

## INFLUÊNCIA DO ENTOMOPATÓGENO *Metarhizium anisopliae* (HYPOCREALES: CLAVICIPITACEAE) NA PREFERÊNCIA ALIMENTAR E OVIPOSIÇÃO DE FÊMEAS *Aedes aegypti* (CULICIDAE) COM DIFERENTES TEMPOS DE INFECÇÃO

Laerciana Pereira Vieira<sup>1</sup> e Richard Ian Samuels<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Doutora, Professora da Faculdade Pitágoras, Guarapari/ ES, laerciana@yahoo.com.br; <sup>2</sup> Doutor, Professor da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias – Laboratório de Entomologia e Fitopatologia, Campos/RJ.

**RESUMO** – O mosquito *A. aegypti* é o principal vetor urbano dos arbovírus da Febre amarela, Dengue, Zika e Chikungunya. Recentemente estudos têm revelado a suscetibilidade de larvas e adultos desse vetor à infecção por fungo entomopatógeno *M. anisopliae*. Esse trabalho teve como objetivo verificar se esse fungo tem influência no comportamento alimentar e fecundidade e sobrevivência de fêmeas de *A. aegypti* com 48, 72 e 96h de infecção. O fungo foi aplicado diretamente sobre as fêmeas na concentração  $1 \times 10^7$  conídios/ml (para tratadas) e tween 0,05% para os grupos controle. Foram utilizadas 120 fêmeas distribuídas em três repetições para o teste de preferência alimentar por sangue, e dessas, dez totalmente egurgitadas de cada repetição foram separadas para análise de fecundidade e viabilidade dos ovos. Foi observado que o fungo não interferiu na sobrevivência de fêmeas com 48 e 96h de infecção. Foi registrado uma diminuição na preferência alimentar por sangue em fêmeas infectadas, principalmente no grupo com 72h de infecção, e fêmeas com 72h de infecção ovipositaram 63,1% menos ovos que o controle, mostrando o potencial desse microrganismo no controle da população de mosquitos.

**PALAVRAS-CHAVE:** Fêmeas *Aedes aegypti*. *Metarhizium anisopliae*. Controle. Ovos.

**ABSTRACT** - The mosquito *A. aegypti* is the main urban vector of the arboviruses of yellow fever, Dengue, Zika and Chikungunya. Recently studies have revealed the susceptibility of larvae and adults of this vector to entomopathogenic fungus infection, *M. anisopliae*. The objective of this work was to verify if this fungus has influence on the feeding behavior and fecundity and survival of *A. aegypti* females with 48, 72 and 96 hours of infection. The fungus was applied directly to the females at the concentration  $1 \times 10^7$  conidia / ml for treated and 0.05% tween for the control groups. We used 120 females distributed in three replicates for the blood feeding preference test, and of these, ten fully exegarited from each replicate were separated for analysis of egg fertility and viability. It was observed that the fungus did not interfere in the survival of females with 48 and 96 hours of infection. There was a decrease in blood feeding preference in infected females, especially in the group with 72 hours of infection, and females with 72 hours of infection oviposited 63.1% less eggs than the control, showing the potential of this microorganism in the control of the mosquito population.

**KEYWORD:** Females *Aedes aegypti*. *Metarhizium anisopliae*. Control. Eggs.

### 1 INTRODUÇÃO

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

*A. aegypti*, além de vetor da dengue, também é o transmissor da febre amarela, sendo ambas causadas por cepas do vírus *Flavivirus* (Família Flaviridae) (Sim; Dimopoulos, 2010). Atualmente conhecem-se quatro sorotipos distintos do agente etiológico do vírus (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4), que podem se apresentar como: Dengue Assintomática, Clássica, Hemorrágica e Choque da dengue. Não há vacina para a doença, portanto o controle do vetor é a única maneira de prevenção da doença (KAUR et al., 2003). Ele também é o principal vetor urbano dos arbovírus Zika e Chikungunya (ZARA, et al. 2016).

Desde o começo do século XX, os agentes químicos têm sido usados para combater as populações de *A. aegypti*, porém apresentaram o efeito tóxico ao homem e provocaram resistência na população do mosquito (FRENCH-CONSTANT, 2005).

Por tais resultados negativos com o uso de inseticidas clorados, deu-se grande importância aos microrganismos biológicos que pudessem eliminar mosquitos vetores de doenças humanas. Isolados de fungos, bactérias entomopatogênicos, virulentos contra mosquitos, além de apresentarem baixa contaminação do ambiente, possuem especificidade aos organismos-alvo, baixa probabilidade do mosquito tornar-se resistente, e ademais possibilita a auto-dispersão no caso dos fungos.

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

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

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

O presente trabalho teve como objetivo analisar se há influência do entomopatógeno *M. anisopliae* na alimentação sanguínea e fecundidade.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 PREFERÊNCIA ALIMENTAR DE FÊMEAS DE *A. aegypti*, INFECTADAS COM *M. anisopliae*, POR SANGUE.

Para testar a preferência alimentar de fêmeas por sangue, infectadas com fungo, foram selecionados mosquitos *A. aegypti* (Linhagem Rockefeller) com três dias de idade, criados no insetário do Laboratório de Entomologia e Fitopatologia (CCTA/UENF).

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

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

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

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

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

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

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

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não houve diferença significativa entre fêmeas com 48 e 96h de infecção e controle. Foi observado diferença significativa ( $F_{(5,10)} = 7,48$ ;  $p=0,003667$ ) no tempo de 72h de infecção (Fig.1), onde as fêmeas doentes se alimentaram 20% menos de sangue, quando comparado ao controle.

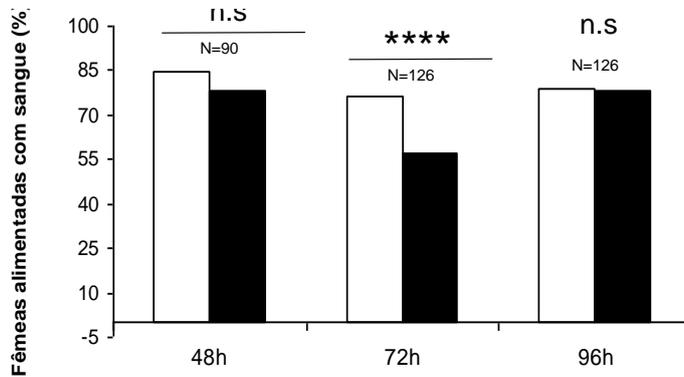
Resultados semelhantes foram registrados por Scholte et al. (2006) para fêmeas de *An. gambiae* infectadas com *M. anisopliae*, porém em nosso trabalho em menor concentração, quando comparado à por Scholte et al. ( $1,6 \times 10^9$  conídios/ml). Os mosquitos estavam confinados em gaiolas 30x30x30cm.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

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

A baixa preferência pode ser considerada um ponto positivo para o controle do *A. aegypti* uma vez que são insetos que estão intimamente associados a humanos e pouco se alimentam de sacarose, encontrada no néctar de plantas e frutas. As fêmeas são capazes de

sobreviver e reproduzir somente com alimentação sanguínea, sendo isso epidemiologicamente relevante uma vez que esse mosquito é vetor do vírus da Dengue (SCOTT, 1997).

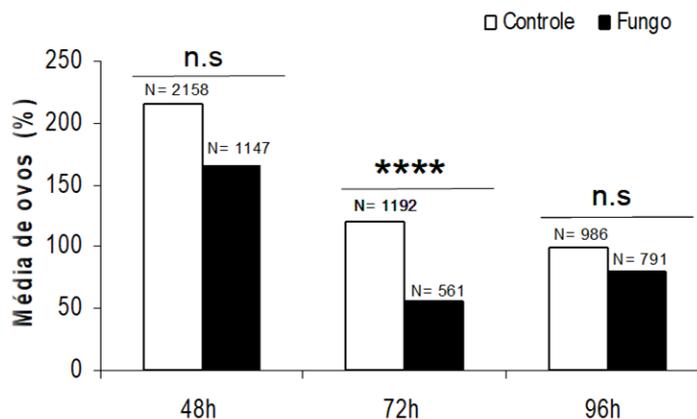
**Figura 1.** Preferência alimentar de fêmeas *A. aegypti* após 48,72 e 96 horas de infecção. Teste Duncan,  $0,05 \leq P$ .



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

Os dados não apresentaram diferença significativa na quantidade de ovos produzidos por fêmeas com 48 e 96 horas de infecção. Porém, as fêmeas com 72 horas de infecção apresentaram menor quantidade de ovos ( $F_{(5,10)} = 10,86$ ;  $p = 0,00087$ ) (Fig.2). A diferença entre fêmeas tratadas e controle foi de 63,1%. Scholte, et al. (2006) mostraram em seu trabalho que o fungo foi capaz de interferir na quantidade de ovos produzidos por fêmeas de *An. gambiae* com 72h de infecção.

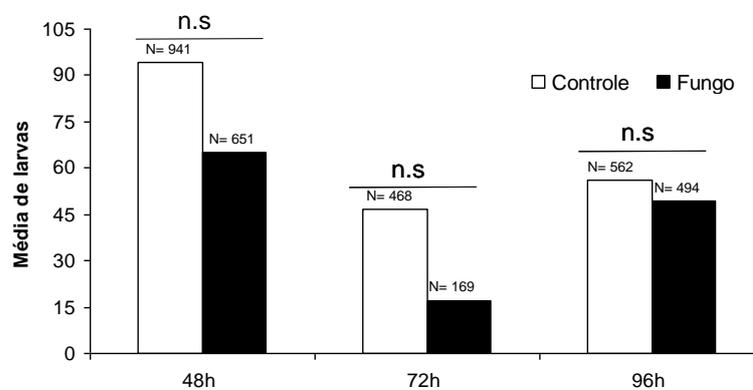
**Figura 2.** Quantidade de ovos produzidos por fêmeas *A. aegypti* em diferentes tempos de pós-infecção. Teste Duncan,  $0,05 \leq P$ .



As destruxinas (toxinas do fungo) têm poder de induzir a despolarização das células, causando também injúrias citológicas. Segundo Sikura, et al. (1972) *fitness* reprodutivo em fêmeas de *An. Gambiae* foi reduzido devido a injúrias histológicas e citológicas nos ovários provocadas pelo *M. anisopliae*. O fungo interferiu nos recursos ou fontes necessárias para a reprodução, como, por exemplo, corpo gorduroso.

O resultado encontrado para fêmeas com 72 horas de infecção pode estar relacionado ao “limite do custo da defesa”. Quando o sistema imunológico é altamente ativado existe a possibilidade de déficit em algumas funções do organismo do inseto, como, por exemplo, a reprodução. Quando não há uma redução, pode ocorrer atraso em algum dos processos fisiológicos do organismo. A natureza destes custos é desconhecida, porém pode ser resultado de vias bioquímicas compartilhadas, ou o receptor que está envolvido na resistência a infecção também está participando do desenvolvimento de instares larvais (SCHMID-HEMPEL, 2005). Price et al. (2011) sugeriu que os genes expressos a partir do corpo gorduroso são direcionados para produção de proteínas que estão envolvidas no acúmulo de nutrientes importantes na vitelogenese.

**Figura 3.** Quantidade de larvas eclodidas de ovos produzidos por fêmeas de *A. aegypti* a diferentes tempos de pós-infecção. Teste Duncan,  $0,05 \leq$ .



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

Os mosquitos com 48h de infecção apresentaram oviposição tardia, com uma diferença de 24h para o controle. Isso também foi observado para fêmeas com 72h de infecção. As fêmeas com 96h de infecção apresentaram comportamento de oviposição oposto aos demais tempos. Cinquenta por cento dos ovos foram ovipostos no segundo dia de avaliação, enquanto fêmeas do controle ovipositaram 47% de seus ovos no quinto dia. Talvez a presença de destruxinas e seus componentes secundários tenham estimulado esse comportamento nesse grupo de fêmeas, reduzindo, talvez, a resposta imune e maximizando a reprodução.

Apesar de fêmeas com 72 e 96h de infecção apresentarem menor número de larvas eclodidas, estatisticamente a diferença não foi significativa ( $F_{(5,10)} = 2,509$ ;  $p = 0,10121$ ) (FIG. 3), apesar da quantidade no controle, de fêmeas do período 72 pós-infecção, sobressair em 299 larvas. A não eclosão de alguns ovos pode estar relacionada à má formação do embrião ou ausência de algum componente importante para seu desenvolvimento (FIG.4).

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

**Figura 4.** Imagem do processo de embriogênese de *A. aegypti*. Embrião de fêmeas com 72h de infecção. **A** – embrião saudável; **B**- embrião mal formado, possivelmente devido a infecção por *M. anisopliae*.



#### 4 CONCLUSÃO

No teste de preferência alimentar foi observada diferença significativa no tempo de 72h de infecção, onde as fêmeas doentes se alimentaram 20% menos de sangue, quando comparado ao controle. A não preferência de algumas fêmeas por sangue pode estar relacionado ao tempo de ação do fungo no organismo, podendo estar associado à degradação de tecidos, produção de metabólicos secundários e paralisia do sistema digestivo, resultado considerado positivo para o controle do *A. aegypti* uma vez que são insetos que estão intimamente associados a humanos e pouco se alimentam de sacarose.

A quantidade de ovos ovipostos por fêmeas com 48 e 96 horas de infecção não apresentou diferença significativa. Porém as fêmeas com 72 horas de infecção apresentaram menor quantidade de ovos. Isso sugere “limite do custo da defesa”. Quando o sistema imunológico é ativado existe a possibilidade de déficit em algumas funções do organismo do inseto, como, por exemplo, a reprodução. Outra hipótese seria o compartilhamento de vias bioquímicas durante o processo de reprodução e defesa.

#### 5 AGRADECIMENTOS

A Universidade Estadual Norte Fluminense- Darcy Ribeiro (UNF) pela oportunidade de realizar esse trabalho, e a FAPERJ pela concessão da bolsa.

#### REFERÊNCIAS

BLANFORD, S.; CHAN, B. H. K.; JENKINS, N.; SIM, D.; TURNER, R. J.; READ, A. F. THOMAS, M. B. (2005) Fungal pathogen reduces potential for malaria transmission. **Science** 308: 1638–1641.

CHARNLEY, A.K. (1997) Entomopathogenic fungi and their role in pest control, in The Mycota IV, eds C.P. Kubicek and I.S. Druzhinina, Berlin: Springer-Verlag pp.185-201.

- CLARK, T. B.; KELLEN, W. R.; FUKUDA, T.; LINDEGREN. Field and laboratory studies on the pathogenicity of the fungus *Beauveria bassiana* to tree genera of mosquitoes. **Jornal of Invertebrate Pathology**, v.11, n. 1-7, 1968.
- DAOUST, R. A.; ROBERTS, D. W. (1982) Virulence of Natural and Insect-Passaged strains of *Metarhizium anisopliae* to Mosquito Larvae. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.40, p. 107-117.
- DARBRO, J.; JOHNSON, P.; THOMAS, M.; RITCHIE, S.; KAY, B.; RYAN, P. Effects of *Beauveria bassiana* on Survival, Blood-Feeding Success and Fecundity of *Aedes aegypti* in Laboratory and Semi-field Conditions. **American Journal of Tropical Medicine & Hygiene**.2012.
- FRENCH-CONSTANT, R. H. (2005) Something old, something transgenic, or something fungal for mosquito control. **Ecology and Evolution**, p.20, p. 577-579.
- FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. **Dengue Instruções de Combate ao vetor**. Manual de Normas Técnicas. Ministério da Saúde, Brasília, Brasil. 2001.
- HARRINGTON, L.C.; EDMAN, J.D.; SCOTT, T.W. Why do female *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) feed preferentially and frequently on human blood? **Soc. Entomol. of Am.** v.38. p. 411-422, 2001.
- KAUR, J. S.; LAI, Y. L.; GIGER, A. D. Learning and memory in the mosquito *Aedes aegypti* shown by conditioning against oviposition deterrence. **Medical and Veterinary Entomology**, v.17, p. 457-460, 2003.
- LACEY, C. M.; LACEY, L. A.; ROBERTS, D. R. Route of invasion and histopathology of *Metharizium anisopliae* in *Culex quinquefasciatus*. **Jornal of Invertebrate Pathology**, v. 52, p.108-118, 1987.
- MNYONE, L.L.; KIRBY, M.J.; MPINGWA, M.W.; LWETOJERA, D.W.; KNOLS, B.G.J.; TAKKEN, W.; KOENRAADT, C.J.M.; RUSSEL, T.L. Infection of *Anopheles gambiae* mosquitoes with entomopathogenic fungi: effect of host age and blood-feeding status. **Parasitol. Res.** v.108, p.317-322, 2011.
- PAL, S.; LEGER, R.J.ST.; WU, L.P. Fungal peptide Destruxin A plays a specific role in suppressing the innate immune response in *Drosophila melanogaster*. **J. Biol. Chem.**, v.282, p.8969-8976, 2006.
- PRICE, D.P.; NAGARAJAN, V.; CHURBANOV, A.; HOUDE, P.; MILLIGAN, B.; DRAKE, L. L.; GUSTAFSON, J. E.; HANSEN, I. A. The fat body transcriptomes of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*, pre- and post- blood meal. **Plos one**. v.6, p. 1-13, 2011.
- SCHMID-HEMPEL, P. Evolutionary ecology of insect immune defenses. **Annual Review of Entomology**, v.50, p.529- 551, 2005.
- SCOTT, T.W.; NAKSATHIT, A.; DAY, J.E.; KITTAYAPONG, P.; EDMAN, J. A fitness advantage for *Aedes aegypti* and the viruses it transmits when females feed only on human blood. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.57, n.2, p.235-239,1997.

SCHOLTE, E.; KNOLS, B. G.; TAKKEN, W. Autodissemination of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* amongst adults of the Malaria vector *Anopheles gambiae*. **Malaria Journal**, v.3, p. 1-6, 2004.

SCHOLTE, E.; NG`HABI, K.; KIHONDA, J.; TAKKEN, W.; PAAIJMANS, K.; ABDULA, S.; KILLEEN, G. F.; KNOLS, B. G. J. An entomopathogenic fungus for control of adult African malaria mosquitoes. **Science**, v.308, p. 1641-642, 2005.

SCHOLTE, E.; KNOLS, B. G.; TAKKEN, W. Infection of the malária mosquito *Anopheles gambiae* with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* reduces blood feeding and fecundity. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.91, p.43-49, 2006.

SIM, S.; DIMOPOULOS, G. Dengue Virus Inhibits Immune Responses in *Aedes aegypti* Cells. **Plos one**, v.5, p.1-9, 2010.

ZARA, A. L.S.A. et al. Estratégias de controle do *Aedes aegypti*: uma revisão. **Epidemiol. Serv. Saude**, Brasília, v.25, n.2, p.391-404, 2016.

**Recebido para publicação:** 16 de agosto de 2017

**Aprovado:** 08 de novembro de 2017.