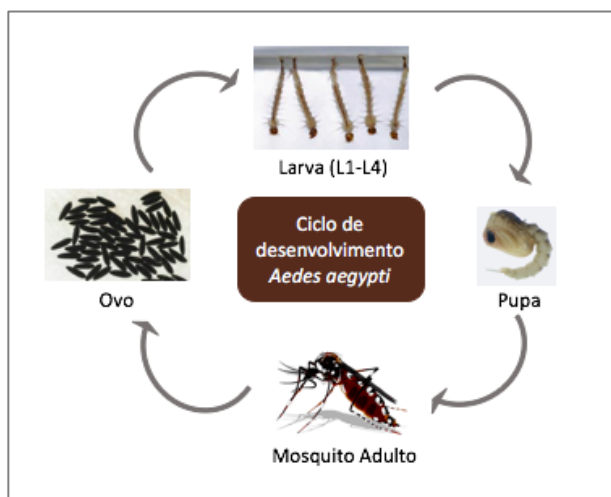


Figura 2. Esquema representando o ciclo de desenvolvimento do mosquito.

Uma peculiaridade da cidade de Botucatu a qual vem chamando a atenção é a quantidade alta de mosquitos aqui encontrados, seguidos de um número pequeno de casos registrados de dengue no mesmo município, quando comparado com a cidade de São José do Rio Preto a qual possui altos casos confirmados da doença. A alta infestação de mosquitos é observada através do Levantamento Rápido do Índice de Infestação por *Aedes aegypti* (LIRAA) que é o mapeamento das residências positivas para a presença de criadouros com larvas. Esse levantamento é realizado pela Vigilância Ambiental em Saúde de cada município e é calculado segundo o Índice Predial (IP) o número de residências positivas dividido pelo número de residências visitadas vezes 100. O valor gerado será analisado em três faixas: $IP < 1$ o município se encontra em situação satisfatória, $1 < IP < 3,9$ o município está em situação de alerta, e $IP > 4$ o município se encontra em risco de surto de dengue (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

A cidade de Botucatu possui mais de 140 mil habitantes e durante os quatro últimos anos registrou segundo LIRAA os IP entre situação satisfatório e de alerta, porém os números de casos de dengue não foram elevados (Tabela 1). Contudo, essa situação chamou a atenção para tentar conhecer os motivos do número de casos não serem tão elevados estudando mais os vetores da cidade.

Tabela 1. Números do Índice Predial do LIRAA no mês de outubro e casos confirmados nos últimos quatro anos da cidade de Botucatu e São José do Rio Preto. Dados reportados ao município de Botucatu (VIGILÂNCIA AMBIENTAL EM SAÚDE, 2018) e dados do Ministério da Saúde.

Cidades	Botucatu		São José do Rio Preto	
Ano	LIRAA (Levantamento Rápido do Índice de Infestação por <i>Aedes aegypti</i>)	Número de casos confirmados de dengue	LIRAA (Levantamento Rápido do Índice de Infestação por <i>Aedes aegypti</i>)	Número de casos confirmados de dengue
2014	1,2	93	3,9	1225
2015	0,8	290	1,6	22018
2016	0,2	105	<1	25743
2017	1	4	-	3229

1.3 Competência Vetorial

A transmissão do DENV pelo mosquito vetor está diretamente relacionada com sua capacidade e competência vetorial. A capacidade vetorial é a propriedade de uma população de vetores em disseminar um agente etiológico à indivíduos susceptíveis de uma determinada área em condições naturais. Parâmetros ecológicos, biológicos e comportamentais do mosquito fornecem importantes características ao estudo de capacidade vetorial, mas ainda são os aspectos referentes à infecção do vetor e susceptibilidade dos hospedeiros, tais quais a competência vetorial, média de picadas infectantes por hospedeiro e duração do período de incubação extrínseco (período de desenvolvimento do vírus no organismo do vetor - PIE), os principais fatores determinantes (FORATTINI, 1992; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 2005).

A competência vetorial, como um componente da capacidade vetorial, é a habilidade intrínseca de um vetor tornar-se infectado, propiciar a multiplicação do agente infeccioso e de transmitir o vírus a um hospedeiro vertebrado. É regida por diversos fatores incluindo o próprio vírus, fatores intrínsecos (genéticos), concentração viral no hospedeiro vertebrado infectado, fatores ambientais e climáticos, barreiras fisiológicas do mosquito vetor, dentre outros ainda não bem compreendidos (CALISHER, 1998; BENNETT et al., 2002).

Barreiras anatômicas próprias do inseto podem determinar a eficiência da infecção no vetor,

que inclui a susceptibilidade à infecção, isto é, a replicação do patógeno, duração do período de incubação extrínseco e eficiência da transmissão do patógeno, afetando consideravelmente a competência vetorial (BEERNTSEN et al., 2000). Dentre essas barreiras se destacam: a barreira de infecção do intestino médio (MIB-*Midgut Infection Barrier*), a barreira de escape do intestino médio (MEB-*Midgut Escape Barrier*) e a barreira de transmissão da glândula salivar (TB-*Transmission Barrier*) (BENNETT et al.; 2002, BLACK et al., 2002) (Figura 5). Um dos mecanismos relacionados a barreiras de infecção do intestino médio é a apoptose que está diretamente relacionada à eliminação de patógenos intracelulares (OCAMPO et al, 2013). Alguns estudos já caracterizaram algumas moléculas responsáveis por esse mecanismo em *Aedes aegypti* (COOPER et al, 2007; COOPER et al, 2009), bem como observaram diferenças na expressão de genes pró-apoptóticos entre mosquitos com a barreira intestinal ativa e mosquitos susceptíveis ao vírus (OCAMPO et al., 2013).

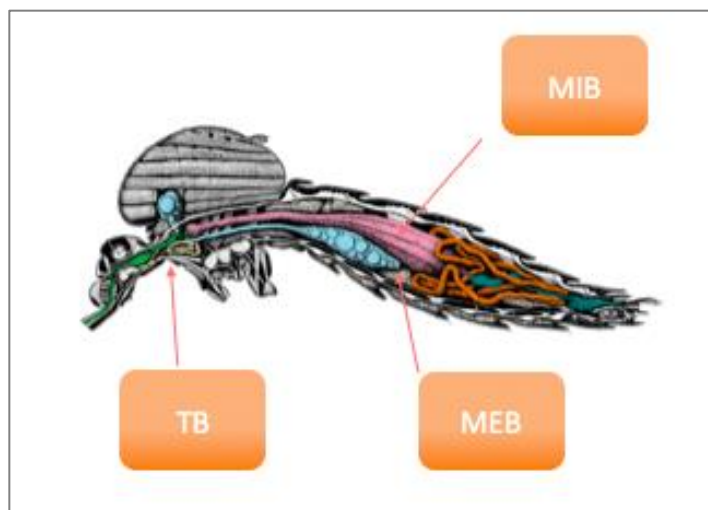


Figura 3. Esquema anatômico do mosquito *Aedes aegypti*. Barreiras anatômicas que determinam a infecção de artrópodes por arbovírus. MIB - barreira de infecção no intestino; MEB - barreira de escape do intestino; TB - barreira de transmissão. Modificado de Jobling (1987).

Estas barreiras podem ou não funcionar para proteger o vetor da replicação do patógeno em seu interior, pois requer a interação do vírus com os vários tecidos e seus respectivos processos fisiológicos de proteção contra patógenos e que quando ultrapassadas permitem uma infecção persistente e duradoura no inseto.

Populações deste *Aedes aegypti* exibem variabilidade considerável na competência vetorial para *flavivírus*, inclusive para o vírus dengue-2 (GUBLER et al., 1979; BOSIO et al., 1998). Calvez et al. (2017) compararam a competência vetorial de diferentes populações de mosquitos na região

da Nova Caledônia infectados com DENV1, e observaram que mesmo os mosquitos possuindo um elevado nível de infecção e disseminação, as taxas de transmissão foram baixas.

Estudos em laboratório certificam que grande variação na infecção oral dos vetores ocorre não só entre diferentes espécies como também entre diferentes populações geográficas da mesma espécie (GUBLER; ROSEN, 1976; ROCCO et al., 2001). Recentemente, muitos estudos de capacidade vetorial foram feitos com diferentes espécies de mosquitos e de diferentes localidades infectados Zika (CHOUIN-CARNEIRO et al., 2016; RICHARD et al., 2016; COSTA-DA-SILVA et al., 2017) e Chikungunya (NGOAGOUNI et al., 2017) para se elucidar os mecanismos de transmissão desses novos vírus circulantes.

Entre os fenótipos encontrados, quatro tipos são observados: 1) mosquitos totalmente resistentes, nos quais os vírus não conseguem estabelecer infecção no intestino médio; 2) mosquitos com infecção viral no intestino, sem disseminação para outros órgãos e/ou tecidos; 3) mosquitos com infecção intestinal e disseminação, exceto para as glândulas salivares; e 4) mosquitos com infecção e disseminação para todos os tecidos, incluindo as glândulas salivares. Destes, apenas aqueles que se enquadrem no item 4 podem ser considerados vetores competentes. Todos os demais, (1, 2 e 3) são considerados vetores não competentes, estando tais fenótipos associados, respectivamente, às barreiras MIB, MEB e TB (COX et al., 2011). Múltiplos QTLs (*Quantitative Trait Locus*) são associados a MIB e MEB. No entanto, apesar de alguns genes serem associados a estas regiões, como é o caso das tripsinas digestivas, até o momento não foi determinada a identidade de genes específicos responsáveis pela competência vetorial de uma espécie, o que se deve provavelmente ao fato de ser uma característica multifatorial bastante complexa (BOSIO et al., 1998. BOSIO et al., 2000; BLACK et al., 2002; BENNETT, et al., 2005). Diferenças na intensidade de infecção (medidas pelos picos de titulação) e a duração do PIE também podem ser observadas entre mosquitos de diferentes populações (SALAZAR et al., 2007). Esta variabilidade é fortemente influenciada por fatores genéticos, devido à ação de genes que controlam a competência vetorial (SEVERSON et al., 2001; BLACK et al., 2002).

A interação biológica vírus-vetor é resultado de um processo de coevolução contínua, que envolve o sistema imune do vetor e suas barreiras físicas e moleculares e os mecanismos virais de escape destas defesas (OBBARD; DUDAS, 2014). Outro estudo aponta também para um importante papel da microbiota intestinal do vetor neste processo (DENISSON et al., 2014).

1.3.1 Mecanismos de defesa ao DENV

Para lidar com o risco de infecção causada pela exposição aos mais diversos microorganismos, os insetos possuem um sistema imune composto de uma variedade de mecanismos de defesa que funcionam em sinergia. Embora menos complexo que a imunidade adaptativa dos vertebrados, devido à ausência de anticorpos e memória do tipo linfócitos B, o sistema imune dos insetos é rapidamente ativado após uma infecção (DIMOPOULOS, 2003).

As respostas imunes dos insetos envolvem mecanismos de defesas celulares e humorais, que são desencadeados pelos receptores de reconhecimento de padrão (PRR, *pattern recognition receptor*), capazes de se ligar especificamente a padrões moleculares associados a patógenos (PAMP, *pathogen-associated molecular patterns*) (MEDZHITOV; JANEWAY Jr., 2002). Os PRRs podem mediar diretamente a eliminação do microorganismo através de fagocitose, ou indiretamente, através do desencadeamento de cascatas de proteases serínicas, que subsequentemente acionam reações de defesa como a encapsulação melanótica; ou a ativação das vias imunes intracelulares, que regulam a transcrição de peptídeos antimicrobianos (AMP, *antimicrobial peptides*) e outros genes efetores de imunidade (HOFFMANN et al., 1999; HOFFMANN; REICHHART, 2002; LEMAITRE; HOFFMANN, 2007).

O sistema imune inato dos mosquitos possui uma potente resposta imune quando ativado por algum microorganismo, sendo capaz de distinguir um amplo número de classificação dos mesmos. As três principais vias responsáveis pela defesa antivírus são Toll, *Immune Deficiency* (IMD) e a *Janus kinase/signal transducers and activators of transcription* (JAK-STAT) (SIM et al., 2014).

A via Toll é ativada quando há detecção dos ligantes dos patógenos pelos PRRs, como os *peptidoglycan recognition proteins* PGRP-AS e -SD, os quais irão clivar a citocina Spätzle, que consequentemente irá se ligar a ativar receptores da via Toll. Essa ativação irá sinalizar e ativar as proteínas MyD88, Tube e Pelle resultando na fosforilação e degradação de Cactus, um regulador negativo da dessa via. A degradação desse inibidor fará com que o fator transcricional Rel1, seja translocado para o núcleo e ative a transcrição de genes alvos da via Toll (SIM et al., 2014). Essa via é bem caracterizada em mosquitos e a infecção por DENV no intestino médio, carcaça ou glândula salivar irá ativar a transcrição da via e seus respectivos efetores, como Spätzle, Toll, Rel1, além de múltiplos AMPs (XI et al., 2008; LUPLERTLOP et al, 2011) (Figura 4).

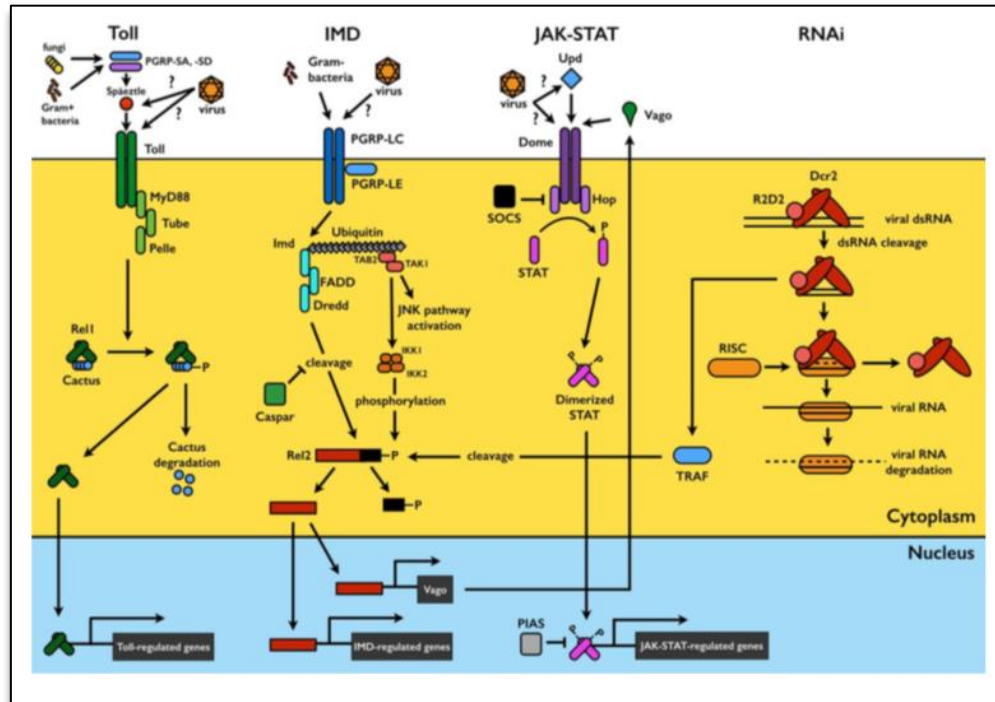


Figura 4. Esquema das três vias de imunidade presentes nos mosquitos, Toll, IMD e JAK-STAT, e a via de RNA de interferência. Sim et al, 2014.

A via IMD também é ativada pelo reconhecimento pela ligação dos patógenos aos diferentes PRRs que são PGRP-LCs e -LES. Essa ligação irá sinalizar proteínas IMD, caspases e quinases que irão desencadear dois caminhos: um é a ativação do fator de transcrição AP-1 da via JNK e o outra é o processamento e ativação do fator de transcrição Rel2 que desencadeará na sua translocação para o núcleo (SIM et al., 2014) e a consequente transcrição de diversos AMPs, incluindo Dipterina e Cecropina (MERKLING; VAN RIJ, 2012). Tanto a via Toll quanto a via IMD são ativadas por bactérias, mais especificamente bactérias Gram-positivas na via Toll e Gram-negativas na via IMD (Figura 4). Porém, na via IMD pouco se sabe sobre sua ativação direta na presença de DENV.

Já a via JAK-STAT será ativada quando o peptídeo Unpaired (Upd) irá se ligar ao receptor Dome. Essa ligação irá desencadear uma modificação conformacional e dimerização do Dome, resultando na sua auto-fosforilação e das quinases associadas Janus-kinase (JAK). Essa ativação irá recrutar proteínas STAT que serão fosforiladas pelo complexo Dome/JAK, resultando em sua ativação e dimerização. A ativação das STATs faz com que estas sejam translocadas para o núcleo, ativando assim a expressão dos genes efetores da via JAK-STAT (SIM et al., 2014) (Figura 4). Essa via é considerada bem conservada contra a infecção de DENV em mosquitos *Aedes aegypti*. Souza-Neto et al (2009) demonstraram que houve um aumento da carga viral no intestino dos

mosquitos quando a via foi inativada parcialmente pelo silenciamento do receptor Dome ou JAK, havendo um efeito oposto sobre a carga viral no intestino dos mosquitos quando o regulador negativo da via (PIAS) foi silenciado.

Outro mecanismo de defesa além das vias de imunidade é a via de RNA de interferência. Ela é ativada quando dsRNA dos vírus são reconhecidos e clivados pela maquinaria Dicer 2 em pequenos RNA de interferência. Esses siRNA são então carregados pelo complexo multi-proteico RISC que irá se ligar à fita complementar do RNA viral e degrada-lo. Além disso, o reconhecimento do dsRNA viral pela Dicer 2 irá ativar TRAF, capaz de ativar Rel2 e consequentemente a via IMD. A ativação de Rel 2 também pode acionar o peptídeo Vago, culminando na ativação da via JAK-STAT (SIM et al., 2014) (Figura 4).

1.3.2 Mecanismos mediados por fatores genéticos do mosquito

A disponibilização da sequência do genoma do mosquito *Ae. aegypti* (NENE et al., 2007), em combinação com metodologias de análise de expressão gênica em alta vazão e genética reversa, tem gerado oportunidades sem precedentes para o estudo das respostas imunes deste mosquito contra diversos patógenos (SOUZA-NETO et al., 2009; XI et al., 2008; ZOU et al., 2011). Estudos envolvendo microarranjos de DNA revelaram que a infecção do mosquito com o DENV resulta em uma ativação massiva de genes do sistema imune do inseto, incluindo fatores associados às vias Toll e JAK-STAT (XI et al., 2008).

Recente estudo realizado em nosso laboratório mostrou resultados preliminares da variação da expressão de genes relacionados ao sistema imune do mosquito através da análise de RNA-seq em mosquito de campo *Aedes aegypti* infectado com o DENV4. Foram analisadas populações de mosquitos infectados da cidade de Botucatu-SP, considerados resistentes devido ao baixo grau de suscetibilidade ao DENV4 quando comparados com os mosquitos da cidade de Neópolis-SE, com maior grau de suscetibilidade (Fig. 5).

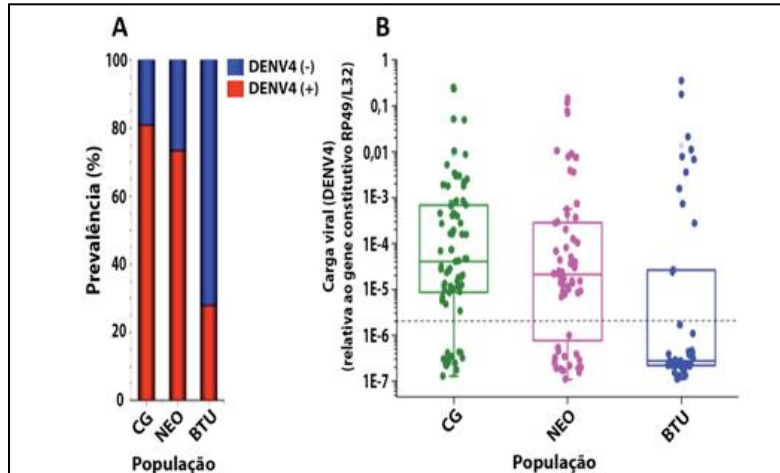


Figura 5. Análise da suscetibilidade de populações naturais do mosquito *Aedes aegypti* ao vírus dengue 4 (DENV4). Os mosquitos de Campo Grande (CG), Neópolis (NEO) e Botucatu (BTU) foram infectados oralmente com o DENV4 através de uma suspensão contendo sangue e DENV4 (1×10^7 PFU/mL). Após a infecção os mosquitos ingurgitados foram separados e utilizados para a determinação da carga viral 4 dpi (dias pós-infecção). O RNA total foi extraído de cada indivíduo e convertido em cDNA, sendo a quantificação viral realizada através de PCR em tempo real com primers para a região 5' UTR do vírus. A) Prevalência de mosquitos infectados com o DENV4 em cada população estudada. B) Intensidade da infecção do DENV4. Cada ponto representa a expressão do RNA viral normalizada pelo gene ribossomal Rp49/L32 do mosquito através do método $2^{-\Delta CT}$. A significância dos resultados foi analisada através do método de Mann-Whitney.

Nossas análises sugerem que a intensidade da resposta e repertório de genes modulados pelo DENV varia grandemente de acordo com a população e possivelmente ao seu grau de suscetibilidade ao vírus (Fig. 6). A análise da abundância relativa de transcritos revelou que apenas um número discreto de genes é modulado pelo DENV4 quando a população de Botucatu é infectada com o vírus (22 induzidos e 2 reprimidos) ao passo que a população de Neópolis, mais suscetível ao vírus, apresenta uma resposta transcricional muito mais robusta ao DENV4, com 166 genes induzidos e 23 genes reprimidos. Surpreendentemente, a infecção com o DENV4 leva a uma notável ativação imunológica nos mosquitos da população de Neópolis, sendo que 43 genes induzidos (32% do total de genes induzidos) possuem função imune.

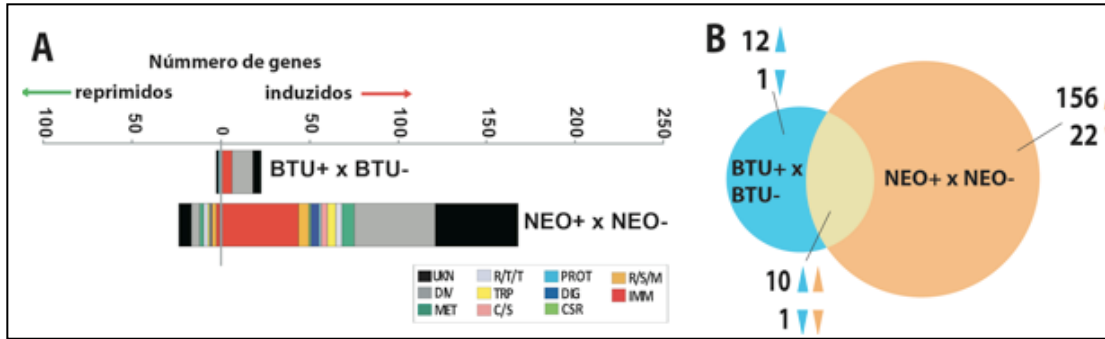


Figura 6. Repostas transcricionais de populações naturais do *Aedes aegypti* ao DENV4. A) Classificação funcional dos transcritomas modulados pelo DENV4 nas populações de Botucatu (BTU) e Neópolis (NEO). Abreviação dos grupos funcionais IMM, imunidade; R/S/M, redox, estresse e mitocôndria; CSR, recepção quimiosensorial; DIG, digestão; C/S, estrutural e citoesqueleto; TRP, transporte; R/T/T, replicação, transcrição e tradução; MET, metabolismo; DIV, funções diversas; UNK, função desconhecida. B) Diagrama de Venn representando regulações gênicas únicas e compartilhadas pelas populações de BTU e NEO em resposta ao DENV4.

1.3.3 Mecanismos mediados pela microbiota intestinal do mosquito

Além dos fatores genéticos intrínsecos ao mosquito, estudos recentes têm demonstrado que a microbiota intestinal também atua como um fator determinante na competência vetorial dos mosquitos. Os mosquitos, assim como os demais insetos, têm seu intestino-médio colonizado por uma microbiota simbiote que é necessária para o seu desenvolvimento (DILLON; DILLON 2004) e para o funcionamento de diversos processos fisiológicos como digestão, nutrição, reprodução (GAIO et al., 2011), maturação do sistema imune (WEISS et al., 2011) bem como proteção contra patógenos (HURST; HUTCHENCE, 2010). Neste sentido, a influência que tais relações exercem sobre os insetos é uma forte justificativa para investigações do uso da microbiota para o controle das doenças transmitidas por vetores (CIRIMOTICH et al., 2011).

A remoção da microbiota do intestino de mosquitos vetores através de um tratamento com antibióticos resulta em níveis mais altos de infecção por *Plasmodium falciparum* em *Anopheles gambiae* (DONG et al., 2009) e DENV em *Ae. aegypti* (XI et al., 2008), sugerindo que tais bactérias protegem os insetos contra infecções por vírus e protozoários. Embora este mecanismo ainda seja amplamente desconhecido, a hipótese mais aceita é a de que a microbiota promova uma estimulação basal do sistema imune dos mosquitos, o que resulta em um aumento na produção das moléculas efetoras que os defendem das infecções com patógenos humanos como o *P. falciparum* e o DENV (CIRIMOTICH et al., 2011). De acordo, Bahia et al. (2014) demonstraram que os principais genes da resposta imune em *An. gambiae* são induzidos por diversas bactérias anti-*Plasmodium* isoladas da microbiota intestinal de anofelinos (*Comamonas* sp., *Acinetobacter* sp., *Pseudomonas putida*, *Pantoea* sp., *Pseudomonas rhodesiae*, *Serratia marcescens*, *Elizabethkingia*

anopheles), corroborando esta hipótese.

Recentemente a descoberta de uma bactéria isolada da microbiota de mosquitos *Aedes aegypti* do Panamá, denominada *Cromobacterium* sp_ *Panama* teve a sua metodologia de isolamento patenteada por Dimopoulos et al. 2017 por possuir a ação larvicida, inseticida e antipatógeno tanto em *Aedes aegypti* quanto em *Anopheles gambiae*, os dois importantes vetores de arbovírus/patógenos.

1.4 Genotipagem de Polimorfismos de Base Única (SNP – Single Nucleotide Polymorphism)

O objetivo dos estudos genéticos é a distinção entre genótipos relevantes para uma determinada característica de interesse em um organismo. Esta distinção ocorre baseada em marcadores informativos e a este sistema dá-se o nome de marcadores genéticos ou marcadores moleculares (SCHLÖTTERER, 2004). Os quais podem fornecer informações sobre a variação alélica ou polimorfismo em um determinado *locus*, indicando o fenótipo molecular oriundo de um gene expresso ou um segmento específico de DNA correspondente às regiões expressas ou não do genoma (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Os marcadores moleculares, contribuem para a entendimento da heterogeneidade genética das espécies, elucidando importantes informações sobre o vetor e sua estrutura populacional (LOU- NIBOS; CONN, 2000). A genotipagem de SNPs está presente em diversos tipos de estudos como melhoramento animal, estrutura populacional, resistência a inseticida (WEETMAN, et al., 2010, JOHNSTON et al., 2014, RAMOS, et al., 2009).

Com o foco em mosquitos vetores, o aumento do conhecimento da relação do fenótipo com o genótipo faz com que possamos entender melhor os fatores que governam a competência vetorial em populações de mosquitos. Um dos métodos bastante utilizado é a avaliação dos SNPs desses indivíduos. Com o avanço da tecnologia, sequenciamentos em larga escala possibilitaram avaliar um maior número de SNPs em determinados indivíduos, como o caso do SNP chip desenvolvido para *Aedes aegypti* (EVANS, et al., 2015), facilitando assim o conhecimento genético desses vetores.

1.5 Estudo da Associação Global do Genoma (GWAS – Genome Wide Association Study)

Apesar de muitos estudos descreverem que a infecção dos mosquitos ao dengue vírus está relacionada com a ativação de vias de imunidade como Jak-Stat, Toll e IMD (XI et al., 2008, SOUZA-NETO et al., 2009, SIM et al., 2014), e também à importância da presença da microbiota intestinal como fator importante para infecção do mosquito e conseqüentemente a sua competência vetorial (XI et al., 2008), pouco se sabe sobre os fatores genéticos que governam a competência vetorial.

O desenvolvimento de arranjos de SNP de alta densidade possibilitou a realização de análises de associação global do genoma (GWAS) o qual corresponde ao estudo de milhares de SNPs genotipados de todo o genoma testados para uma possível associação com um fenótipo de interesse (ZENG et al., 2015). Uma das vantagens do estudo seria a não exigência de conhecimento prévio profundo dos processos fisiológicos e bioquímicos envolvidos na manifestação dos fenótipos estudados (TAYLOR et al., 1998; WANG et al., 2005). Como desafios envolvendo esses estudos estariam a adequação de modelos e metodologias estatísticas para a estimativa de um grande número de efeitos a partir de um limitado número de observações, o tamanho amostral, a colinearidade advinda do desequilíbrio de ligação entre os marcadores e a interpretação dos resultados (CANTOR et al., 2010; PEARSON; MANOLIO, 2008; RESENDE et al., 2012).

Os primeiros estudos envolvendo a associação global do genoma, realizados em humanos, possibilitaram a identificação de loci que afetam várias doenças complexas, como câncer de próstata, transtorno bipolar, doença arterial coronariana, doença de Crohn, hipertensão, artrite reumatóide, diabetes tipo 1 e diabetes tipo 2 (YEAGER et al., 2007; WTCCC, 2007). Atualmente, apesar ainda da grande maioria dos trabalhos que possuem o estudo de GWAS serem feitos em humanos, outros projetos focam no melhoramento genético em animais como os suínos e bovinos para aumento da produção (FAN et al., 2011; SNELLING et al., 2010), além dos estudos que associando doenças e características populacionais em animais e plantas (JOHNSTON et al., 2014; KIJAS et al., 2016; KIJAS et al., 2013; WOLFE et al., 2016).

Especificamente na área de vetores existem poucos trabalhos com esse tipo de análise, sendo encontrado apenas em mosquitos do gênero *Anopheles* spp. (WEETMAN et al., 2010; ISAACS et al., 2018). Com isso, devido ao fato de não haver muitos estudos de associação da associação global do genoma referentes à competência vetorial dos mosquitos de uma das espécies mais importantes para a saúde pública, foi realizado estudos de GWAS com o objetivo de encontrar possíveis associações de SNPs com os fenótipos de mosquitos infectados com DENV.

2. Objetivos

2.1 Geral

Identificar fatores genéticos possivelmente associados à competência vetorial do mosquito *Aedes aegypti* ao vírus dengue.

2.2 Específicos

- Avaliar a competência vetorial dos mosquitos *Aedes aegypti* naturais de Botucatu infectados com diferentes sorotipos de DENV;

- Selecionar subpopulações de mosquitos resistentes ou susceptível ao DENV;

- Genotipar os grupos de mosquitos que apresentem diferentes fenótipos de infecção e/ou disseminação viral;

- Realizar um estudo de associação global do genoma para encontrar eventuais associações entre os diferentes fenótipos de infecção/disseminação viral.

3. Material e Métodos

3.1 Obtenção dos mosquitos *Aedes aegypti*

Os ovos dos mosquitos do presente estudo foram obtidos através de armadilhas de ovoposição. Essas armadilhas chamadas ovitrampas são palhetas de Eucatex de 17x3cm de tamanho das quais são colocadas em recipientes escuros imersas até a sua metade em água de infusão de feno, deixadas em lugares externos das casas sob a proteção de luz na cidade de Botucatu (Figura 7). No ano de 2016 uma ovitrampa foi colocada em três casas distintas e em bairros diferentes da cidade. Porém, só obtivemos ovos de uma ovitrampa e de uma única casa. Considerando o trabalho da Dra. Aline Bronzato (a ser publicado) no qual demonstrou que os mosquitos *Aedes aegypti* da cidade de Botucatu são geneticamente uma mesma população, optou-se por continuar os nossos experimentos mesmo obtendo ovos de uma única região da cidade.



Figura 7. Foto da armadilha para coleta de ovos de mosquitos, chamada ovitrampa (IOC/Fiocruz).

Após uma semana expostas, as madeiras Eucatex positivas para ovos foram levadas para o insetário do Instituto de Biotecnologia – Unesp, o qual possui condições padrões de temperatura à 27°C, umidade relativa de 85±5% e foto período de 12h ideais para manutenção de mosquitos. Os ovos foram eclodidos e quando adultos foram identificados e mantidos apenas a espécie *Aedes aegypti* referente ao estudo. Para manutenção dos mosquitos adultos, eles foram colocados em gaiolas e alimentados com solução de sacarose 10%, e para a obtenção dos ovos os mosquitos foram alimentados artificialmente com sangue de carneiro comercial.

3.2 Replicação, isolamento e titulação viral

Foram utilizados os vírus DENV-2 e DENV-4 devido à sua disponibilidade em nosso laboratório. Ambas as cepas são brasileiras, sendo DENV-2 comercialmente vendido foi utilizado no laboratório do Prof. Jeffrey Powell na universidade Yale. Já o DENV-4 de origem de isolado de paciente, cedido pelo professor Dr. João Pessoa Araújo Junior (UFMG), utilizado nos experimentos realizados no Brasil.

Para ambos os vírus foram realizadas as mesmas técnicas de replicação, isolamento e titulação. Para a replicação viral foi utilizada a linhagem de *Aedes albopictus* C6/36 adquirida do Banco de Células do Rio de Janeiro. As células foram mantidas em garrafas de cultura celular de 75cm² com meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado com soro fetal bovino (SFB, Invitrogen) 10% inativado, 1% L-glutamina e 1% de aminoácidos não-essenciais colocadas no interior de incubadoras modelo Water-Jacketed CO₂ Incubator (Shel lab) a 28°C e 5% CO₂. Quando a confluência celular atingia 80%, o meio de cultura era retirado e adicionados 500µl de vírus mais 1,5ml de meio de cultura sem SFB. A garrafa foi colocada em um agitador gangorra durante 15 minutos e depois deixada na incubadora à 28°C durante 45 minutos. Após esse período foram adicionados mais 13ml do mesmo meio de cultura seguindo-se incubação por 5 dias.

Para o isolamento viral, passados os 5 dias de incubação, o líquido sobrenadante contendo o meio de cultura e as partículas virais foi transferido para um tubo de 50ml e centrifugado à 22.000 x g por 5 minutos para separação das células das partículas virais. Após a centrifugação, alíquotas de 500µl foram estocadas em criotubos a -80°C e utilizadas posteriormente para infecção de outras células ou de mosquitos.

3.2.1 DENV-2

Para a titulação viral das alíquotas de DENV-2 utilizadas nas infecções foram feitos ensaios de placa, com células Vero (linhagem derivada de células do rim de macacos verdes africanos, *Cercopithecus aethiops*). Para a manutenção das células Vero utilizou-se meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) com 10% de Soro Fetal Bovino (GIBCO), 1% de L-Glutamina (Sigma-Aldrich), 1x aminoácidos não essenciais MEM (Sigma-Aldrich) e mantidas à 37°C e 5% CO₂ em incubadoras modelo Water-Jacketed CO₂ Incubator (Shel lab). Para o ensaio

propriamente dito, foram utilizadas placas de 6 poços contendo células com 80% de confluência. Cada poço foi infectado com diferentes diluições virais iniciando em 10^{-2} até 10^{-6} (Figura 8). A metodologia para infectar as células foi a mesma utilizada para as células C6/36 mencionada acima. Após a inoculação do vírus, foram adicionados 3 ml da solução de 47% de meio de cultura MEM 10X (Gibco), mais 47% de solução de agarose na concentração de 0,019mg/ml (Seaplaque Low Melting Agarose-American Bioanalytical), 0,95% de Amphotericin B (Gibco) e 4,7% de FBS (Gibco), seguindo-se incubação a 35°C e 5% CO₂ durante 6 dias. Passado esse período, no 6º dia adicionou-se em cada poço 3 ml de uma solução agarose mais gel Red. Essa solução constitui-se de 95,7% agarose na concentração de 0,0045mg/ml e 4,3% de solução de 33,3% de Neutral Red (1%- Electron Microscopy Sciences) diluídos em 66,6% de meio DMEM (Gibco). Após a adição as placas foram incubadas durante 24 horas à 35°C e 5% de CO₂ e posteriormente foram contadas as placas formadas.

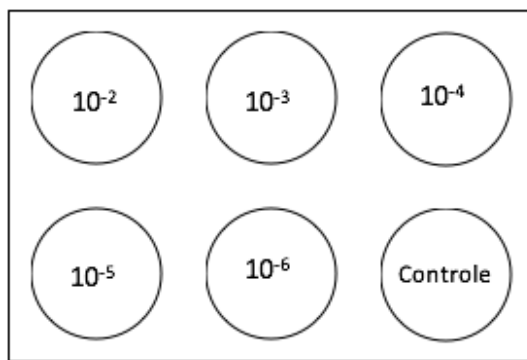


Figura 8. Esquema de uma placa utilizada no ensaio de placa. Estão representadas as diferentes diluições virais, iniciando em 10^{-2} até 10^{-6} e mais o controle.

O número de placas em cada poço foi calculado na seguinte fórmula para posterior resultado em PFU (*Plaque Forming Unit*) (Figura 9).

$$\text{PFU/ml} = \frac{\text{nº placas formadas}}{\left[\text{volume de vírus inoculado-ml} \right] \times \left[\text{diluição} \right]}$$

Figura 9. Fórmula para calcular a quantidade de unidades formadoras de placas para a titulação vira. (Cooper, 1962).

3.9.2 DENV-4

Antes de iniciarmos as infecções com DENV-4 nos mosquitos, foram feitas infecções com as linhagens celulares C6/36 e Vero para determinarmos os melhores parâmetros para produção isolamento viral.

Iniciou-se o processo de padronização com o kit GoTaq®1-Step RT-qPCR (Promega), que possui como função fazer no mesmo tubo, em apenas uma etapa, as reações de síntese de cDNA e de PCR quantitativo em tempo real. Com isso, foram testadas as quantificações de RNA de DENV-4 isoladas em diferentes condições. Quantificou-se vírus presente no sobrenadante de células das duas linhagens C6/36 e Vero, e de uma alíquota de RNA já extraído do sobrenadante de uma garrafa de C6/36 infectada com DENV-4.

Iniciamos as reações seguindo o protocolo sugerido pelo do kit com reação total de 10 µl. Os reagentes utilizados foram: 5µl de GoTaq, 1,0µl de Primer Forward DENV-4 (Tabela 2), 1,0µl *Primer Reserve* DENV-4 (Tabela 1), 0,2µl GoScript™RT mix e 2,8µl de RNA viral. Para a programação da reação de PCR utilizamos as seguintes etapas:

- 37°C por 15 minutos para a transcrição reversa
 - 95°C por 10 minutos para inativação da etapa de transcrição reversa e ativação da fase de amplificação
 - 95°C por 10 segundos para desnaturação da fita dupla
 - 60°C por 30 segundos para o anelamento dos iniciadores
 - 72°C por 30 segundos para a fase de extensão da fita
 - 95°C por 5 minutos para dissociação
- } x 40

3.3 Infecção dos mosquitos

Fêmeas de *Aedes aegypti* da população Botucatu das gerações F0 até F2 foram infectadas com DENV-2 e DENV-4 através de uma alimentação sanguínea artificial contendo partículas virais. Para as infecções com DENV-2 na titulação de $4,6 \cdot 10^7$ PFU realizados em Yale, foi utilizado sangue comercial procedente de ovelhas. Já para as infecções com DENV-4 na titulação de $5 \cdot 10^6$ PFU, realizadas em Botucatu, foi utilizado sangue humano. Foram utilizados 400 µl de uma solução contendo o sangue combinado com partículas virais na proporção de 1:1 para ambos

os sorotipos. A solução foi colocada em alimentadores artificiais de vidro conectados a um banho-maria com circulação externa modelo Isotemp Circulators 4100 H7 (Fisher Scientific).

Após a alimentação sanguínea as fêmeas ingurgitadas foram separadas em gaiolas individuais ou tubos de 50ml contendo papéis de filtro para postura dos ovos. Após 3 dias da alimentação com sangue infectado os ovos foram coletados e identificados. As dissecções dos órgãos foram realizadas 15 dias após a alimentação com sangue infectado para a determinação da carga viral nos mosquitos.

Como as infecções com os diferentes sorotipos foram feitas em laboratório diferentes, utilizou-se o ambiente cedido por cada laboratório. Os procedimentos envolvendo a manipulação do DENV-4 foram realizados em áreas de contenção com nível de biossegurança (NB) 2 no laboratório situado no Instituto de Biotecnologia – Unesp Botucatu. Já os procedimentos envolvendo o DENV-2 foram realizados no laboratório biossegurança nível 3 no *The Connecticut Agricultural Experiment Station* na cidade de New Haven, Estados Unidos.

3.4 Dissecção dos mosquitos infectados

Antes da dissecção, todo o material utilizado foi desinfetado utilizando a autoclave e posteriormente exposto por aproximadamente 20 minutos à luz U.V. As fêmeas de *Aedes. aegypti* tiveram suas superfícies desinfetadas através da imersão individual em etanol 70% (v/v). A dissecção foi realizada com o auxílio de microscópio estereoscópico Stemi DV4 (Carls Zeiss). Após a desinfecção da parte externa os mosquitos foram colocados sobre uma lâmina de vidro onde tiveram o corpo dissecado em três partes, cabeça, tórax e abdômen. Para os mosquitos alimentados com sangue contendo DENV-4, cada parte foi colocada em tubos de 1,5ml contendo 200µl de Trizol® Reagent (Life Technologies). Já para os mosquitos alimentados com sangue contendo DENV-2 as partes foram armazenadas em no tampão de lise TNA (Mag-Bind® Viral DNA/RNA kit).

3.5 Extração de DNA/RNA

As extrações de RNA seguiram metodologia padrão de cada laboratório em que o experimento foi realizado. Para os mosquitos alimentados com sangue contendo DENV-4 utilizou-se a metodologia reagente Trizol® Reagent (Life Technologies) seguindo o protocolo do

fabricante. Após a extração do RNA total foi quantificado no espectrofotômetro NanoDrop 2000c (Thermo Scientific) e com 1µg de RNA das amostras foi realizado o tratamento com DNase e posteriormente feitas as sínteses de cDNA seguindo o protocolo do kit RevertAid First Strand cDNA Synthesis (Thermo Scientific).

Já as extrações para os mosquitos alimentados com sangue contendo DENV-2, seguiu-se o protocolo do kit Mag-Bind® Viral DNA/RNA e foram realizadas no equipamento KingFisher Flex System (Thermo Fisher Scientific). O DNA e RNA são extraídos concomitantemente e, ao final, o RNA e DNA são eluídos em 50µl da solução 1/10X TE e posteriormente foram armazenadas à temperatura de -80°C.

3.6 Quantificação do RNA Viral

Para a quantificação da carga viral das partes dos mosquitos infectados com o DENV-4 foi utilizado a técnica de q-PCR utilizando o equipamento StepOne Plus™ Real Time PCR System (Applied Biosystems), no qual um par de iniciadores foi desenhado para amplificar parte da região 5'UTR do DENV-4 e outro para amplificar parte da região que codifica a proteína ribossomal (Rp49/L32) (gene constitutivo de *Aedes aegypti*) utilizada como controle endógeno (Tabela 2).

Tabela 2. Sequências de iniciadores utilizados para quantificação viral.

* Sequências de iniciadores cedidas pela equipe do Prof. Dr. João Trindade Marques da Universidade Federal de Minas Gerais.

Produto gênico	Iniciadores (5'-3')		Referência
	<i>Sense</i>	<i>Antisense</i>	
DENV-4 5' UTR	TCGGAAGCTTGCTTAACACA	TTCGTTGGTTCATTTTCCAG	*
Proteína Ribossomal (Rp49/L32) AAEL003396	ACAAGCTTGCCCCCAACT	CCGTAACCGATGTTTGGC	Bonizzoni <i>et al.</i> , 2011

As reações foram realizadas utilizando 7,5 µL de *Master Mix* (2X) do kit comercial Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (Thermo Scientific), 0,75 µL de cada iniciador (0,5 µM), 1 µL de

cDNA e H₂O para completar o volume final de 15 µL. Os ciclos de amplificação seguiram o programa padrão: 95°C por 10 minutos, 40 ciclos com 95°C por 15 segundos e 60°C por 30 segundos, acrescido do passo do cálculo da temperatura de *melting* (T_m).

Já para os mosquitos infectados com DENV-2 foi utilizada a metodologia de quantificação absoluta com sonda fluorescente com o equipamento 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) e utilizando o kit SuperScript™ III Platinum™ One-Step qRT-PCR Kit (Invitrogen). As reações foram feitas utilizando os seguintes reagentes: 0,4µl de Platinum/Superscript, 10µl de 2X tampão de reação, 0,4µl DENV primer F, 0,4µl DENV primer R, 0,2µl da sonda, 0,4µl de ROX (1:10), 6,2µl água DEPC e 2µl de amostra, totalizando 20µl totais de reação. Foram utilizados os *primers* e sonda para DENV-2 descritos na Tabela 3. O ciclo utilizado foi: 50°C por 5 minutos, 95°C por 2 minutos, 40 ciclos de 95°C por 3 segundos, 60°C por 30 segundos. Para a análise dos resultados foi considerado o valor de Ct acima de 37 como negativo.

Tanto os *primers* de DENV-2 quanto os de DENV-4 foram utilizados na concentração de 10nmol.

Tabela 3. *Primers* e sonda utilizado para reações de com DENV-2.

<i>Primer</i>	Sequencia	Referência
DEN-2-Forward	CATGGCCCTKGTGGCG	Callahan JD et al. 2001
DEN-2-Reverse	CCCCATCTYTTTCAGTATCCCTG	Callahan JD et al. 2001
DEN-2-Probe	TCCTTCGTTTCCTAACAATCC	Callahan JD et al. 2001

3.7 Seleção dos diferentes fenótipos disseminado (D), resistente (R) e barreira de escape do intestino médio (MEB) dos mosquitos

Como tentativa para a seleção dos mosquitos com diferentes fenótipos para a infecção/disseminação viral, foram considerados os seguintes grupos: mosquitos resistentes, ou seja, sem vestígios de partículas virais (R); mosquitos com disseminação, ou seja, com vírus detectado em ambas as partes, cabeça e abdômen (D); e mosquitos com vírus detectado apenas no abdômen (MEB).

Com isso, foram preparados dois desenhos experimentais diferentes dependendo do sorotipo utilizado. A seleção de isolinhagens com os fenótipos D, R ou MEB para DENV2 ocorreu em três etapas, como descrito a seguir: fêmeas da geração F0 (sem seleção de fenótipo), foram alimentadas com sangue contendo DENV2 para a identificação dos indivíduos com os diferentes fenótipos (D, R ou MEB) e agrupamento dos seus respectivos ovos (geração F1); na segunda etapa, os ovos F1 foram eclodidos separadamente, de acordo com seu respectivo fenótipo, e agrupados em gaiolas na proporção de 1:5 (macho:fêmea), prosseguindo-se com uma alimentação sanguínea contendo DENV-2 e subsequente coleta dos ovos (F2) para cada grupo separadamente. Na terceira etapa, os ovos F2 foram eclodidos como no passo anterior. No entanto, todos os indivíduos, machos e fêmeas, foram colocados na mesma gaiola, de acordo com seu respectivo fenótipo. Com isto, obteve-se duas gaiolas (R e D), permitindo-se o cruzamento intrafamiliar dos indivíduos da geração F2 com o mesmo fenótipo. (Figura 10).

Já para os mosquitos infectados com o sorotipo DENV-4 as etapas de seleção nas gerações F0 e F1 foram feitas iguais a etapa três da seleção com DENV-2. (Figura 11).

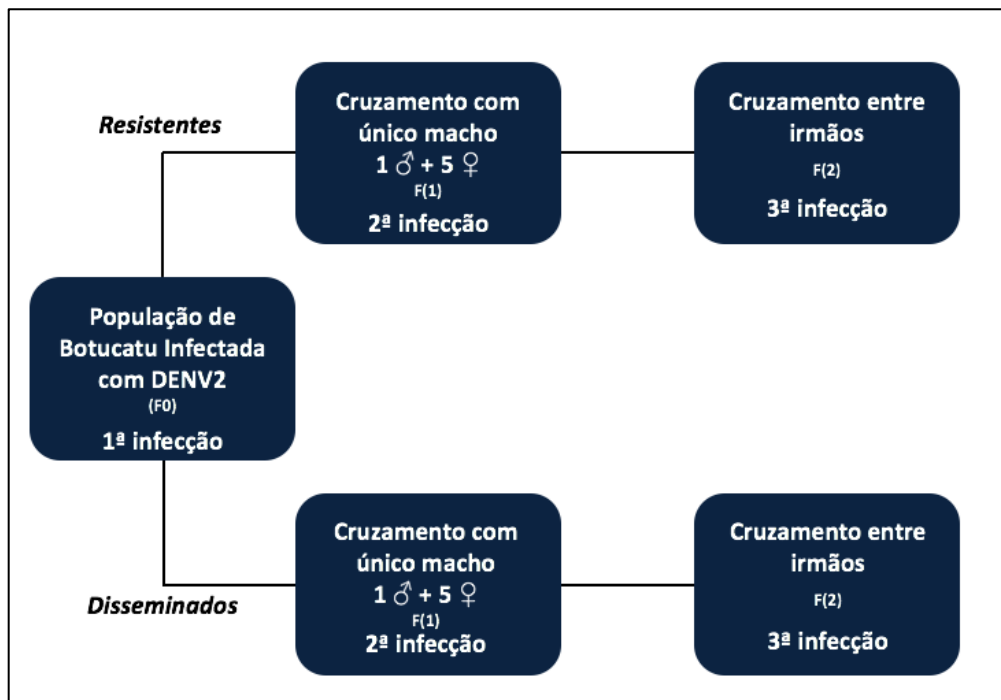


Figura 10. Esquema representando as etapas para a seleção das linhagens com DENV2. Inicialmente se infectou um grande número de mosquitos de Botucatu que posteriormente a quantificação viral tiveram os ovos separados em dois grupos, disseminados (D) e resistentes (R). Na segunda infecção os mosquitos dos diferentes fenótipos foram agrupados em gaiolas com 1 macho e 5 fêmeas. Na terceira infecção a progênie de mosquitos com o mesmo fenótipo cruzaram entre si.

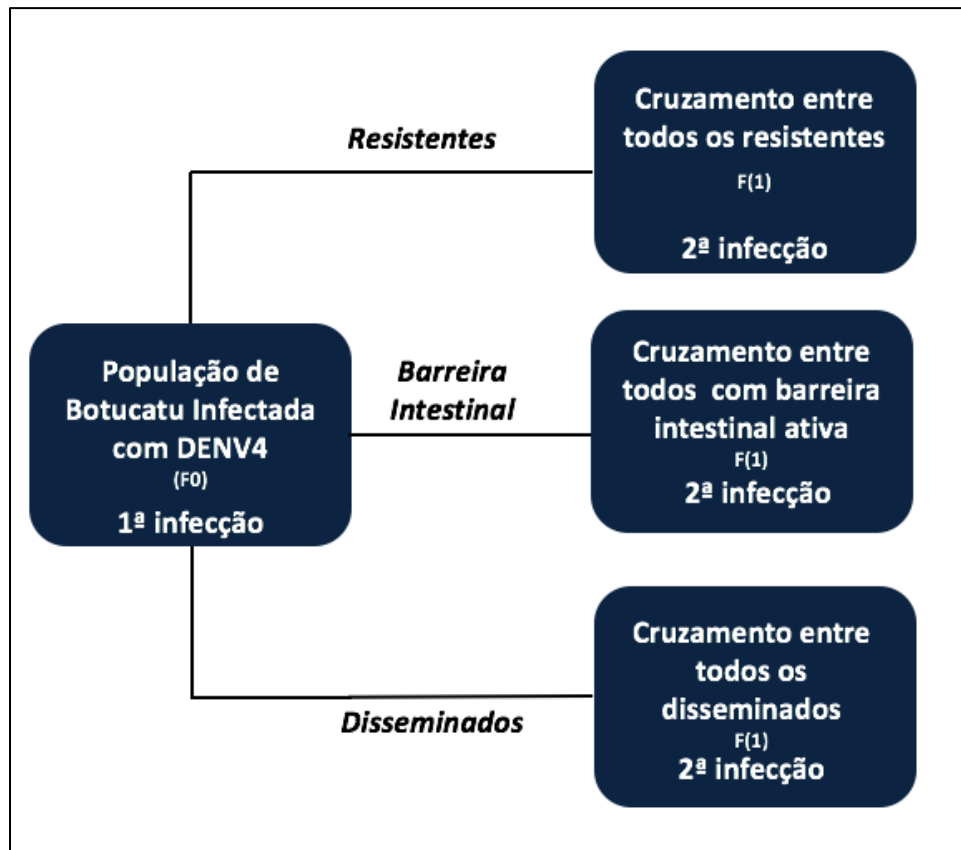


Figura 11. Esquema representando as etapas para a seleção das linhagens com DENV-4. Inicialmente se infectou um grande número de mosquitos de Botucatu que posteriormente à quantificação viral tiveram os ovos separados em três grupos, disseminados (D), resistentes (R) e barreira intestinal (MEB). Na segunda infecção os ovos dos mosquitos de diferentes fenótipos foram eclodidos todos nos seus respectivos grupos, sem serem separados por quantidade de sexos diferentes.

3.8 Análises de genotipagem

A análise de genotipagem com marcadores do tipo SNP foi realizada pela metodologia de SNP chip desenvolvido por Evans et al. (2015), através da qual é possível identificar até 50.000 SNPs em *Aedes aegypti*. Na análise de SNP chip os gDNAs das amostras, extraídos como descrito no item 3.5, foram concentrados utilizando as colunas Amicon Ultra 0.5mL -30K. As amostras eluídas no volume final de 200 µl com 1/10X TE, foram colocadas nas colunas e centrifugadas a 14.000 x g por 10 minutos a 4°C. Após a primeira centrifugação foram descartados os tubos contendo o líquido e as colunas foram colocadas em outros tubos e centrifugadas novamente a 1.000 x g por 2 minutos a 4°C. Após a última centrifugação as amostras contendo o DNA foram quantificadas no equipamento Qubit Fluorometric Quantitation (Thermo Fisher Scientific) com o

reagente High Sensitivity DNA (Thermo Fisher Scientific). Posteriormente as amostras foram normalizadas com água ultrapura para a obtenção de 22 µl a 12ng/µl cada uma. As amostras foram colocadas em placa de 96 poços, sendo 95 amostras e 1 controle negativo requerido pela universidade, e enviadas para *University of North Carolina* juntamente com o SNP chip Axiom_aegypti1 composto por várias sondas de SNPs extraídos do DNA genômico de mosquitos da espécie *Aedes aegypti* de diferentes populações.

Após a realização do experimento os dados foram enviados para o laboratório onde foram analisados no software Axion Analysis Suite (Affymetrix) os quais passaram pela primeira etapa de filtragem como controle de qualidade das amostras.

3.9 Estudo da Associação Global do Genoma

De acordo com Pearson et al. (2008) o estudo de GWAS pode ser realizada em quatro passos: 1) um número elevado de indivíduos para a coleta de informação fenotípica de interesse, número esse que garanta a consistência da informação; 2) garantir uma boa qualidade desde a extração de DNA, genotipagem e a verificação da qualidade das amostras e dos SNPs genotipados; 3) os testes de associação entre os SNPs garantidos pelos testes estatísticos e os indivíduos com a característica fenotípica de interesse; 4) e a replicação para identificar a associação em uma população independente.

Além dos quatro passos citados acima, a análise do estudo se divide em duas etapas, sendo a primeira o controle de qualidade das amostras e da genotipagem realizada, e o segundo o estudo de associação aliados às análises estatísticas.

3.9.1 Controle de qualidade

O controle de qualidade é realizado anteriormente ao estudo de associação para que não haja erros de associações falso positivas (TURNER et al., 2011). Primeiramente são feitas algumas etapas denominadas de filtragens, tanto das amostras quanto dos SNPs, a fim de garantir os resultados do estudo posteriormente.

Dentre os critérios utilizados no controle de qualidade das amostras pode-se verificar a eficiência de genotipagem (call rate), a heterozigosidade média, se há amostras idênticas que estão em duplicidade, a estratificação da população e a subestrutura da população. A checagem de discordâncias quanto ao sexo também é realizada para as amostras. Com relação aos SNPs, o

controle de qualidade leva em consideração a eficiência de genotipagem, os desvios com relação ao equilíbrio de Hardy-Weinberg, frequência do menor alelo e SNPs idênticos. A remoção de amostras e SNPs problemáticos também reduz o número de testes a serem realizados na análise de associação, reduzindo os esforços computacionais (TURNER et al., 2011).

Ainda não existem valores padronizados para os parâmetros a serem utilizados em mosquitos. Sendo assim, dependendo de cada experimento os limiares são flexíveis (FREIMER; SABATTI, 2005), mas sempre com o objetivo final de reduzir o número de falsos positivos.

3.9.1.1 Controle de qualidade das amostras

- Eficiência da genotipagem das amostras (*Call rate*)

Muitos dos problemas das análises feitas com SNPs são devidos a falhas nas amostras de DNA as quais podendo indicar uma baixa qualidade, conseqüentemente interferindo na genotipagem. Recomenda-se um limiar para a eficiência da genotipagem das amostras entre 98-99%, sendo que essa sugestão possa variar de estudo para estudo, dependendo da plataforma de genotipagem utilizada, a qualidade do DNA, até a variabilidade de erros de genotipagem cometidos pelos equipamentos e das pessoas que realizaram o processo (TURNER et al, 2011). Visto que não há padrões das taxas de eficiência, Zeng et al. (2015) geralmente sugere-se uma taxa de 95 -99% de eficiência.

- Consistência das amostras e discordância do sexo

Muitas vezes os erros da genotipagem podem ocorrer devido à manipulação das amostras, podendo ocorrer a duplicidade das amostras ou erros quanto ao sexo. É importante estar atento quanto à duplicidade das amostras, observando-se as amostras relatadas com os resultados, ou através de análises que comparem os números de alelos repetidos em cada locus por indivíduo (TURNER et al, 2011). Já para distinguir os erros das amostras segundo o sexo, observa-se os cromossomos sexuais, comparando-os com os dados do que foi relatado com os resultados estudados (ZENG et al, 2015).

- Subestruturação da população

Segundo Turner et al. (2011), a estratificação da população estudada ocorrerá quando as amostras compreenderem grupos de indivíduos que irão diferir sistematicamente em seus ancestrais genéticos e os fenótipos a serem estudados. É considerada uma análise crítica a verificação da estratificação da população pois essa informação poderá ser utilizada posteriormente para as outras análises de GWAS a serem realizadas.

Análise de Componente Principal se baseia em análises multivariadas e são utilizadas para identificar as estruturas genéticas em grandes conjuntos de dados. PCA resume a variabilidade global entre indivíduos, que inclui tanto a divergência entre os grupos (variabilidade genética estruturada), quanto a variação que ocorre no interior de grupos (variabilidade genética "aleatória") (HOTELLING, 1933).

3.9.1.2 Controle de qualidade dos SNPs

-Eficiência da genotipagem dos SNPs (*Call rate*)

Da mesma forma que na eficiência da genotipagem das amostras, a eficiência de genotipagem dos marcadores possui limiares não fixos. Turner et al (2011) também recomenda a remoção de SNPs com eficiência menor a 98-99%, mas essa taxa pode variar de acordo com cada tipo de estudo.

- Frequência do Alelo Menor (Minor Allele Frequency – MAF)

Outra filtragem importante é a baseada na frequência do menor alelo, pois as análises estatísticas realizadas no controle de qualidade são baixas em relação a SNPs raros. Recomenda-se remover todos os SNPs raros, incluindo os monomórficos (TURNER et al, 2011), pois eles também podem representar erros de genotipagem podendo causar uma falsa associação (LAIRD et al, 2011).

O limiar utilizado para essa frequência também varia dependendo do tipo de estudo, porém o que se tem visto na literatura é uma variação de menor que 1% até 2%. Esse valor também pode variar conforme o tamanho da amostra estudada (ANDERSON et al., 2010; ZENG et al., 2015; TURNER et al, 2011).

- Equilíbrio de Hardy-Weinberg (Hardy-Weinberg Equilibrium - HWE)

Segundo a teoria do equilíbrio de Hardy-Weinberg, teoria essa básica para a genética de populações, é esperado em uma população grande sob acasalamento ao acaso, as frequências alélicas e genotípicas mantenham-se estabilizadas ao longo das gerações. Pelas suposições do Equilíbrio de Hardy-Weinberg espera-se que as frequências genotípicas de uma geração para outra seja: $p^2 + 2pq + q^2$, sendo p a frequência dos alelos dominantes e q dos recessivos (DENG et al., 2000).

Para os estudos de GWAS, a maioria deles excluem marcadores que não se encontram dentro desse equilíbrio, pois eles podem indicar erros tanto de genotipagem quanto de parâmetros (ANDERSON et al, 2010). Segundo a literatura, o limiar significativo para que o SNP seja considerado em equilíbrio de Hardy-Weinberg os valores de P variam de 0,001 a $5,7 \times 10^{-7}$ (WTCCC, 2007).

Com isso, os resultados advindos da análise de genotipagem pré-filtrados pelo software Axion Analysis Suite (Affymetrix) foram analisados na primeira parte do estudo de associação, que é o controle de qualidade tanto das amostras quanto dos SNPs, no software PLINK versão 1.9 (PURCELL et al, 2007), com o auxílio do software Rstudio versão 1.0.153 e o pacote qqman. Para o controle de qualidade foram analisados: a) eficiência da genotipagem (call rate) de 98% tanto para as amostras, quanto para os SNPs, b) frequência do menor alélico (MAF) <1%, c) equilíbrio de Hardy-Weinberg <0,00001 d) estruturação da população.

3.9.2 Análises de Associação

Após realizadas todas as etapas de filtragem, para que haja um menor número de SNPs que sejam falsos-positivos, são feitas as análises para uma possível associação entre os marcadores e o fenótipo desejado.

No caso do presente estudo, foram analisados cinco tipos de possíveis associações entre os mosquitos da espécie *Aedes aegypti* da cidade de Botucatu infectados com DENV-2 conforme a sua infecção e resistência ao vírus. Os fenótipos encontrados e analisados foram: infectado (I) que são os mosquitos com vírus em qualquer parte dissecada, disseminado (D) que são os mosquitos com partículas virais no abdômen e cabeça, *midgut escape barrier* (MEB) mosquitos com partículas virais apenas no abdômen, resistente (R) mosquitos em partículas virais em nenhuma parte dissecada, disseminado com alta taxa viral (D_{high}) e disseminado *low* (D_{low}).

Essas duas últimas classificações foram realizadas dividindo os mosquitos em dois grupos. Para tal, todos os mosquitos do fenótipo D foram agrupados em quartis segundo os seus valores de Ct. O quartil contendo os indivíduos com os menores valores de Ct, tanto no abdômen quanto na cabeça, foram chamados D_{high} . Os mosquitos dentro do quartil com os maiores valores de Ct foram nomeados D_{low} .

O método mais simples de analisar GWAS é a associação com um único marcador (SMA; Single Marker Association), ou seja, testa-se um marcador de cada vez. Essa metodologia utiliza testes de hipótese para detectar associação entre locos e caráter fenotípico em nível populacional com significância estatística (RESENDE et al., 2012). A análise de marcador único auxilia na determinação do número e da natureza do gene/QTL que controla a característica de interesse. Para detectar a associação entre marcadores moleculares e características de interesse, uma variedade de análises estatísticas pode ser utilizada, incluindo o teste t, a ANOVA, a regressão, estimativas de máxima verossimilhança e log likelihood ratios (RESENDE et al., 2012).

Foi realizado o ajuste do modelo e verificada a existência de subestrutura da população utilizando o modelo de gráfico Quantil-Quantil (Q-Q plot) (SETTLES et al., 2009; ZANELLA et al., 2011). O gráfico irá representar os valores de p esperados contra os valores de p observados das amostras estudadas. O desvio da linha observada (λ) no final do gráfico é representação dos SNPs associados com fenótipo a ser testado.

A interpretação do resultado do estudo de associação entre os SNPs e fenótipo será realizada dependendo do valor de p. Weetman et al (2010), o qual observou SNPs em regiões de resistência a inseticida em diferentes populações de *Anopheles gambiae*, utilizou como limiar $p < 0,05$, associado à correção estatística de Bonferroni para reduzir o número de falsos-positivos. Essa correção estatística tem como objetivo estabelecer um limiar de seleção de SNPs e minimizar os problemas de associações falso-positivas resultantes dos testes múltiplos.

Com isso, para as análises de associação também foram utilizados os dois softwares PLINK versão 1.9 (PURCELL et al, 2007) e o Rstudio versão 1.0.153 e o mesmo pacote do Rstudio. As análises realizadas foram: a) associação e Manhattna plot, b) gráfico de Quantil-quantil-qplot para visualizar a estruturação da população e possível associação entre as amostras estudadas. Além dos gráficos gerados, para o teste de significância da associação entre os SNPs e as características avaliadas foi utilizado o limiar baseado no critério de Bonferroni, também considerado bastante conservador, que consiste no valor de p desejado dividido pelo número de testes.

Para essas análises foram utilizados os mosquitos com diferentes fenótipos (Tabela 4).

Tabela 4. Descrição dos fenótipos e siglas utilizadas nas análises para o estudo de associação.

Fenótipos	Descrição	Siglas
Infectado	Mosquitos com partículas virais encontradas em qualquer parte dissecada do mosquito, tanto no abdômen quanto na cabeça	I
Disseminado	Mosquitos com partículas virais encontradas no abdômen e na cabeça	D
Disseminado com alta taxa viral	Mosquitos com maiores taxas de partículas virais encontradas na cabeça e abdômen	D _{high}
Disseminado com baixa taxa viral	Mosquitos com menos taxas de partículas virais encontradas na cabeça e abdômen	D _{low}
Barreira de Escape do Intestino Médio	Mosquitos com partículas virais apenas no abdômen	MEB
Resistente	Mosquitos sem partículas virais nas partes dissecadas	R

4. Resultados

4.1 Padronizações do isolamento viral e quantificação de DENV-4

Observou-se melhor eficiência do isolamento viral em células C6/36. (Tabela 5).

Tabela 5. Valores de Ct de três amostras diferentes para a quantificação do RNA viral de DENV-4 utilizando o kit GoTaq[®] 1-Step RT-qPCR (Promega).

Nome da Amostra	Primer	Valor do Ct (Média)
Extração do sobrenadante C6/36	DENV-4	11.61135292
Sobrenadante C6/36	DENV-4	25.4174614
Sobrenadante Vero	DENV-4	29.68519783

Após o teste do kit GoTaq[®] 1-Step RT-qPCR (Promega), prosseguiu-se com a padronização da quantificação viral em sobrenadantes de células Vero e C6/36. Esta etapa teve como objetivo definir a melhor linhagem e tempo para o isolamento viral após a infecção das células com DENV-4.

Primeiramente testamos a linhagem celular Vero, isolando-se o vírus nos dias 3, 4, 5, 6, e 7 após a inoculação das células. A cada dia uma amostra era retirada da garrafa de cultura contendo as células infectadas e armazenada diretamente -80°C. Todas as reações de quantificação por PCR em tempo real foram realizadas com o kit GoTaq[®] 1-Step RT-qPCR (Promega), como padronizado acima. Como controle positivo foi utilizado uma alíquota do RNA viral extraído do sobrenadante de C6/36 previamente testado (vide tabela 6).

Tabela 6. Dias após a infecção com DENV-4 em células da linhagem Vero e seus respectivos valores das médias dos Ct.

Nome da Amostra	Primer	Média do Ct
RNA extraído	DENV-4	11.61135292
Vírus isolado C6/36-2015	DENV-4	25.4174614
Dia3-Vero	DENV-4	29.68519783
Dia4-Vero	DENV-4	28.0423336
Dia5-Vero	DENV-4	24.12806129
Dia6-Vero	DENV-4	25.91461563
Dia7-Vero	DENV-4	26.12946701

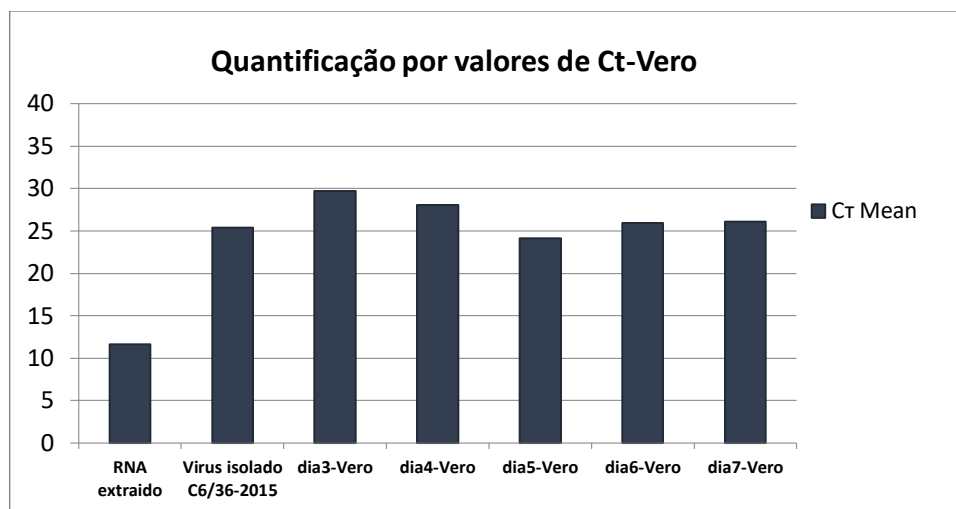


Figura 12. Gráfico da Tab. 6 representando os dias após infecção com DENV-4 e seus respectivos valores das médias dos Cts. Observa-se que o melhor dia para o isolamento viral é o dia com o menor valor de Ct, conseqüentemente 5o dia.

Pelos valores das médias dos Cts obtidos, observou-se que o melhor dia para o isolamento viral que o 5º dia após a infecção (Tabela 6 e Figura 12).

Posteriormente, os mesmos testes foram realizados com a linhagem celular C6/36. Os dias analisados após a infecção foram maiores nesse caso. Foram feitas reações para a quantificação absoluta do vírus desde o 1º até o 8º dia após infecção. Como controle positivo foi utilizado uma alíquota do RNA viral extraído do sobrenadante de C6/36 previamente testado (vide tabela 5). Observou-se que o melhor dia para o isolamento viral também é o 5º dia após infecção (Tabela 7 e Figura 13).

Tabela 7. Dias após a infecção com DENV-4 em células da linhagem C6/36 e seus respectivos valores médios de Ct.

Nome da Amostra	Primer	Média do Ct
Vírus isolado C6/36-2015	DENV-4	25.4174614
Dia 1	DENV-4	24.81538773
Dia 2	DENV-4	23.20414352
Dia 3	DENV-4	18.46839142
Dia 4	DENV-4	14.91870594
Dia 5	DENV-4	14.00390625
Dia 6	DENV-4	16.17730141
Dia 7	DENV-4	15.75614357
Dia 8	DENV-4	17.69515228

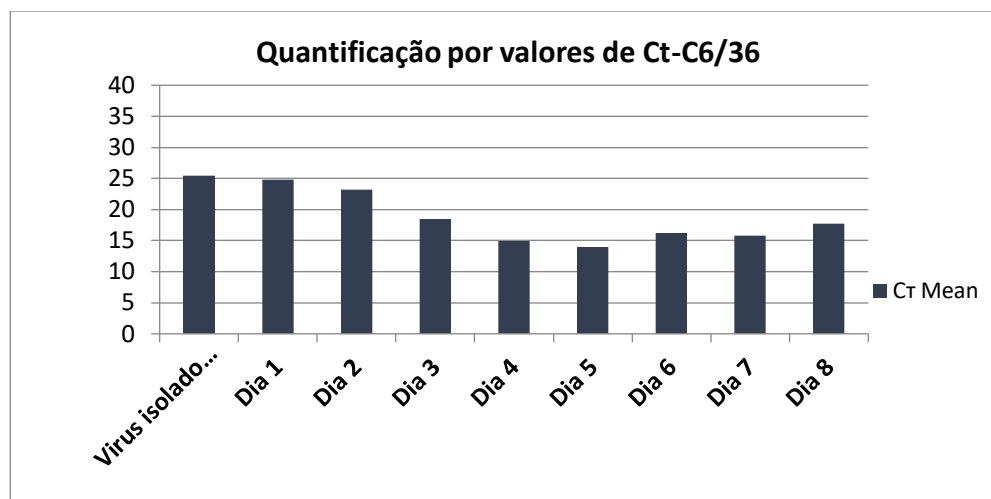


Figura 13. Gráfico da Tab. 7 representando os dias após infecção com DENV-4 e seus respectivos valores das médias dos Cts. Observa-se que o melhor dia para o isolamento viral é o dia com o menor valor de Ct, conseqüentemente 5º dia.

Com isso, adotou-se como padrão em nosso laboratório o isolamento viral no 5º dia após a inoculação de DENV-4 em C6/36.

4. 2 Quantificação Absoluta de DENV-4

A quantificação de DENV-4 nos mosquitos infectados em nosso laboratório, foi realizada através da conversão dos valores de Ct em concentração viral (PFU/ml), com o auxílio de uma curva padrão.

A partir de uma alíquota previamente titulada (5×10^6 PFU/ml), foram preparadas três réplicas de diluição seriada (10^{-1} até 10^{-4}), prosseguindo-se com a extração do RNA e síntese de cDNA para cada diluição. Finalmente, as amostras foram quantificadas RT-qPCR e os valores de Ct utilizados para a confecção de uma curva padrão de acordo com os respectivos valores de PFU de cada amostra (Tabela 8 e Figura 14).

Tabela 8. Associações dos números correspondentes aos valores de concentração em PFU/ml e valores de Ct,

Nº correspondente no gráfico	Concentração em PFU/ml	Valores de Ct
1	5.10^6	12.55499935
2	5.10^5	24.6423022
3	5.10^4	29.27295939
4	5.10^3	33.56831169
	5.10^2	Indeterminado

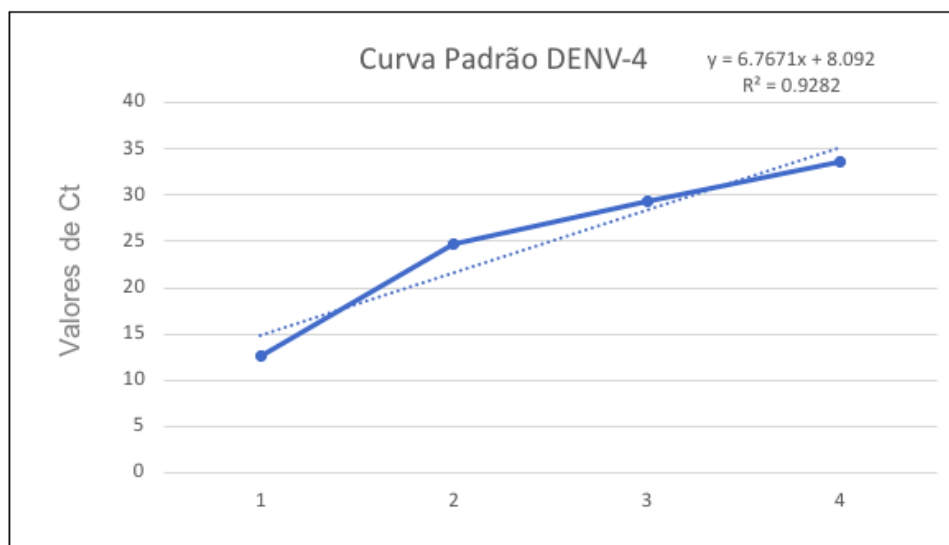


Figura 14. Gráfico de curva padrão. O gráfico representa os valores de Ct correspondentes às concentrações em PFU/ml das amostras de DENV-4 e mais valores de R^2 e equação da curva padrão.

4.3 Competência Vetorial ao DENV-4 e Seleção dos fenótipos Disseminado (D), Resistente (R) e MEB (*Midgut Escape Barrier*)

Ao iniciarmos os experimentos para o estudo da competência vetorial nos mosquitos *Aedes aegypti* da cidade de Botucatu, realizamos a primeira infecção com DENV4. Foram realizadas duas réplicas biológicas e em cada réplica foram utilizados 150 mosquitos fêmeas, as quais foram expostas ao sangue infectado. Na primeira réplica (réplica 1) obtivemos 70 mosquitos ingurgitados e 39 sobreviveram até o 15º dia. Já para a segunda réplica (réplica 2), obtivemos 60 mosquitos ingurgitados e 30 sobreviveram até o 15º dia. No 15º dia foram feitas as disseções e posteriormente extrações de RNA como descrito no item 3.5 para posterior quantificação viral. O gráfico da figura 15 representa prevalência de infecção nas partes dissecadas (cabeça e abdômen)

nas duas repetições realizadas. A tabela 9 apresenta o número de indivíduos em cada réplica e os diferentes fenótipos obtidos.

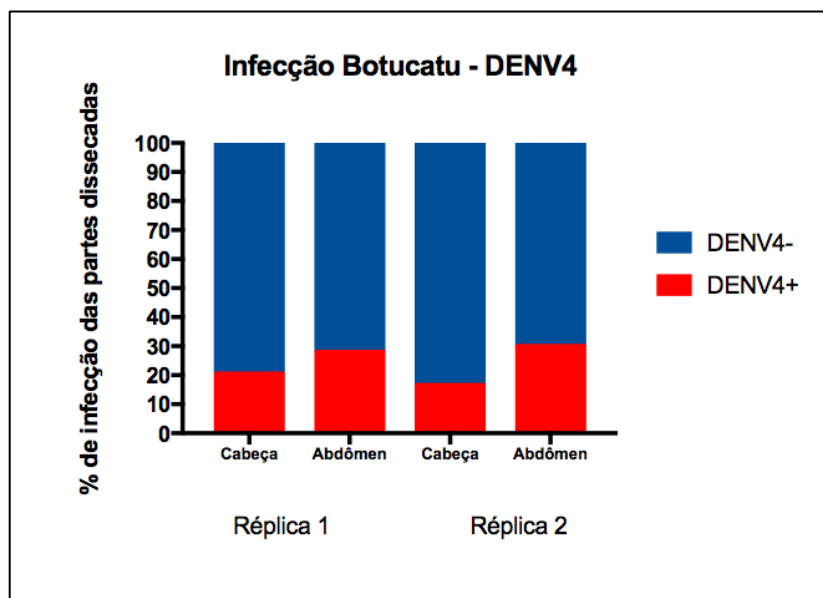


Figura 15. Gráfico com as porcentagens de infecção dos mosquitos de Botucatu infectados com DENV-4. Estão representadas no gráfico as duas réplicas biológicas, e as duas partes dissecadas, cabeça e abdômen dos mosquitos. As barras em azul representam a porcentagem de mosquitos que não se infectaram e as barras em vermelho a porcentagem dos mosquitos que se infectaram.

Tabela 9. Número de indivíduos distribuído em cada réplica biológica, para cada fenótipo estudado (disseminado, resistente e MEB) e suas porcentagens.

Réplica	Fenótipo	Número de Indivíduos	Porcentagem
Réplica 1	Disseminado	8	23%
	Resistente	23	67%
	MEB (<i>Midgut Escape Barrier</i>)	3	8%
	Total	34	
Réplica 2	Disseminado	5	18%
	Resistente	17	62%
	MEB (<i>Midgut Escape Barrier</i>)	5	18%
	Total	27	

Como resultado, observamos que entre 18% a 21% dos mosquitos foram classificados como disseminados (o qual foi encontrado vírus tanto no abdômen quanto na cabeça) e de 62% a 72% foram classificados como resistentes nas duas réplicas biológicas realizadas. Apenas 3 e 5 mosquitos foram classificados como MEB em cada repetição, respectivamente. As diferenças entre a carga viral de cabeças e abdomens foram estatisticamente significativas em todas as comparações realizadas (Figura 16).

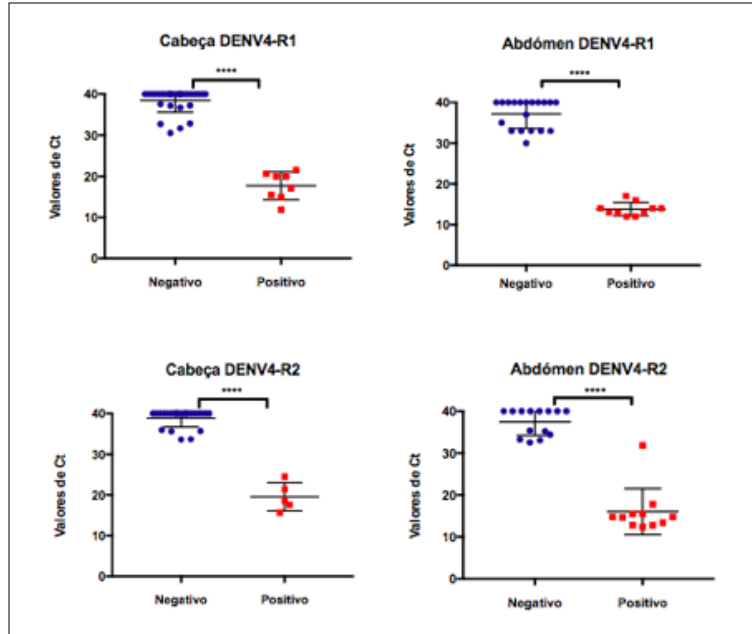


Figura 16. Gráficos com valores de Ct para cada parte dissecada tanto da réplica 1 (R1) e réplica 2 (R2) com resultado da análise estatística de Mann-Whitney. Os quadrados em vermelho representam partes dos mosquitos dissecados com valores de Ct correspondentes, os quais consideramos positivos para a presença do RNA viral. Já os pontos em azuis também representam partes dos mosquitos dissecados com valores de Ct correspondentes, os quais consideramos negativos para a presença do RNA viral.

Para a segunda rodada de infecção, os ovos de cada mosquito previamente analisado foram armazenados separadamente. Após a classificação dos fenótipos, todos os ovos referentes a um mesmo fenótipo (R, D ou MEB) foram agrupados e colocados em recipientes com água para eclosão. Desta forma, três grupos de mosquitos foram formados com ovos oriundos de cada uma das réplicas biológica apresentadas na figura 17. Para cada grupo, as infecções e quantificações foram realizadas como descrito no item 3.3.

Nos dois grupos D e R obtivemos mosquitos nas duas réplicas, já no grupo MEB não foi possível formar uma colônia de mosquitos adultos na réplica 2, pois as larvas não se desenvolveram. Com isso, na figura 16 estão representadas as taxas de porcentagem de infecção dos mosquitos referente a cada fenótipo.

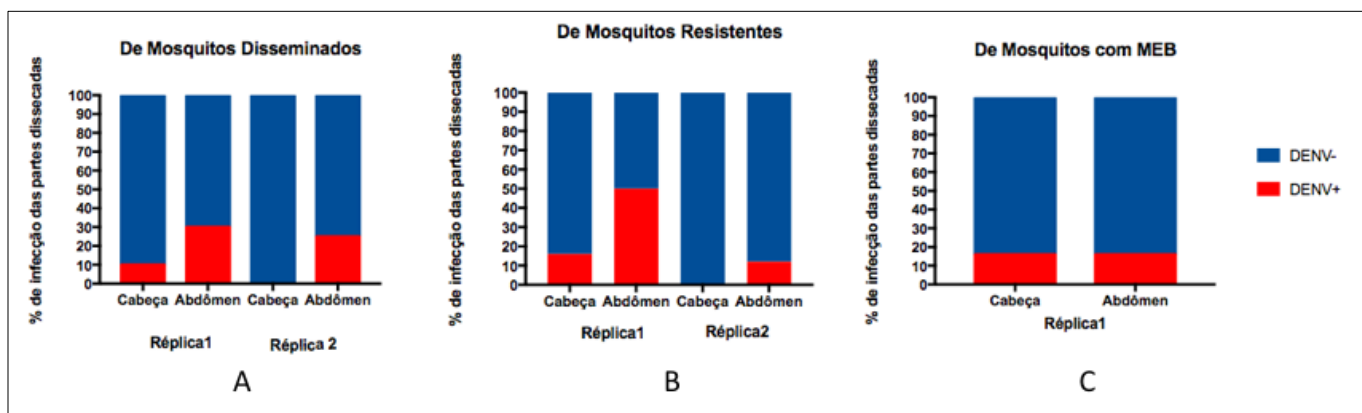


Figura 17. Estão representados os três gráficos com as taxas de infecção da progênie dos mosquitos com os mesmos fenótipos nas duas réplicas. No primeiro gráfico A são a progênie dos mosquitos com fenótipo D. No gráfico B são as taxas de infecção da progênie dos mosquitos R. E no gráfico C são as taxas da progênie dos mosquitos com o fenótipo MEB, sendo esse gráfico com representação apenas da réplica 1.

Através destas análises observa-se que na geração F1 o número de mosquitos resistentes persiste independentemente do fenótipo do grupo parental (D, R ou MEB). Além disso, o número total de mosquitos diminuiu para essa primeira geração, quando comparados com o número de indivíduos na primeira infecção (Tabela 10).

Tabela 10. Números de indivíduos para todos os três grupos de fenótipos de origem, fenótipos da progênie e a porcentagem.

Fenótipo de Origem dos Genitores	Réplica	Fenótipo da Progênie	Número de Indivíduos	Porcentagem
<u>Disseminado</u>	Réplica 1	<u>Disseminado</u>	1	<u>10%</u>
		<u>Resistente</u>	7	70%
		<u>MEB (Midgut Escape Barrier)</u>	2	20%
		Total	10	
	Réplica 2	<u>Disseminado</u>	1	<u>20%</u>
		<u>Resistente</u>	3	60%
		<u>MEB (Midgut Escape Barrier)</u>	1	20%
		Total	5	
<u>Resistente</u>	Réplica 1	<u>Disseminado</u>	1	16%
		<u>Resistente</u>	3	<u>50%</u>
		<u>MEB (Midgut Escape Barrier)</u>	2	33%
		Total	6	
	Réplica 2	<u>Disseminado</u>	0	-
		<u>Resistente</u>	7	<u>87%</u>
		<u>MEB (Midgut Escape Barrier)</u>	1	12%
		Total	8	
<u>MEB (Midgut Escape Barrier)</u>	Réplica 1	<u>Disseminado</u>	1	16%
		<u>Resistente</u>	5	83%
		<u>MEB (Midgut Escape Barrier)</u>	0	-
		Total	6	
	Réplica 2	-	-	-

Nesta análise da seleção dos fenótipos não se observou um padrão de seleção acentuado, havendo predominância do fenótipo R em todos os grupos. O fenótipo com menor número de mosquitos foi D, com exceção da réplica 1 dos descendentes do grupo MEB, no qual não se observou mosquitos com o fenótipo MEB (Tabela 10).

4.4 Competência Vetorial ao DENV-2 e Seleção dos fenótipos Disseminado (D), Resistente (R)

Análises similares às anteriores, utilizando-se DENV-2, foram realizadas com a população *Ae. aegypti* Botucatu, no laboratório do professor Jeffrey Powell, Yale University, New Haven, EUA, no âmbito da bolsa de Doutorado Sanduíche/CAPES.

De modo surpreendente, os resultados das infecções de *Ae. aegypti* Botucatu com outro sorotipo (DENV-2) foram distintos daqueles obtidos com o DENV-4 (Figura 18). Foram separadas 150 fêmeas para cada réplica, sendo que para a réplica 1, 65 mosquitos foram alimentados, com 61 fêmeas sobrevivendo até o 15º dia. Na segunda réplica, 102 fêmeas foram alimentadas e 44 sobreviveram até o 15º dia.

Após a quantificação viral dos mosquitos sobreviventes, calculou-se a porcentagem de disseminação e resistência desses mosquitos: ao todo e foram detectados 73% e 75% de mosquitos D, 14% e 18% de mosquitos R, e 11% e menos de 1% de mosquitos MEB nas primeiras e segunda réplicas, respectivamente (Tabela 11).

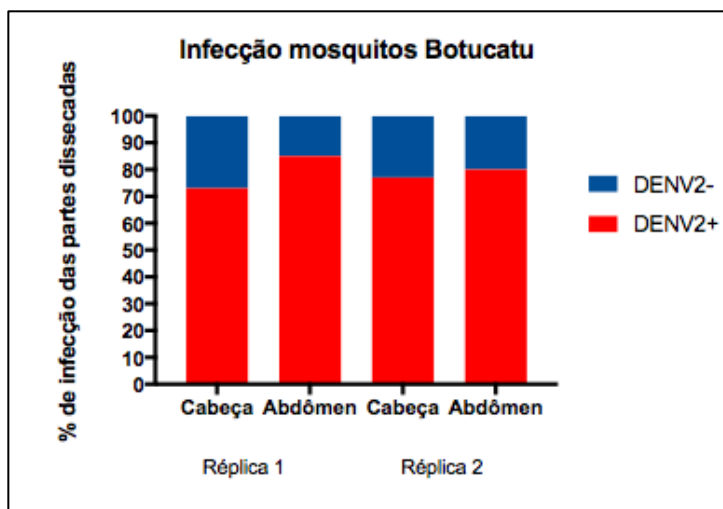


Figura 18. Gráfico com as porcentagens de infecção dos mosquitos de Botucatu infectados com DENV-2. Estão representadas no gráfico as duas réplicas biológicas, e as duas partes dissecadas, cabeça e abdômen dos mosquitos. As barras em azul representam a porcentagem de mosquitos que não se infectaram e as barras em vermelho a porcentagem dos mosquitos que se infectaram.

Tabela 11. Número de indivíduos distribuído em cada réplica biológica, para cada fenótipo estudado (disseminado, resistente e MEB) e suas porcentagens.

Réplica	Fenótipo	Número de Indivíduos	Porcentagem
Réplica 1	Disseminado	45	73%
	Resistente	9	14%
	MEB (<i>Midgut Escape Barrier</i>)	7	11%
	Total	61	
Réplica 2	Disseminado	30	75%
	Resistente	7	18%
	MEB (<i>Midgut Escape Barrier</i>)	1	2,5%
	Total	38	

Para DENV-2, uma infecção controle realizada com mosquitos da linhagem de laboratório Rockefeller. O resultado combinado de duas réplicas revela uma já esperada alta taxa de infecção, com apenas um mosquito resistente em cada réplica (Figura 19).

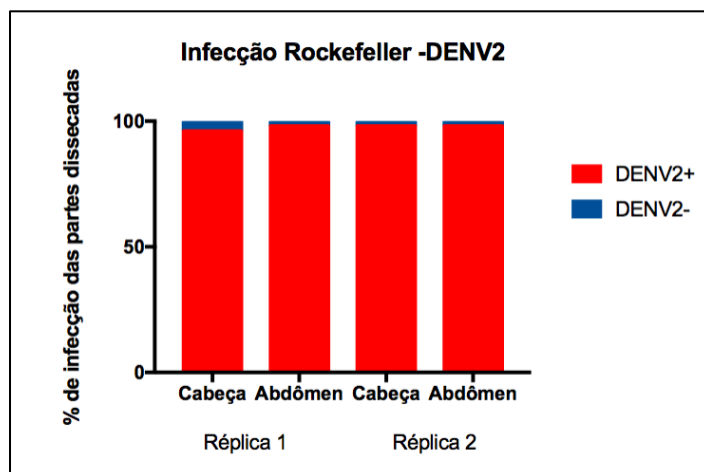


Figura 19. Gráfico com as porcentagens de infecção dos mosquitos da linhagem Rockefeller utilizados como controle e infectados com DENV-2. Estão representadas no gráfico as duas réplicas biológicas, e as duas partes dissecadas, cabeça e abdômen dos mosquitos. As barras em azul representam a porcentagem de mosquitos que não se infectaram e as barras em vermelho a porcentagem dos mosquitos que se infectaram.

Após a identificação dos fenótipos dos mosquitos infectados, iniciou-se o processo para a seleção dos grupos R e D de *Ae. aegypti* Botucatu para DENV-2. Assim como a seleção para DENV-4, ovos das fêmeas foram agrupados e eclodidos separadamente de acordo com o fenótipo e infecção/disseminação viral, como descrito no item 3.7. Neste caso especificamente, a metodologia de seleção diferiu ligeiramente daquela utilizada em nosso laboratório. Desta forma, as pupas foram separadas em placas de 64 poços e após a emergência os adultos foram acondicionados em gaiolas na proporção de 1 macho para 5 fêmeas, para ambos os fenótipos R e D. Este desenho experimental visa diminuir a variabilidade genética da progênie para maximizar as chances de sucesso da seleção de fenótipos.

No total, 50 mosquitos fêmeas de cada fenótipo foram expostas ao sangue contendo DENV-2. Os procedimentos de quantificação para a identificação dos fenótipos da progênie foram os mesmos utilizados para DENV-4. A partir dos ovos de fêmeas D para DENV-2, obteve-se no 15º dia após alimentação apenas 12 mosquitos. As taxas de infecção estão representadas no gráfico da figura 20, no qual 50% dos mosquitos apresentam o mesmo fenótipo dos pais (Figura 20 e Tabela 12). Já no grupo R obteve-se no 15º dia 9 mosquitos totais, sendo que destes apenas 30% apresentaram o mesmo fenótipo dos pais (Figura 21 e Tabela 12).

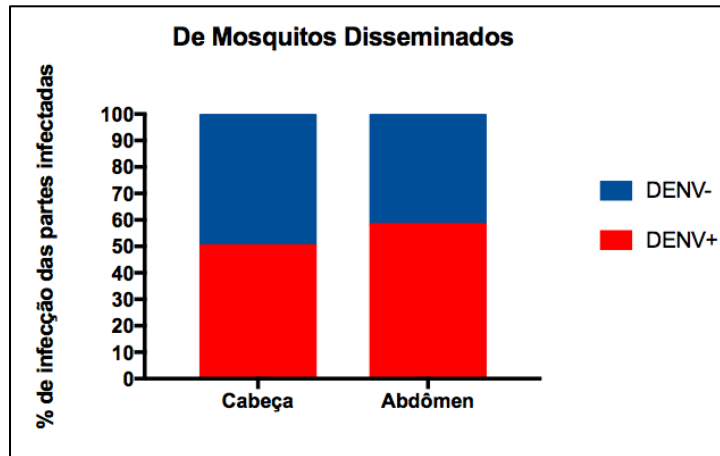


Figura 20. Gráfico representando as porcentagens das taxas de infecção das partes dissecadas com DENV-2 da geração F1 de mosquitos D. Observa-se uma taxa de 50% de infecção na cabeça e aproximadamente 60% no abdômen.

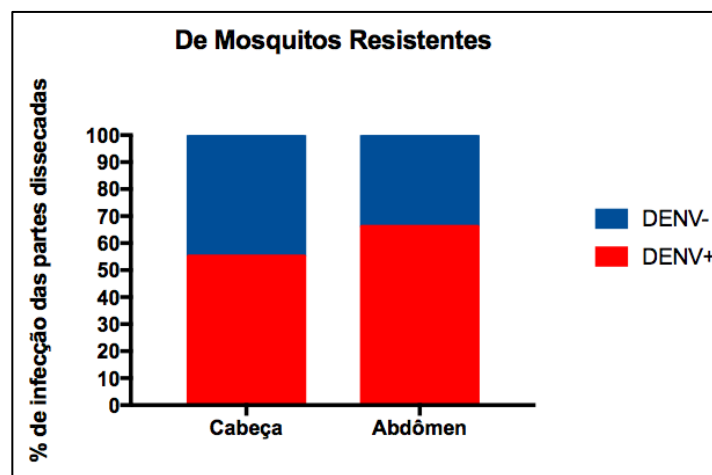


Figura 21. Gráfico representando as porcentagens das taxas de infecção das partes dissecadas com DENV-2 da geração F1 de mosquitos R. Observa-se mais de 50% de infecção na cabeça e aproximadamente 70% de infecção no abdômen.

Tabela 12. Números de indivíduos para todos os dois grupos de fenótipos de origem, fenótipos da progênie e a porcentagem.

Fenótipo de Origem dos Genitores	Réplica	Fenótipo da Progênie	Número de Indivíduos	Porcentagem
<u>Disseminado</u>	Réplica 1	<u>Disseminado</u>	6	50%
		Resistente	5	41%
		MEB (<i>Midgut Escape Barrier</i>)	1	8%
		Total	12	
<u>Resistente</u>	Réplica 1	Disseminado	5	55%
		<u>Resistente</u>	3	33%
		MEB (<i>Midgut Escape Barrier</i>)	1	11%
		Total	9	

Considerando-se que o número total de descendentes F1 obtidos no experimento anterior foi muito baixo, na terceira rodada de infecção (para obtenção de F2 D ou R) todos os indivíduos oriundos de F1 D ou F1 R foram colocados, respectivamente, em uma única gaiola (1 gaiola para F2 D e outra para F2 R), sem se seguir a combinação anterior macho: fêmea (1:5).

Da geração F2 D foram obtidos 13 mosquitos, sendo que mais de 70% deles possuíam o fenótipo parental D (Figura 22). Para a geração, F2 R, 5 mosquitos foram obtidos, com cerca de 80% possuindo o fenótipo parental (Figura 23) (Tabela 13).

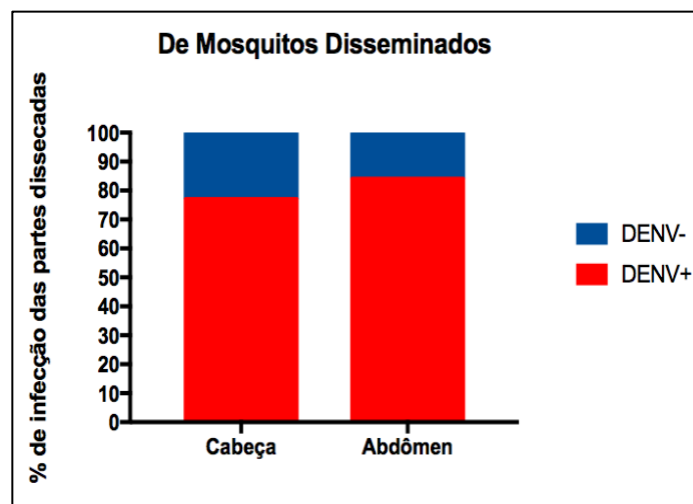


Figura 22. Gráfico representando as porcentagens das taxas de infecção com DENV-2 das partes dissecadas na geração F2 de mosquitos D. Observa-se aproximadamente 80% de infecção na cabeça e mais de 80% de infecção no abdômen.

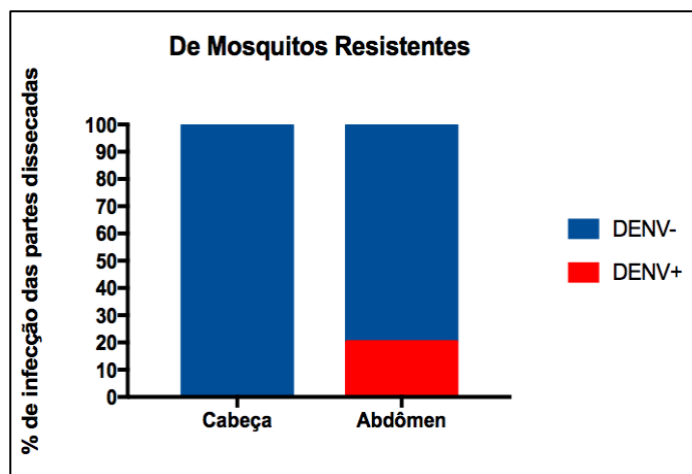


Figura 23. Gráfico representando as porcentagens das taxas de infecção com DENV-2 das partes dissecadas da geração F2 de mosquitos R. Observa-se nenhuma infecção na cabeça e aproximadamente 20% de infecção no abdômen.

Tabela 13. Números de indivíduos para todos os três grupos de fenótipos de origem, fenótipos da progênie das duas gerações F1 e F2, e as porcentagens relativas aos fenótipos.

Fenótipo de Origem dos Genitores	Fenótipo da Progênie F1	Fenótipo da Progênie F2	Número de Indivíduos	Porcentagem
<u>Disseminado</u> R1(73%) R2(75%)	<u>Disseminado</u> (50%)	<u>Disseminado</u>	10	76%
		Resistente	2	15%
		MEB (<i>Midgut Escape Barrier</i>)	1	7%
		Total	13	
<u>Resistente</u> R1(14%) R2(18%)	<u>Resistente</u> (33%)	Disseminado	0	-
		<u>Resistente</u>	4	80%
		MEB (<i>Midgut Escape Barrier</i>)	1	20%
		Total	5	

4.5 Análises do Estudo de Associação Global do Genoma (GWAS)

As possíveis associação de SNPs em *loci* genômicos aos diferentes fenótipos encontrados para DENV-2 na população *Ae. aegypti* Botucatu foi investigada através de GWAS. Para as análises, os mosquitos infectados (I) foram dividido em três grupos: infecção disseminada com baixa taxa viral (D_{low}), infecção disseminada com maior taxa viral (D_{high}), e MEB. Em todos os grupos

foram utilizados como controle os indivíduos resistentes ou com menores taxa viral. Com isso foram realizadas associações representadas a seguir na Tabela 14.

Tabela 14. Número das associações realizadas e os fenótipos dos mosquitos utilizados como caso e controle nas análises.

Associação	Fenótipo Caso	Fenótipo Controle
1 ^a	I	R
2 ^a	MEB	R
3 ^a	D ^{high}	R
4 ^a	D ^{high} + D ^{low} = D	MEB
5 ^a	D ^{high}	D ^{low}

Para cada estudo de associação feita com os diferentes fenótipos foram utilizadas as mesmas metodologias de análise com controle de qualidade dos SNPs e amostras, e posteriormente as análises de associação com estruturação da população, associação dos SNPs estatisticamente significativos.

O resultado da genotipagem pela metodologia de SNP chip foi o mesmo utilizado para todas as associações feitas. Do total de 95 mosquitos *Aedes aegypti* da população de Botucatu que foram genotipados, 93 indivíduos passaram pela filtragem do software da Axion Analysis Suite (Affymetrix). E dos 25 mil possíveis SNPs a serem genotipados, após a filtragem pelo software obtivemos 24137 SNPs.

As análises foram conduzidas no programa Plink versão 1.9 e os gráficos confeccionados no programa RStudio com o pacote qqman (TURNER, 2014). Os dados referentes ao controle de qualidade de cada associação investigada, assim como SNPs com provável significância estatística, são apresentados nas tabelas 13-22. A partir da figura 18, são apresentados os resultados referentes às diversas associações investigadas: 1) PCAs representando a estruturação da população; 2) SNPs associados aos cromossomos do mosquito (Manhattan *plot*); e 3) Gráficos de Quantil-Quantil representando a probabilidade de associação SNPs-fenótipos. E por fim, as tabelas 14, 16, 18, 20 e 22 com as informações.

1^a) Associação entre mosquitos infectados (I) e resistentes (R) para DENV-2.

No total, 87 mosquitos e 13.137 SNPs foram analisados nessa associação após a filtragem do controle de qualidade (Tabela 15). Observou-se no resultado da análise de componente principal que não houve uma subestruturação entre mosquitos infectados e resistentes (Figura 24). Já nos resultados das análises de associação entre os SNPs, estão representados os SNPs e seus respectivos valores de significância da frequência alélica, sendo nomeados aqueles com os menores P-valor ($2.024e-04$ a $7.247e-05$) (Figura 25). Observa-se que nenhum dos SNPs identificados apresenta significância acima do limiar da correção de Bonferroni (linha vermelha), a qual elimina potenciais SNPs falsos-positivos. No entanto, nota-se com a análise de Quantil-Quantil que alguns pontos se distanciam da linha diagonal para a parte superior do gráfico, a qual corresponde aos SNPs observados, sugerindo que há uma possível associação desses variantes alélicos aos fenótipos investigados (Figura 26).

Tabela 15. Parâmetros para o controle de qualidade das amostras e dos SNPs. Números iniciais dos e finais após o controle de qualidade.

Controle de Qualidade	Número de SNPs	Número de Indivíduos
Total (Início)	24137	93
Eficiência da Genotipagem –Amostra (>95%)	24137	6
Eficiência de Genotipagem –SNP (>98%)	4091	-
Frequência do Menor Alelo (<1%)	6889	-
Equilíbrio de Hardy-Weinberg (0,001)	0	-
Total de (após Controle de Qualidade)	13157	87

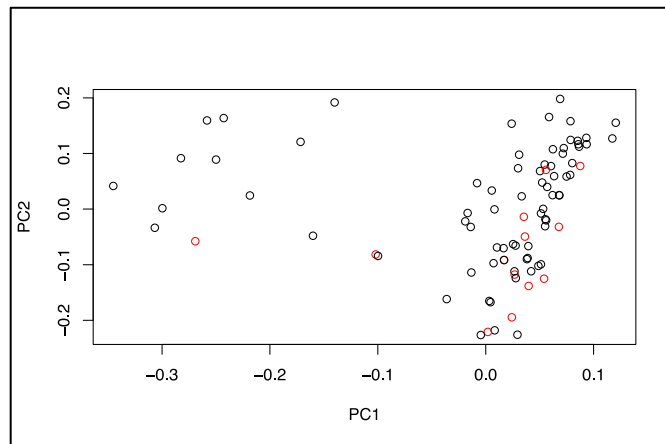


Figura 24. Representação gráfica da Análise do Componente Principal (PCA). Os indivíduos com fenótipo infectado estão representados como círculos em preto e os indivíduos com fenótipo R (controle) como círculos em vermelho.

É importante ressaltar que os parâmetros de filtragem e análises estatísticas utilizadas em nossas análises nunca foram anteriormente testadas para análises intrapopulacionais. Tais parâmetros são altamente restritivos e padronizados para análises interpopulacionais, as quais naturalmente geram um maior número de variantes alélicas e, conseqüentemente, de falsos-positivos. Desta forma, é possível que alguns dos SNPs ligeiramente abaixo do limiar de Bonferroni identificados no *qq-plot* possam estar de fato associados aos fenótipos aqui estudados.

Neste sentido, investigamos os loci e respectiva função putativa para os SNPs com P valor próximo ao limiar da correção de Bonferroni ($0,0001 > p > 0,000001$) (Tabela 16). O SNP AX-93217741 está localizado no cromossomo 2 em uma região entre os genes AAEL001010 e AAEL018150. O primeiro codifica a proteína *Defective proboscis extension response*, que pertence à superfamília das imunoglobulinas (NAKAMURA et al, 2002). Já o segundo possui um ortólogo associado à supressão tumoral em humanos (PARK et al, 2007). O segundo SNP, AX-93224565 se encontra em um íntron do gene AAEL002879, o qual codifica a proteína *Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein r*, componente de um complexo de proteínas relacionadas ao processamento de RNA mensageiro (MAYRAND; PETERSON, 1983). Finalmente, o SNP AX-93226799 localiza-se em um íntron do gene AAEL003550, que codifica uma provável aquaporina.

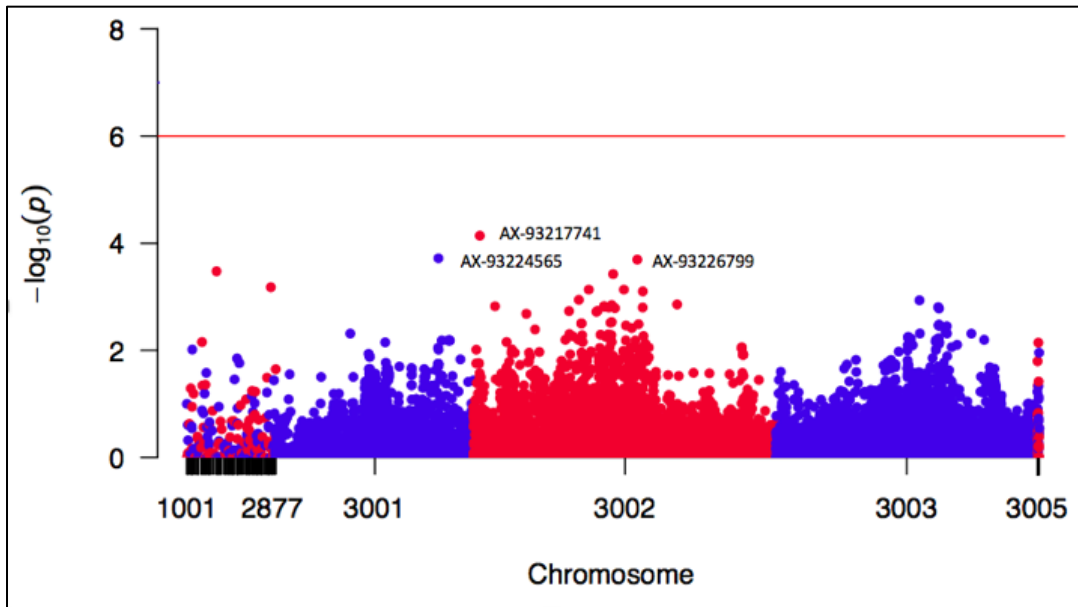


Figura 25. Gráfico *Manhattan plot*, no qual estão representados os resultados das associações dos SNPs devido aos seus valores de P , e suas localizações nos cromossomos do mosquito *Aedes aegypti*. Cada ponto representa um determinado SNP associado ao fenótipo infectado. Os SNPs anotados são os com menor valor de P . E está representada a linha vermelha o limiar da correção de Bonferroni.

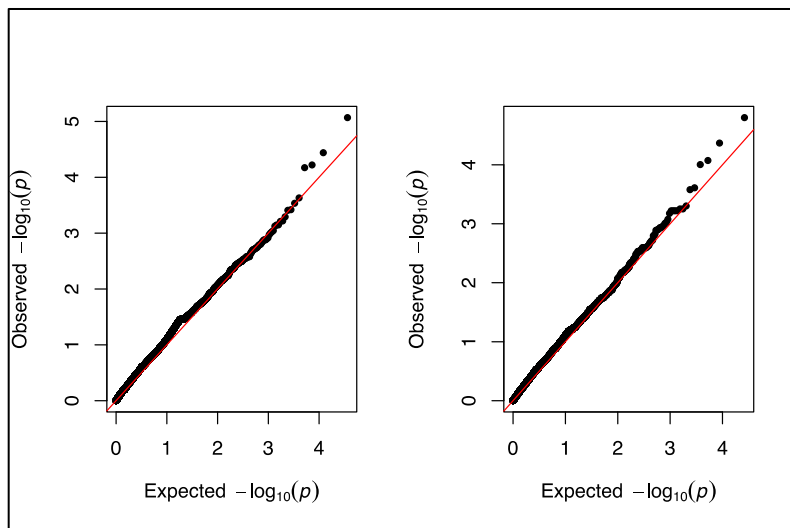


Figura 26. Representação gráfica da análise Quantil-Quantil. No gráfico a esquerda, estão representados pelos pontos em preto todos os SNPs da associação dos fenótipos infectado antes de passarem pelo controle de qualidade. E no gráfico a direita todos os SNPs após o controle de qualidade.

Tabela 16. Grupo de genes com o menor *P*-valor e suas características.

Marcador	Cromossomo	Posição Genética	P valor	Gene adjacente	Função Predita
AX-93217741	3002	9436478	7.247e-05	Região intergenica	Sem descrição
AX-93224565	3001	255328521	1.911e-04	AAEL002879 (Intron)	<i>Heterogeneous nuclear</i>
AX-93226799	3002	256413214	2.024e-04	AAEL003550 (Intron)	<i>Aquaporina-gene ortólogo</i>

2^a) Associação entre mosquitos infectados com o fenótipo MEB *versus* R para DENV2

Um estudo de associação entre mosquitos com o fenótipo MEB e R também foi realizado. Após a filtragem do controle de qualidade, foram analisados 19 indivíduos e 11512 SNPs (Tabela 17), sem aparente agrupamento quanto aos fenótipos MEB ou R após serem submetidos à PCA (Figura 27).

Tabela 17. Parâmetros para o controle de qualidade das amostras e dos SNPs. Números iniciais dos e finais após o controle de qualidade.

Controle de Qualidade	Número de SNPs	Número de Indivíduos
Total (Início)	24137	23
Eficiência da Genotipagem –Amostra (>95%)	24137	4
Eficiência de Genotipagem –SNP (>98%)	4577	-
Frequência do Menor Alelo (<1%)	8048	-
Equilíbrio de Hardy-Weinberg (0,001)	0	-
Total de (após Controle de Qualidade)	11512	19

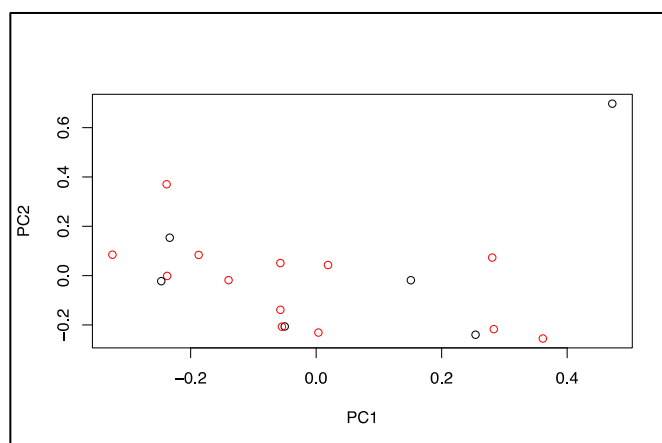


Figura 27. Representação gráfica da Análise do Componente Principal (PCA). Os indivíduos com fenótipo MEB estão representados como círculos em preto e os indivíduos com fenótipo R (controle) como círculos em vermelho.

Nossas análises novamente revelam SNPs com significância estatística abaixo do limiar de Bonferroni (Figura 28), e com notável desvio da linha diagonal para a porção inferior do gráfico, sugerindo uma não associação destes SNPs aos fenótipos associados (Figura 29). Chama a atenção, contudo, o fato de que dos dois SNPs com valor P mais próximo ao limiar, um deles, AX-93217741, é o mesmo encontrado na análise anterior (Tabela 18). Já o SNP AX-93216745 está em um íntron do gene AAEL019474 cujos ortólogos em *Anopheles ssp.* e em *Drosophila melanogaster* tem função predita de “ligação a RNA” (RNA binding).

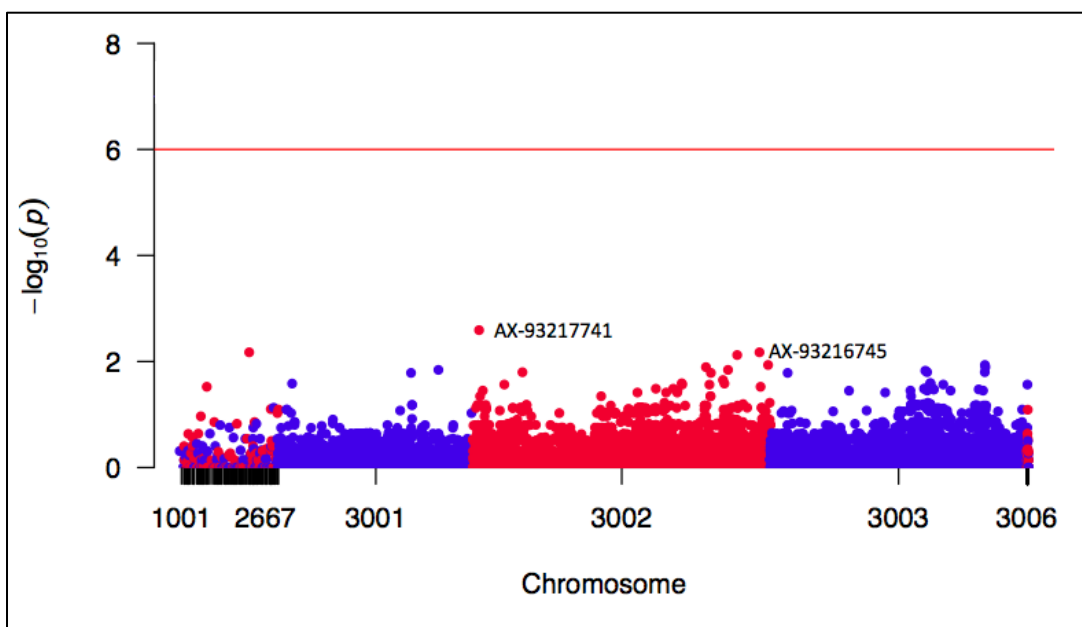


Figura 28. Gráfico Manhattan plot, no qual estão representados os resultados das associações dos SNPs devido aos seus valores de P, e suas localizações nos cromossomos do mosquito *Aedes aegypti*. Cada ponto representa um determinado SNP da associação entre os mosquitos com fenótipo MEB. Os SNPs anotados são os com menor valor de P. E está representada a linha vermelha o limiar da correção de Bonferroni.

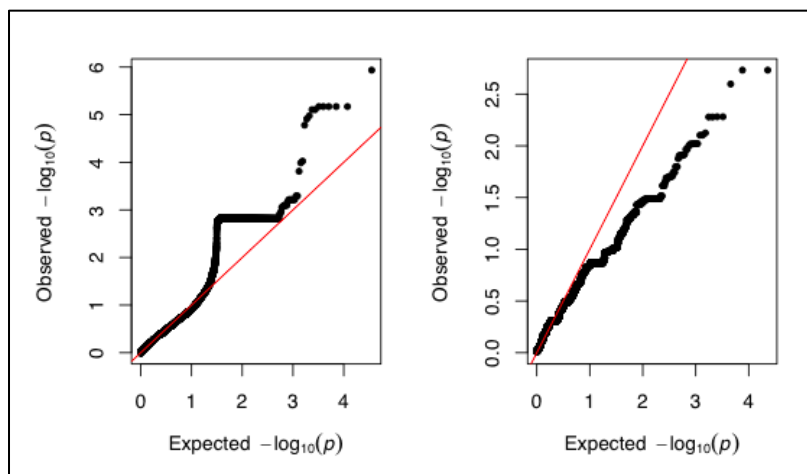


Figura 29. Representação gráfica da análise Quantil-Quantil. No gráfico a esquerda, estão representados pelos pontos em preto todos os SNPs da associação dos fenótipos MEB antes de passarem pelo controle de qualidade. E no gráfico a direita todos os SNP após o controle de qualidade.

Tabela 18. Grupo de genes com o menor P -valor e suas características.

Marcador	Cromossomo	Posição Genética	P -valor	Gene Adjacente	Função Predita
AX-93217741	3002	9436478	0.002561	Região intergenica	-
AX-93216745	3002	457082078	0.006706	AAEL019474 (Intron)	RNA binding

3^a) Associação entre mosquitos infectados com fenótipo D_{high} (com maior taxa de infecção) *versus* R para DENV-2

No total, considerando-se os grupos D_{high} e R, foram analisados 28 mosquitos e 12394 SNPs após a filtragem do controle de qualidade (Tabela 19). A PCA revelou uma distribuição dos SNPs sem agrupamentos visíveis (Figura 30), sem nenhum candidato acima do limiar da correção de Bonferroni (Figura 31), o que é corroborado pela análise de qq-plot (Figura 32) e sugere baixa associação entre tais SNPs e os fenótipos estudados.

Seguindo a mesma abordagem utilizada nas análises anteriores, foram investigados o locus e função predita dos SNPs com valor P mais próximo ao limiar da correção de Bonferroni, com destaque para os SNPs AX-93252419, AX-93225534 e AX-93243314 (Tabela 20). AX-93252419 encontra-se localizado no cromossomo 2, em um dos íntrons do gene AAEL011083, de função ainda desconhecida. AX-93225534, também localizado no cromossomo 2, no gene AAEL026095,

possui um ortólogo cuja função está relacionada à geração e diferenciação de neurônios durante o desenvolvimento em *D. melanogaster* (ABRAMCZUK et al., 2017). AX-93243314 está localizado no cromossomo 3, no gene AAEL008276, também sem função conhecida.

Tabela 19. Parâmetros para o controle de qualidade das amostras e dos SNPs. Números iniciais dos e finais após o controle de qualidade.

Controle de Qualidade	Número de SNPs	Número de Indivíduos
Total (Início)	24137	33
Eficiência da Genotipagem –Amostra (>95%)	24137	5
Eficiência de Genotipagem –SNP (>98%)	4380	-
Frequência do Menor Alelo (<1%)	7363	-
Equilíbrio de Hardy-Weinberg (0,001)	0	-
Total de (após Controle de Qualidade)	12394	28

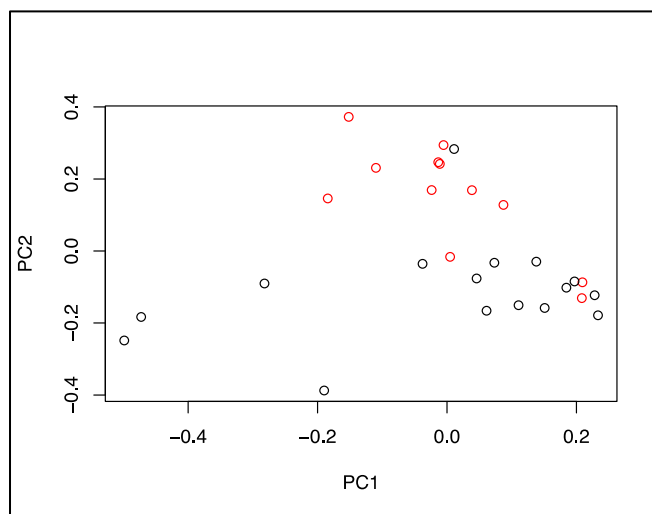


Figura 30. Representação gráfica da Análise do Componente Principal (PCA). Os indivíduos com fenótipo D (com taxa maior de infecção) estão representados como círculos em preto e os indivíduos com fenótipo R (controle) como círculos em vermelho.

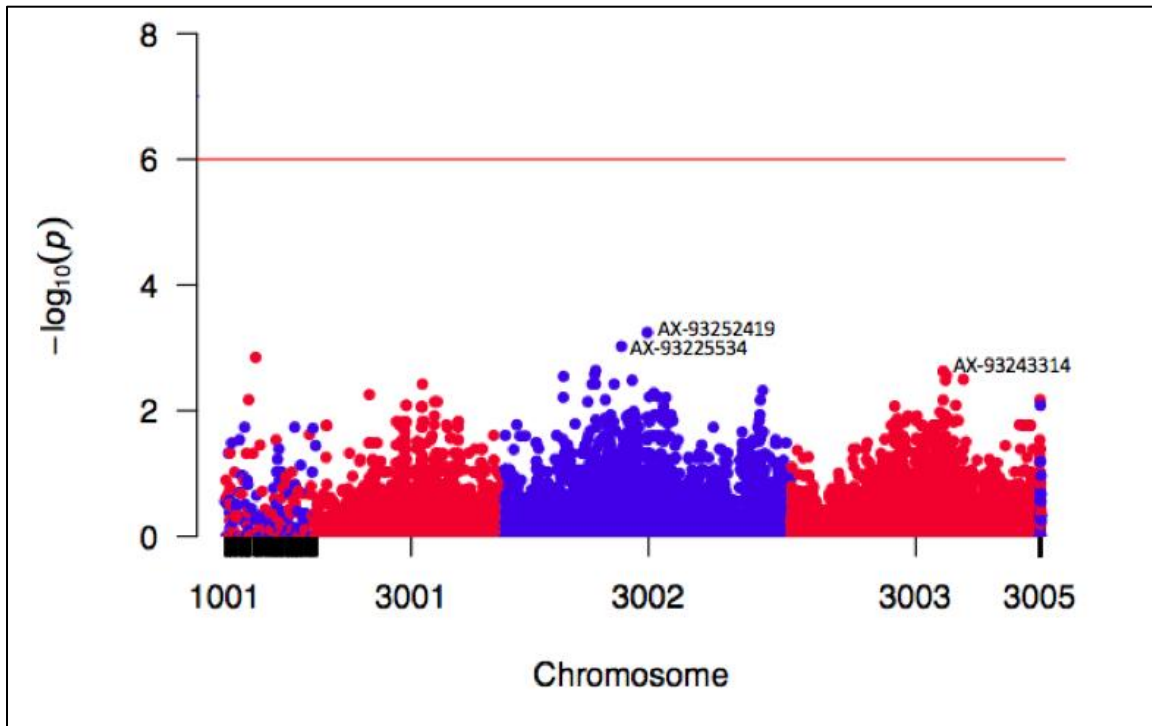


Figura 31. Gráfico *Manhattan plot*, no qual estão representados os resultados das associações dos SNPs devido aos seus valores de P , e suas localizações nos cromossomos do mosquito *Aedes aegypti*. Cada ponto representa um determinado SNP associado ao fenótipo D (com maior taxa de infecção). Os SNPs anotados são os com menor valor de P . E está representada a linha vermelha o limiar da correção de Bonferroni.

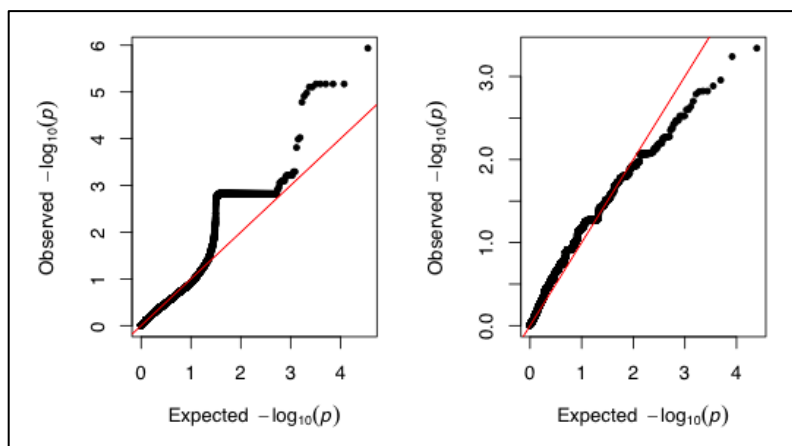


Figura 32. Representação gráfica da análise Quantil-Quantil. No gráfico a esquerda, estão representados pelos pontos em preto todos os SNPs da associação dos fenótipos D (com maior taxa de infecção) e R (controle) antes de passarem pelo controle de qualidade. E no gráfico a direita todos os SNP após o controle de qualidade.

Tabela 20. Grupo de genes com o menor *P*-valor e suas características.

Marcador	Cromossomo	Posição Genética	P-valor	Gene Adjacente	Função Predita
AX-93252419	3002	235333151	0.0005716	AAEL011083	Sem descrição
AX-93225534	3002	192309392	0.0009461	AAEL02695/AEL025258	Sem descrição
AX-93243314	3003	250415322	0.0023760	AAEL008276	-

4^a) Associação entre mosquitos infectados com fenótipo D *versus* MEB para DENV2

Para as associações entre D e MEB foram utilizados 75 indivíduos e 13710 SNPs após o controle de qualidade (Tabela 21), sem aparente agrupamento dos mosquitos de acordo com o fenótipo estudado após a PCA (Figura 33). Nestas análises, nenhum SNP foi detectado acima do limiar estipulado pela correção de Bonferroni (Figura 34), nem significativamente associado a um dos fenótipos (Figura 35). Daqueles dispostos próximos ao limiar da correção de Bonferroni, destacam-se três SNPs: AX-93220265, AX-93231930 e AX-93263886, todos localizados no cromossomo 1 (Tabela 22).

AX-93220265, localizado no íntron do gene AAEL001604 codifica a proteína Guanine Nucleotide Exchange Factor. AX-93231930, encontrado no íntron do gene AAEL019563, é ortólogo do gene AALF026958 de *Aedes albopictus*, que codifica a proteína *Segmentation Protein Cap'n'collar*, com função de “ligação a DNA” (*DNA binding*) em *Drosophila melanogaster*. AX-93263886 está localizado em uma região intergênica, entre os genes AAEL009759 e AAEL021138, os quais, respectivamente, codificam as proteínas TP53-inibidor regulado de apoptose e Sidestep, esta última também membro da superfamília das imunoglobulinas.

Tabela 21. Parâmetros para o controle de qualidade das amostras e dos SNPs. Números iniciais dos e finais após o controle de qualidade.

Controle de Qualidade	Número de SNPs	Número de Indivíduos
Total (Início)	24137	78
Eficiência da Genotipagem –Amostra (>95%)	24137	3
Eficiência de Genotipagem –SNP (>98%)	3488	-
Frequência do Menor Alelo (<1%)	6939	-
Equilíbrio de Hardy-Weinberg (0,001)	0	-
Total de (após Controle de Qualidade)	13710	75

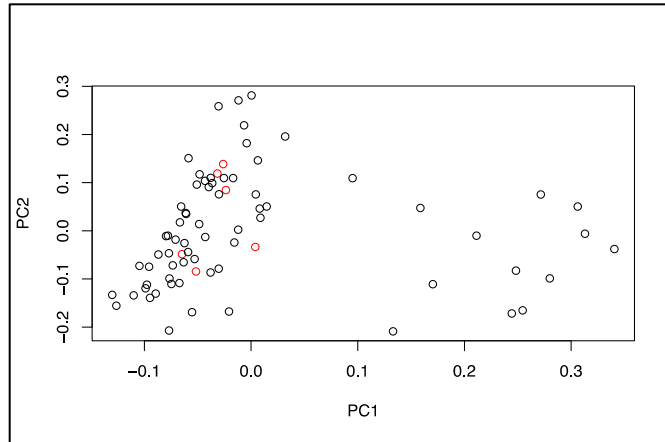


Figura 33. Representação gráfica da Análise do Componente Principal (PCA). Os indivíduos com fenótipo D estão representados como círculos em preto e os indivíduos com fenótipo MEB (controle) como círculos em vermelho.

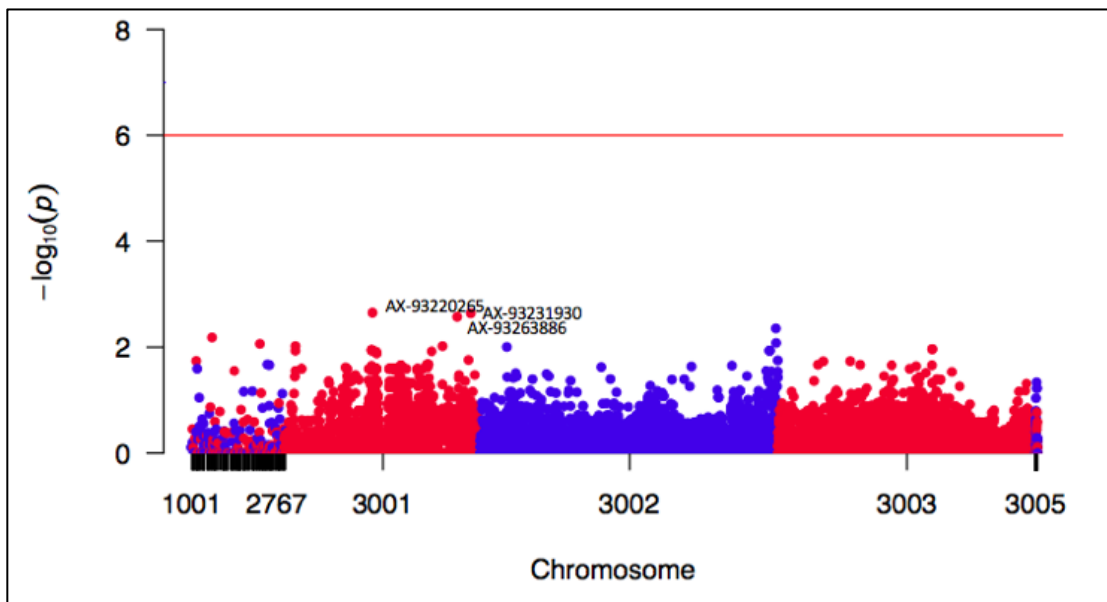


Figura 34. Gráfico Manhattan plot, no qual estão representados os resultados das associações dos SNPs devido aos seus valores de P , e suas localizações nos cromossomos do mosquito *Aedes aegypti*. Cada ponto representa um determinado SNP da associação dos mosquitos com fenótipo D. Os SNPs anotados são os com menor valor de P . E esta representada a linha vermelha o limiar da correção de Bonferroni.

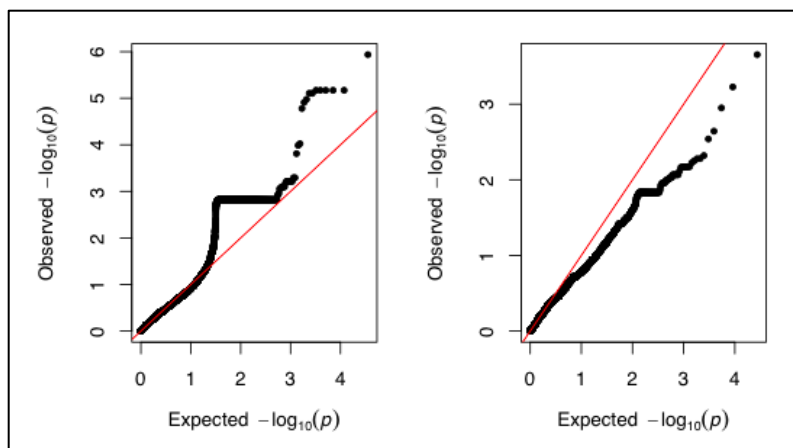


Figura 35. Representação gráfica da análise Quantil-Quantil. No gráfico a esquerda, estão representados pelos pontos em preto todos os SNPs da associação dos fenótipos D antes de passarem pelo controle de qualidade. E no gráfico a direita todos os SNP após o controle de qualidade.

Tabela22. Grupo de genes com o menor P -valor e suas características.

Marcador	Cromossomo	Posição Genética	P valor	Gene Adjacente	Função Predita
AX-93220265	3001	138961269	0.002239	AAEL001604 (Intron)	<i>Guanine Nucleotide Exchange Factor</i>
AX-93231930	3001	295277823	0.002296	AAEL019563(Intron)	Sem descrição
AX-93263886	3001	273689462	0.002673	Região intergenica	-

5ª) Associação entre mosquitos com fenótipo D_{high} versus D_{low} para DENV2.

Para esse último estudo de associação foram utilizados mosquitos dos grupos D_{high} e D_{low} . Ao todo 34 indivíduos e 13618 SNPs foram analisados após o controle de qualidade (Tabela 23), não apresentando agrupamento notável pela PCA (Figura 36). Assim como nas análises anteriores, nenhum SNP foi detectado acima do limiar de significância estipulado pela correção de Bonferroni (Figura 37). Contudo, três SPNs, AX-93225699, AX-93231292 e AX-93251292 destacaram-se na análise de associação genótipo-fenótipo por *qq-plot* (Figura 38 e Tabela 24). AX-93225699 está localizado no cromossomo 1, no éxon do gene AAEL017213, que codifica a proteína DNA-directed RNA polymerase subunit beta. AX-93231292, localizado no cromossomo 3, está em uma região intergênica, entre os genes AAEL004999 (sem função definida) e AAEL005003, o qual é imediatamente flanqueado por AAEL021659. AAEL005003 e AAEL021659 codificam, respectivamente, as proteínas Serine/Threonine-Protein Kinase e Ionotropic Receptor IR93a. AX-

93251292, também localizado no cromossomo 3, situa-se no gene AAEL019431, o qual codifica uma proteína ortóloga do Receptor de Ecdisona.

Tabela 23. Parâmetros para o controle de qualidade das amostras e dos SNPs. Números iniciais dos e finais após o controle de qualidade.

Controle de Qualidade	Número de SNPs	Número de Indivíduos
Total (Início)	24137	36
Eficiência da Genotipagem –Amostra (>95%)	24137	2
Eficiência de Genotipagem –SNP (>98%)	3434	-
Frequência do Menor Alelo (<1%)	7085	-
Equilíbrio de Hardy-Weinberg (0,001)	0	-
Total de (após Controle de Qualidade)	13618	34

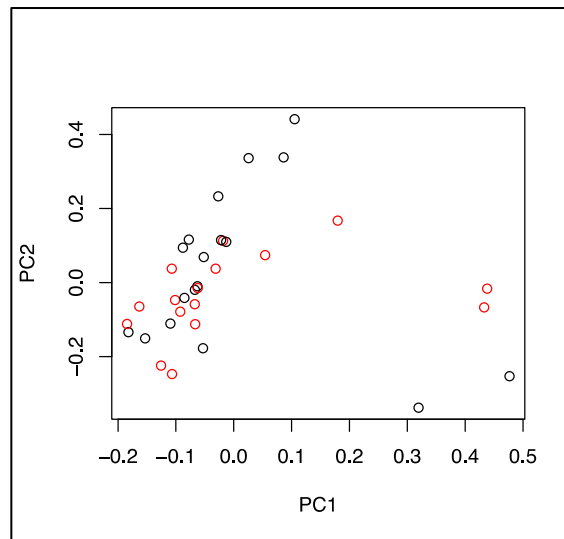


Figura 36. Representação gráfica da Análise do Componente Principal (PCA). Os indivíduos com fenótipo D (com taxa maior de infecção) estão representados como círculos em preto e os indivíduos com fenótipo D (com taxa menor de infecção) (controle) como círculos em vermelho.

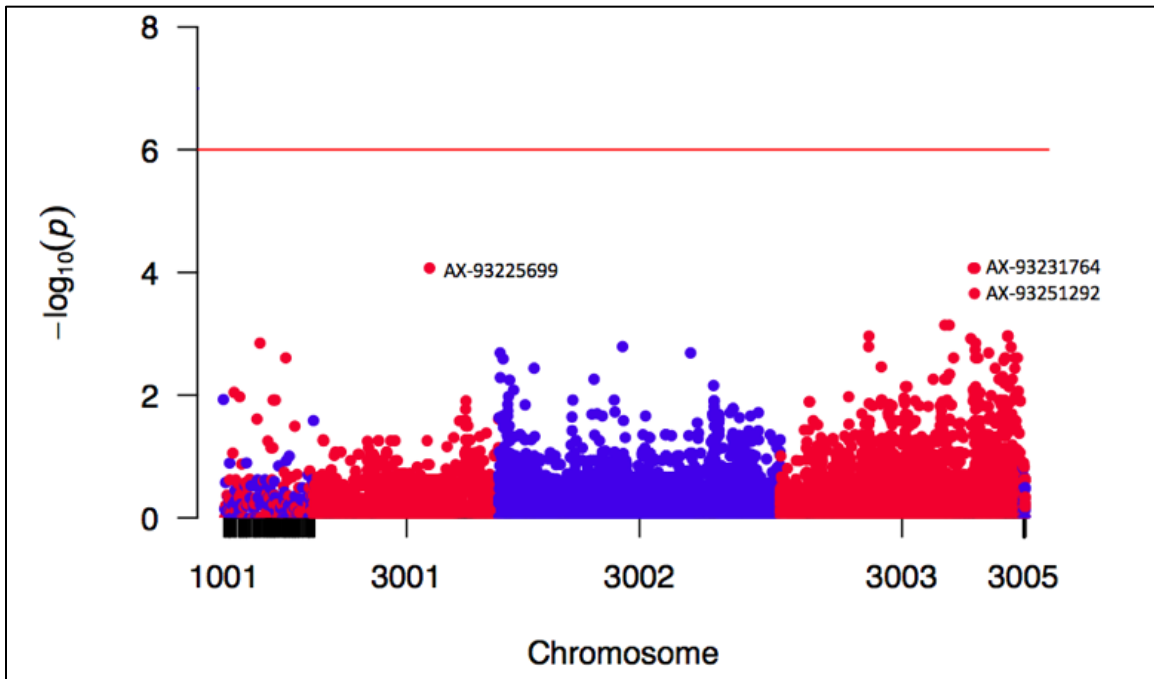


Figura 37. Gráfico Manhattan *plot*, no qual estão representados os resultados das associações dos SNPs devido aos seus valores de P , e suas localizações nos cromossomos do mosquito *Aedes aegypti*. Cada ponto representa um determinado SNP associado com fenótipo D (com maior taxa de infecção). Os SNPs anotados são os com menor valor de P . E está representada a linha vermelha o limiar da correção de Bonferroni.

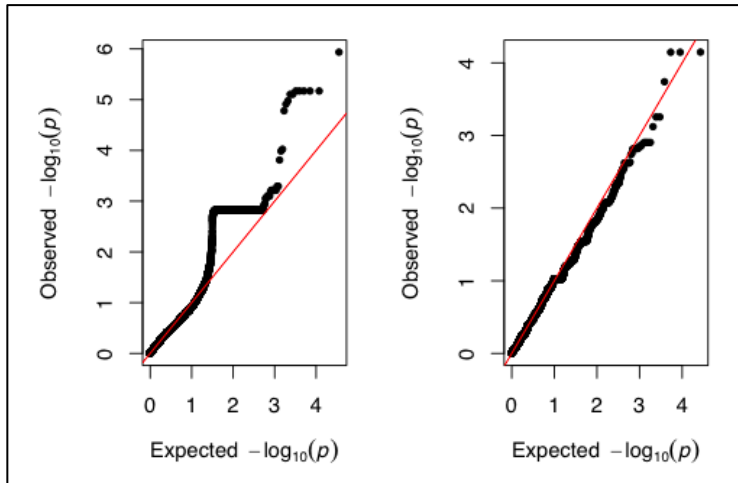


Figura 38. Representação gráfica da análise Quantil-Quantil. No gráfico a esquerda, estão representados pelos pontos em preto todos os SNPs da associação dos fenótipos D (com maior taxa de infecção) antes de passarem pelo controle de qualidade. E no gráfico a direita todos os SNP após o controle de qualidade.

Tabela 24. Grupo de genes com o menor *P*-valor e suas características.

Marcador	Cromossomo	Posição Genética	<i>P</i>-valor	Gene Adjacente	Função
AX-93225699	3001	194033246	8.507e-05	AAEL017213 (missense)	<i>DNA-directed RNA polymerase subunit beta</i>
AX-93231764	3003	325133691	8.530e-05	Região intergenica	-
AX-93251292	3003	327903665	8.530e-05	AAEL019431	<i>Ecdysone Receptor</i>

5. Discussão

Apesar da ampla disponibilidade de protocolos padronizados para a replicação viral (SINGH; PAUL, 1969; KUNO et al., 1985; YAMADA et al., 2002; JARMAN et al., 2011), neste trabalho foi necessário padronizar a produção de estoques virais de DENV-4, oriundos de São José do Rio Preto, de acordo com as condições experimentais e linhagens celulares em nosso laboratório.

Primeiramente os resultados apresentados na tabela 5 e figura 12 determinaram a melhor linhagem celular para ser utilizada que foi C6/36, como já relatado em um dos primeiros trabalhos com isolamento viral por Singh; Paul, 1969, no qual 18 soros infectados com os 4 sorotipos de DENV foram inoculados em células Vero e C6/36, e foi observado efeito citopático em 11 amostras de células Vero e em 15 amostras de C6/36. Além disso, observou-se que a linhagem Vero possuía efeito citopático apenas para o sorotipo 2, e a linhagem C6/36 para os 4 sorotipos. Os resultados apresentados na tabela 6 e figura 13 demonstraram que o melhor tempo para o isolamento viral foi o quinto dia após a inoculação de C6/36 com DENV-4, como já descrito por KUNO et al. (1985).

A competência vetorial pode ser definida pela habilidade do mosquito em se infectar com um determinado patógeno após a ingestão de sangue infeccioso e em seguida transmiti-lo após um período de incubação extrínseco, no qual o patógeno se multiplica dentro do vetor e migra para suas glândulas salivares (AGARWAL et al., 2017). Devido ao fato do patógeno se replicar dentro de um organismo vivo, a competência vetorial é determinada por múltiplos fatores. Esses fatores podem ser divididos em três grupos, a) fatores intrínsecos ao vetor, como as barreiras do intestino médio (MIB e MEB), barreiras das glândulas salivares, microbiota intestinal e o sistema imunológico, b) fatores extrínsecos ambientais, como temperatura, humidade, nutrição e tamanho do mosquito (LEFÈVRE et al., 2013), e c) fatores genéticos, tanto do mosquito vetor quanto do patógeno (AGAWAL et al., 2017).

Neste trabalho, demos início aos estudos de competência vetorial de uma população de *Aedes aegypti* coletada em Botucatu/SP ao vírus dengue sorotipos 2 e 4. Em média, a população *Ae. aegypti* Botucatu foi composta por 33% de indivíduos suscetíveis e 67% de mosquitos resistentes a DENV-4, o que corrobora dados preliminares conduzidos em nosso laboratório com a mesma população. Chama a atenção, neste caso, a quantidade de mosquitos resistentes ao DENV, tornando-se esta população alvo de estudo em nosso laboratório.

Em nosso desenho experimental, cada mosquito foi individualmente estudado e, durante a dissecação, dividido em três partes: cabeça, tórax e abdômen. Isso nos possibilitou distinguir se houve infecção pontual e/ou disseminação parcial ou total do vírus no vetor. Quando partículas virais foram detectadas apenas no abdômen (que continha os intestinos), o fenótipo foi chamado MEB (*midgut escape barrier*). Por outro lado, quando o vírus foi encontrado tanto no abdômen quanto na cabeça este fenótipo foi chamado D (mosquitos com disseminação viral). É importante ressaltar a funcionalidade da barreira intestinal de escape nos insetos estudados, com 8% e 18% de mosquitos MEB nas réplicas 1 e 2, respectivamente, da primeira infecção com DENV-4. Considerando-se a combinação de mosquitos R e MEB, nota-se que mais de 70% dos mosquitos estudados não são capazes de transmitir o vírus, revelando uma baixa competência vetorial da população *Ae. aegypti* Botucatu para DENV-4. Por outro lado, nossos dados sugerem que a baixa competência vetorial desta população a DENV é sorotipo específica. Inversamente aos dados obtidos com DENV-4, a maioria dos mosquitos apresentou fenótipo D (74% em média) quando alimentada com sangue contendo DENV-2.

Quando comparamos os resultados da competência vetorial dos mosquitos *Ae. aegypti* Botucatu infectados com DENV-4 com outros estudos na literatura, observamos variações das taxas de infecção nas diferentes populações estudadas. Knox et al. (2003) compararam a competência vetorial de populações de mosquitos da Austrália infectadas com DENV-2 e DENV-4, observando uma maior taxa de infecção para DENV-2 do que para DENV-4 naquela população, apesar da grande variação (12-84%). Já em outro estudo comparando *Ae. aegypti* e *Ae. mediovittatus* infectados com os quatro sorotipos, observou que *Ae. aegypti* é mais susceptível aos quatro sorotipos sendo a taxa de infecção com DENV-4 maior que 62% (POOLE-SMITH, 2015). Com isso, devido ao fato de diferentes populações infectadas com o mesmo sorotipo possuírem diferentes taxas de infecção, deve-se atribuir que a competência vetorial seja multifatorial dependente de fatores intrínsecos e extrínsecos, não podendo ser analisada apenas pelo tipo de vírus.

Diferenças nas taxas de infecção com DENV-2 em mosquitos *Aedes aegypti* também já foram descritas na literatura (KNOX et al., 2003; DIALLO et al., 2008; MOURA et al., 2015). As diferentes populações e cepas virais utilizadas podem ser os principais fatores responsáveis. O sorotipo DENV-2 apresentou altas taxas de infecção quando comparadas com outros três sorotipos em uma população da ilha de Santiago na África (MOURA et al., 2015), com taxas diferentes

dependendo da origem do vírus, se silvestre ou urbana, ou da linhagem do mosquito (DIALLO et al., 2008; DICKSON et al., 2014).

Além das diferenças em competência vetorial encontradas, estudos com mosquitos infectados com DENV-2 destacam QTLs associados ao fenótipo de uma alta infecção do intestino médio e alta disseminação viral, chamado de D2S3 (*Dengue 2 Susceptible on 3 chromossomes*), e outro responsável pela barreira de escape do intestino médio (MEB) chamado de D2MEB (*Dengue 2 Midgut Escape Barrier*) (Bennett et al, 2005). Esses QTLs foram mapeados e confirmados serem modelos multigênicos localizando-os nos 3 cromossomos do mosquito (BENNETT et al., 2005).

Posteriormente à primeira infecção, que foi utilizada para analisar a competência vetorial da população de Botucatu a DENV-2 e DENV-4, foram realizadas rodadas de infecção para a seleção de isolinhagens com os diferentes fenótipos: D (mosquitos com disseminação viral), R (resistentes) e MEB para DENV-4; e D e R apenas para DENV-2. A seleção dos mosquitos para DENV-4 ocorreu apenas até a geração F1, etapa na qual a maioria da progênie ainda não possuía o mesmo fenótipo de sua respectiva geração parental, com predominância de mosquitos R em todos os grupos. Estes dados sugerem que o caráter de resistência a DENV-4 é predominante na população *Ae. aegypti* Botucatu.

Já a tentativa de seleção dos diferentes fenótipos dos mosquitos infectados com DENV-2 foi realizada até a geração F2. Os dados apresentados nas figuras 20 e 21 e na tabela 11 revelam uma diminuição na porcentagem de indivíduos D de 74% para 50% dos parentais D para F1 D. Inversamente, é possível notar uma clara seleção do fenótipo R da geração parental R para a F1 R (16% para 33%). Na geração F2 D, o número de indivíduos D passa para 76%, semelhante às taxas encontradas na geração parental D, ao passo que a proporção de mosquitos R salta para 80% na geração F2 R.

Portanto, com os mosquitos infectados com DENV-2 parece haver uma seleção dos dois diferentes fenótipos. Porém, vale ressaltar que o número de indivíduos diminuiu drasticamente durante as gerações, fazendo com que esses números não sejam suficientes estatisticamente para afirmarmos a seleção desses fenótipos. A diminuição do número de indivíduos conforme as gerações podem estar relacionadas à expressão de alelos recessivos deletérios, devido ao fato do alto grau de parentesco entre esses indivíduos (BENNETT et al., 2005), sendo que essa diminuição se inicia com uma diminuição da ovoposição nas três primeiras gerações consecutivas de mosquitos expostos ao patógeno (OCAMPO et al., 2013).

A seleção de fenótipos relacionados à competência vetorial em mosquitos infectados com flavivírus, com o intuito de encontrar fatores genéticos ou fatores intrínsecos pontuais não é recente. Miller e Mitchell (1991), como um exemplo de sucesso, conseguiram selecionar mosquitos resistentes da espécie *Aedes aegypti formosus*, originários da África, infectados com vírus da febre amarela. Já Ocampo et al. (2012) tentaram selecionar fenótipos susceptíveis, MEB e MIB (*Midgut Infection Barrier*) para DENV-2 em *Ae. aegypti* da cidade de Cali na Colômbia. Para tal, foram necessárias 19 gerações para que o fenótipo susceptível passasse de 65,8% para 96,4% de mosquitos, 15 gerações para conversão de MEB de 25% para 44,1%, e 16 gerações para a conversão de MIB de 20% para 40% naquela população. Estes autores também observaram que quando os mosquitos eram infectados gerações consecutivas, as linhagens podiam ser mantidas por apenas três gerações, fazendo-se necessário interromper a seleção fenotípica em algumas gerações a fim de que seu efeito deletério pudesse ser suavizado. Tais observações podem ajudar a explicar os baixos números de mosquitos obtidos em nossos experimentos à medida que se avançou consecutivamente na seleção dos fenótipos ao longo das gerações, tanto para DENV-2 quanto para DENV-4.

Muitos estudos de análise de associação global do genoma (GWAS) são realizados no âmbito de doenças em humanos, melhoramento animal e vegetal (KIJAS et al., 2016; JOHNSTON et al., 2014; TWTCCC, 2007), mas em mosquitos vetores ainda há poucos estudos, principalmente relatando associações com variações na competência vetorial. Como um exemplo, Weetman et al. (2010) estudou a associação de mosquitos de duas populações diferentes de *Anophles gambiae* resistentes a um tipo de peritroíde, no qual foram encontrados três SNPs no cromossomo 2L.

Devido ao baixo número de estudos de GWAS em mosquitos, houve uma dificuldade notável em se identificar trabalhos que pudessem ser utilizados como referência para nossas análises. Neste sentido, foram encontrados alguns desafios em relação às análises, tais quais a quantidade de mosquitos, parâmetros e tipos de análises estatísticas, e correções a serem realizadas. Inicialmente, em uma visão geral dos resultados obtidos, não foram encontradas associações significativas entre o fenótipo infectado, tanto nas infecções disseminadas, quanto nas infecções apenas no intestino médio, utilizando-se a correção estatística de Bonferroni (BLAND; ALTMAN, 1995). Porém, como dito acima, os parâmetros utilizados são aparentemente mais adequados para análises interpopulacionais do que intrapopulacionais, como é o nosso caso. Neste

sentido, consideramos para análises futuras os SNPs com valor de significância estatística mais próximos ao limiar estipulado pela correção de Bonferroni, em cada associação testada.

O estudo de associação dos SNPs com os fenótipos infectado (D+MEB) *versus* R foi o que se gerou SNPs com menores valores de P (10^{-5}) observado no gráfico *Manhattan plot* (Figura 25) e associação dos mesmos SNPs no gráfico *qq-plot* (Figura 26), sendo esses AX-93217741, AX-93224565 e AX-93226799 (Tabela 14). O SNP AX-93217741 está localizado na região intergênica do cromossomo 2, entre o gene AAEL001010 com função descrita de *Defective proboscis extension response* que corresponde a uma superfamília de imunoglobulinas primeiramente descrita em *Drosophila* (NAKAMURA et al., 2002) e está relacionada à resposta avessa ao sal devido a transmissão por sinal neuronal. Além disso, foi descrito que a superfamília de imunoglobulinas está relacionada diretamente ao sistema imune inato em *Anopheles gambiae* diminuindo a infecção por *Plasmodium falciparum* (GARVER, et al., 2007). A descoberta dessa família possui grande importância na escolha no momento da alimentação, a qual será responsável pelo reconhecimento do alimento e decisão da extensão da probócite em *Drosophila*. O outro gene AAEL018150 tem função descrita em genes ortólogos de *Sodium-coupled monocarboxylate transporter 1*, atuando como supressor tumoral em humanos em casos de câncer de próstata (UENO et al., 2004; PARK et al., 2007). Posteriormente genes da mesma família foram descritos em *Drosophila melanogaster* e *Anopheles gambiae* encontrados no intestino e túbulos de Malpighi desses insetos relacionado a transporte de íons e manutenção do pH do intestino (HIRATA et al., 2012). O outro SNP AX-93224565 é localizado na região de íntron do gene AAEL002879 no cromossomo 1. Esse gene possui como função descrita *Heterogeneous nuclear Ribonucleoprotein r*, está relacionada ao processamento do pré-mRNA, incluindo transcrição, splicing, estabilização, transporte subcelular e degradação (DREYFUSS et al., 1993). Em um estudo com infecção com DENV in vitro, foi demonstrado que uma subunidade dessa família de proteínas (*Heterogeneous nuclear Ribonucleoprotein k*) teve múltiplas funções alteradas pela proteína do capsídeo DENV (CHANG et al., 2001), podendo assim estar relacionada ao controle da replicação viral. Por fim o SNP AX-93224565 localizado no íntron do gene AAEL003550 no cromossomo 2, com função de aquaporina, sendo associado fluxo água para a célula (DUCHESNE et al., 2003).

Com isso, observa-se que os SNPs associados aos loci desses fenótipos estão localizados em genes ou próximo a genes com funções distintas de reguladores da expressão e manutenção de funções essenciais da célula. Muitos dos SNPs são encontrados em regiões de íntron dos genes, o

que pode caracterizar regiões não codificadoras de microRNAs, os quais são importantes na regulação gênica pós-transcricional. Em *Ae. aegypti* alguns miRNAs relacionados à via de RNAi foram descritos como moduladores da infecção por DENV-2 (SANCHEZ-VARGAS, et al., 2009), indutores do fenótipo resistente (YEN et al., 2018).

Para os SNPs encontrados em regiões intergênicas, foram investigados os genes flanqueadores dessas regiões, haja vista que a expressão desses genes pode ser eventualmente afetada por mutações em regiões regulatórias em cis. Além disso, certas regiões intergênicas podem codificar *long intergenic noncoding RNAs* (lincRNA), os quais são importantes reguladores das mais diversas funções biológicas, incluindo imunidade (CLARK; MATTICK, 2011). Etebari et al. (2016) observaram um aumento na abundância de lincRNAs em *Ae. aegypti* infectados com DENV-2, estando esse fenômeno associado à supressão da replicação viral em células do mosquito.

Para a segunda associação realizada com os fenótipos MEB e R o valor de P para associação representada no *Manhattan plot* (Figura 28) foi baixo (10^{-3}), e não foi observada associação na representação gráfica da probabilidade da associação no gráfico do *qq-plot* (Figura 29). Porém os SNPs com menor valor de P foram identificados, sendo eles AX-93217741 e AX-93216743 (Tabela 16). O primeiro SNP é o mesmo estudado da associação com o fenótipo anterior localizado em uma região intergenica. Já o SNP AX-93216743 está localizado em um íntron no gene AAEL019474 do cromossomo 2. Esse gene codifica uma proteína com afinidade por RNA (*RNA binding*), que funciona como regulador de transcrição dependente ou transcrição independente da expressão genica, além de estar relacionada à biologia de células do sistema imune. Suas funções moleculares compreendem transcrição, processamento de RNA, exportação de mRNA, montagem de ribossomos, iniciação da tradução, alongação e silenciamento, e degradação de RNA (TURNER; DÍAZ-MUÑOZ, 2018).

Na terceira associação dos SNPs, entre D_{high} e R, também foram geradas associações com baixos valores de P (10^{-3}) representados no *Manhattan plot* (Figura 31). Essa não associação também foi visualizada no *qq-plot* (Figura 32). Os SNPs identificados com menores valores de P foram AX-93252419, AX-93225534 e AX-93243314 (Tabela 18). O SNP AX-93252419 está localizado no gene AAEL011083 no cromossomo 2, e ainda não possui função predita. O segundo SNP AX-93225534 está localizado no cromossomo 2 nos genes AAEL026095 sem função predita, nem nos genes ortólogos e no gene AAEL025258 com função predita em gene ortólogo como

Barricade em *Drosophila melanogaster*. Esse gene está associado à renovação de células nervosas, sendo requerido na geração de neurônios durante o desenvolvimento cerebral, assegurando o precursor neural correto para a proliferação e diferenciação celular (ABRAMCZUK et al, 2017). O terceiro SNP AX-93243314 está localizado no gene AAEL008276 no cromossomo 3 sem função predita.

Na quarta associação dos SNPs, entre os fenótipos D e MEB também obtivemos SNPs com baixos valores de P (10^{-3}) associação (Figura 34). Os SNPs selecionados com menor valor de P foram AX-93220265, AX-93231930 e AX-93263886 (Tabela 20). O primeiro SNP, AX-93220265 está localizado no íntron do gene AAEL001604 no cromossomo 1. Esse gene codifica a proteína *Guanine Nucleotide Exchange Factor*, a qual tem como função a ativação de enzimas GTPases responsáveis por vários aspectos celulares (SCHMIDT; HALL, 2002). Proteínas da família de GTPase Rab5 e Rab18 foram descritas por estarem relacionadas à replicação dos vírus da família *Flaviviridae*, sendo que Rab18 está diretamente ligada a replicação de DENV (TANG, et al., 2014, LIN, et al., 2017). O segundo SNP, AX-93231930, está localizado no íntron do gene AAEL019563 do cromossomo 1 que codifica a proteína *Segmentation Protein Cap'n'collar*, moduladores de outras famílias de proteínas responsáveis pela formação do eixo corporal posterior-anterior em *Drosophilla* (MCGINNIS et al., 1998). Além disso, a proteína nuclear *factor erythroide-derived factor 2* (Nrf2) da família das proteínas *Cap'n'collar* estão relacionados ao controle da infecção de DENV e ZIKV devido a regulação do balanço redox no intestino dos mosquitos (BOTTINO-ROJAS, et al., 2018). Um outro SNP de interesse nessa associação é AX-93263886 localizado em uma região intergênica do cromossomo 1, entre o gene AAEL009759 que codifica uma proteína *TP53-regulated inhibitor of apoptosis*. Essas proteínas são importantes moduladores das vias de apoptose, prevenindo a formação de complexos apoptóticos (FOOK-ALVES et al., 2016). Genes pró-apoptose, *caspase 16* e *Aedronc* foram descritos por Serrato, et al. (2017) sendo encontrados em mosquitos *Aedes aegypti* com fenótipo R, ressaltando a importância dos mecanismos de apoptose relacionados a competência vetorial. O outro gene AAEL021138 que codifica proteínas *side* também pertencentes a superfamília de imunoglobulinas (SINK, et al., 2001).

Finalmente, na última associação dos SNPs, entre os fenótipos D_{high} e D_{low} valores menores de P foram encontrados ($p < 10^{-5}$), o que culmina na associação mais aparente observada no gráfico de probabilidade *qq-plot* (Figura 38). Os três SNPs selecionados com menores valores de P foram AX-93225699, AX-93231764 e AX-93251292 (Tabela 22). O primeiro SNP está localizado no

gene AAEL017213 com função predita de *DNA-directed RNA polymerase subunit beta*, é uma subunidade da enzima que polimeriza RNA de uma sequência complementar de DNA (HELMANN; CHAMBERLIN, 1988). O segundo SNP AX-93231764 está localizado em uma região intergênica do cromossomo 3 e possui em sua proximidade os genes AAEL004999 sem função descrita, e AAEL005003 que codifica uma *Serine/Threonine-Protein Kinase*, pertencente a uma família de proteínas envolvida na regulação de vastas respostas celulares, como proliferação celular, diferenciação e sobrevivência (SU; KARIN, 1996). O terceiro SNP de interesse nessa associação, AX-93251292 codifica uma proteína do tipo *Ecdysone Receptor*, responsável por modular a arquitetura dos dendritos de sensores neurais em larvas de *Drosophila* (MCPARLAND et al., 2015).

Após observar mais detalhadamente os SNPs com maior potencial de associação com os *loci* dos mosquitos com fenótipos infectados e resistentes, independente da maneira de infecção, a maioria deles são encontrados em genes ou regiões próximas a genes com funções gerais de manutenção e desenvolvimento celular, pois muitos genes ainda não foram especificamente descritos. Contudo, alguns deles localizam-se próximos ou no interior de genes que participam de importantes processos relacionados à replicação viral e/ou ao controle da suscetibilidade de *Ae. aegypti* a arbovírus.

Um dos motivos para não termos encontrado associações de alta significância estatística entre os SNPs e os fenótipos estudados pode estar relacionado ao número de indivíduos genotipados. Ainda não existe um padrão ouro para o número de indivíduos para essa análise, porém estudos envolvendo GWAS em outros organismos utilizam mais indivíduos variando de 150 até 1000 (JOHNSTON et al., 2014; KIJAS et al., 2013; TWTCCC, 2007). Porém, como os estudos de associação são feitos em sua maioria com populações distintas, onde são encontradas maiores diferenças genéticas entre elas, deve-se levar em conta que os parâmetros utilizados neste trabalho tenham sido demasiadamente restritivos. Com isso, testes funcionais de validação com metodologias como RNAi ou CRISPR-Cas serão importantes para verificar a verdadeira associação desses SNPs com o controle da competência vetorial de *Ae. aegypti* ao vírus dengue.

Além disso, é importante considerar que os mecanismos que controlam a suscetibilidade e mosquitos ao vírus não são influenciados apenas por fatores genéticos. Fatores ambientais e externos, particularidades de cada patógeno, e até mesmo a própria microbiota intestinal simbiote do inseto, representam importantes atores neste processo (DENNISSON et al., 2014).

6. Conclusão

Em nosso estudo podemos concluir que:

- Uma mesma população de mosquito pode apresentar diferenças em competência vetorial para diferentes sorotipos do vírus dengue.
- Para a seleção de fenótipos é necessário um maior número de indivíduos iniciais e que o fenótipo R parece ser mais dominante do que o fenótipo D.
- Os mecanismos que controlam a competência vetorial a diferentes vírus são provavelmente distintos e multifatoriais
- Para os estudos de GWAS é necessário a utilização parâmetros diferentes para a análise de indivíduos intrapopulacionais.
- Foram encontrados SNPs localizados em genes ou adjacente a genes com importantes funções relacionadas à replicação viral. Tornando-se alvos para posteriores estudos funcionais.

7. Referências

- ABRAMCZUK, M.K. The splicing co-factor Barricade/Tat-SF1, is required for cell cycle and lineage progression in *Drosophila* neural stem cells. **Development**, 144: 3932-3945, 2017.
- AGARWAL, A.; PARIDA, M.; DASH, P.K. Impact of transmission cycles and vector competence on global expansion and emergence of arboviruses. **Rev. Med. virol.**, v.194, p.1-12, 2017
- ANDERSON, C.; PETTERSSON, F.; CLARKE, G.M.; CARDON, L.R.; MORRIS, A.P.; ZONDERVAN, K.T. Data quality control in genetic case-control association studies. *Nature Protocols*, v.5, n.9, p.1564-1573, 2010.
- BAHIA, A.C.; DONG, Y.; BLUMBERG, B.J.; et al. Exploring *Anopheles* gut bacteria for *Plasmodium* blocking activity. **Environmental Microbiology**, v. 16, n. 9, p. 2980–2994, 2014.
- BEERNTSEN, B.T.; JAMES, A.A.; CHRISTENSEN, B.M. Genetics of mosquito vector competence. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. Madison.*, v. 64, n. 1, p.115–137, 2000.
- BENNETT, K.E.; BEATY, B.J.; BLACK, W.C. 4th. Selection of *D2S3*, an *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Strain with High Oral Susceptibility to Dengue 2 Virus and *D2MEB*, a Strain with a Midgut Barrier to Dengue 2 Escape. **J. Med. Entomol.**, v. 42, n. 2, p. 110-119, 2005.
- BENNETT, K.E.; FLICK, D.; FLEMING, K.H.; JOCHIM, R.; BEATY, B.J.; et al. Quantitative trait loci that control dengue-2 virus dissemination in the mosquito *Aedes aegypti*. **Genetics**, v. 170, p. 185–194, 2005.
- BENNETT, K.E.; OLSON, K.E.; MUÑOZ, M.L.; FERNANDEZ-SALAS, I.; FARFAN-ALE, J.A.; HIGGS, S.; BLACK, W.C.; BEATY, B.J. Variation in vector competence for dengue 2 virus among 24 collections of *Aedes aegypti* from Mexico and the United States. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 67, n. 1, p.85-92, 2002.
- BHATT, S., GETHING, P.W., BRADY, O.J., et al. The global distribution and burden of dengue. **Nature**, v. 496, 504–507, 2013.
- BLACK, I.V. W.C.; BENNETT, K.E.; GORROCHÓTEGUI-ESCALANTE, N.; et al. Flavivirus susceptibility in *Aedes aegypti*. **Arc. Med. Res.**, v.33, p.379-388, 2002.
- BLAND, J.M. ; ALTMAN, D.G. Multiple significance tests: the Bonferroni method. **BMJ**, v.310, p. 170, 1995.
- BONIZZONI, M.; DUNN, W.A.; CAMPBELL, C.L.; OLSON, K.E.; DIMON, M.T.; MARINOTTI, O.; JAMES, A.A. RNA-seq analyses of blood-induced changes in gene expression in the mosquito vector species, *Aedes aegypti*.
- BOTTINO-ROJAS, V., et al. The redox-sensing gene *Nrf2* affects intestinal homeostasis, insecticide resistance and Zika virus susceptibility in the mosquito *Aedes aegypti*. **JBC**, 2018.
- BOSIO, C.F.; BEATY, B.J.; BLACK, W.C. Quantitative genetics of vector competence for dengue-2 virus in *Aedes aegypti*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v. 59, p. 965–970, 1998.

- BOSIO, C.F.; FULTON, R.E.; SALASEK, M.L.; BEATY, B.J & BLACK, W.C.T. Quantitative trait loci that control vector competence for dengue-2 virus in the mosquito *Aedes aegypti*. **Genetics**, v. 156, p. 687–698, 2000
- CALISHER, C.H. Evolutionary, ecological and Taxonomic relationships between arboviruses of Florida, U. S. A. and Brazil. In: **An overview Arbovirology in Brazil and neighbouring countries**. Travassos da Rosa, A. P. A., Vasconcelos, P. F. C., Travassos da Rosa, J. F. S (ed.) Belém-Pa, Instituto Evandro Chagas. p. 32-41, 1998.
- CALVEZ, E.; GUILLAUMONT, L.; GIRAULT, D.; et al. Dengue-1 virus and vector competence of *Aedes aegypti*(Diptera: Culicidae) populations from New Caledonia. **Parasites & Vectors**, v.10, p. 381, 2017.
- CLARK, M.B.; MATTICK J.S. Long noncoding RNAs in cell biology. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v.22, p. 366-376, 2011.
- CANTOR, R. M.; LANGE, K.; SINSHEIMER, J. S. Prioritizing GWAS results: A review of statistical methods and recommendations for their application. **American Journal of Human Genetics**, v. 86, n. 1, p. 6–22, jan. 2010.
- CHOUIN-CARNEIRO, T.; VEGA-RUA, A.; VAZEILLE, M. et al. Differential Susceptibilities of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from the Americas to Zika Virus. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 10, n. 3, e0004543, 2016.
- CHANG, C-J.; LUH, H-W.; WANG, S-H.; LIN, H-J.; LEE, S-C.; HU, S-T. The Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein K (hnRNP K) Interacts with Dengue Virus Core Protein. **DNA and Cell Biology**, v.20, n.9, p.569-577, 2011.
- CIRIMOTICH, C.M.; RAMIREZ, J.L.; DIMOPOULOS, G. Native microbiota shape insect vector competence for human pathogens. **Cell Host Microbe**, v..10, p.307–310, 2011.
- CONSOLI, R.A.G.B.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. **Principais Mosquitos de Importância Sanitária no Brasil**. 1.ed. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 225p, 1994.
- COOPER, D.M.; CHAMBERLAIN, C.M; LOWERBERGER, C. Aedes FADD: A novel death domain-containing protein required for antibacterial immunity in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. **Insect biochemistry and molecular biology**. v. 39, p. 47–54, 2009.
- COOPER, D.M.; PIO, F.; THI, E.P.; et al. Characterization of Aedes Dredd: a novel initiator caspase from the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v.37, n. 6, p. 559–569, 2007.
- COOPER, P.D. The Plaque Assay of Animal Virus. **Advances in Virus Research.**, v.8, p.319-178, 1962.
- COSTA-DA-SILVA, A.L.; IOSHINO, R.S.; ARAÚJO, H.R.C.C.; et al. Laboratory strains of *Aedes aegypti* are competent to Brazilian Zika virus. **PLoS ONE**, v. 12, n. 2, e0171951, 2017.
- COX, J.; BROWN, H.E.; RICO-HESSE, R. Variation in Vector Competence for Dengue Viruses Does Not Depend on Mosquito Midgut Binding Affinity. **PLoS Negl. Trop. Dis.** v. 5, e1172, 2011.

- DENG, H.W.; CHEN, W.M. Biased tests of association: comparison of allele frequencies when departing from Hardy-Weinberg proportions. **Am. J. Epidemiol.**, v.151, p.335-357, 2000.
- DENNISON, N. J., JUPATANAKUL, N. & DIMOPOULOS, G. The mosquito microbiota influences vector competence for human pathogens. **Curr Opin Insect Sci**, v.3, p.6–13, 2014.
- DIALLO, M.; BA, Y.; FAYE, O.; SOUMARE, M.L.; DIA, I.; SALL, A.A. Vector competence of *Aedes aegypti* populations from Senegal for sylvatic and epidemic dengue 2 virus isolated in West Africa. **Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.102, p.493-498, 2008.
- DICKSON, L.B.; SANCHEZ-VARGAS, I.; SYLLA, M.; FLEMING, K.; BLACK IV, W. Vector Competence in West African *Aedes aegypti* is flavivirus Species and Genotype Dependent. **Plos Neglected tropical Diseases**, v.8, n.10, 2014.
- DILLON, R.J.; DILLON, V.M. The gut bacteria of insects: Nonpathogenic interactions. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 49, p. 71-92, 2004.
- DIMOPOULOS, G. Insect immunity and its implication in mosquito-malaria interactions. **Cell Microbiol.**, v. 5 , p. 3-14, 2003.
- DIMOPOULOS, G.; SHORT, S.M.; RAMIREZ, J.L. Compositions and methods useful for the prevention of malária and dengue vírus transmission. **Patent Application Publication**, Appl.n. 15/507,332, Pub.n.US2017/0280730, 2017.
- DONG, Y.; MANFREDINI, F.; DIMOPOULOS, G. Implication of the mosquito midgut microbiota in the defense against malaria parasites. **PLoS Pathog.**, v. 5, e1000423, 2009.
- DREYFUSS, G.; MATUNIS, G.M.; PINOL-ROMA, S.; BURD,C.G. hnRNP proteins and the biogenesis of mRNA. **Annu. Rev. Biochem.**, v.62, p.289-321, 1993.
- DUCHESNE, L.; HUBERT, J-F.; VERBAVATZ, J-M; THOMAS, D.; PIETRANTONIO, P.V. Mosquito (*Aedes aegypti*) aquaporin, present in tracheolar cells, transports water, not glycerol, and forms orthogonal arrays in *Xenopus* oocyte membranes. **Er. J. Biochem**, v. 270, p. 422-429, 2003.
- ETEBARI, K., ASAD, S., ZHANG, G., ASGARI, S. (2016) Identification of *Aedes aegypti* Long Intergenic Non-coding RNAs and Their Association with Wolbachia and Dengue Virus Infection. **PLoS Negl Trop Dis.**, v.10, n.10, p.e 0005069, 2016.
- EVANS, B.R.; GLORIA-SORIA, A.; HOU, L.; MCBRIDE, C.; BONIZZONI, M.; ZHAO, H.; POWELL, J. R. A Multipurpose, High-Througput Single-Nucleotide Polymorphism Chip for the Dengue and Yellow Fever Mosquito, *Aedes aegypti*. **Genes Genomes Genetics**, v.5, p.711-718, 2015.
- FAN, B.; ONTERU, S.K.; DU, Z-Q; GARRICK, D.J.; STALDER,K.J.; ROTHSCHILD, M.F. Genome-Wide Association Study Identifies Loci for Body Composition and Structural Soundness Traits in Pigs. **PLoS ONE**, v. 6; n. 2; e14726, 2011.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3.ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN. 1998, p. 220.
- FIGUEIREDO, L.T.M.; FONSECA, B.A.L. Dengue. In: **Tratado de Infectologia** (R. Veronesi & R. Focacia, org.), pp. 345-35, São Paulo: Editora Atheneu, 1966.

- FOOK-ALVES, V.L.; OLIVEIRA, M.B.; ZANATTA, D.B.; STRAUSS B.E.; COLLEONI, G.W.B. TP53 Regulated Inhibitor of Apoptosis 1 (TRIAPI1) stable silencing increases late apoptosis by upregulation of caspase 9 and APAF1 in RPMI8226 multiple myeloma cell line. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1862, n. 6, p. 1105–1110, 2016.
- FORATTINI, O.P. **Ecologia Epidemiologia e Sociedade**. São Paulo: Artes Médicas. 1992.
- FREIMER, N. B.; SABATTI, C. Guidelines for association studies in Human Molecular Genetics. **Human Molecular Genetics**, v. 14, n. 17, p. 2481–2483, 2005.
- GAIO, A.D.; GUSMAO, D.; SANTOS, A.; BERBERT-MOLINA, M.; PIMENTA, P.; *et al.* Contribution of midgut bacteria to blood digestion and egg production in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) (L.). **Parasit. Vectors**, v. 4, p.105, 2011.
- GARVER, L.S., XI, Z.; DIMOPOULOS, G. Immunoglobulin superfamily members play na importante role in the mosquito immune system. **Dev. Comp. Immunol.**, v. 32, n.5, p.519-531, 2007.
- GUBLER, D.J. Dengue and dengue hemorrhagic fever. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 11, n. 3, p. 480-496, 1998b.
- GUBLER, D.J. Resurgent vector-borne diseases as a global health problem. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 4, n. 3, p. 442-450, 1998a.
- GUBLER, D.J.; ROSEN, L. Variation among geographic strains of *Aedes albopictus* in susceptibility to infection with dengue viruses. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 25, p .318-325, 1976
- GUBLER, D.J. Variation in Susceptibility to Oral Infection with Dengue Viruses among Geographic Strains of *Aedes aegypti*. **A. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 28, p.1045–52, 1979.
- GUNTHER, J. *et al.* Evidence of vertical transmission of dengue virus in two endemic localities in the state of Oaxaca, Mexico. **Intervirolology**, v. 50, p. 347–352, 2007.
- HALSTEAD, S.B. Dengue. **Lancet**, v. 370, n. 9599, p. 1644-1652, 2007.
- HELMANN, J.D.; CHAMBERLIN, M.J. Structure and function of bacterial sigma factors. **Annual Review of Biochemistry**, v. 57, p. 839-872, 1988.
- HIRATA, T. et al. Ion and solute transport by prestin in *Drosophila* and *Anopheles*. **J. Insect Physiol.**, v.58, n.4, p.563-569, 2012.
- HOFFMANN, J.A.; KAFATOS, F.C.; JANEWAY JR., C.A.; EZEKOWITZ, R.A.B. Phylogenetic Perspectives in Innate Immunity. **Science**, v. 284, p. 1313-1318, 1999.
- HOFFMANN, J.A.; REICHHART, J.M. *Drosophila* immunity : an evolutionary perspective. **Nature Immunology**, v. 3, n. 2, p.121-126, 2002.

- HOTELLING, H. Analysis of a complex of statistical variables into principal components. **The Journal of Education Psychology**, v. 24, n.6, p.417-441, 1993.
- HURST, G.D.D.; HUTCHENCE, K.J. Host defence: getting by with a little help from our friends. **Curr. Biol.**, v. 20, p. R806-R808, 2010.
- ISAACS, A.T.; MAWEJJE, H.D.; TOMLINSON, S.; RIGDEN, D. J.; DONNELLY, M.J. Genome-wide transcriptional analyses in Anopheles mosquitoes reveal an unexpected association between salivary gland gene expression and insecticide resistance. **BMC Genomics**, v. 19, n. 1, p. 225, 2018.
- JARMAN, R.G.; et al. Factors Influencing Dengue Virus Isolation by C6/36 Cell Culture and Mosquito Inoculation of Nested PCR-Positive Clinical Samples. **Am J Trop Med Hyg.**, v. 84, n. 2, p. 218–223, 2011.
- JOHNSTON, S.E.; ORELL, P.; PRITCHARD, V. L.; KENT, M.P.; LIEN, S.R.N.; NIEMELÄ, E.; ERKINARO, J.; PRIMMER, C.R. Genome-wide SNP analysis reveals a genetic basis for sea-age variation in a wild population of Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Molecular Ecology**, v. 23, p. 3452–3468, 2014.
- KIJAS, J.W.; HADFIELD, T.; SANCHEZ, M.N.; COCKETT, N. Genome-wide association reveals the locus responsible for four-horned ruminant. **Animal Genetics**, v. 47, p. 258–262, 2016.
- KIJAS, J.W.; ORTIZ, J.S.; MCCULLOCH, R.; JAMES A.; BRICE, B.; SWAIN, B.; TOSSER-KLOPP, G; INTERNATIONAL GOAT GENOME CONSORTIUM. Genetic diversity and investigation of polledness in divergent goat populations using 52 088 SNPs. **Animal Genetics**, v. 44, n. 3, p. 325-35, 2013.
- KNOX, T.B.; KAY, B.H.; HALL, R.A.; RYAN SOURCE, P.A. Enhanced Vector Competence of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from the Torres Strait Compared with Mainland Australia for Dengue 2 and 4. **Journal of Medical Entomology**, v. 40, n. 6, p. 950-956. 2003.
- KUNO, G.; GUBLER, D.J.; VALEZ, M.; OLIVER, A. Comparative sensitivity of three mosquito cell lines for isolation of dengue viruses. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 63, n. 2, p. 279-286, 1985.
- LAIRD, N.M.; LANGE, C. The Fundamentals of Modern Statistical Genetics. New York: Springer, 2011, 226p.
- LEFÈVRE, T.; VANTAUX, A.; DABIRE, K.R.; MOULINE, K.; COHUET, A. Non-genetic determinants of mosquito competence for malaria parasites. **PLoS Pathog.**, v. 9, n. 6, e1003365, 2013.
- LEMAITRE, B.; HOFFMANN, J. The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annu. Rev. Immunol.*, v. 25, p. 697-743, 2007.
- LIN, J. et al. Rab5 Enhances Classical Swine Fever Virus Proliferation and Interacts with Viral NS4B Protein to Facilitate Formation of NS4B Related Complex. **Font. Microbiol.** v.8, n. 1468, 2017.
- LOUNIBOS, L.P.; CONN, J.E. Malaria vector heterogeneity in South America. **Am Entomol.**, v.46, p.238-49, 2000.
- LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. Principais insetos vetores e mecanismos de transmissão das doenças infecciosas e parasitárias. In: J. R. Coura, Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias; Guanabara – Koogan: Rio de Janeiro, 2005.

- LUPLERTLOP, N.; SURASOMBATPATTANA, P.; PATRAMOOL, S.; DUMAS, E.; WASINPIYAMONGKOL, L.; SAUNE, L.; HAMEL, R.; BERNARD, E.; SERENO, D.; THOMAS, F.; et al. Induction of a peptide with activity against a broad spectrum of pathogens in the *Aedes aegypti* salivary gland, following infection with dengue virus. **PLoS Pathog.**, v. 7, n. 1, e1001252, 2011.
- MARTINEZ-TORRES, M. E. **Dengue hemorrágico en crianças**. La Habana: José Martin. p.180,1990.
- MATTINGLY, P.F. Genetical aspects of the *Aedes aegypti* problem: I - Taxonomy and bionomics. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, n.51, p.392-408, 1957.
- MAYRAND, S., PEDERSON, T. Heat Shock Alters Nuclear Ribonucleoprotein Assembly in *Drosophila* Cell. **Molecular and Cellular Biology**, v.3, n.2, p.161-171, 1983.
- MCGINNIS, N.; RAGNHILDSTVEIT, E.; VERAKSA, A.; MCGINNIS, W. A cap 'n' collar protein isoform contains a selective Hox repressor function. **Development**, v. 125, n. 22, p. 4553-4564, 1998.
- MCPARLAND, A.L.; FOLLANSBEE, T.L.; VESENKA, G.D.; PANAITIU, A.E.; GANTER, G.K. Steroid Receptor Isoform Expression in *Drosophila* Nociceptor Neurons Is Required for Normal Dendritic Arbor and Sensitivity. **PLoS ONE**, v. 10, n. 10, e0140785, 2015.
- MEDZHITOV, R.; JANEWAY, C.A., Jr. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. **Science**, v. 296, p. 298-300, 2002.
- MERKLING, S.H.; VAN RIJ, R.P. Beyond RNAi: antiviral defense strategies in *Drosophila* and mosquito **J.Insect Physiology**, v. 59, p. 159–170, 2012.
- MILLER, B.R.; MITCHELL, C.J. Genetic selection of a flavivirus.- refractory strain of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. **Am. J. Trop.Med. Hyg.**, v. 45, n. 4, p. 399-407, 1991.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Diagnóstico rápido nos municípios para vigilância entomológica do *Aedes aegypti* no Brasil – LIRAA : metodologia para avaliação dos índices de Breteau e Predial**. Secretaria de Vigilância em Saúde, Diretoria Técnica de Gestão. Brasília-DF. 2005, 60p.
- MOURA, A.J.F. et al. Vector competence of the *Aedes aegypti* population from Santiago Island, Cape Verde, to different serotypes of dengue virus. **Parasites & Vectors**, v.8, n.114, p.1-9, 2015.
- MUSTAFA, M.F.; RASOTGI, V.; JAIN, S.; et al. Discovery of fifth serotype of dengue virus (DENV-5): A new public health dilemma in dengue control. **Medical Journal Armed Forces India.**, v. 71, n. 1, p. 67-70, 2015.
- NAKAMURA, M.; BALDWIN, D.; HANNAFORD, S.; PALKA, J.; MONTELL, C. Defective Proboscis Extension Response (DPR), a Member of the Ig Superfamily Required for the Gustatory Response to Salt. **The Journal of Neuroscience**, v.22, n.9, p.3463-3472, 2002.
- NENE, V.; WORTMAN, J.R.; LAWSON, D.; HAAS, B.; KODIRA, C.; et al.. Genome sequence of *Aedes aegypti*, a major arbovirus vector. **Science**, v. 316, p. 1718–23, 2007.
- NEVES, D.P. **Parasitologia Dinâmica**. Rio de Janeiro: Editora Atheneu. pp. 485-486, 2009.
- NGOAGOUNI, C. ; KAMGANG, B. ; KAZNJI, M. ; PAUPY, C. ; NAKOUNÉ, E. Potential of *Aedes*

aegypti and *Aedes albopictus* populations in the Central African Republic to transmit enzootic chikungunya virus strains. **Parasites & Vectors**, 10:164, 2017.

OBBARD, D. J. & DUDAS, G. The genetics of host-virus coevolution in vertebrates. **Curr. Opin. Virol.**, v. 8, p. 73-78, 2014.

OCAMPO, C.B.; CAICEDO, P.A.; URSIC, B.R.; et al. Differential Expression of Apoptosis Related Genes in Selected Strains of *Aedes aegypti* with Different Susceptibilities to Dengue Virus. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4 e61187, 2013.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION (PAHO). Reported Cases of Dengue Fever in The Americas by Country or Territory Cumulative Cases Disponível em: <<http://www.paho.org/data/index.php/en/mnu-topics/indicadores-dengue-en/dengue-nacional-en/252-dengue-pais-ano-en.html>>. Acesso em: 20 abr. 2018.

PARK, J.Y.; ZHENG, W.; KIM, D.; CHENG, J.Q.; KUMAR, N.; AHMAD, N.; POW-SANG, J. Candidate tumor suppressor gene SLC5A8 is frequently down-regulated by promoter hypermethylation in prostate tumor. **Cancer Detection and Prevention**, v.31, p.359-365, 2007.

PEARSON, T.A.; MANOLIO, T.A. How to interpret a genome-wide association study. **JAMA**, v. 299, p. 1335-1344, 2008.

POOLE-SMITH, B.K.; HEMME, R.R.; DELOREY, M.; FELIX, G.; GONZALEZ, A.L.; AMADOR, M.; et al. Comparison of Vector Competence of *Aedes mediiovittatus* and *Aedes aegypti* for Dengue Virus: Implications for Dengue Control in the Caribbean. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 9, n. 2, e0003462, 2015.

PURCELL, S.; NEALE, B.; TODD-BROWN, K.; et al. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage disequilibrium analyses. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 81, n. 3, p. 559-575, 2007.

RAMOS, A.M., et al. Design of a high density SNP genotyping assay in the pig using SNPs identified and characterized by next generation sequencing technology. **Plos One**, v.4, p.e6534, 2009.

RESENDE, M. D.V, SILVA, F. F., LOPES, P. S. P., AZEVEDO, C. F. Seleção Genômica Ampla (GWS) via Modelos Mistos (REML/BLUP), Inferência Bayesiana (MCMC), Regressão Aleatória Multivariada (RRM) e Estatística Espacial. **Viçosa: Universidade Federal de Viçosa/ Departamento de Estatística**, 2012. 291 p.

RICHARD, V.; PAOAAFAITE, T.; CAO-LORMEAU. Vector Competence of French Polynesian *Aedes aegypti* and *Aedes polynesiensis* for Zika Virus. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 10, n. 9, e0005024, 2016.

RIGAU-PÉREZ, J.G.; VORNDAM, A.V.; CLARK, G.G. The dengue and dengue hemorrhagic fever epidemic in Puerto Rico. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 64, n. 1, p. 67-74, 2001.

ROCCO, I.M.; KAVAKAMA, B.B.; SANTOS, C.L.S. First Isolation of Dengue 3 in Brazil from an Imported Case. **Rev.Inst. Med. trop. S. Paulo**, v.43, n.1, 2001.

RÜCKERT, C.; et al. Impact of simultaneous exposure to arboviruses on infection and transmission by *Aedes aegypti* mosquitoes. **Nature Communications**, v.8, n.15412, 2016.

SALAZAR, M.I.; *et al.* Dengue virus type 2: replication and tropisms in orally infected *Aedes aegypti* mosquitoes. **BMC Microbiol.**, v. 30, p.7–9, 2007.

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

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

SCHLÖTTERER, C. The evolution of molecular markers — just a matter of fashion?. **Nature Reviews: Genetics**, v. 5, n. 1, p.63-69, 2004.

SCHMIDT, A.; HALL, A. Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch. **Genes Dev.**, 16: 1587-1609, 2002.

SCOTT, T.W. *et al.* Blood-feeding patterns of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) collected in a rural Thai village. **J. Med. Entomol.**, v.30, p.922–927, 1993.

SCOTT, T.W. *et al.* Longitudinal studies of *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) in Thailand and Puerto Rico: blood feeding frequency. **J. Med. Entomol.**, v.37, p.89–101, 2000.

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE. **Plano de contingência para as arboviroses no estado de são paulo.** Secretaria de Estado da Saúde - São Paulo. Grupo Técnico Assessor em Arboviroses no Estado de São Paulo. 2017, 34p. Disponível em: <http://www.saude.sp.gov.br/resources/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica/publicacoes/plano17_contingencia_arboviroses.pdf>. Acesso em: 2 out. 2017.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Boletim Epidemiológico: Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 12. Ministério da Saúde. v. 49, n. 16, 2018.

SETTLES, M.; ZANELLA, R.; MCKAY, S.D.; SCHNABEL, R.D.; TAYLOR, J.F. A whole genome association analysis identifies loci associated with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection status in US holstein cattle. **Anim Genet.**, v.40, p.655–662, 2009.

SEVERSON, D.W.; BROWN, S.E.; KNUDSON, D.L. Genetic and physical mapping in mosquitoes: molecular approaches. **Annu. Rev. Entomol.** v.46, p.183–219, 2001.

SIM, S.; JUPATANAKUL, N.; RAMIREZ, J.L.; KANG, S.; ROMERO-VIVAS, C.M.; MOHAMMED, H.; DIMOPOULOS, G. Transcriptomic Profiling of Diverse *Aedes aegypti* Strains Reveals Increased Basal-level Immune Activation in Dengue Virus-refractory Populations and Identifies Novel Virus-vector Molecular Interactions. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 7, n. 7, e2295, 2013.

SIM, S.; JUPATANAKUL, N.; DIMOPOULOS, G. Mosquito Immunity against Arboviruses. **Viruses**, v. 6, n. 11, v. 4479–4504, 2014.

SINGH, K.R.; PAUL, S.D. **Isolation of Dengue viruses in *Aedes albopictus* cell cultures.** **Bull World Health Organ.**, v. 40, n. 6, p. 982–983, 1969.

SINK, H; REHM, E.J.; RICHSTONE, L.; BULLS, Y.M.; GOODMAN, S. *sidestep* Encodes a Target-

Derived Attractant Essential for Motor Axon Guidance in *Drosophila*. *Cell*, v.105, p.57-67, 2001.

SNELLING, W.M.; ALLAN, M.F.; KEELE, J.W.; KUEHN, L.A.; MCDANELD, T.; SMITH, T.P.; SONSTEGARD, T.S.; THALLMAN, R.M.; BENNETT, G.L. Genome-wide association study of growth in crossbred beef cattle. **Journal of Animal Science**, v. 88, n. 3, p. 837-848, 2010.

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

SU, B.; KARIN, M. Mitogen-activated protein kinase cascades and regulation of gene expression. **Curr Opin Immunol.**, v. 8, n. 3, p. 402-411, 1996.

TANG, W-C.; LIN, R-J.; LIAO, C-L.; LIN Y-L. Rab18 Facilitates Dengue Virus Infection by Targeting Fatty Acid Synthase to Sites of Viral Replication. *Journal of Virology*, v. 88, n. 12, p.6793-6804, 2014.

TAYLOR, J. F. et al. Candidate gene analysis of GH1 for effects on growth and carcass composition of cattle. **Animal Genetics**, v. 29, n. 3, p. 194–201, jun. 1998.

THE WELLCOME TRUST CASE CONTROL CONSORTIUM (TWTCCC). Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. **Nature**. v. 447, n. 7145, p. 661–678, 2007.

TURNER, M.; DÍAZ-MUÑOZ, M.D. RNA-binding proteins control gene expression and cell fate in the immune system. **Natura Immunology**, v. 19, p.120–129, 2018.

TURNER, S.D. qqman: an R package for visualizing GWAS results using Q-Q and manhattan plots. **bioRxiv**, 2014.

TURNER, S.; et al. Quality Control Procedures for Genome Wide Association Studies. *Curr. Protoc. Hum. Genet.*, v. 19, p. -24, 2011.

UENO, M.; et al. Aberrant methylation and histone deacetylation associated with silencing of SLC5A8 in gastric cancer. **Tumour Biol.**, v. 25, n. 3, p. 134-40, 2004.

VIGILÂNCIA AMBIENTAL EM SAÚDE DE BOTUCATU. **Notícias**. Prefeitura de Botucatu, 2018. Disponível em: <<http://www.botucatu.sp.gov.br/http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>>. Acesso em: 20 de abril de 2018.

WANG, W. Y. S. et al. Genome-wide association studies: theoretical and practical concerns. **Nature Reviews Genetics**, v. 6, p. 109–118, 2005.

WEETMAN, D.; WILDING, C.S.; STEEN, K.; MORGAN, J.C.; SIMARD, F.; et al. Association Mapping of Insecticide Resistance in Wild *Anopheles gambiae* Populations: Major Variants Identified in a Low-Linkage Disequilibrium Genome. **PLoS ONE**, v. 5, n. 10, e13140, 2010.

WEISS, B.L.; WANG, J.; AKSOY, S. Tsetse Immune System Maturation Requires the Presence of Obligate Symbionts in Larvae. **PLoS Biol**, v. 9, n. 5, p. e1000619, 2011.

WOLFE, M.D.; et al. Genome-Wide Association and Prediction Reveals Genetic Architecture of Cassava Mosaic Disease Resistance and Prospects for Rapid Genetic Improvement. **The Plant Genome**, v. 9, n. 2, 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Dengue and severe dengue**. 2014. <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>>. Acesso em: 20 mar. 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Dengue control: Epidemiology**. 2017. Disponível em: <<http://www.who.int/denguecontrol/epidemiology/en/>>. Acesso em: 12 set. 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Dengue and dengue haemorrhagic fever**. 2009. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>> . Acesso em: 22 jan. 2014.

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

YAMADA, K.; TAKASAKI, T.; NAWA, M.; KURANE, I. Virus isolation as one of the diagnostic methods for dengue virus infection. **J. Clin. Virol.** v. 24, n. 3, p. 203-209, 2002.

YEAGER, M.; ORR, N.; HAYES, R.B. et al.: Genome-wide association study of prostate cancer identifies a second risk locus at 8q24. **Nat. Genet.**, v.39, p.645-649. 2007.

YEN, P.S., JAMES, A., LI, J-C, CHEN, C-H, FAILLOUX, A-B. Synthetic miRNAs induce dual arboviral-resistance phenotypes in the vector mosquito *Aedes aegypti*. **Communications Biology**, v. 1, n.11, p.1-11, 2018.

ZANELLA, R.; CASAS, E.; SNOWDER, G; NEIBERGS, H. L. Fine Mapping of Loci on BTA2 and BTA26 Associated with Bovine Viral Diarrhea Persistent Infection and Linked with Bovine Respiratory Disease in Cattle. **Front Genet.**, v.40, n.5, p.655-662, 2011.

ZENG, P.; et al. Statistical analysis for genome-wide association study. **J. Biomed. Res.**, v. 29, n. 4, p. 285–297, 2015.

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