UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

# **PRESENÇA DE *Ascogregarina* spp. EM POPULAÇÕES DE *Aedes* (*Stegomyia*) spp. NO ESTADO DE SANTA CATARINA E ASPECTOS DA INTERAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO EM *Aedes aegypti*.**

THIAGO NUNES PEREIRA

Orientadora: Profª. Drª. Onilda Santos da Silva
Co-orientadora: Profª. Drª. Josiane Somariva Prophiro

Porto Alegre
Agosto/ 2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

# PRESENÇA DE *Ascogregarina* spp. EM POPULAÇÕES DE *Aedes* (*Stegomyia*) spp. NO ESTADO DE SANTA CATARINA E ASPECTOS DA INTERAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO EM *Aedes aegypti*.

Thiago Nunes Pereira
Licenciado em Ciências Biológicas

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Microbiologia do controle biológico.

Orientador: Profª Drª Onilda Santos da Silva
Co-orientadora: Profª Drª Josiane Somariva Prophiro

Porto Alegre, Rio Grande do Sul - Brasil
Agosto/2015

CIP - Catalogação na Publicação

Nunes Pereira, Thiago
PRESENÇA DE Ascogregarina spp. EM POPULAÇÕES DE Aedes (Stegomyia) spp. NO ESTADO DE SANTA CATARINA E ASPECTOS DA INTERAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO EM Aedes aegypti. / Thiago Nunes Pereira. -- 2015.
56 f.

Orientadora: Onilda Santos da Silva.
Coorientadora: Josiane Somariva Prophiro.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2015.

1. Aedes aegypti. 2. Aedes albopictus. 3. Controle biológico e quimico. I. Santos da Silva, Onilda , orient. II. Somariva Prophiro, Josiane, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

“O jovem que deseja ser cientista – e à ciência dedicar todo o seu tempo e amor – tem pelo menos três certezas: a de que morrerá um dia (como todo mundo), a de que não ficará rico (como quase todo mundo) e a de que se divertirá muito (como pouca gente) ”.

Newton Freire-Maia (1918-2003)

## AGRADECIMENTOS

Aos estagiários (as) do Laboratório de Imunoparasitologia (IMPAR - UNISUL), Joice Guilherme Oliveira, Guilherme Werner Dandolini, Franciny Antunes, Roger Porfirio, Alex Silveira e Paula Variza pela amizade, ajuda nas coletas e experimentos.

Aos amigos do Setor de Parasitologia (URFGS), Keli Cristiane Barroso, Vinicius José Maschio, Guilherme Liberato da Silva, João Luiz da Rosa, Alessandra Bittencourt de Lemos e Ana Maria Antonello pelas conversas, troca de saberes, ajuda nos experimentos, além dos tours gastronômicos.

A minha família por todo amor, apoio e compreensão.

Ao Prof. Dr. René Blazius por toda ajuda na parte teórica e prática sobre biologia molecular.

A Profª Drª Onilda Santos da Silva pela orientação, paciência e principalmente pela amizade durante todo esse processo de aprendizagem e crescimento pessoal.

A Profª Drª Josiane Somariva Prophiro pelo incentivo, apoio, e fundamentalmente por acreditar em minha capacidade (não existem palavras para expressar minha gratidão...).

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq) pela concessão da bolsa.

Muito obrigado!

**PRESENÇA DE *Ascogregarina* spp. EM POPULAÇÕES DE *Aedes* (*Stegomyia*) spp. NO ESTADO DE SANTA CATARINA E ASPECTOS DA INTERAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO EM *Aedes aegypti*.**

Autor: Thiago Nunes Pereira
Orientadora: Profª Drª Onilda Santos da Silva
Co-orientador: Profª Drª Josiane Somariva Prophiro

## RESUMO

*Ascogregarina taiwanensis e Ascogregarina culicis* são protozoários que parasitam *Aedes albopictus* e *Aedes aegypti*, respectivamente, e são conhecidos por interferir fisiologicamente em seus hospedeiros. Alguns estudos têm relatado a distribuição destes protozoários em diferentes regiões do globo, entretanto, no Brasil, relatos destes protozoários são raros. O objetivo deste trabalho foi verificar a presença de *Ascogregarina* spp. em *Ae. albopictus* e *Ae. aegypti* no estado de Santa Catarina e a possível influência de seu parasitismo aliado aos inseticidas temephos e ao óleo de neem *Azadirachta indica*. Os resultados revelaram a presença de *A. taiwanensis* em larvas de *Ae. albopictus* nas cidades de Capivari de Baixo, Laguna e Gravatal. Somente em Tubarão foram encontradas as duas espécies de mosquitos albergando este protozoário. Com relação aos bioensaios químicos onde se testou insetos parasitados ($^{+}$) e não parasitados ($^{-}$) por *A. taiwanensis*, as $CL_{50}$ foram 0.025 mg/L ($^{+}$) e 0.063 mg/L ($^{-}$) para temephos e 0,815 mg/L ($^{+}$) e 1.812 mg/L ($^{-}$) para óleo de *A. indica*. Os resultados demonstram que houve diferença significativa entre os valores de mortalidade em relação ao grupo controle com $P<0.001$. Divergindo dos relatos na literatura cientifica, observou-se infecção por *A. taiwanensis* em *Ae. aegypti*, porém, a transmissão vertical em laboratório foi observada somente em *Ae. albopictus*. Este é o primeiro registro de *A. taiwanensis* para Santa Catarina e o terceiro para o Brasil. A utilização dessa espécie de gregarina associada a inseticidas poderia ser um método interessante para futuros estudos de controle de *Ae. aegypti*.

[1]Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (56 p.) Agosto, 2015.

**PRESENCE OF *Ascogregarina* spp. IN *Aedes* (*Stegomyia*) spp. POPULATIONS IN SANTA CATARINA STATE AND ASPECTS OF PARASITE-HOST INTERACTION IN *Aedes aegypti*.**

Author: Thiago Nunes Pereira

Advisor I: Profª Drª Onilda Santos da Silva

Advisor II: Profª Drª Josiane Somariva Prophiro

## ABSTRACT

*Ascogregarina taiwanensis* and *Ascogregarina culicis* are protozoa parasites of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*, respectively and these parasites are able to interfere physiologically in their hosts. Some studies have reported the distribution of these protozoa in different parts of the world, however in Brazil, reports about these protozoa are rare. The aim of this study was to verify the presence of *Ascogregarina* spp. in *Ae. albopictus* and *Ae. aegypti* in Santa Catarina and the possible influence of its parasitism with insecticide temephos and the *Azadirachta indica* oil. The results demonstrated the presence of *A. taiwanensis* in *Ae*. *albopictus* larvae in the cities of Capivari de Baixo, Gravatal and Laguna. Only in the city of Tubarao the two species of mosquitoes have been found harbouring *Ascogregarina taiwanensis*. Regarding to bioassays evaluating parasite ($^{+}$) and non-parasited ($^{-}$) mosquitoes by *A. taiwanensis*, the $LC_{50}$ 0.063 mgL ($^{+}$) and 0.025 mgL ($^{-}$) for temephos and 0.815 mgL($^{+}$) and 1,812 mgL ($^{-}$) for *A. indica* oil. The results show that there was significant difference between the mortality values comparing to the control group with $P<0.001$. Diverging from scientific literature reports, infection of this gregarine was observed, both in field and laboratory reared *Ae. aegypti* populations. However, the vertical transmission of *A. taiwanensis* could be observed only in *Ae. albopictus*. This is the first record of *A. taiwanensis* in Santa Catarina and the third in Brazil. The use of this species of gregarine in association with insecticides this could be an interesting method for future studies about control of *Ae*. *aegypti*.

[1]Master of Science Thesis in Agricultural and Environmental Microbiology – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (56 p.)

**SUMÁRIO**

**1 INTRODUÇÃO** ..... 1
**2 OBJETIVOS** ..... 3
2.1 Geral ..... 3
2.2 Específicos ..... 3
**3 REVISÃO DA LITERATURA** ..... 4
3.1 Diptera: Culicidae ..... 4
3.2 Biologia de Ae. aegypti e *Ae*. albopictus. ..... 6
3.3 Arbovirus transmitidos por *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*. ..... 7
3.4 Métodos de controle ..... 10
3.4.1 Controle químico por inseticidas sintéticos. ..... 10
3.4.2 Controle químico de origem botânica ..... 11
3.4.3 Controle biológico ..... 12
4.4 Ascogregarina ..... 12
4.4.1 Ciclo de vida de Ascogregarinas ..... 13
4.4.2 Ascogregarinas no controle biológico ..... 15
**5 MATERIAL E METODOS** ..... 17
5.1 Área de estudo ..... 17
5.2 Coletas e identificação dos mosquitos ..... 17
5.3 Verificação de parasitismo ..... 18
5.4 Extração do DNA genômico de *Ascogregarina* sp ..... 19
5.5 Amplificação por PCR ..... 19
5.6 Transmissão de *A. taiwanensis* para larvas de *Ae. aegypti* ..... 20
5.7 Transmissão vertical de *A. taiwanensis* em *Ae. aegypti* ..... 20
5.8 Bioensaios com inseticidas ..... 21
5.9 Analise estatística ..... 22
**6 RESULTADOS E DISCUSSÂO** ..... 23
6.1 *Ascogregarina* spp. em populações silvestres de *Ae. aegypti* e de *Ae. albopictus*. ..... 23
6.2 Identificação e caracterização das espécies de *Ascogregarina* spp. encontradas em Tubarão, Santa Catarina. ..... 24
6.3 Observação do parasitismo de *A. taiwanensis* em hospedeiro não natural ..... 24

6.4 Verificação da transmissão vertical do parasito *A. taiwanensis* em *Ae. aegypti*..... 27
6.5 Avaliação da influência do parasitismo de *A. taiwanensis* na influência da susceptibilidade larval de *Ae. aegypti* quando associada ao temephos e *A. indica*. ..... 28
**7 CONCLUSÕES** ..... 32
**8 REFERÊNCIAS**..... 33

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ocorrência de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictos* entre os anos 1960 e 2014.....5

Figura 2 - Ilustração do ciclo de biológico de *Aedes* sp. representando as seguintes fases: ovo, larva, pupa e adulto.....7

Figura 3 - Áreas onde a dengue tem sido reportada ou que estão sob-risco desta doença.....8

Figura 4 - Ilustração do ciclo silvestre e urbano da febre amarela.....9

Figura 5 - Ilustração do ciclo reprodutivo assexuado (A) e sexuado (B) de *A. taiwanensis* quando parasitando *Ae. albopictus.*.....15

Figura 6 - Mapa do Brasil com destaque na região sul de Santa Catarina e nas cidades de estudo.....17

Figura 7 - Ilustração do oitavo seguimento abdominal de *Ae. aegypti* e Ae. *albopictus*.....18

Figura 8 - (A) Larva *Aedes* sp. silvestre. (B) Intestino dissecado de larva de Larva *Aedes* sp. silvestre parasitado em aumento de 10 x em microscópio óptico com presença de trofozoítos.....18

Figura 9- Ilustração dos modelos de bioensaio para os inseticidas.....22

Figura 10 - (A) Larva de *Ae. albopictus* e (B) larva de *Ae. aegypti* parasitadas. Realce nas escalas de pente do oitavo segmento abdominal e nos parasitos..... 23

Figura 11 - Imagem *A. taiwanensis*. Aumento de 10x e 20x em microscópio de contraste de fase.....25

Figura 12 - Fotografia de gel de agarose 2% visualizado em UV.....26

Figura 13 - Comparação da susceptibilidade de larvas de *Ae. aegypti* a uma solução contendo óleo de *A. indica*, quando parasitados e não parasitados por *A. taiwanensis.*.....28

Figura 14 - Comparação da susceptibilidade de larvas de *Ae. aegypti* a uma solução contendo temephos quando parasitados e não parasitados por *A. taiwanensis.*.....29

# 1 INTRODUÇÃO

*Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (Linnaeus, 1762) e *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* (Skuse, 1894) (Diptera: Culicidae) são espécies de mosquitos mundialmente conhecidas uma vez que estão diretamente envolvidas na transmissão de agentes de doenças como: febre amarela (Gubler, 2002), dengue (Gubler, 2011), chikungunya (Staples e Fischer, 2014), além de outros agentes de doenças infecciosas (Tchankouo-Nguetcheu et al., 2010).

Estas doenças têm causado grande impacto na saúde pública mundial e vem aumentando consideravelmente em várias partes do mundo, em especial devido às condições ambientais que facilitam a distribuição e dispersão destas espécies de mosquitos (Marques 2014). A Organização Mundial da Saúde (OMS,1998) estabelece estratégias para o controle de populações destes vetores. Dentre estas, sugere a utilização de produtos químicos e biológicos integrados a partir de programas de manejo ambiental capazes de eliminar as formas larvais e de insetos adultos.

Entretanto, existem vários relatos de que o uso frequente de inseticidas químicos convencionais promove a seleção de populações resistentes (Carvalho et al., 2004; Prophiro et al., 2011). Além disso, geram efeitos adversos sobre organismos não alvo, elevado custo de aplicação e danos ambientais, por enquanto grande parte dos inseticidas aplicados não são biodegradáveis (Blair et al., 2000).

Em contrapartida, os produtos químicos de origem botânica são amplamente reconhecidos por sua diversidade bioquímica, bem como por sua considerável aplicação na área farmacêutica (Penido et al., 2005). Estes constituem uma fonte alternativa de controle, pois contêm uma série de químicos bioativos. Dessa forma, tem-se ressaltado a busca e o desenvolvimento de substâncias derivadas de plantas para controle de mosquitos (Rahuman et al.,2008; Silva et al., 2008; Kanis et al., 2013). O controle biológico também é considerado uma alternativa ao uso de inseticidas químicos e é um fenômeno que acontece espontaneamente na natureza. DeBach (1968) definiu o controle biológico como “a ação de parasitoides, predadores e patógenos na manutenção da densidade de outro

organismo a um nível mais baixo ...'' Este método de controle é vantajoso, pois emprega organismos que possuem especificidade ao seu alvo, não polui o ambiente e, até o momento, apresenta menor risco de selecionar indivíduos resistentes (Owuama, 2001).

Entre os métodos relatados existem os reguladores de crescimento, inibidores da síntese de quitina e modificadores de comportamento que podem ser gerados por vírus, bactérias, fungos, protozoários, entre outros (Hoffmann et al., 2011; Otta et al., 2012; Leles et al., 2012; Lu et al., 2012).

Dentre os protozoários, alguns representantes de *Ascogregarina* (Apicomplexa: Lecudinidae) apresentam alta prevalência em populações naturais de algumas espécies de mosquitos vetores (Blackmore et al., 1995). Pesquisas avaliando a influência destes parasitos sobre insetos demonstram que sua patogenicidade e sua especificidade podem variar geograficamente (Sulaiman, 1992). Por exemplo, é conhecido que algumas cepas asiáticas de *Ascogregarina* são patogênicas para *Ae. aegypti* (Sulaiman, 1992), enquanto que outra cepa da mesma espécie oriunda dos Estados Unidos (Barrett, 1968) é considerada não patogênica.

No Brasil, pouco se conhece sobre a presença de *Ascogregarina* sp. em mosquitos, bem como sua distribuição aos vetores locais. Dessa forma, é importante verificar se existem populações de *Ae. aegypti* e de *Ae. albopictus* infectadas com *Ascogregarina* spp. também no sul do Brasil e quais seriam as espécies prevalentes. É importante ainda, averiguar se populações de *Ae. aegypti* infectadas com *Ascogregarina* sp. apresentariam diversidade na resposta de susceptibilidade a inseticida químico sintético e de origem botânica. Os resultados poderão contribuir para um maior conhecimento sobre a distribuição destes protozoários no Brasil, bem como possíveis estratégias de controle de mosquitos vetores.

# 2 OBJETIVOS

## 2.1 Geral

Avaliar o parasitismo de *Ascogregarina* spp. em populações de *Aedes aegypti* e de *Aedes albopictus*.

## 2.2 Específicos

Detectar a presença de *Ascogregarina* spp. em populações de campo de *Ae. aegypti* e de *Ae. albopictus*, em Santa Catarina;

Identificar e caracterizar, por métodos morfológicos e biomoleculares as espécies de *Ascogregarina* encontradas;

Verificar a possibilidade de parasitismo por *Ascogregarina* spp. em hospedeiro não especifico;

Verificar a transmissão vertical do parasito em *Ae. aegypti*;

Avaliar a influência da presença do parasito em *Ae. aegypti* na susceptibilidade larval, quando expostos ao temephos e ao óleo de *Azadirachta indica*.

# 3 REVISÃO DA LITERATURA

## 3.1 Diptera: Culicidae

Os mosquitos pertencem à ordem Diptera e à Família Culicidae, a qual possui 3.610 espécies distribuídas em 175 gêneros. Destas, aproximadamente 150 espécies pertencentes aos gêneros *Anopheles, Aedes, Haemagogus, Sabethes* e *Culex* estão diretamente envolvidas na transmissão de agentes patogênicos ao ser humano e outros vertebrados (Rueda, 2008).

Estes dipteros podem transmitir agentes de doenças como plasmódios, arbovírus (febre amarela, dengue, chickungunya) além de filarias e outros agentes virais pouco conhecidos (Hayes, 2009; Tchankouo-Nguetcheu et al., 2010). Atualmente as espécies *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*, apresentam grande importância na transmissão de arbovírus, especialmente do vírus da dengue, chickungunya e mais recentemente do zika virus ( Gubler, 2011; Hay et al., 2013; OMS, 2015).

Os primeiros relatos de *Ae. aegypti* em terras brasileiras foram feitos em 1898, por Lutz, e em 1899, por Ribas. Acredita-se que esse vetor foi introduzido nas Américas a bordo de navios vindos da Europa que cruzavam o Atlântico durante as primeiras explorações e colonizações europeias ao Novo Mundo (Bisset, 2002).

Por apresentar estreita associação com o homem, esta espécie é essencialmente urbana e encontrada em maior abundância em cidades, vilas e povoados (Powell e Tabachinick, 2013). Entretanto, no Brasil, México e Colômbia, já foi localizada em zonas rurais, provavelmente transportados de áreas urbanas em vasos domésticos, onde se encontravam ovos e larvas (OPAS,1991). Na década de 30, esta espécie de mosquito ocupava uma pequena área do País e em 1940, o Brasil iniciou uma campanha para seu controle em escala hemisférica no intuito de combater a febre amarela (Guedes, 2012).

*Aedes albopictus* é uma espécie com extraordinária capacidade de colonização e é originária da selva tropical do Sudeste Asiático (Surtees, 1967). Na atualidade sabe-se que esta espécie está presente em todos os continentes, exceto na Antártida (Hawley, 1988; Lounibos, 2002; Kraemer et

al.,2015).

Ao contrário do *Ae. aegypti*, esta espécie se espalha nos ambientes urbano, suburbano e rural, não dependendo de locais de grande concentração humana (Consoli e Oliveira, 1994; Delatte et al., 2008). Seu sucesso como invasor parece resultar de vários aspectos de sua biologia, como: adaptação a diferentes habitats, hábitos alimentares ecléticos, adaptação a diferentes condições climáticas e capacidade de viver em ambientes antrópicos (Focks et al., 1994; Tatem et al., 2006).

Embora estas espécies possam apresentar hábitos e aspectos ecológicos diferenciados, acredita-se que com a expansão urbana, ambas as espécies estão cada vez mais próximas, aumentando assim os riscos à saúde pública. Em um estudo recente, Kraemer et al., (2015) mapearam as ocorrências globais (**Fig. 1**) de adultos, pupas, larvas e ovos de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* entre os anos de 1960 e 2014.

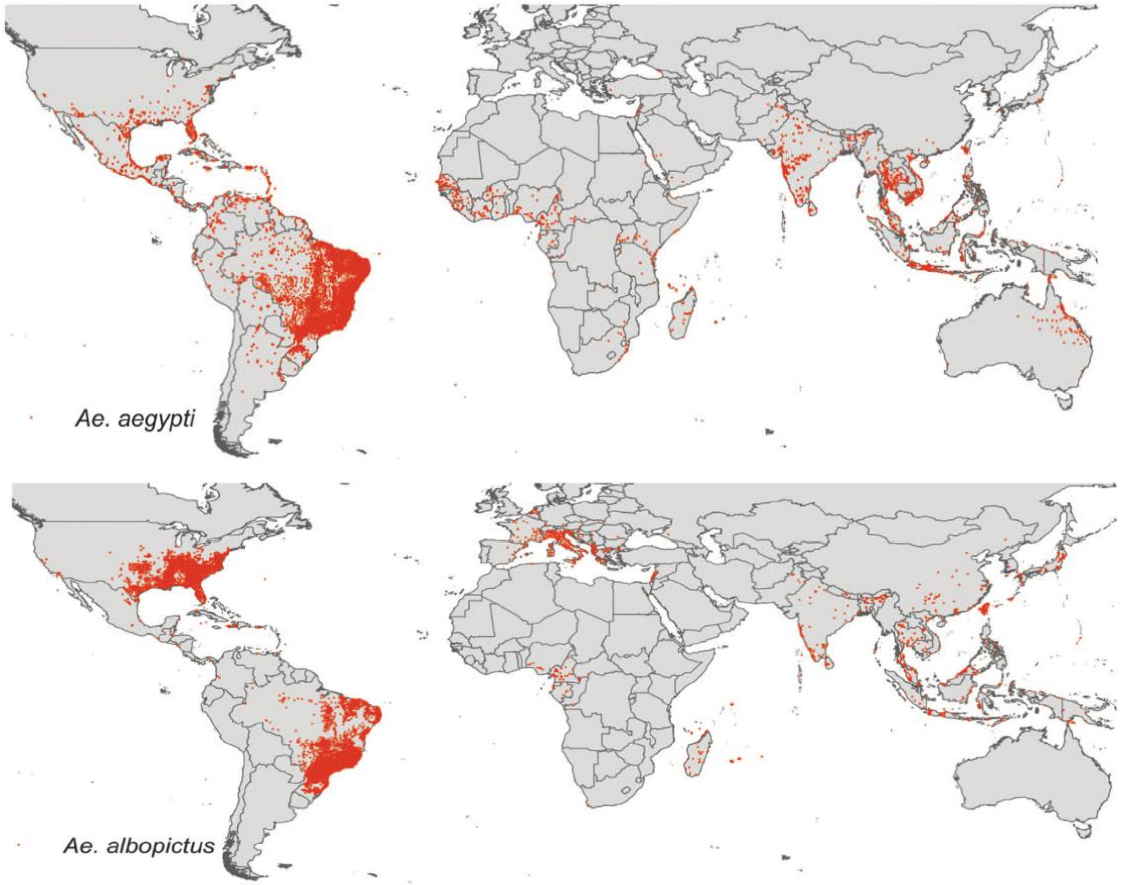


Figura 1 - Ocorrência de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* entre os anos 1960 e 2014. (Kraemer et al., 2015).

## 3.2 Biologia de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*.

*Aedes aegypti* e *Ae. albopictus* possuem ciclo de vida muito semelhante, correspondente as seguintes fases: ovo, larva, pupa e adultos (**Fig. 2**). Os ovos, que medem aproximadamente 1 mm de comprimento, apresentam contorno alongado e fusiforme e são depositados individualmente pela fêmea nas paredes internas dos depósitos que servem como criadouros.

As larvas são aquáticas e possuem quatro estágios larvais e sua duração depende da temperatura, disponibilidade de alimento e densidade das larvas no criadouro (Forattini, 1997).

As pupas ocorrem também na água, não se alimentam e é nesta fase que ocorre a metamorfose para dar origem aos adultos. Esses são alados, possuem pernas e antenas longas e dimorfismo sexual. Os machos possuem as antenas plumosas e uma peça bem visível denominada de clasper (que possui a função de agarrar a fêmea durante o ato sexual). As fêmeas possuem antenas pilosas e um gonotrema, de onde uma abertura distal da vagina, comunicando-a com o meio externo (Consoli e Oliveira, 1994).

Machos e fêmeas de ambas as espécies se alimentam de néctar para o metabolismo básico, e, em adição, as fêmeas se alimentam de sangue para o desenvolvimento dos ovos. O repasto sanguíneo ocorre geralmente no período vespertino ou no crepúsculo, período em que também depositam seus ovos (Nelson, 1986; Powell e Tabachnick, 2013).

Para o desenvolvimento das larvas, *Ae. aegypti* pode utilizar recipientes do domicílio ou peridomicílio como tanques de armazenamento de água e vasilhames temporários, potes, barris, pneus usados, latas, garrafas e vasos de plantas (Powell e Tabachnick, 2013).

As fêmeas desta espécie de mosquito têm a capacidade de fazer ingestões múltiplas de sangue durante um único ciclo gonadotrófico, o que amplia a sua possibilidade de se infectar e de transmitir agentes virais (Scott et al., 1993). Além disso, em um mesmo ciclo de oviposição a fêmea pode colocar os ovos em vários recipientes (Nelson 1986), garantindo a sobrevivência e a dispersão de sua prole, o que tem sido chamado de saltos de oviposição (Reiter et al., 1991).

As fêmeas de *Ae. albopictus* podem ovipositar em criadouros artificiais

ou naturais. Os recipientes naturais como ocos de árvores e bromeliáceas parecem estar entre os habitats onde suas larvas são mais frequentemente encontradas (Juliano, 2002; Delatte et al., 2008).

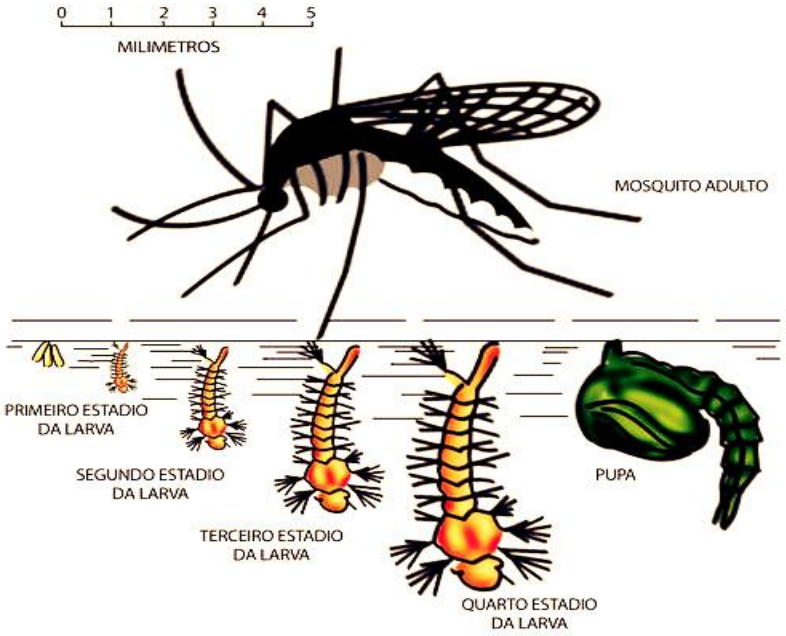


Figura 2 - Ilustração do ciclo de biológico de *Aedes aegypti*. Fonte: https://deleonscarlett.wordpress.com/2012/11/25/ciclo-de-vida-del-aedes-aegypti-2/editado-1-7/

## 3.3 Arbovirus transmitidos por *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*.

A dengue é considerada a mais importante arbovirose que afeta o homem, constituindo-se um sério problema de saúde pública no mundo. A Organização Mundial da Saúde (OMS) destaca que a cada ano, mais de um bilhão de pessoas são infectadas pelo vírus da dengue. Esta organização ressalta ainda a importância de manter-se o alerta e a necessidade de dar continuidade as ações preventivas no controle de insetos vetores, pois mais de um milhão de pessoas morrem anualmente (OMS, 2014).

A dengue é causada por um arbovírus pertencente ao gênero *Flavivirus* (Familia Flaviviridae), que se mantém na natureza pela multiplicação em espécies de mosquitos hematófagos, principalmente do gênero *Aedes.* Até pouco tempo sabia-se da existência de quatro sorotipos DENV-1, DENV2, DENV-3 E DENV-4 os quais podem causar tanto a forma clássica, quanto a forma mais grave da doença (Barth, 2000). Em 2013 uma nova cepa (DENV-5) foi descrita na Malásia (Mustafa et. al., 2015). A área geográfica mundial

em que ocorre transmissão de dengue tem-se expandido nos últimos anos (**Fig. 3**), com especial atenção às regiões tropicais e subtropicais do globo.

Figura 3: Áreas onde a dengue tem sido reportada ou que estão sob risco de dengue. Fonte: Organização Mundial da Saúde (2012). International Travel and Health Interactive map. Disponível em: <http://apps.who.int/ithmap/>. Acesso em: 10 agosto. 2015.

A febre amarela foi a grande protagonista na história sanitária do Brasil. Epidemiologicamente, esta doença pode se apresentar sob duas formas distintas (**Fig. 4**): Febre Amarela Silvestre, no qual o homem susceptível é inserido acidentalmente no ciclo de transmissão quando entra em contato com áreas florestais - macaco → mosquito silvestre → homem e; Febre Amarela Urbana, cujo ciclo de transmissão é: homem → *Ae. aegypti* → homem, (Brasil, 2008; Bicca-Marques e Freitas, 2010).

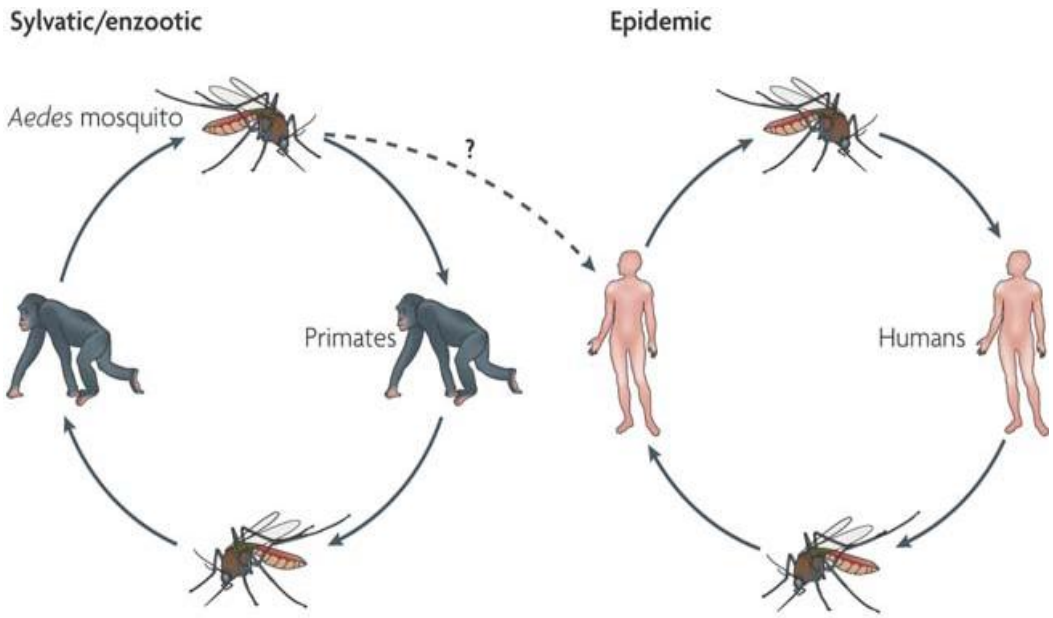


Figura 4 – Ilustração do ciclo silvestre e urbano da febre amarela. Fonte: https://cienciaetec.files.wordpress.com/2013/06/animal-health-figura-2-cicloepidemiolc3bgicos-silvestre-e-urbano-dafebre-amarela-no-brasil-2009.jpg

Os pacientes mais acometidos pela febre amarela silvestre são geralmente indivíduos jovens, do sexo masculino, realizando atividades agropecuárias bem como ecoturistas que se embrenham nas matas sem vacinação prévia (Vasconcelos, 2000).

A manifestação clínica da doença pode ser assintomática ou com sintomas leves ou moderados, ou grave e maligno. A mortalidade varia entre 5,0 % e 10,0 %, atingindo 60,0 % nas formas mais graves (Vasconcelos et al., 2003). Sua prevenção dá-se pelo uso da vacinação antiamarílica mediante aplicação da vacina 17D que tem validade de 10 anos (Robertson,1993).

Chikungunya é um arbovírus pertencente ao gênero *Alphavirus* (Família Togaviridae), que pode ser transmitido por *Ae. aegypti* e por *Ae. albopictus*. A infecção decorrente por este arbovirus, geralmente leva a sintomas como febre, erupção cutânea e incapacitante artralgia (Schilte et al., 2012). A palavra chikungunya é usada tanto para o vírus como para a doença e significa "andar curvado", no dialeto Africano (Powers et al., 2000).

Na Ásia e na região do Oceano Índico os principais vetores do vírus chikungunya são *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*. Os seres humanos servem de reservatório do vírus durante períodos epidêmicos e fora desses períodos, os principais reservatórios são macacos, roedores, pássaros e outros

vertebrados (Jeandel et al., 2004).

Atualmente, o vírus circula em alguns países da África e da Ásia. De acordo com a OMS (2015), desde 2004 já foi identificado em 19 países. Em 2010, houve relato de casos na Índia, Indonésia, Mianmar, Tailândia, Ilhas Maldivas, Ilhas Reunião e Taiwan. França e Estados Unidos também registraram casos em 2010, mas sem transmissão autóctone.

No Brasil, os três primeiros casos de chikungunya, todos importados, foram identificados em 2010. Em 2015, até a nona semana epidemiológica, foram notificados 2.103 casos autóctones suspeitos de febre de chikungunya. Destes, 1.049 casos foram confirmados, sendo três por critério laboratorial e 1.046 por critério clínico-epidemiológico; 1.054 casos continuam em investigação (MS, 2015).

O zika vírus é também um arbovírus que, como a dengue, pertence ao gênero *Flavivirus.* Foi isolado pela primeira vez em 1947 a partir de um macaco do gênero *Rhesus*, na floresta Zika do Uganda (Dick et al., 1952). Casos humanos esporádicos foram relatados a partir da década de 1960 na Ásia e na África. O primeiro grande surto relatado ocorreu em 2007 na ilha de Yap, Estados Federados da Micronésia (Duffy et al., 2009). No Brasil foi registrado em 2015 e até o momento os casos registrados encontram-se em São Paulo, Bahia, Maranhão, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Sergipe e Paraíba (OMS, 2015).

Além destas arboviroses, há outras não menos importantes, mas com menor incidência humana. Por exemplo, existem vários outros gêneros de arbovírus, predominantes em regiões tropicais, em florestas de clima quente e úmido, os quais são fatores necessários para a formação de inúmeros criadouros de mosquitos (OMS, 2014).

## 3.4 Métodos de controle

### 3.4.1 Controle químico por inseticidas sintéticos.

Uma das principais estratégias para conter vetores que transmitem arbovírus ao homem é o uso de inseticidas químicos. No entanto, nos últimos anos, alguns destes produtos têm levado à resistência fisiológica de importantes vetores como, por exemplo, *Ae. aegypti* (Liu et al., 2011; Dusfour

et al., 2011; Koffi et al., 2012).

Segundo Valle e Galvani (2009) o monitoramento contínuo da resistência é necessário para o controle adequado de *Ae. aegypti* e, consequentemente da transmissão do vírus da dengue. Para os autores a aplicação de inseticidas deve ser restrita à incidência da dengue, reduzindo assim a resistência e aumentando o tempo de vida de um inseticida.

Contudo, apesar dos importantes avanços alcançados no desenvolvimento de métodos alternativos, os inseticidas químicos continuam sendo uma das principais ferramentas dos programas integrados de controle (Rose, 2001). O inseticida temephos é um organofosforado amplamente utilizado no controle de larvas de *Ae. aegypti*. Todavia esse inseticida não é específico para insetos, podendo causar efeitos tóxicos em outros organismos não-alvo, como o homem e animais domésticos, além de contaminação de água, solo e ar (Hamm et al., 1998; Carvalho et al., 2004; Silva et al., 2008). Esse fato destaca a necessidade da introdução de alternativas biológicas em programas de controle de vetores da dengue, uma vez que podem superar os problemas de resistência, proporcionar ausência do efeito residual e menor custo na aplicação (Brancco et al., 1997; Kusumawathie et al., 2008).

### 3.4.2 Controle químico de origem botânica

Nos últimos anos, esforços têm sido feitos na busca de produtos naturais derivados de plantas, como alternativa aos inseticidas químicos sintéticos convencionais (Quesada-Moraga et al., 2006). Inseticidas biológicos são muitas vezes apontados como sendo mais seguros e mais sustentáveis (Thomas e Read, 2007).

O Neem, *Azadirachta indica* A. Juss, família Meliaceae, tem chamado a atenção de muitos pesquisadores por suas propriedades medicinais (Schumacher, 2011). Esta planta tem como principal composto a *azadiractina*, um tetranortriterpenoide isolado da semente. Este composto constitui um importante princípio ativo do ponto de vista entomológico (Mordue et al., 2000).

Todos os inseticidas naturais à base Neem são produzidos por extração da planta e são biodegradáveis. Estes possuem ação repelente,

antialimentar, reguladora de crescimento e inseticida. Além disso, já se relatou sua atividade acaricida, fungicida e nematicida (Martinez, 2003; Vacari et al., 2004; Maciel et al., 2010).

Os produtos químicos de origem botânica são amplamente reconhecidos por sua diversidade química, bem como por sua considerável aplicação (Penido et al., 2005). Estes propiciam uma fonte alternativa de controle, pois contêm uma série de bioativos químicos. Assim, vários trabalhos têm ressaltado a busca e o desenvolvimento de novas substâncias derivadas de plantas para controle de mosquitos (Rahuman et al*.,* 2008; Silva et al., 2008; Kanis et al., 2013).

### 3.4.3 Controle biológico

O controle biológico foi definido por DeBach (1968) como “a ação de parasitoides, predadores e patógenos que interferem na manutenção da densidade populacional de outro organismo”.

Pesquisas sobre controle biológico vêm crescendo com o objetivo de minimizar danos ambientais que os inseticidas comuns podem causar. Apesar de algumas restrições, apresenta vantagens significativas como segurança humana e baixo desenvolvimento de resistência (Polanczyk et al., 2003).

Como bons exemplos destacam-se patógenos como vírus, bactérias, fungos e protozoários que podem atuar como reguladores de crescimento; inibidores da síntese de quitina e modificadores de comportamento (Hoffmann et al., 2011; Otta et al., 2012; Leles et al., 2012; Lu et al., 2012). Dentre esses, algumas espécies de *Ascogregarina* (Apicomplexa: Ascogregarinidae) apresentam alta prevalência em populações naturais de determinadas espécies de mosquitos vetores (Blackmore et al., 1995).

## 4.4 Ascogregarina

O Filo Apicomplexa é representado por protozoários parasitos intracelulares obrigatórios, denominados de gregarinas (Morrison, 2009). Até o momento, 10 espécies foram descritas parasitando mosquitos (Beier e Craig, 1985; Chen, 1999; Lantova et al., 2014). O gênero *Ascogregarina* (Syn. *Monocystis*, Lankesteria, *Ascocystis*) engloba as gregarinas asseptadas que

parasitam mosquitos e flebotomíneos (Chen, 1999).

Embora a maioria das gregarinas seja muitas vezes considerada como não-patogênica para seus hospedeiros naturais (Henry, 1981), sabe-se que o seu impacto sobre insetos infectados nem sempre é claro (Clopton, 1995). Além disso, a patogenicidade destas gregarinas varia geográfica e especificamente (Sulaiman, 1992). Cerca de 250 gêneros e 1.650 espécies de gregarinas estão identificados até o momento. No entanto, estima-se que ainda exista uma gama de espécies a ser descritas em invertebrados (Clopton, 2000; Hausmann et al., 2003).

A maioria dos registros referentes a gregarinas tem sido principalmente para insetos, incluindo uma ampla variedade de aquáticos, muitos coleópteros e dipteros (Voty'pka et al., 2009).

### 4.4.1 Ciclo de vida de Ascogregarinas

Apesar de alguns estudos apresentarem dados sobre a bionomia e o potencial das gregarinas como agentes de controle biológico para mosquitos do gênero *Aedes*, ainda pouco se sabe sobre seu papel no controle destes mosquitos (McCray et al., 1970; Sulaiman, 1992).

O ciclo de vida de representantes de *Ascogregarina* apresentado neste trabalho é baseado na relação entre *Ascogregarina taiwanensis* (Lien and Levine) e *Ae. albopictus* (**Fig.5**). Este ciclo é semelhante em quase todas as espécies e inicia pela ingestão dos oocistos maduros por um hospedeiro invertebrado (Chen et al., 1997a). O ciclo assexuado (esporogonia) inicia quando os oocistos são ingeridos pelas formas imaturas dos insetos. Após alguns minutos, os esporozoítos são liberados e passam por uma curta fase intracelular nas células epiteliais do intestino anterior do mosquito (Roychoudhury et al., 2006). Em outros hospedeiros podem também invadir o celoma e tecidos reprodutivos (Beier e Craig, 1985; Leander, 2008).

Após uma fase intracelular curta, os esporozoítos deixam as células epiteliais invadidas para formar trofozoítos extracelulares que se ligam ao epitélio através de uma estrutura chamada epimerite, a qual permite sua fixação na célula (Chen et al., 1997b). Esses trofozoítos são encontrados principalmente na parte posterior do intestino médio em que o tipo H + -

ATPase vacuolar (V-ATPase) é expressa ativamente (Huang et al., 2006). Trofozoítos de *A. taiwanensis* amadurecem no intestino médio das larvas de mosquitos, juntamente com o desenvolvimento das mesmas (Chen e Yang, 1996).

Acredita-se que apenas 50% (ou menos) dos trofozoítos de *A. taiwanensis* migram com sucesso para os túbulos de Malpighi (Chen, 1999) e com o restante geralmente acontece morte por apoptose (Kanduc et al., 2002).

Após o amadurecimento, os trofozoítos se desenvolvem em gamontes no lúmen do intestino médio e, na fase de pupa, migram em virtude da motilidade de deslizamento para os túbulos de Malpighi, onde irá ocorrer o ciclo sexual (Wetzel et al., 2003). A migração do intestino médio para os túbulos de Malpighi é unidirecional e ocorre geralmente entre os trofozoítos que foram liberados no intestino médio de pupas jovens (geralmente 5 horas após a fase de pupa) (Chen e Fan-Chiang, 2001). O tamanho dos gamontes maduros é extremamente variável, depende muito do hospedeiro e de sua localização geográfica (Garcia et al., 1994).

A reprodução sexuada resulta na formação de gametocistos, em que os verdadeiros gametas são formados através de divisões e citocinese nucleares. A fertilização então ocorre pela fusão de dois gametas, resultando na produção de oocistos com oito esporozoítos (Chen et al*.,* 1997a).

As possíveis formas de disseminação destes protozoários ocorrem quando pupas ou adultos recém-emergidos que abrigam oocistos morrem no criadouro, ou quando oocistos são liberados após a emergência dos adultos infectados. Ou ainda, a transmissão pode ocorrer no momento da oviposição onde fêmeas infectadas liberam os oocistos juntamente com seus ovos (Beier e Craig, 1985; Leander, 2008). Na maioria das espécies de *Ascogregarina* os oocistos podem resistir em média de 4-6 meses em ambiente sem água (Roychoudhury et al.,2006).

Uma vez que os oocistos são o único estágio de desenvolvimento de vida livre do parasito, quase não há diferença de tamanho entre as espécies. Assim, é bastante difícil identificá-las baseando-se apenas nas observações microscópicas de oocistos. Estudos para identificação através de subunidade

ribossomal (SSU rDNA) tem demonstrado ser altamente informativo para estudos filogenéticos e de identificação das espécies (Roychoudhury et al., 2007).

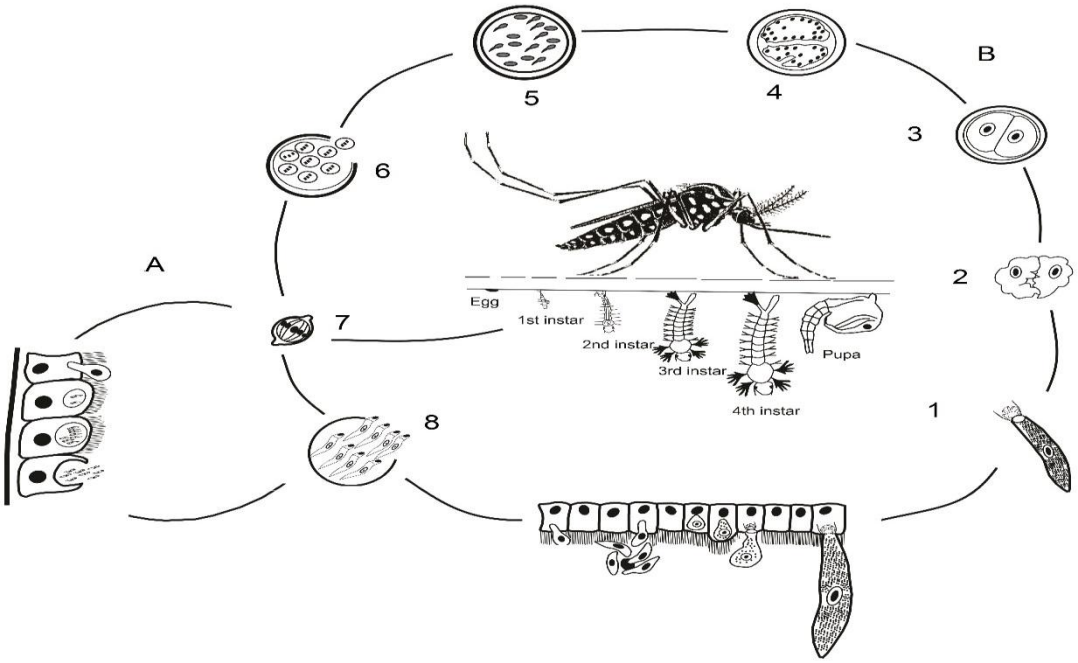


Figura 5 - Ilustração do ciclo reprodutivo assexuado (A) e sexuado (B) de *A. taiwanensis* quando parasitando *Ae. albopictus,* (modificado de Vivier e Desportes 1990 e Funasa 2001). 1 -Trofozoito, 2 a 5 - fusão dos gametas, formação de gametocistos e formação dos oocistos, 6 - liberação dos oocistos, 7 - oocisto e 8 - esporozoitos.

### 4.4.2 Ascogregarinas no controle biológico

Entre as poucas espécies relatadas para *Aedes* spp., *A. taiwanensis* e *Ascogregarina culicis* (Ross) são as mais comuns e têm sido descritas em vários países (Reeves 2004). Apesar de alguns estudos descreverem sobre a bionomia e o potencial de gregarinas como agentes de controle biológico para mosquitos do gênero *Aedes*, pouco se sabe sobre sua biologia e distribuição. Da mesma forma, pouco se sabe sobre seu efeito patogênico para o hospedeiro, uma vez que sua patogenicidade pode variar geograficamente (Mccray et al., 1970; Sulaiman, 1992).

Uma das primeiras observações da patogenicidade de gregarinas foi realizada por Barrett (1968), que observou um atrofiamento e aumento da mortalidade em larvas e pupas de *Ae. aegypti* infectadas com *A. culicis*. Sulaiman (1992) também observou mortalidade larval proporcional à

intensidade da infecção por *A. culicis* e menor tempo de desenvolvimento das larvas. No entanto, esta gregarina não afetou o desenvolvimento larval, o tamanho, a mortalidade, o peso de pupa ou emergência de adultos de *Ae. aegypti*, em um estudo realizado por McCray et al., (1970). Algumas linhagens asiáticas de *A. culicis* são patogênicas para *Ae. aegypti* (Sulaiman, 1992), enquanto que a linhagem de *A. culicis* nos Estados Unidos ( Barrett, 1968) é considerada não patogênica para seu hospedeiro.

O parasitismo por *A. barretti* (Vavra) aumenta o tempo de desenvolvimento do estágio de pupa para machos e diminui o tamanho de pupa para as fêmeas, mas não tem efeito sobre a sobrevivência larval, emergência, ou sobrevivência dos adultos de *Aedes triseriatus* (Say, 1823) (Beier e Harris, 1983). Walker et al., (1987) observaram ainda uma redução de 32% na produção de ovos de fêmeas parasitadas. Em outro estudo, Spencer e Olson (1982) observaram que em hospedeiros não naturais para *A. barretti*, pode ocorrer uma baixa sobrevivência larval e eclosão e uma redução no peso das fêmeas parasitadas.

Garcia et al., (1994) observaram que o nível de patogenicidade das gregarinas não é influenciado somente pelo sexo ou por nutrientes, mas pode ser significativamente mais patogênica quando é introduzida em um hospedeiro não natural. Por exemplo quando *A. taiwanensis* infecta o seu hospedeiro não natural *Aedes taeniorhynchus* (Wiedemann).

Prophiro et al., (2013, dados não publicados) analisaram, em condições laboratoriais, a influência do parasitismo de *A. taiwanensis* na biologia de *Ae. albopictus*. Foi observado que a população infectada teve uma menor sobrevida, número de ovos, viabilidade/taxa de eclosão quando comparado com a mesma população não infectada.

Estudos em laboratório demonstram que hospedeiros não naturais de *A. taiwanensis* como *Ochlerotatus japonicus* (Dyar e Knab = *Aedes epactius;* ver Reinert 2000) e *Ochlerotatus taeniorhynchus* (Garcia et al., 1994) apresentam capacidade de abrigar o protozoário e dar-lhes condições para completar o seu ciclo de vida, entretanto alterações no fitness do hospedeiro podem ocorrer.

A partir de diversos estudos, acredita-se que efeitos patogênicos de

gregarinas aos seus hospedeiros são provavelmente dados pelo impacto negativo sobre os tecidos, onde os parasitos se desenvolvem. As células epiteliais do intestino das larvas de mosquito, quando infectadas, ampliam seus núcleos, podendo ser destruídas pelos parasitos (Kramar 1952, Sanders e Poinar 1973). Os túbulos de Malpighi nos adultos ficam dilatados e as suas células são distorcidas e danificadas (McCray et al.,1970; Sanders e Poinar 1973), sendo a extensão dos danos proporcional parasitemia (Barrett 1968).

## 5 MATERIAL E METODOS

### 5.1 Área de estudo

As coletas dos mosquitos imaturos foram realizadas em Santa Catarina (**Fig. 6**) em quatro municípios: Tubarão (28º28'00" S - 49º00'25" W), Gravatal (28º19'52" S - 49º02'07" W), Laguna (28º28'57" S 48º46'51" W) e Capivari de Baixo (28º26'41" S - 48º57'28" W). O clima destas cidades é subtropical, com temperatura média anual de 15,5 °C a 23,6 °C (IBGE 2014).

Figura 6 - Mapa do Brasil com destaque na região sul de Santa Catarina e nas cidades de estudo.

### 5.2 Coletas e identificação dos mosquitos

Para a obtenção dos mosquitos imaturos, pneus com água, foram distribuídos nas cidades mencionadas acima. Foram realizadas 12 coletas para cada cidade no período de 2013 a 2014, e quinzenalmente os imaturos foram coletados e levados ao Laboratório de Immunoparasitologia da Universidade do Sul de Santa Catarina (UNISUL). As larvas coletadas foram

identificadas com base nas escamas do oitavo segmento abdominal (**Fig. 7**) e verificadas quanto a possível presença dos parasitos.

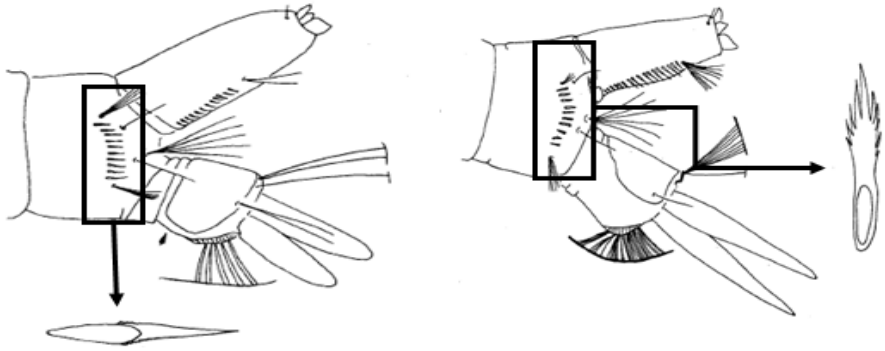

Figura 7 - Ilustração do oitavo seguimento abdominal de *Aedes albopictus* e *Aedes aegypti*, respectivamente. Com destaque nas escamas. Desenho adaptado de Consoli e Oliveira (1998).

## 5.3 Verificação de parasitismo

Uma amostra das larvas coletadas, quando no terceiro e/ou quarto estádios foi dissecada à luz de um microscópio estereoscópico (OLYMPUS CX31-P). A observação do parasitismo foi feita através da dissecação do trato digestivo, o qual consiste em exercer uma tração horizontal na parte cefálica **(Fig. 8 A, parte 1)** e no sifão respiratório **(Fig. 8 A, parte 2)** da larva. Desta forma, o exoesqueleto larval se rompe, expondo o trato digestivo. Assim pôde-se visualizar a presença dos parasitos, quando presentes **(Fig.8B - 3)**. Confirmando-se a presença de *Ascogregarina* sp. nas larvas, essas foram fotografadas e/ou filmadas no microscópio óptico (ZEISS STEMI 200 C) com o programa VMS3.5.

Figura 8 – (A) Larva *Aedes* sp. de campo. (B) Intestino dissecado de larva de Larva *Aedes* sp. silvestre parasitado em aumento de 10x em microscópio óptico e presença de trofozoítos.

## 5.4 Extração do DNA genômico de *Ascogregarina* sp.

Após a confirmação da presença de *Ascogregarina* sp. nas larvas dos mosquitos, um pool de dez intestinos de *Ae. aegypti* e de *Ae. albopictus* foram colocados separadamente em tubos de 1,5 ml com etanol a 70%. O DNA genômico foi extraído utilizando-se o protocolo de Collins et al., (1987) com algumas modificações. O trato digestivo das larvas foi macerado em 60 µL de tampão (0,16 M de NaCl, 0,06 M de sacarose, EDTA a 0,5%, SDS a 0,1 M, Tris-HCl, pH 8,6) e incubado a 65°C, durante 30 minutos. Subsequentemente, 40 µL de acetato de potássio a 8 M foram adicionados e uma segunda incubação foi realizada a 4 °C durante 30 minutos.

A solução foi então centrifugada a 12.000 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo de 1,5 ml contendo 100 µL de etanol absoluto e centrifugado durante 10 minutos a 12.000 rpm. O DNA foi lavado em etanol a 70% e ressuspendido em 50 µL de água destilada estéril. Após a extração a quantificação do material genômico foi feito no Spectrophotometro NanoDrop.

## 5.5 Amplificação por PCR

Os iniciadores utilizados para a identificação de *A. taiwanensis* e *A. culicis* foram AT e AC respectivamente, um iniciador (UA universal) para *Ascogregarina* sp., desenhados por Morales et al., (2005).

O primer **AT** (5 ‘GAGS AAG CCG TCG TCA ATA CAG C 3') se liga à região ITS2 do DNAr e **AC** (5 'CAC TTA GTG TTT TGT TTG ATG TC 3’) liga-se à região ITS1 do DNAr. **AU** (5 'ACC GCC CGT CCG TTC AAT CG 3') é um primer universal que une a região 18S de *Ascogregarina* sp. em ambas as espécies.

Cada reação foi preparada com um volume total de 25 µL contendo 2 µL de DNA genômico de *Ae. albopictus* ou *Ae. aegypti* (50 ng), 8,5 µL de água livre de nuclease (Promega), 12,5 µL de mistura mestre GoTaq® - Promega (Reação Tampão (pH 8.5), 400µM dATP, 400µM dGTP, 400µM dCTP, 400µM dTTP e 3mM MgCl2 ) e 1 µL de iniciadores AC ou AT e 1 µL de UA, ambos a 2 mM.

As condições de amplificação do DNA incluíram uma desnaturação

inicial a 94 °C durante 1 minuto, seguido por 30 ciclos de amplificação (94 °C durante 1 min, 50 °C durante 1 min, 72 °C durante 2 minutos e um passo final de extensão a 72 °C durante 10 min). A visualização do DNA foi feita em gel de agarose a 2% previamente corado com brometo de etídio, sob luz UV e fotografado.

Após a positividade de DNA de *Ascogregarina* sp., o produto foi purificado com a utilização o kit de extração QIAquick® (QUIAGEN GmbH, Hilden, Alemanha) de acordo com as recomendações do fabricante. Os fragmentos genômicos foram enviados à Empresa Ludwig Biotec para sequenciamento, em um sequenciador automático MegaBace 1000. Para a análise das sequencias obtidas utilizou-se o programa BioEdit.

## 5.6 Transmissão de *A. taiwanensis* para larvas de *Ae. aegypti*

A transmissão de *A. taiwanensis* para larvas de *Ae. aegypti* da linhagem Rockefeller (colônia mantida há mais de 15 anos no laboratório de Imunoparasitologia – IMPAR da UNISUL), deu-se pela maceração de 100 adultos (para a obtenção de oocistos, forma de transmissão do parasito) de *Ae. albopictus.* Estes adultos eram provenientes de uma linhagem de campo e parasitados por *A. taiwanensis*. O macerado foi adicionado a 3 litros de água em uma bandeja com aproximadamente 3.000 ovos de *Ae. aegypti*. Após a eclosão, uma porção de aproximadamente 200 larvas de terceiro instares, escolhidas aleatoriamente, foi dissecada e observada em microscópio óptico, para a confirmação do parasitismo. A alimentação dessas larvas deu-se pela adição de 15 gramas da ração Cat show a cada dois dias.

## 5.7 Transmissão vertical de *A. taiwanensis* em *Ae. aegypti*

Após a obtenção de adultos de *Ae. aegypti* parasitados, através da transmissão do protozoário para as larvas (ver item 5.6), 100 fêmeas e 50 machos foram acondicionadas em uma gaiola de 30cm x 30cm x 30cm. Estes foram alimentados com uma solução de mel a 10%, trocada uma vez por semana. Para o repasto sanguíneo das fêmeas, ofereceu-se uma fonte sanguínea durante 10 minutos, uma vez por semana durante um mês. Além disso, foi simulado um criadouro artificial para oviposição das fêmeas e

criação das larvas. A verificação da infecção da prole F1 nascida no criadouro deu-se pela dissecção e observação de larvas em quarto instar.

## 5.8 Bioensaios com inseticidas

Para este estudo foram utilizados dois tipos de inseticidas: um químico sintético (Temephos) e um químico de origem botânica (*Azadirachta indica*).

Ambos os inseticidas utilizados foram calibrados com a linhagem susceptível de *Ae. aegypti* da cepa Rockefeller. Os bioensaios seguiram o protocolo recomendado pela Organização Mundial da Saúde, descrito em WHO (1981). O protocolo compreende dois tipos de parâmetros: resposta de mortalidade frente à exposição em concentração diagnóstico (CD) e resposta à exposição a um gradiente de concentrações (concentrações múltiplas - CM) para estabelecimento da linha-base de dose resposta.

O inseticida químico utilizado foi o temephos grau técnico 96% lote #SZBD128XV fabricado pelo laboratório “Fluka Analytical”, St. Louis, MO 63103 – USA.

Para cada bioensaio utilizaram-se 1.080 larvas de terceiro instar tardio e quarto instar inicial de *Ae. aegypti* não parasitado, e *Ae. aegypti* parasitado por *A. taiwanensis* (ver item 5.6). Três réplicas de 15 larvas, totalizando 45 larvas por concentração foram expostas a seis diferentes concentrações (CM) de temephos. Entre as concentrações múltiplas estava a concentração diagnóstica (CD). Para o controle, seis réplicas de 15 larvas, totalizando 90 larvas de cada população foram expostas ao solvente etanol e à água.

O inseticida químico de origem botânica utilizado foi o Óleo de *Azadirachta indica* lote 44796-04 fabricado pelo laboratório “Handa Fine Chemicals”, West Sussex – USA.

Para cada bioensaio utilizaram-se 1.080 larvas de terceiro instar tardio e quarto instar inicial de *Ae. aegypti* não parasitados, e *Ae. aegypti* parasitado por *A. taiwanensis*. Três réplicas de 15 larvas, totalizando 45 larvas por concentração, foram expostas a seis diferentes concentrações (CM) de *A. indica*. Para o controle, seis réplicas de 15 larvas, totalizando 90 larvas de cada população foram expostas ao solvente Tween (polisorbato) e à água.

Os bioensaios foram reproduzidos três vezes em dias diferentes para

cada produto e cada replica continha 100 ml de solução em 24 horas de exposição (**Fig. 9**).

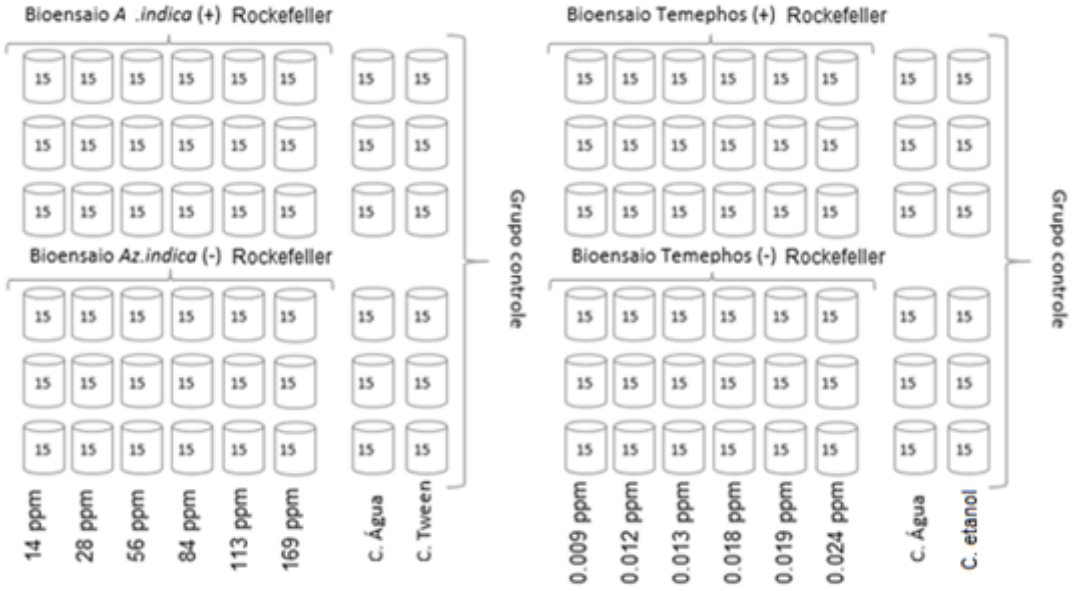


Figura 9 - Ilustração dos bioensaios para os inseticidas. (+) presença do parasito, (-) ausência do parasito.

## 5.9 Analise estatística

O programa Probit GW-Basic foi utilizado para determinação das concentrações letais.

Para análise dos resultados foi utilizado Two-way ANOVA do GraphPad Prisma 5.03, com nível de significância de 5%. Os resultados também foram armazenados em formato de planilhas no programa Microsoft Office Excel.

# 6 RESULTADOS E DISCUSSÂO

## 6.1 *Ascogregarina* spp. em populações silvestres de *Ae. aegypti* e de *Ae. albopictus*.

Nos quatro municípios estudados foram coletados imaturos de *Ae. albopictus*. Entretanto, larvas de *Ae. aegypti* foram registradas apenas em Tubarão-SC. Nesta cidade, ambas as espécies de *Aedes* foram encontradas convivendo no mesmo criadouro.

As larvas de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* examinadas albergavam representantes de *Ascogregarina* sp. em seu tubo digestivo (**Fig.10**). Este é o primeiro registro de *Ascogregarina* para Santa Catarina e o terceiro para o Brasil.

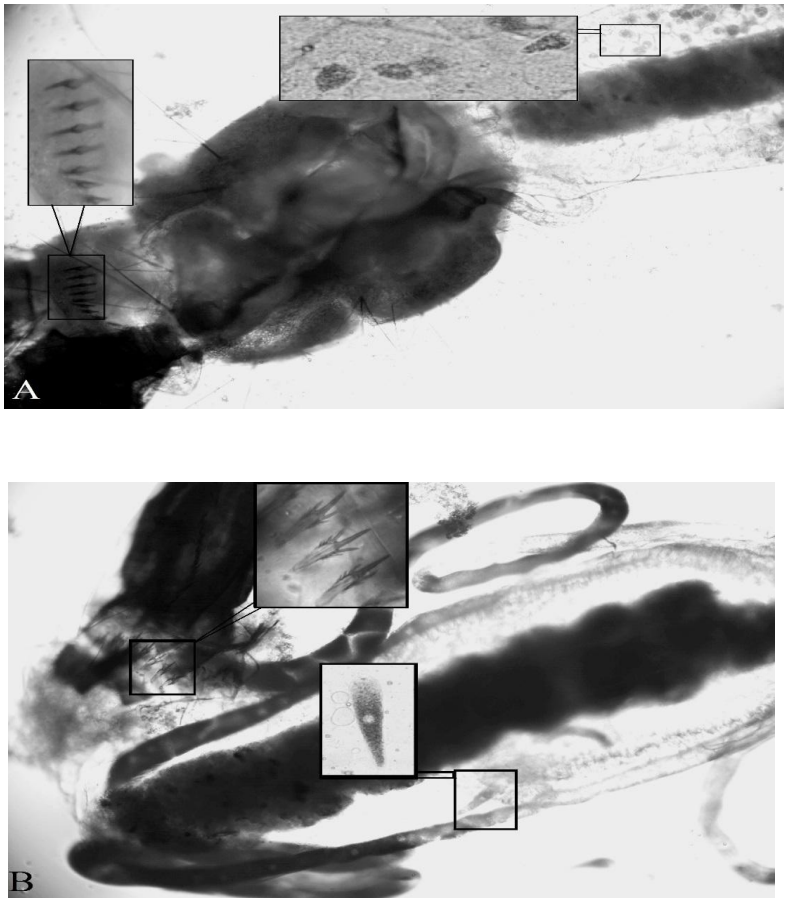


Figura 10 – (A) Larva de *Aedes albopictus* e (B) larva de *Aedes aegypti* parasitadas por *Ascogregarina* sp. Realce nas escalas de pente do oitavo segmento abdominal e nos parasitos. Ambas as imagem em aumento de 10x em microscópio de contraste de fase.

Marchoux et al.,1903 (apud Dellapé et al.,2005) relataram o primeiro registro de *A. culicis* em *Ae*. *aegypti* no Brasil. Posteriormente, Passos e Tadei (2008) coletando mosquitos em Manaus no Amazonas, também registraram *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* no mesmo criadouro, infectados com *A. culicis* e *A. taiwanensis,* respectivamente. A identificação das gregarinas por Passos e Tadei (2008) baseou-se apenas nas características morfológicas e de pigmentação de trofozoítos, quando observados em microscópio de contraste de fase, conforme os métodos descritos por Reyes - Villanueva et al., (2001).

A identificação dos trofozoítos por dissecação e características morfológicas, além de laborioso pode apresentar problemas por questões biológicas e técnicas. Por exemplo, pode-se observar a sobreposição das amostras, a presença do parasito em diferentes estágios de desenvolvimento, o diferencial de amostragem e a preservação inadequada de espécimes (Morales et. al 2005). Além disso, muitas vezes a idenficação pode ser comprometida devido às semelhanças morfológicas dos protozoários. Dessa forma, a utilização de técnicas moleculares torna-se menos laboriosa e mais precisa.

## 6.2 Identificação e caracterização das espécies de *Ascogregarina* spp. encontradas em Tubarão, Santa Catarina.

Os trofozoítos encontrados, em larvas de *Ae. albopictus* nas quatro cidades estudadas, em geral, foram morfologicamente semelhantes a uma vírgula e tinham uma pigmentação marrom quando observada ao microscópio de contraste de fase. Tais observações foram semelhantes aos métodos de identificação de Reyes - Villanueva et al., (2001), sugerindo-se assim, tratar-se da espécie *A. taiwanensis* (**Fig 11**). Lien e Levine (1980) identificaram este parasito em larvas de *Ae. albopictus,* em Taiwan, com base na morfologia dos trofozoítos e especificidade de hospedeiros, designando assim a gregarina como *A. taiwanensis.*

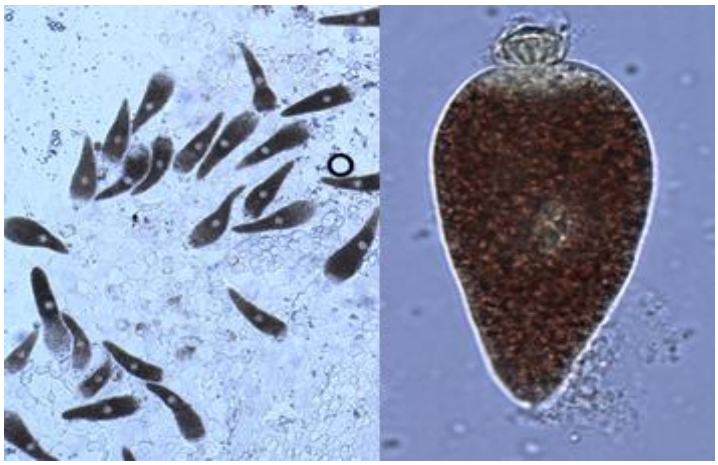

Figura 11 – Imagem *Ascogregarina taiwanensis*. Aumento de 10x e 20x em microscópio de contraste de fase (Optika Microscópio B-500Tph).

O tamanho dos trofozoítos foi variável, medindo entre 50 µm - 170µm. Adicionalmente, trofozoítos gigantes (por exemplo, 223 µm - 621 µm) foram encontrados no intestino médio das larvas de *Ae. albopictus*, os quais foram maiores do que os relatados por Albicocco e Vezzani (2009). Segundo Chen e Yang (1996) o tamanho dos trofozoítos é dependente da temperatura da água, sendo estes menores em temperaturas mais elevadas. Resultados semelhantes foram observados também para *A. taiwanensis* em *Ae. albopictus* (Roychoudhury e Kobayashi, 2006). Entretanto, acreditamos que tais dados podem sofrer influência de acordo com o número de protozoários coexistindo no hospedeiro e a disponibilidade alimentar.

Para a aplicação de técnicas moleculares, utilizaram-se apenas larvas da cidade de Tubarão, pois esta foi a única cidade em que se encontrou estes vetores coexistindo no mesmo criadouro. Nas demais cidades poucos espécimes foram coletados no decorrer do estudo.

*Ascogregarina taiwanensis* e *A. culicis* apresentam ciclo de vida muito semelhante em termos de tamanho e morfologia, o que pode levar a dificuldades na sua identificação específica (Lien e Levine , 1980). Com base em técnicas moleculares utilizadas(**Fig. 12**), observou-se que as duas espécies de *Aedes* coletadas em Tubarão foram negativas para *A. culicis* e positivas para *A. taiwanensis*.

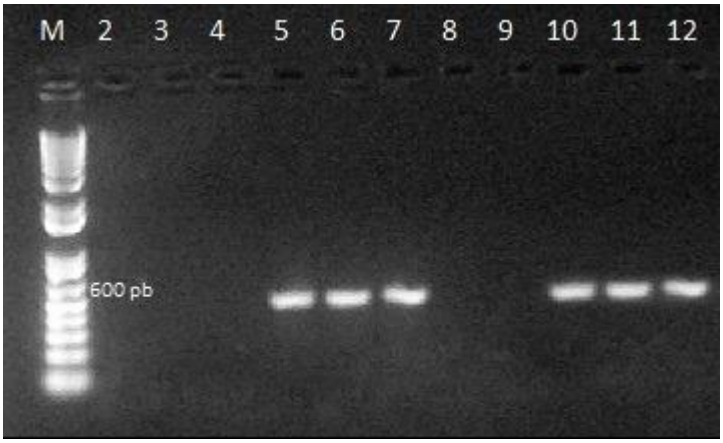


Figura 12 – Fotografia de gel de agarose 2% visualizado em UV. A coluna M refere-se ao marcador de 100-bp; 2 - controle negativo (água); 3 - DNA de *Aedes albopictus* não infectado; 4 - DNA de *Aedes albopictus* não amplificado com o primer AC; 5,6 e 7 - DNA de *Aedes albopictus* amplificado com o primer AT; 8 - DNA de *Aedes aegypti* não infectado; 9 - DNA de *Aedes aegypti* não amplificado com o primer AC; 10, 11 e 12 - DNA de *Aedes aegypti* amplificado com o primer AT.

O sequenciamento das duas amostras de *A. taiwanensis* resultou na obtenção de fragmentos com 275 e 212 pares de bases para *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*, respectivamente. O alinhamento das sequências, com a base de dados do NCBI através do programa BLAST, demonstraram que os isolados apresentaram identidade similar à *A. taiwanensis* de 97% para *Ae. aegypti* e de 98% para *Ae. albopictus*. As sequências de nucleotídeos foram depositadas no GenBank, NCBI, sob o número de acesso KM387707 para *Ae. aegypti* e KM387708 para *Ae. albopictus*.

## 6.3 Observação do parasitismo de *A. taiwanensis* em hospedeiro não natural.

Quando se analisou os resultados dos testes moleculares observou-se que a coexistência de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* no mesmo criadouro facilitou o parasitismo de *A. taiwanensis* em *Ae. aegypti*. Entretanto, esta espécie não é conhecida por ser hospedeiro natural deste protozoário (Albicocco e Vezzani, 2009).

Contudo, é importante salientar que até o momento o que se tem registrado na literatura, é que as gregarinas *A. culicis* e *A. taiwanensis* são parasitos específicos de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus,* respectivamente (Beier

e Craig 1985). Albicocco e Vezzani (2009) descrevem ainda que a única espécie de ascogregarina encontrada na natureza, parasitando *Ae. aegypti*, a nível mundial é *A. culicis*.

Em estudos anteriores pelo grupo IMPAR ( Imunoparasitologia), entre 2009 e 2013, apenas larvas de *Ae. albopictus* foram registradas na cidade de Tubarão, parasitadas por *A. taiwanensis*. Portanto a presença de *Ae. aegypti* no ano de 2014 pode indicar uma competição e adaptação desta espécie ao ambiente, já que neste último ano, larvas de *Ae. albopictus* e *Ae. aegypti* foram encontradas no mesmo criadouro e com a mesma espécie de parasito.

É importante ressaltar ainda que em nossos estudos, também foi possível observar o parasitismo de *A. taiwanensis* em *Ae. aegypti* até mesmo na cepa Rockefeller. Essas observações sugerem que não se pode afirmar que o parasitismo de *A. taiwanensis* seja espécie/especifico para *Ae. albopictus*, como descrito na literatura.

## 6.4 Verificação da transmissão vertical do parasito *A. taiwanensis* em *Ae. aegypti*.

No presente estudo não foi possível observar o parasito na prole de colônias de *Ae. aegypti* (Rockefeller) e (de campo) quando essas eram provenientes de um grupo infectado na fase larval. Tal observação indica que provavelmente a transmissão vertical do protozoário e consequente produção de oocistos não tenha ocorrido. Assim, sugere-se que *A. taiwanensis* permanece incapaz de completar seu ciclo em *Ae. aegypti* (hospedeiro não natural), em condições de laboratório e quando provenientes de campo. Por outro lado, temos observado que, em *Ae. albopictus* (hospedeiro natural) é possível manter o parasito por várias gerações.

A capacidade de *A. taiwanensis* em completar seu ciclo biológico em hospedeiros alternativos pode representar uma estratégia adaptativa para a sobrevivência em longo prazo. Observações em laboratório com hospedeiros não naturais para esta espécie de gregarina demonstram ter capacidade de abrigar o protozoário e dar-lhes condições para completar o seu ciclo de vida. Entretanto, alterações fisiológicas no hospedeiro podem ocorrer (Garcia et al.,

1994).

Dessa forma, podemos sugerir que provavelmente, com a evolução, parasitos e hospedeiros podem adaptar-se uns aos outros, podendo chegar a um estado de equilíbrio e tolerância mútua. Tal fato explicaria também os efeitos negativos que são observados em hospedeiros não naturais, já que para estes provavelmente ainda não existam equilíbrio e tolerância mútua.

## 6.5 Avaliação da influência do parasitismo de *A. taiwanensis* na influência da susceptibilidade larval de *Ae. aegypti* quando associada ao temephos e *A. indica*.

No tratamento com *A. indica* obteve-se maior mortalidade larval onde havia sinergismo entre o protozoário *A. taiwanensis* e o óleo vegetal de *A. indica* (**Fig.13**). Na presença do parasito, a $CL_{50}$ foi de 0,815 mg/L enquanto que sem o parasito a $CL_{50}$ foi de 1.812 mg/L. Os resultados demonstram que houve diferença significativa entre os valores de mortalidade em relação ao grupo controle (P<0.001).

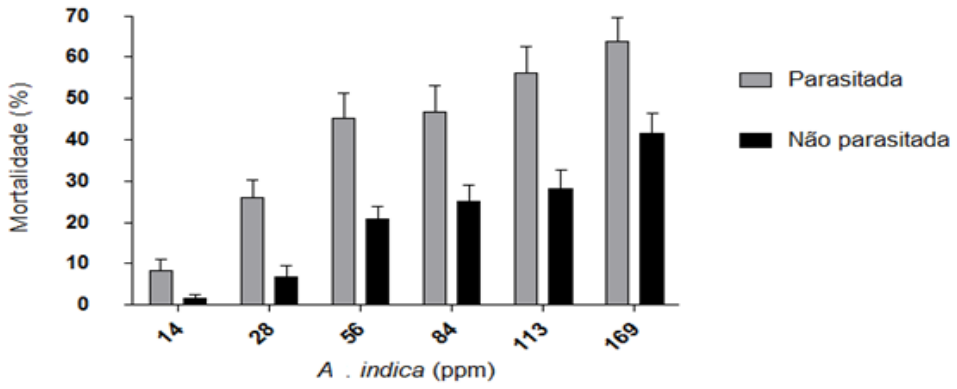


Figura 13 - Comparação da susceptibilidade de larvas de *Ae. aegypti* a uma solução contendo óleo de *A. indica*, quando parasitados e não parasitados por *A. taiwanensis*

Para o tratamento com temephos observou-se também uma maior mortalidade onde havia sinergismo entre o protozoário *A. taiwanensis* e temephos (**Fig.14)**. Na presença do parasito a $CL_{50}$ foi de 0.025 mg/L enquanto que sem o parasito a $CL_{50}$ foi de 0.063 mg/L. Os resultados demonstram que houve diferença significativa entre os valores de mortalidade em relação ao grupo controle (P<0.001).

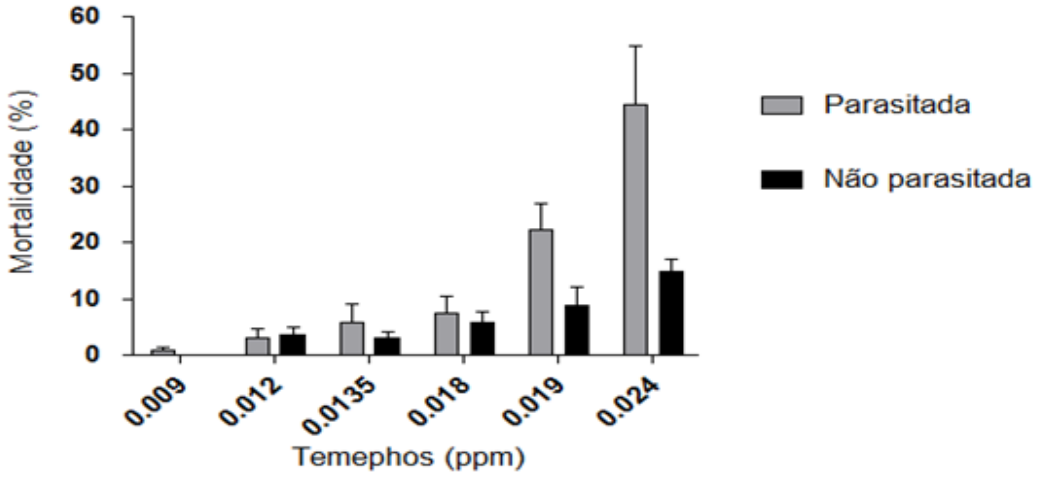


Fig.14 - Comparação da susceptibilidade de larvas de *Ae. aegypti* a uma solução contendo temephos quando parasitados e não parasitados por *A. taiwanensis.*

Os resultados evidenciam que, quando larvas de *Ae. aegypti* infectadas por *A. taiwanensis* são tratadas com *A. indica* ou temephos há redução na sua taxa de sobrevida (Tabela 1 e 2). Assim, a utilização desta gregarina em associação com larvicidas poderia contribuir para uma melhor estratégia de controle de vetores.

Resultados similares foram observados por Gomes (2012) quando expuseram larvas de *Ae. aegypti* ao óleo *A. indica,* juntamente com uma solução contendo o fungo *Metarhizium anisopliae* ($5x10^5$ conídios/mL). Dessa forma, obtiveram uma maior mortalidade de larvas, indicando assim um possível sinergismo entre o fungo e *A. indica*.

Entretanto, outro estudo da associação de *M. anisopliae* e temephos, resultou em menor mortalidade larval, do que quando apenas se utilizando o fungo. A concentração subletal do inseticida influenciou a virulência do fungo, diminuindo assim sua ação sobre larvas de *Ae. aegypti,* evidenciando que na interação entre o inseticida e o fungo houve efeito antagônico (Paula 2010). Benz (1971) cita que algumas das prováveis causas de antagonismo entre inseticidas e patógenos podem estar relacionadas com a capacidade do patógeno em degradar metabolicamente a molécula do inseticida, impedindo ou diminuindo sua ação sobre o inseto.

Apesar de o temephos diminuir a virulência de *M. anisopliae* às larvas

de *Ae. aegypti*, vários outros inseticidas utilizados em conjunto com fungos entomopatogênicos não proporcionaram efeito adverso (Mohamed et al., 1987). Moino e Alves (1998) observaram ainda que os inseticidas imidacloprid e fipronil, por exemplo, foram compatíveis com os fungos *Beauveria bassiana* e *M. anisopliae*, quando utilizados nas concentrações médias recomendadas ou em concentrações subletais.

Andrade (1991) observou em outros insetos, por exemplo, que quando utiliza-se *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (Bti) com temephos, obtém-se uma mortalidade larval maior na primeira hora de exposição, em relação ao grupo tratado apenas com temephos. Como resultado do experimento o autor observou que o sinergismo induziu até 90% de mortalidade larval.

Das várias espécies do gênero *Bacillus*, algumas poucas como (Bti) tem a capacidade de sintetizar pró-toxinas ativas contra insetos. Sua especificidade está relacionada a cinco toxinas existentes em um corpo cristalino que se forma por ocasião da esporulação da bactéria. Quando ingeridas e sob as condições alcalinas do intestino das larvas de dípteros, quebram-se pela ação de enzimas (proteinases). Essa quebra libera as frações realmente tóxicas que então se ligam a receptores específicos da membrana epitelial provocando poros e quebrando o balanço osmótico no tecido intestinal (Yousten, 1996). Isso leva à lise das células e extravasamento do conteúdo intestinal para a hemolinfa, com consequente parada alimentar, paralisia e morte rápida por toxemia. É interessante notar que essas toxinas agem sinergicamente, ou seja, quando isoladas tem menor efeito do que juntas (Yousten, 1996).

A ação antiparasitária de *A. indica* já foi relatada por alguns autores (Costa et al., 2006; Moreira et al., 2006). Em nosso estudo, o aumento na mortalidade de larvas de *Ae. aegypti* parasitadas e expostas a *A. indica* poderia estar relacionada a essa ação antiparasitária. Conforme Golstein e Kroemer (2007) relatam, variações extremas de condições fisiológicas em associação com a infecção parasitária podem causar necrose nas células, resultando em dano direto às membranas plasmáticas do hospedeiro. Dessa forma, pode-se sugerir que se houver ação antiparasitária sobre as gregarinas e essa resultar

em danos às membranas plásticas, esse mecanismo poderia facilitar a entrada do inseticida nas células. Com isso, aumentaria sua eficiência.

Sabe-se que o temephos é um inseticida organofosforado que atua no sistema nervoso da larva, inibindo as colinesterases, principalmente a acetilcolinesterase (Carvalho et al., 2004; Silva et al., 2008). Entretanto a utilização desse inseticida juntamente com protozoário também resultou em maior mortalidade.

Ainda não podemos explicar claramente por que acontece aumento na mortalidade das larvas ao se utilizar produtos químicos e/ou de origem botânica, quando essas estão parasitadas com *A. taiwanensis*. Logo um estudo mais detalhado sobre o mecanismo de ação destas associações poderá vir a esclarecer tais fatos.

Embora a concentração de *A. indica* seja superior à de temephos nos valores em dosagem, vale ressaltar que existem relatos sobre a sobrevivência de *Ae. aegypti* exposto a mais de 0,02 mg/L de temephos, indicando a possibilidade de resistência entre a população testada (Brown,1986; Denham et al., 2015; Arslan et al., 2015). Dessa forma há vantagens na utilização de *A. indica*, uma vez que os relatos de resistência por inseticidas derivados de plantas são raros, além de possuírem vantagem de ser biodegradável e não tóxicos ao homem.

De acordo com Guirado e Bicudo, (2009) novos métodos de controle de *Aedes* spp. visando a diminuição do uso de inseticidas químicos devem ser urgentemente priorizados. Alem disso, vale ressaltar que a integração entre inseticidas biológicos e químicos para controlar larvas de mosquitos podem apresentar muitas vantagens. Dessa forma, acreditamos que o comando integrado e intercalado pode também reduzir a pressão normal para a selecção de resistência a  inseticidas químicos usado rotineiramente.

## 7 CONCLUSÕES

Nos quatro municípios de Santa Catarina avaliados, Capivari de Baixo, Tubarão, Laguna e Gravatal, registrou-se a presença de *Ascogregarina* spp. em larvas de *Ae. albopictus.*

Apenas em Tubarão foram encontradas larvas de *Ae. albopictus* e *Ae. aegypti* infectadas com *A. taiwanensis*, no mesmo criadouro.

É possível ocorrer infecção por *A. taiwanensis* em *Ae. aegypti*, tanto em populações silvestres como na cepa Rockefeller.

Não foi observada transmissão vertical de *A. taiwanensis* em *Ae. aegypti,* em indivíduos silvestres nem naqueles da cepa Rockefeller.

Observou-se efeito sinérgico quando se avaliou *A. indica* e temephos juntamente com *A. taiwanensis,* indicando que esta associação apresenta potencial para o controle de *Ae. aegypti*.

## 8 REFERÊNCIAS

Albicócco AP, Vezzani D. 2009. Further study on *Ascogregarina culicis* in temperate Argentina: prevalence and intensity in *Aedes aegypti* larvae and pupae. Journal of Invertebrate Pathology, v. 101, n. 3, p. 210-214.

Andrande CS, Modolo M. 1991. Susceptibility of *Aedes aegypti* larvae to temephos and *Bacillus thuringiensis var israelensis* in integrated control. Revista de Saúde Pública, v. 25, n. 3, p. 184-187.

Arslan A, Mukhtar MU, Mushtaq S, Zakki AB, Hammad M, Bhatti A. 2015. Comparison of Susceptibility Status of laboratory and field populations of *Aedes aegypti* against temephos in Rawalpindi.

Barrett WL. 1968. Damage caused by *Lankesteria culicis* (Ross) to *Aedes aegypti* (L). Mosquito News, v. 28, n. 3, p. 441-&.

Barth OM. 2000. Atlas of dengue viruses morphology and morphogenesis. In: Atlas of dengue viruses morphology and morphogenesis. Instituto Oswaldo Cruz.

Beier JC, Craig JR. 1985. Gregarine parasites of mosquitoes. *In* Integrated mosquito control methodologies, volume 2, M. Laird (ed.). Academic, London, U.K., p. 167–184.

Beier JC. Harris C. 1983. *Ascogregarina barretti* (Sporozoa: diplocystidae) infections in natural populations of *Aedes triseriatus* (Diptera: Culicidae). The Journal of Parasitology, v. 69, n. 2, p. 430-431.

Benz G. 1971. Synergism of microorganisms and chemical insecticides. In: Burges, H.D., Hussey, N.W. (eds.) Microbial control of insects and mites. Londres: Academic Press, p. 327-356.

Bicca-Marques JF, David S. 2010. The role of monkeys, mosquitoes and humans in the occurrence of a yellow fever outbreak in a fragmented landscape in south Brazil: protecting howler monkeys is a matter of public health [78-89].

Bisset JA. 2002. Uso correcto de insecticidas: control de la resistencia. Revista Cubana de Medicina Tropical, v. 54, n. 3, p. 202-219.

Blackmore MS. Glen AS. Geoge BC. 1995. Parasitism of *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* (Diptera: Culicidae) by *Ascogregarina* spp.(Apicomplexa: Lecudinidae) in Florida. Journal of Medical Entomology, v. 32, n. 6, p. 847-852.

Blair CD. Adelman ZN. 2000. Molecular strategies for interrupting arthropod-borne virus transmission by mosquitoes. Clinical Microbiology Reviews, v. 13, n. 4, p. 651-661.

Brancco JE. Moacyr D. Osvaldo M. Jose MSB. 1997. Organophosphorous and carbamate resistence in a population of *Culex quinquefasciatus*. Revista de Saúde Pública, v. 31, n. 2, p. 182-183.

Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. 2008. Dengue-instrução para pessoal de combate ao vetor: manual de normas técnicas. - 3. ed. - Brasília: Ministério da Saúde.

Brown AW. 1986. Insecticide resistance in mosquitoes: a pragmatic review. Journal of the American Mosquito Control Association, v. 2, n. 2, p. 123-140.

Carvalho ML. Caldas ED. Degallier N. Oliveira CD. 2004. Susceptibility of *Aedes aegypti* larvae to the insecticide temephos in the Federal District, Brazil. Revista de Saúde Pública, v. 38, n. 5, p. 623-629.

Chen WJ. Wu ST. Chow CY. Yang CH. 1997b. Sporogonic development of the gregarine *Ascogregarina taiwanensis* (Lien and Levine) (Apicomplexa: Lecudinidae) in its natural host *Aedes albopictus* (Skuse)(Diptera: Culicidae). Journal of Eukaryotic Microbiology, v. 44, n. 4, p. 326-331.

Chen WJ. 1999. The life cycle of *Ascogregarina taiwanensis* (Apicomplexa: Lecudinidae). Parasitology Today, v. 15, n. 4, p. 153-156.

Chen WJ. Wu ST. 1997a. Ultrastructure of infection, development and gametocyst formation of *Ascogregarina taiwanensis* (Apicomplexa: Lecudinidae) in its mosquito host, *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). Journal of Eukaryotic Microbiology, v. 44, n. 2, p. 101-108.

Chen WJ. Yang CH. 1996. Developmental synchrony of *Ascogregarina taiwanensis* (Apicomplexa: Lecudinidae) within *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). Journal of medical entomology, v. 33, n. 2, p. 212-215.

Clopton RE. 1995. Leidyana migrator n. sp. (Apicomplexa: Eugregarinida: *Leidyanidae*) from the Madagascar hissing cockroach, *Gromphadorhina portentosa* (Insecta: Blattodea). Invertebrate Biology, p. 271-278.

Clopton RE. 2000. Order Eugregarinorida Léger 1900. In: Lee, J.J., Leedale, G.F.,Bradbury, P. (Eds.), The Illustrated Guide to the Protozoa, second ed**.** Allen Press,Inc., Lawrence, Kansas, pp. 05–298.

Collins, FH. 1987. A ribosomal RNA gene probe differentiates member species of the *Anopheles gambiae* complex. The American journal of tropical medicine and hygiene, v. 37, n. 1, p. 37-41.

Consoll RB. Oliveira, RL. 1994. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. SciELO-Editora FIOCRUZ.

Costa CTC. Bevilaqua CML. Maciel MV. Souza MMC. 2006. Anthelmintic activity of *Azadirachta indica A. Juss* against sheep gastrointestinal nematodes. Veterinary Parasitology, Ceará, v. 137, p. 306-310.

Debach P. 1964. Control biológico de las plagas de insectos y malas hierbas. CIA. Editorial Continental, SA México.

Delatte H. Dehecq JS. Thiria J. Domerg C. Paupy C. Fontenille D. 2008. Geographic distribution and developmental sites of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) during a Chikungunya epidemic event. Vector-Borne and zoonotic diseases, v. 8, n. 1, p. 25-34.

Dellapé ME. Marti GA. Tranchida MC. García JJ. 2005. First record of *Aedes aegypti* (L.)(Diptera: Culicidae) infected by the parasite *Ascogregarina culicis* (Ross)(Apicomplexa: Lecudinidae) in Argentina. Entomología y Vectores, v. 12, n. 1, p. 111-115.

Denham S. Eisen L. Beaty M. Beaty BJ. Black WC. Saavedra-Rodriguez K. 2015.Two Novel Bioassays to Assess the Effects of Pyrethroid-Treated Netting on Knockdown-Susceptible Versus Resistant Strains of *Aedes aegypti*. Journal of the American Mosquito Control Association, v. 31, n. 1, p. 52-62.

Dick GA. Kitchen SF. Haddow AJ. 1952. Zika virus (I). Isolations and serological specificity. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, v. 46, n. 5, p. 509-520.

Duffy MR. 2009. Zika virus outbreak on Yap Island, federated states of Micronesia. New England Journal of Medicine, v. 360, n. 24, p. 2536-2543.

Dusfour I. Thalmensy V. Gaborit P. Issaly J. Carinci R. Girod R. 2011. Multiple insecticide resistance in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations compromises the effectiveness of dengue vector control in French Guiana. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 106, n. 3, p. 346-352.

Fan-Chiang MH. 2001. Directed migration of *Ascogregarina taiwanensis* (Apicomplexa: Lecudinidae) in its natural host *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). Journal of Eukaryotic Microbiology, v. 48, n. 5, p. 537-541.

Focks DA. Linda SB. Craig GB. Hawley WA. Pumpuni CB. 1994. *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae): a statistical model of the role of temperature, photoperiod, and geography in the induction of egg diapause. Journal of Medical Entomology, v. 31, n. 2, p. 278-286.

Forattini OP. Kakitani I. Sallum MAM. Rezende LD. 1997. Produtividade de criadouro de *Aedes albopictus* em ambiente urbano. Revista de Saúde Pública, v. 31, n. 6, p. 545-555.

Garcia JJ. Fukuda T. Becnel JJ. 1994. Seasonality, prevalence and pathogenicity of the gregarine *Ascogregarina taiwanensis* (Apicomplexa: Lecudinidae) in mosquitoes from Florida. Journal of the American Mosquito Control Association, v. 10, n. 3, p. 413-418.

Golstein P. Kroemer G. 2007. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. Trends in Biochemical Sciences, v. 32, n. 1, p. 37-43.

Gomes AS. 2012. **Avaliação da toxicidade de extratos da alga laurencia dendroideae e de azadirachta indica (nim) e sinergismo entre o óleo de nim e o fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* contra larvas de *Aedes aegypti***. Dissertação - Universidade Estadual do Norte Fluminsense Darcy Ribeiro- Campos dos Goytacazes, RJ.

Gubler DJ. 2011. Dengue, urbanization and globalization: the unholy trinity of the 21st century. Tropical medicine and health, v. 39, n. 4 Suppl, p. 3.

Gubler DJ. 2001. Human arbovirus infections worldwide. Annals of the New York Academy of Sciences, v. 951, n. 1, p. 13-24.

Guedes DD. 2012. **Análise da competência vetorial para o vírus Dengue em populações naturais de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* de Pernambuco**. Tese de Doutorado. Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães.Fundação Oswaldo Cruz, Recife.

Guirado MM. 2009. Bicudo MC. Alguns aspectos do controle populacional e da resistência a inseticidas em *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). BEPA. Boletim Epidemiológico Paulista (Online), v. 6, n. 64, p. 5-14.

Hamm JT. Wilson BW. Hinton DE. 1998. Organophosphate-induced acetylcholinesterase inhibition and embryonic retinal cell necrosis in vivo in the teleost (*Oryzias latipes*). Neurotoxicology, v. 19, n. 6, p. 853-869.

Hausmann K. Hülsmann N. "R. Radek. 2003.Protistology. 3rd completely revised edition."

Hawley WA. 1988. The biology of Aedes albopictus. Journal of the American Mosquito Control Association. Supplement, v. 1, p. 1-39.

Hay SI. 2013. Global mapping of infectious disease. Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences, v. 368, n. 1614, p. 20120250.

Hayes EB. 2009. Zika virus outside Africa. Emerging Infectious Diseases, v. 15, n. 9, p. 1347.

Henry JE. 1981. Natural and applied control of insects by protozoa. Annual Review of Entomology, v. 26, n. 1, p. 49-73.

Hoffmann AA. Montgomery BL. Popovici J. Iturbe-Ormaetxe I.Johnson PH. O'Neill S L. 2011. Successful establishment of *Wolbachia* in *Aedes* populations to suppress dengue transmission. Nature, v. 476, n. 7361, p. 454-457.

Huang CG. Tsai KH. Wu WJ. Chen WJ. 2006. Intestinal Expression of H+ V-ATPase in the Mosquito *Aedes albopictus* is Tightly Associated with Gregarine Infection**.** Journal of Eukaryotic Microbiology, v. 53, n. 2, p. 127-135.

IBGE. 2014. População residente, por sexo e situação do domicílio,população residente de 10 anos ou mais de idade, total, alfabetizada e taxa de alfabetização, segundo os Municípios. Disponível em <http://http://www.cidades.ibge.gov.br/xtras/home.php> acessado em 16/05/2015

Jeandel P. Josse R. Durand JP. 2004. Exotic viral arthritis: role of alphavirus. Médecine tropicale: revue du Corps de santé colonial, v. 64, n. 1, p. 81.

Juliano SA. O'Meara GF. Morrill JR. Cutwa MM. 2002. Desiccation and thermal tolerance of eggs and the coexistence of competing mosquitoes. Oecologia, v. 130, n. 3, p. 458-469.

Kanduc D. Mittelman A. Serpico R. Sinigaglia E. Sinha A A. Natale C. 2002. Cell death: apoptosis versus necrosis (review). International journal of oncology, v. 21, n. 1, p. 165-170.

Kanis LA. Rabelo BD. Moterle D. Nogaretti RM. Nunes,T. Silva OS. Prophiro JS. 2013. Standardized extract of *Piper ovatum* (Piperaceae) to control *Aedes aegypti* larvae (Diptera: Culicidae). Industrial Crops and Products, v. 50, p. 816-820.

Koffi AA. 2012. Update on resistance status of *Anopheles gambiae* to conventional insecticides at a previous whopes field site," Yaokoffikro", 6 years after the political crisis in Cote d'Ivoire. Parasitogy of Vectors, v. 5, p. 68.

Kraemer MU. Sinka ME. Duda KA. Mylne A. Shearer FM Brady OJ. Hay SI. 2015. The global compendium of *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* occurrence. Scientific data, v. 2.

Kramar J. 1952. Hromadinka *Lankesteria culicis* Ross, parasit komara *Aedes* (Finlaya) *geniculatus* Oliv**.** Vestn. Ceskoslovenske Zoology Spolecnosti 16, 43–49.

Kusumawathie PH. 2008. Costs and effectiveness of application of *Poecilia reticulata* (guppy) and temephos in anopheline mosquito control in river basins below the major dams of Sri Lanka. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, v. 102, n. 7, p. 705-711.

Lantova L. Volf P. 2014. Mosquito and sand fly gregarines of the genus *Ascogregarina* and *Psychodiella* (Apicomplexa: Eugregarinorida, Aseptatorina)–Overview of their taxonomy, life cycle, host specificity and pathogenicity. Infection, Genetics and Evolution, v. 28, p. 616-627.

Leander BS. 2008. Marine gregarines: evolutionary prelude to the apicomplexan radiation?. Trends in Parasitology, v. 24, n. 2, p. 60-67.

Leles RN. D'alessandro WB. Luz C. 2012. Effects of *M*etarhi*zium anisopliae* conidia mixed with soil against the eggs of *Aedes aegypti.* Parasitology Research, v. 110, n. 4, p. 1579-1582.

Lien SM. 1980. Three new species of Ascocystis (Apicomplexa, Lecudinidae) from mosquitoes. Journal of Protozoology, v. 27, n. 2, p. 147-151.

Liu Y. Zhang H. Qiao C. Lu X. Cui F. 2011. Correlation between carboxylesterase alleles and insecticide resistance in *Culex pipiens* complex from China. Parasitoly of Vectors, v. 4, p. 236.

Lounibos LP. 2002. Invasions by insect vectors of human disease. Annual Review of Entomology, v. 47, n. 1, p. 233-266.

Lu P. Bian G. Pan X, Xi Z. 2012. Wolbachia induces density-dependent inhibition to dengue virus in mosquito cells. PLoS Neglected Tropical Diseases, v. 6, n. 7, p. e1754-e1754.

Maciel MV. Morais SM. Bevilaqua CM. Silva, R. A. Barros RS. Sousa RN. Souza-Neto MA. 2010. Atividade Inseticida in Vitro do Óleo de Sementes de Nim Sobre *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, Jaboticabal, v.19,n.1, p. 7-11.

Marchoux E. Salimbeni AT. Simond P. 1903.La fièvre jaune: rapport de la Mission Française. Impr. Charair.

Marques, MA. 2014. Mosquitos invasores na Europa e importância da sua vigilância em Portugal.

Martinez SS. van E. Helmut F. 2003. Growth disruption, abnormalities and mortality of *Spodoptera littoralis* (Boisduval)(Lepidoptera: Noctuidae) caused by azadirachtin. Neotropical Entomology, v. 30, n. 1, p. 113-125.

McCray EM. Fay RW. Schoof HF. 1970. The bionomics of *Lankesteria culicis* and *Aedes aegypti.* Journal of Invertebrate Pathology, v. 16, n. 1, p. 42-53.

Mohamed AK. Pratt JP. Nelson FR. 1987. Compatability of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* with chemical pesticides. Mycopathologia. V.99, n.2, p. 99-105.

Moino JR. Alves AB. 1998. Efeito de imidacloprid e fipronil sobre *Beauveria bassiana*(Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e no comportamento de limpeza de *Heterotermes tennuis* (Hagen). Anais da Sociedade Entomológica do *Brasi*l 27: 611-620.

Morales ME. 2005. Differential identification of Ascogregarina species (Apicomplexa: Lecudinidae) in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) by polymerase chain reaction. Journal of Parasitology, v. 91, n. 6, p. 1352-1356.

Mordue AJ. 2000. Azadirachtin from the neem tree *Azadirachta indica*: its action against insects. Anais da Sociedade Entomológica do Brasil, v. 29, n. 4, p. 615-632.

Moreira VS. 2006. Resultados preliminares do uso do suco de nim (Azadirachta indica) a 5% na prevenção e controle de parasitas gastrintestinais que acometem bezerros búfalos. In: XXXIII Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, Cuiabá – MG.

Morrison DA. 2009. Evolution of the Apicomplexa: where are we now?.Trends in Parasitology, v. 25, n. 8, p. 375-382.

MS – Ministério da Saude. 2015. **Monitoramento dos casos de dengue e febre de chikungunya até a Semana Epidemiológica 9,** 2015. Disponível em: http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2015/marco/13/Boletim-Dengue-SE09-2015.final.pdf. Acesso em: 23 set.

Mustafa MS. Rasotgi V. Jain S. Gupta V. 2015. 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.

Nelson MJ. 1986. *Aedes aegypti*: biologia y ecologia. Washington, DC, Organización Panamericana de La Salud.

OMS – Organização Mundial da Saude. **Circulação Zica Virus no Brasil. 2015** disponível em: http://www.paho.org/bra/Aconfirmada-acirculacao-do-zika-virusnobrasil&catid=1272%3Anoticiasdten&itemid=816. Acesso em: 22 julho. 2015.

OMS – Organização Mundial da Saude. **Global Alert and Response (GAR).** Dengue/dengue haemorrhagic fever.2014 Disponível em: <http://www.who.int/csr/disease/dengue/ en/>. Acesso em: 22 fev. 2015.

OMS - Organização Mundial de Saúde. **Test procedures for insecticide resistence monitoring in vectors, bio-efficacy and persistence of insecticides on treated surfaces. Genebra**: Organização Mundial da Saúde,1998.

OPAS/OMS - Organização Panamericana da Saúde. **Diretrizes relativas à prevenção e ao controle da dengue e da dengue hemorrágica nas Américas. Relatório da Reunião sobre Diretrizes para Dengue**. Washington, 16-20 de dezembro 1991. Washington: 1991.

Organização Mundial da Saúde. 2012. **International Travel and Health Interactive map**. Disponível em: <http://apps.who.int/ithmap/>. Acesso em: 25 jun. 2014.

Otta DA. Rott MB. Carlesso AM. Silva OS. 2012. Prevalence of *Acanthamoeba* spp.(Sarcomastigophora: Acanthamoebidae) in wild populations of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). Parasitology Research, v. 111, n. 5, p. 2017-2022.

Owuama CI. 2001. Entomopathogenic symbiotic bacteria, *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* of nematodes. World Journal of Microbiology and Biotechnology, v. 17, n. 5, p. 505-515.

Passos RA. Tadei WP. 2008. Parasitism of *Ascogregarina taiwanensis* and *Ascogregarina culicis* (Apicomplexa: Lecudinidae) in larvae of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Manaus, Amazon region, Brazil. Journal of Invertebrate Pathology, v. 97, n. 3, p. 230-236.

Paula OC. 2010. **Resistência de larvas de *Aedes aegypti* ao temefós e Interação do Larvicida com o fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae.*** Dissertação - Universidade Estadual do Norte Fluminsense Darcy Ribeiro- Campos dos Goytacazes, RJ.

Penido C. Costa KA. Pennaforte RJ. Costa MFS. Pereira JFG. Siani AC. Henriques MGMO. 2005. Anti-allergic effects of natural tetranortriterpenoids isolated from *Carapa guianensis* Aublet on allergen-induced vascular permeability and hyperalgesia. Inflammation Research, v. 54, n. 7, p. 295-303.

Polanczyk RA. Garcia MO. Alves SB. 2003. Potential of *Bacillus thuringiensis israelensis* Berliner for controlling *Aedes aegypti.* Revista de Saúde Pública, v. 37, n. 6, p. 813-816.

Powell JR. Tabachnick WJ. 2013. History of domestication and spread of *Aedes aegypti*-A Review. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 108, p. 11-17.

Powers AM. Brault AC. Tesh RB. Weaver SC. 2000. Re-emergence of Chikungunya and O'nyong-nyong viruses: evidence for distinct geographical lineages and distant evolutionary relationships. Journal of General Virology, v. 81, n. 2, p. 471-479.

Prophiro JS. Silva OS. Luna JED. Piccoli CF. Kanis LA. Silva MAND. 2011. *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae): coexistence and susceptibility to temephos, in municipalities with occurrence of dengue and differentiated characteristics of urbanization. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 44, n. 3, p. 300-305.

Quesada-Moraga E. Carrasco-Díaz JA. Santiago-Álvarez C. 2006. Insecticidal and antifeedant activities of proteins secreted by entomopathogenic fungi against *Spodoptera littoralis* (Lep., Noctuidae).Journal of Applied Entomology, v. 130, n. 8, p. 442-452.

Rahuman AA. 2008. Larvicidal activity of some Euphorbiaceae plant extracts against *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). Parasitology Research, v. 102, n. 5, p. 867-873.

Reeves WK. 2004. Oviposition by *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in relation to conspecific larvae infected with internal symbiotes. Journal of Vector Ecology, v. 29, p. 159-163.

Reiter P. Amador MA. Colon N. 1991. Enhancement of the CDC ovitrap with hay infusions for daily monitoring of *Aedes aegypti* populations. Journal of the American Mosquito Control Association (USA).

Reyes-Villanueva F. Becnel JJ. Butler JF. 2001. Morphological traits for distinguishing extracellular gamonts of *Ascogregarina culicis* and *Ascogregarina taiwanensis* in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. Journal of Invertebrate Pathology, v. 77, n. 3, p. 227-229.

Robertson, SE. 1993. The immunological basis for immunization series: Yellow fever. World Health Organization (Document WHO/EPI/GEN/93.18), Geneva.

Rose RI. 2001. Pesticides and public health: integrated methods of mosquito management. Emerging Infectious Diseases journal 7(1):17-23.

Roychoudhury S. Isawa H. Hoshino K. Sasaki T. Saito N. Sawabe K. Kobayashi M. 2007. Comparison of the morphology of oocysts and the phylogenetic analysis of four *Ascogregarina* species (Eugregarinidae: Lecudinidae) as inferred from small subunit ribosomal DNA sequences. Parasitology International, v. 56, n. 2, p. 113-118.

Roychoudhury S. Kobayashi M. 2006. New findings on the developmental process of *Ascogregarina taiwanensis* and *Ascogregarina culicis* in *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*. Journal of the American Mosquito Control Association, v. 22, n. 1, p. 29-36.

Rueda LM. 2008. Global diversity of mosquitoes (Insecta: Diptera: Culicidae) in freshwater. In: Freshwater Animal Diversity Assessment. Springer Netherlands, p. 477-487.

Sanders RD. Poinar GO. 1973. Fine structure and life cycle of *Lankesteria clarki* sp. n. (Sporozoa: Eugregarinida) parasitic in the mosquito *Aedes sierrensis* (Ludlow). The Journal of Protozoology, v. 20, n. 5, p. 594-602.

Schilte C. Staikowsky F. Couderc T. Madec Y. Carpentier F. Kassab S. Michault A. 2012.Chikungunya virus-associated long-term arthralgia: a 36-month prospective longitudinal study. PLoS neglected tropical diseases, v. 7, n. 3, p. e2137-e2137.

Schumacher M. 2011. Antiinflammatory, Pro-apoptotic, and Anti-proliferative Effects of a Methanolic Neem Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.9, n.17; p. 2013 3268 (*Azadirachta indica*) Leaf Extract are Mediated Via Modulation of The Nuclear FactorkB Pathway. Genes Nutrition, 6: 149-160.

Scott TW. Clark GG. Lorenz LH. Amerasinghe PH. Reiter P. Edman JD. 1993. Detection of multiple blood feeding in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) during a single gonotrophic cycle using a histologic technique. Journal of Medical Entomology, v. 30, p. 94-94.

Silva WJ. Dória GAA. Maia RT. Nunes RS. Carvalho GA. Blank AF. Cavalcanti SCH. 2008. Effects of essential oils on *Aedes aegypti* larvae: alternatives to environmentally safe insecticides. Bioresource Technology, v. 99, n. 8, p. 3251-3255.

Spencer JP. Olson JK. 1982. Evaluation of the combined effects of methoprene and the protozoan parasite *Ascogregarina culicis* (Eugregarinida, Diplocystidae), on *Aedes* mosquitoes [Integrated pest management]. Mosquito News.

Staples JE. Fischer M. 2014. Chikungunya virus in the Americas—what a vectorborne pathogen can do. New England Journal of Medicine, v. 371, n. 10, p. 887-889.

Sulaiman I. 1992. Infectivity and pathogenicity of *Ascogregarina culicis* (Eugregarinida: Lecudinidae) to *Aedes aegypti* (Diptera: culicidae). Jornal de Medicina Entomologica, v. 29, p. 1-4.

Surtees G. 1967. *Aedes* (Stegomyia) *albopictus*: A summary of present knowledge with particular reference to competition with *Aedes aegypti*. International Journal of Pest Management, v. 13, n. 2, p. 172-172.

Tatem AJ. Hay I. Rogers, DJ. 2006. Global traffic and disease vector dispersal. Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 103, n. 16, p. 6242-6247.

Tchankouo-Nguetcheu S. Khun H. Pincet L. Roux P. Bahut M. Huerre M. Choumet V. 2010. Differential protein modulation in midguts of *Aedes aegypti* infected with chikungunya and dengue 2 viruses. PLoS One, v. 5, n. 10, p. e13149.

Thomas MB. Read AF. 2007. Can fungal biopesticides control malaria ?. Nature Reviews Microbiology, v. 5, n. 5, p. 377-383.

Vacari AM. Albergaria NMMS. Otuka AK. Dória HOS. Loureiro E. Bortoli SA. 2004. Seletividade de óleo de nim (*Azadirachta indica A. Juss*) sobre *Podisus nigrispinus* (Callas, 1851) (Heteroptera: Pentatomidae). Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo, v. 71, (supl.), p. 741-749.

Valle D. Galvani AP. 2009. Impact of insecticide interventions on the abundance and resistance profile of *Aedes aegypti.* Epidemiology and infection nº137.08: 1203-1215

Vasconcelos PF. 2000. Febre amarela. Sociedade Brasileira de Pediatria, Rio de Janeiro. Vigilância Epidemiológica. In: Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso.

Vasconcelos PF. Sperb AF. Monteiro HA. Torres MA. Sousa MR. Vasconcelos HB. Rodrigues SG. 2003. Isolations of yellow fever virus from *Haemagogus leucocelaenus* in Rio Grande do Sul State, Brazil. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, v. 97, n. 1, p. 60-62.

Votýpka J. Lantov AL. Ghosh K. Braig H. Volf P. 2009.Molecular characterization of gregarines from sand flies (Diptera: Psychodidae) and description of *Psychodiella* ng (Apicomplexa: Gregarinida). Journal of Eukaryotic Microbiology, v. 56, n. 6, p. 583-588.

Walker ED. Poirier SJ. Veldman WT. 1987. Effects of *Ascogregarina barretti* (Eugregarinida: Lecudinidae) infection on emergence success, development time, and size of *Aedes triseriatus* (Diptera: Culicidae) in microcosms and tires. Journal of medical entomology, v. 24, n. 3, p. 303-309.

Wetzel DM. Håkansson S. Hu K. Roos D. Sibley LD. 2003. Actin filament polymerization regulates gliding motility by apicomplexan parasites. Molecular biology of the cell, v. 14, n. 2, p. 396-406.

World Health Organization. Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquito larvae to insecticides. 1981.

World Health Organization, Geneva. WHO/Vector Control/66.195, 1966.

Yousten AA. 1996. Mosquitocidal toxins from bacteria of the Genus *Bacillus*,p. 304-309. In: Anais Conferências e Palestras, V SINCOBIOL – Simpósio de Controle Biológico, Foz do Iguaçu, PJ Comunicação & Eventos Ed., 448p.