

**INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA - INPA  
PROGRAMAS DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA, CONSERVAÇÃO E  
BIOLOGIA EVOLUTIVA - PPG GCBEV**

Expressão diferencial de genes codificadores de Proteínas de choque térmico (*Hsp*)  
em *Aedes aegypti* Linnaeus, 1762 (Diptera: Culicidae), mantidos em condições  
climáticas previstas pelo IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change) para o  
ano de 2100

JOAQUIM FERREIRA DO NASCIMENTO NETO

Manaus / Amazonas  
Junho - 2019

JOAQUIM FERREIRA DO NASCIMENTO NETO

Expressão diferencial de genes codificadores de Proteínas de Choque Térmico (*Hsp*) em *Aedes aegypti* Linnaeus, 1762 (Diptera: Culicidae), mantidos em condições climáticas previstas pelo IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change) para o ano de 2100

Orientador: Dr. Wanderli Pedro Tadei – INPA  
Co-orientador: Dr. Adolfo José da Mota – UFAM

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva (PPG GCBEv) do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA) como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva.

Manaus / Amazonas  
Junho - 2019

SEDAB/INPA © 2019 - Ficha Catalográfica Automática gerada com dados fornecidos pelo(a) autor(a)  
Bibliotecário responsável: Jorge Luiz Cativo Alauzo - CRB11/908

N244e Nascimento, Joaquim Ferreira do Nascimento Neto  
Expressão diferencial de genes codificadores de  
Proteínas de choque térmico (Hsp) em *Aedes aegypti*  
Linnaeus, 1762 (Diptera: Culicidae), mantidos em  
condições climáticas previstas pelo IPCC  
(Intergovernmental Panel on Climate Change) para o  
ano de 2100 / Joaquim Ferreira do Nascimento Neto  
Nascimento; orientador Wanderli Pedro Tadei Tadei;  
coorientador Adolfo José da Mota Mota. --  
Manaus:[s.l], 2019.  
49 f.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós Graduação  
em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva) --  
Coordenação do Programa de Pós-Graduação, INPA, 2019.

1. Aquecimento global. 2. Microcosmo. 3. Sala  
ambiental. 4. Amazônia. I. Tadei, Wanderli Pedro  
Tadei, orient. II. Mota, Adolfo José da Mota,  
coorient. III. Título.

CDD: 597.80415

### Sinopse:

No presente trabalho, avaliou-se à expressão dos genes *Hsp26*, *Hsp83* e *Hsc70* de *Aedes aegypti*, exposto a diferentes cenários de aquecimento global, sob condições laboratoriais, simulando os eventos climáticos previstos pelo IPCC para o ano de 2100.

Palavras-chave: Aquecimento global, Microcosmo, Sala ambiental, Amazônia.

**Dedico este trabalho a Deus e aos meus pais,  
Rosevete e João, por todo o amor, carinho e  
dedicação depositados em mim.**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me prover o folego de vida e todas as forças necessárias para que eu pudesse chegar até aqui. Agradeço imensamente aos meus pais Rose e João por toda dedicação, carinho, incentivo e apoio incondicional. Sem eles não teria conseguido alcançar meus objetivos. A minha irmã Luana por todo apoio e carinho. A Lilian Simião, pelo carinho, apoio e incentivo de todas as horas.

Ao meu orientador Dr. Wanderli Pedro Tadei, por me receber e ter dado oportunidade para eu mostrar do que sou capaz como profissional. Mesmo novato no laboratório, nunca me tratou com desrespeito, inferioridade e/ou indiferença, e sim, como um profissional de pesquisa. Nunca irei esquecer dos conselhos, conversas, planos e estímulos para que eu me tornasse um profissional e pessoa melhor do que era quando comecei.

Ao meu coorientador Dr. Adolfo José da Mota, por ter me apresentado as portas para uma área tão inusitada e apaixonante da biologia que é a genética. Agradeço a confiança, aos ensinamentos, paciência, conselhos, apoio e toda ajuda e auxílio que depositou em mim durante todos os anos nos quais trabalhamos juntos. Mesmo nas dificuldades, sempre estava me motivando e guiando, com isso, tornou-se uma parte fundamental na minha escolha profissional.

A Dr. Dosemary Roque do laboratório de Malária e Dengue por toda a atenção, ajuda e carinho prestados a mim. Mesmo na correria, com os prazos apertados e toda a dinâmica que é a pesquisa em laboratório, sempre esteve disposta e me ajudar e auxiliar no que fosse preciso. Seus conselhos, sugestões e auxílios foram de extrema importância e relevância para mim, muito obrigado por tudo.

A todos os amigos que fiz no laboratório de Malária e Dengue e no INPA, a companhia de vocês foi muito importante para mim, obrigado pelo carinho e atenção de todos, isto foi muito significativo para mim. Agradeço em especial aos meus amigos Augusto, Elerson, Thamiles, Rejane, Joelma, Claudia, Gervilane, Edineusa, Gabriel, por me ajudarem e instruírem de forma especial durante todo esse tempo de pesquisa, muito obrigado por tudo, abraço a todos.

Agradeço também a todo corpo administrativo do PPG-GCBEv por toda atenção, em especial a dona Elci pela atenção, conselhos e ajudas que me forneceu nas horas de sufoco com documentos, muito obrigado.

Aos meus amigos Francisco Neto e Daniele Raquel, por estarem me acompanhando nesta engajada caminhada da pesquisa desde o início da minha vida na genética. Muito obrigado pelos conselhos, ajudas, pela amizade, por tudo. O carinho e amizade de vocês durante todos esses anos foi fundamental.

A Samara, por sua amizade, carinho e auxílios de todas as horas, obrigado por tudo. A sua companhia no laboratório, nas conversas, sua amizade durante esses anos de pesquisa foi muito importante para mim.

Agradeço a toda equipe do Laboratório de Biotecnologia UFAM, alunos e professores, por estarem comigo no dia a dia da pesquisa. A companhia de todos vocês, em todos momentos nos quais estive no laboratório foram especiais. Obrigado pela amizade, dicas, auxílios, pelas conversas fora de hora e nos lanches, por tudo. Cada momento e aprendizado que tive com cada um, agregou positivamente no meu eu pessoal e profissional. Vocês são show.

Aos meus amigos de longa data Lindimar e Bacelar, que me acompanharam desde o início da vida científica e sempre estiveram ali me ajudando e apoiando. Obrigado pelo apoio, conversas, almoços, lanches da tarde e principalmente pela amizade de vocês. O apoio e incentivo de vocês foram fundamentais para que eu pudesse chegar até aqui. Muito obrigado.

Agradeço imensamente a toda equipe do Laboratório de Ecofisiologia e Evolução Molecular por ter me recebido e acolhido durante o período experimental no microcosmo, em especial a Nazaré, Samara, Fernanda, Danilo, Waldir e Jaqueline, por terem me acompanhado de perto na correria no laboratório, sempre estiveram ali para me apoiar, conversar, trocar ideias, experiências e me fornecer suporte quando eu travava em algum ponto. O companheirismo de todos vocês foi extremamente relevante para mim durante esse período. Certamente, esta etapa teria sido mais difícil sem vocês, muito obrigado.

Agradeço imensamente também a toda minha família e amigos por me apoiarem e entenderem minha constante ausência em muitos momentos, todo apoio e carinho de vocês foram muito importantes para mim.

Agradeço a todos os professores que anteriormente, somaram à minha formação profissional. As oportunidades e confiança que todos vocês depositaram a mim, foram extremamente importantes. Cada um teve uma parcela significativa durante a minha formação. Em especial a Prof. Dr. Ana Frazão Teixeira que me guiou e auxiliou para que eu conseguisse dar o primeiro passo na carreira científica. Seu incentivo, amizade e apoio durante o meu início na ciência foi muito importante. Obrigado por me ajudar e guiar em todos os momentos.

Agradeço as agências de fomento: Conselho Nacional de Desenvolvimento Tecnológico (CNPq); Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) e projetos: INCT ADAPTA I e II e Projeto Pro-Amazônia. Por financiar esta pesquisa.

## RESUMO

As alterações antrópicas estão associadas à intensificação do efeito estufa, resultando em variações nos níveis de CO<sub>2</sub> e da temperatura, agravando os efeitos das mudanças climáticas na Amazônia. Estas modificações alteram a evapotranspiração e modificam os índices pluviométricos nesta região, resultando no declínio da floresta tropical, favorecendo a formação das áreas de campos. O *Intergovernmental Panel on Climate Change* (IPCC) prevê para a Amazônia aumentos de 2,5 °C e 400 ppm de CO<sub>2</sub> no cenário intermediário (A1B) e 4,5 °C e 850 ppm de CO<sub>2</sub> no cenário extremo (A2). Estas mudanças favorecem os criadouros naturais e artificiais do *Aedes aegypti*, espécie com acentuada antropofilia e transmissora da Dengue, Zika, Febre Amarela e da Febre Chikungunya. As pequenas e grandes *Heat shock proteins* (*Hsp*) podem explicar essa adaptabilidade do vetor, pois estão associadas ao estresse térmico e proporcionam maior estabilidade às proteínas intracelulares, aumentando a tolerância aos fatores ambientais. Colônias de *A. aegypti* mantidas por mais de sessenta gerações foram analisadas nos seguintes cenários: atual, e nos cenários simulados (A1B) e (A2) do IPCC. O mRNA foi extraído e a expressão gênica de *Hsp26*, *Hsp83* e *Hsc70* foi analisada por PCR *Real Time*. Os Machos e as fêmeas mostraram diferenças significativas na expressão dos genes avaliados. Em todas as condições climáticas testadas, os genes *Hsp* apresentaram diferenças significativas na regulação dos genes, com o cenário intermediário, apresentando as maiores variações. O padrão da expressão não apresentou, em parte, semelhança com os dados verificados na literatura. Sugerindo que tais organismos, desenvolveram mecanismos de adaptações para condições de estresse ainda não bem descritos, sendo necessários outros estudos para averiguar com mais afinco, tais mecanismos.

Palavras-chave: Aquecimento global, Microcosmo, Sala ambiental, Amazônia

## ABSTRACT

Anthropogenic changes are associated with the intensification of the greenhouse effect, resulting in variations in CO<sub>2</sub> levels and temperature, aggravating the effects of climate change in the Amazon. These changes alter the evapotranspiration and modify the rainfall indexes in this region, resulting in the decline of the tropical forest, favoring the formation of the field areas. The Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC) predicts for the Amazon increases of 2.5 °C and 400 ppm of CO<sub>2</sub> in the intermediate scenario (A1B) and 4.5 °C and 850 ppm of CO<sub>2</sub> in the extreme scenario (A2). These changes favor the natural and artificial breeding grounds of *Aedes aegypti*, a species with marked anthropophilia and a transmitter of Dengue, Zika, Yellow Fever and Chikungunya Fever. The small and large Heat shock proteins (Hsp) can explain this adaptability of the vector, since they are associated with thermal stress and provide greater stability to the intracellular proteins, increasing the tolerance to environmental factors. *A. aegypti* colonies maintained for over sixty generations were analyzed in the following scenarios: current, and in the simulated scenarios (A1B) and (A2) of the IPCC. The mRNA was extracted and the gene expression of Hsp26, Hsp83 and Hsc70 was analyzed by Real Time PCR. Males and females showed significant differences in the expression of the evaluated genes. In all the climatic conditions tested, Hsp genes presented significant differences in gene regulation, with the intermediate scenario, presenting the greatest variations. The expression pattern did not present, in part, similarity with the data verified in the literature. Suggesting that such organisms have developed adaptive mechanisms for stress conditions not yet well described, and other studies are needed to ascertain, such mechanisms.

Key words: Global warming, Microcosm, Environmental room, Amazon

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>XI</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>XII</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b> .....	<b>XIII</b>
<b>1. Introdução</b> .....	<b>1</b>
1.1 O <i>Aedes aegypti</i> .....	4
1.2 Biologia do Mosquito .....	5
1.3 <b>Proteínas de Choque Térmico - Heat Shock Proteins (Hsp)</b> .....	<b>6</b>
<b>2. Justificativa</b> .....	<b>8</b>
<b>3. Hipóteses</b> .....	<b>9</b>
<b>4. Objetivos</b> .....	<b>10</b>
4.1 Objetivo Geral .....	10
4.2 Específicos .....	10
<b>5. Materiais e métodos</b> .....	<b>10</b>
5.1 Local do Experimento .....	10
5.2 Manutenção das gerações de <i>Aedes aegypti</i> no Microcosmos.....	10
5.3 Microcosmos .....	11
5.3.1 Cenários Climáticos.....	11
5.3.2 Preparo dos Grupos Experimentais .....	12
5.4 Extração de RNA Total e Síntese de cDNA.....	13
5.5 PCR quantitativa em Tempo Real (qPCR).....	13
<b>6. Análise Estatística</b> .....	<b>15</b>
<b>7. Resultados</b> .....	<b>15</b>
7.1 Microcosmo .....	15
7.2 Teste de especificidade e eficiência dos <i>primers</i> para qPCR .....	17
7.3 Ensaio quantitativos com PCR em Tempo Real (qPCR) .....	19
<b>8. Discussão</b> .....	<b>24</b>
<b>9. Conclusão</b> .....	<b>28</b>
<b>10. Referências</b> .....	<b>29</b>

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1. <b>Simulações do IPCC para a temperatura e CO<sub>2</sub> até 2100.</b> .....	2
Tabela 2. <b>Sequências dos <i>primers</i> para qPCR.</b> .....	14

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Concentração de CO <sub>2</sub> nos cenários climáticos. ....	15
Figura 2. Temperatura do ar nos cenários climáticos. ....	16
Figura 3. Concentração da umidade do ar.. ....	16
Figura 4. Teste de eficiência dos <i>primers</i> para o gene ACTIN. ....	17
Figura 5. Teste de eficiência dos <i>primers</i> para o gene $\alpha$ -tubulin. ....	17
Figura 6. Teste de eficiência dos <i>primers</i> para o gene RPL 32. ....	18
Figura 7. Teste de eficiência dos <i>primers</i> para o gene eEF1 $\alpha$ . ....	18
Figura 8. Teste de eficiência dos <i>primers</i> para o gene <i>Hsp26</i> . ....	18
Figura 9. Teste de eficiência dos <i>primers</i> para o gene <i>Hsp83</i> . ....	19
Figura 10. Teste de eficiência dos <i>primers</i> para o gene <i>Hsc70</i> . ....	19
Figura 11. Expressão relativa do gene <i>Hsp26</i> . ....	20
Figura 12. Expressão relativa do gene <i>Hsp83</i> . ....	21
Figura 13. Expressão relativa do gene <i>Hsc70</i> . ....	22
Figura 14. Expressão global dos genes das proteínas <i>Hsp26</i> , <i>Hsp83</i> e <i>Hsc70</i> . ....	23

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>cDNA</b>	DNA complementar
<b>DEPEC</b>	Diethyl pyrocarbonate
<b>dNTP</b>	Desoxirribonucleotídeos Fosfatado
<b><math>\Delta\Delta Ct</math></b>	Delta Delta Ct
<b><math>\Delta G</math></b>	Energia livre de Gibbs
<b><math>\Delta Rn</math></b>	Valor de Rn final do ciclo <i>menos</i> o valor de Rn gerado durante a <i>baseline</i> devido ao background.
<b>Fig.</b>	Figura
<b>GC</b>	Guanina e Citosina
<b>H</b>	Horas
<b>°C</b>	Grau Celsius
<b>IPCC</b>	<i>Intergovernmental Panel on Climate Change</i>
<b>Max.</b>	Máximo
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Cloreto de Magnésio
<b>NCBI</b>	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PCR</b>	Reação em Cadeia da Polimerase
<b>qPCR</b>	PCR quantitativa em Tempo Real
<b>q.s.p</b>	Quantidade suficiente para
<b>Rn</b>	Repórter normalizado. Valor da razão entre a fluorescência do repórter e a fluorescência da referência passiva.
<b>RNA</b>	Ácido Ribonucleico
<b>RNAi</b>	RNA de interferência
<b>RNAse</b>	Ribonuclease
<b>ROX</b>	6-carboxi-X-rodamina
<b>Na</b>	Sódio
<b>TEB</b>	Tris Base; EDTA ( <i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> ); Ácido bórico ( <i>Boric acid</i> )

## 1. Introdução

Durante as últimas décadas, as modificações ambientais provocadas pelas mudanças climáticas têm aumentado consideravelmente e o controle destas alterações é um grande desafio para a humanidade (Tedesco et al. 2013, Derkzen et al. 2017). Houve um incremento nas médias da temperatura entre os anos de 1961 a 1990, resultando em um aquecimento da superfície terrestre em torno de 0,6 °C, e há projeção de aumento de 1,4 °C a 5,8 °C, até o ano de 2100 (Griggs e Noguier 2007; IPCC 2014). O aumento da temperatura média está associado às ações antropogênicas, dentre as quais se destacam a elevação da emissão de gases de efeito estufa, aerossóis, desmatamentos seguidos de queimadas e formação de ilhas urbanas de calor (Hamilton et al. 2015).

Desde as primeiras medições meteorológicas em 1861, e considerando as últimas décadas, os últimos cinquenta anos apresentaram os maiores índices na elevação média da temperatura (Folland et al. 2001; IPCC 2014), com destaque para os anos de 1961, 1998, 2003, 2005 e 2010, em que a elevação da temperatura global foi acima das médias, estes foram os anos mais quentes, desde o início dos registros (Nobre e Salazar 2007; Marengo 2008; Guerra et al. 2015).

Na região amazônica os registros da temperatura média mostraram aumentos em relação à média global, entre as faixas de 0,3 °C a 3 °C. Como consequência do aumento da temperatura média da região amazônica, pode ocorrer a redução da evapotranspiração das florestas nas faixas de 15 % a 30 % e declínio na precipitação entre 5 a 20 %, o que pode acelerar as mudanças da vegetação de floresta para a formação de campos (Barcellos e Corvalan 2009; Sorribas et al. 2016). Contudo, as alterações ocasionadas pelo efeito estufa, em função das mudanças climáticas, não ocorrem de forma homogênea no planeta, estimando que, no futuro a Amazônia poderá ter as médias da temperatura acima dos valores registrados atualmente (Fearnside 2008; Rockstrom et al. 2014).

Com base na necessidade de estudos aprofundados sobre tais efeitos, foi criado o Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas (*Intergovernmental Panel on Climate Change - IPCC*), a fim de estudar os possíveis cenários frente a estas modificações ambientais ocasionadas pelo homem durante as próximas décadas, até o

ano de 2100 (IPCC5 WGII 2014). Segundo o quarto relatório do IPCC (2007), as emissões de gases com efeito estufa (GEE), em função das ações antropogênicas, estão sendo constantemente lançadas no ambiente desde a era pré-industrial (Griggs e Noguer 2007). Estas ações levaram ao aumento na atmosfera dos níveis de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), metano (CH<sub>4</sub>) e óxido nitroso (N<sub>2</sub>O), contribuindo para o agravamento do efeito estufa (Griggs e Noguer 2007; IPCC 2014). Aproximadamente 40% dessas emissões de GEE não são reabsorvidas pelas florestas e demais organismos fotossintetizantes, conseqüentemente, permanecendo na atmosfera. E cerca da metade dessas emissões ocorreram nos últimos 40 anos (de la Fuente e Mac 2017).

Segundo o quarto relatório do IPCC (2007), tomando-se como referência os anos de 1986 - 2005, ocorrerá a elevação da temperatura média global na superfície da terra, até o final do século XXI (2081 - 2100). O relatório do IPCC projetou três cenários principais e prováveis para as últimas décadas até 2100 (Tabela I): B1 como cenário brando; A1B cenário intermediário e A2 como cenário extremo entre os anteriores.

Tabela 1. **Simulações do IPCC para a temperatura e CO<sub>2</sub> até 2100.** Concentrações de Dióxido de Carbono (CO<sub>2</sub>) em partes por milhão (ppm) e graus célsius (°C) dos cenários previsto pelo IPCC para 2100.

Cenários \ Fatores	°C	ppm CO <sub>2</sub>
B1	0,3 a 0,9	445 a 490
A1B	1,7 a 4,4	590 a 710
A2	2 a 5,4	710 a 885

Além do aumento da temperatura média global são previstas modificações em outros fatores abióticos, entre eles a elevação da temperatura nos polos, ocasionando elevação no nível médio do mar, em aproximadamente 0,4 a 1,4 m no cenário B1 e de 1 a 3,7 m no cenário A2 (Griggs e Noguer 2007). O incremento da temperatura do mar pode potencializar seus impactos nas regiões tropicais e subtropicais (Church e White 2006).

Estes impactos estão relacionados à alterações na frequência da precipitação, podendo acarretar menores regimes de chuvas em regiões secas de latitudes médias e subtropicais, além de provável aumento da precipitação nas altas latitudes e no pacífico equatorial, para o cenário A2 (Church e White 2006; Griggs e Noguer 2007). As altas latitudes e o Pacífico equatorial, provavelmente experimentarão um aumento na precipitação média anual no cenário A2. Em muitas regiões secas de latitudes médias e

subtropicais, a precipitação média provavelmente diminuirá, enquanto em muitas regiões úmidas de latitude média, as precipitações provavelmente aumentarão no cenário A2 (Church e White 2006; IPCC 2014).

As modificações esperadas na paisagem e biodiversidade do Brasil são vastas, podendo levar à diminuição do regime de chuvas na região Amazônica e na região Nordeste, com aumento das chuvas no Sudeste do Brasil (Lemes e Loyola 2015). A Mata Atlântica pode sofrer redução de 30 % da área hoje ocupada, podendo atingir 65 % até 2100 (Dias e Fisch 2016). Todos estes eventos, podem gerar uma perda da biodiversidade, com média de 12 % para aves, 30 % para os mamíferos e anfíbios que atualmente já apresentam algum grau de ameaça à extinção (Marrego 2001; Lemes e Loyola 2015; Dias e Fisch 2016).

As modificações nos diferentes ambientes podem favorecer a reprodução de espécies vetoras de doenças, aumentando os impactos na saúde pública mundial, onerando ainda mais o sistema que em muitos países já operam de forma precária. Um alerta importante é sobre as doenças transmitidas por vetores, principalmente em países de clima tropical e subtropical, pois apresentam naturalmente temperaturas elevadas, o que favorece o desenvolvimento de mosquitos, como o *Aedes aegypti*. Com isso, doenças como a Dengue, a Febre Amarela, a zika e a Febre Chikungunya podem sofrer aumento no número de casos, em virtude das condições favoráveis à reprodução e permanência do *A. aegypti* nos ambientes (Chaves et al. 2014; Lima-Camara 2016).

As modificações ambientais podem influenciar significativamente na taxa de desenvolvimento e crescimento do *A. aegypti*, desde as formas larvais até a longevidade dos adultos (Mohammed e Chadee 2011; Chaves et al. 2014). Em consequência, são registradas alterações tanto na fecundidade quanto na alimentação sanguínea, pois o ambiente mais quente e úmido influencia sobre o tempo de desenvolvimento do *A. aegypti* e da incubação dos vírus, tornando-se mais curtos e, em consequência disso, o aumento do número e da duração das epidemias (Farjana et al. 2013; Couret e Benedict 2014).

## 1.1 O *Aedes aegypti*

O *A. aegypti* pertence à família Culicidae, subfamília Culicinae, sendo uma das espécies de maior importância médica, considerando sua relação como vetor na transmissão das principais arboviroses atualmente distribuídas no planeta, e na transmissão dos vírus da Dengue, Chikungunya, Zika e da Febre Amarela (Gubler 1997; Forattini 2002; Kyle e Harris 2008). Estudos da fauna primitiva sugerem que o *A. aegypti* é oriundo do velho mundo, com evidências de sua origem na África, apesar de ter sido primeiramente descrito no Egito (Silva et al. 1998; Melo e Zanotto 2009; Carvalho e Moreira 2017). Sua vinda para o continente americano aconteceu durante a colonização e o constante fluxo dos navios negreiros, procedentes dos continentes africano e europeu. Atualmente, o *A. aegypti* tem vasta distribuição geográfica, ocorrendo em toda a faixa tropical e sub-tropical do planeta, sendo considerado uma espécie cosmopolita (Glasser e Gomes 2002; Lieko e Voltolini 2003; Kraemer et al. 2015).

O *A. aegypti* é o maior transmissor de arboviroses urbana do mundo e apresenta acentuada antropofilia. Considerando a dengue, são conhecidos quatro sorotipos distintos: DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4. Apresenta síndrome viral pouco específica e benigna até um quadro clínico grave e fatal da doença e pode evoluir para um quadro hemorrágico. A sua incidência passa por flutuações em função de fatores climáticos, ligados à biologia do vetor (Pinheiro e Tadei 2002; Rocha e Tauil 2009; Aguilera-Pesantes et al. 2016; Kang et al. 2017).

A febre Chikungunya registrada no Brasil em 2014, causa síndrome febril súbita debilitante e em quadros clínicos avançados pode causar danos neurológicos em idosos e neonatos, podendo levar a óbito (Donalisio e Freitas 2015; Honório et al. 2015). Outra arbovirose transmitida por este mosquito é a febre Zika, e foi detectada no Brasil em 2015 e 80 % das pessoas infectadas não desenvolvem os sintomas. Esta doença pode se apresentar com sintomas como cefaleia, febre baixa, dores nas articulações, manchas vermelhas na pele, prurido e vermelhidão. Em alguns casos, pode haver microcefalia em bebês e óbito (Bonaldo et al. 2016; Chouin-Carneiro et al. 2016). Além destas, a febre Amarela é transmitida no meio urbano pelo *A. aegypti* e, na floresta, por mosquitos dos gêneros *Haemagogus* e *Sabethes*. Trata-se de uma doença infecciosa e não contagiosa, que normalmente pode evoluir para febre hemorrágica com elevado nível de letalidade nos casos confirmados - 51,8% (Da Costa Vasconcelos 2003; Braga e Valle 2007; Couto-Lima et al. 2017; Brasil 2017).

## 1.2 Biologia do Mosquito

A fêmea de *A. aegypti* realiza a postura de seus ovos em recipiente com água, normalmente cerca de dois milímetros acima da parte superior da linha d'água, na parede de objetos ou recipientes que estejam em contato com a mesma e que, preferencialmente, possuam a parede rugosa. Segundo Forattini (2002), a fêmea raramente faz a desova diretamente na água. A fêmea necessita realizar a alimentação sanguínea para a maturação dos ovos, com oviposição média entre 80 a 120 ovos por postura. O seu ciclo de atividade é diurno, com dois picos de atividade entre os horários das 6:00 às 8:00 horas e das 16:00 às 18:00 horas. Segundo Marques et al. (2013), a oviposição pode ocorrer em recipientes naturais ou artificiais, sendo um dos parâmetros determinantes para a densidade e o tamanho da população.

Os períodos de incubação ocorrem entre quatro e sete dias, não havendo condições favoráveis (inexistência de água), os ovos podem entrar em estado de quiescência, permanecendo assim por períodos de seis meses a um ano (Silva e Silva 1999). Quando as condições ambientais tornam-se novamente favoráveis (presença de água), as larvas eclodem, porém em percentuais menores, proporcionalmente ao período de permanência no estado de quiescência (Silva e Silva 1999; Guimarães et al. 2013; Cabral e Silva 2015).

A temperatura influencia diretamente o tempo de maturação das larvas. A 30 °C, as larvas levam aproximadamente seis dias para completar o desenvolvimento até atingir o quarto estágio de seu ciclo total e, aproximadamente, 13 dias a 20 °C (Forattini 2002). Nesta vertente, Azevedo (2015) conduziu estudos onde foram analisados parâmetros de colônias de *A. aegypti*, mantidas em simulador climático, segundo os parâmetros descritos pelo IPCC para o ano de 2100 (IPCC 2007). Nestes foram analisados os parâmetros biológicos do mosquito. Foi verificado que o aumento da temperatura, da concentração de CO<sub>2</sub> e da umidade influenciaram os parâmetros biológico do mosquito. A alimentação, peso médio e sucesso reprodutivo de machos e fêmeas apresentaram aumento significativo, em cenários mais drásticos. No entanto, foram registrados menores valores para a oviposição, viabilidade dos ovos e longevidade dos adultos nas mesmas condições. Estes parâmetros, demonstram como os fatores ambientais podem influenciar sobre a biologia do *A. aegypti*, provocando acelerada adaptação às mudanças extremas do ambiente.

Outra variável ambiental que pode ter influencia sobre *A. aegypti* é a concentração de CO<sub>2</sub>. Os elevados níveis das concentrações de CO<sub>2</sub> no ambiente, podem influenciar sobre o comportamento vetorial desta espécie, pois estes utilizam o CO<sub>2</sub> exalado no ambiente, afim de guia-lo até o seu hospedeiro, podendo assim, realizar a alimentação sanguínea (Smith et al. 2013, Majeed et al. 2014). Estas alterações nas concentrações de CO<sub>2</sub> atmosférico, pode modelar a frequência e tamanho das epidemias, em anos futuros.

Tais adaptações dos mosquitos frente aos fatores ambientais podem estar relacionadas à ativação de genes, principalmente aqueles responsáveis pela expressão de proteínas de choque térmico (*Hsp*). Este processo pode resultar em populações de mosquitos mais adaptadas às atividades antrópicas.

### **1.3 Proteínas de Choque Térmico - *Heat shock proteins (Hsp)*.**

As Proteínas de Choque Térmico, comumente chamadas de *Heat shock proteins (Hsp)*, são descritas como proteínas auxiliadoras (Sheller et al. 1998, King and MacRae 2015, Choutka et al. 2017). As *Hsp* integram um grupo de proteínas conhecidas por sua atuação em respostas ao estresse (Sivan et al. 2017), como o estresse térmico e são classificadas com base na massa molecular, na sequência de aminoácidos e na função (Sheller et al. 1998; Zhao e Jones 2012; King e MacRae 2015).

As *Hsp* são essenciais para a sobrevivência das células, sendo expressas constitutivamente e estando diretamente ligadas à estabilidade e síntese de proteínas que dirigem os reparos celulares, auxiliando no enovelamento (*Folding*) e condução de proteínas aos seus sítios de atividade (Neal 2006; Gross et al. 2009; Sivan et al. 2017). Ao auxiliar na diminuição dos impactos causados pelo estresse, estas proteínas tornam-se relevantes para a sobrevivências dos organismos, em especial dos mosquitos (Zhao et al. 2010), pois previnem a desnaturação das proteínas intracelulares por agentes bióticos e abióticos (Gross e Adelman 2009; Sivan et al. 2017).

Na presença de estressores como calor, frio e outros agentes que possam influenciar na atividade proteica intracelular, a maior parte dos grupos de proteínas celulares podem sofrer declínio da expressão gênica. As *Hsp* no entanto, apresentam incremento na sua expressão e ligam-se a proteínas mal formadas, auxiliando no enovelamento de proteínas que por ventura sejam acometidas por processos de desnaturação ou inativação (Zhao et al. 2008; King e MacRae 2015; Sivan et al. 2017).

As *Hsp* são divididas em dois grupos principais: (1) o grupo das grandes *Hsp*, composto pelas famílias das *Hsp60*, *Hsp70*, *Hsp80* e *Hsp90*, comumente estão associadas aos primeiros grupos de proteínas a entrarem em ação, frente a uma possível desnaturação das proteínas; (2) e o grupo das pequenas *Hsp*, composto pelas famílias das *Hsp20*, *Hsp30* e *Hsp40* (King e MacRae 2015). Estas pequenas *Hsp* interagem com as proteínas, substratos e cofatores proteicos, proporcionando adequado funcionamento de proteínas celulares (Sivan et al. 2017, Zhang et al. 2019).

A *Hsp26* pertence ao grupo das pequenas *Hsp* (*small Hsp*), são encontradas em diversos organismos, como por exemplo *Saccharomyces cerevisiae*, um eucarioto inferior, e é uma chaperona regulada pelo calor (Haslbeck et al. 1999; Lytras et al. 2017). Esta *Hsp* integram um dos primeiros grupos ligados a proteção e prevenção da agregação de proteínas que, sob condições estressantes ou durante o envelhecimento celular, podem apresentar dobra irregular. A *Hsp26*, assim como as demais *small Hsp*, agregam-se a proteínas não ativas, evitando o acúmulo de complexos proteicos não funcionais (Lytras et al. 2017). Também integra processos autofágicos em células neurais de *Drosophila melanogaster*, relacionadas a proteínas que desencadeiam a necrose celular (Lei et al. 2017).

A *Heat shock cognate (Hsc70)* pertence à família da *Hsp70*, tem expressão constitutiva por estar envolvida com maturação de hormônios, *foldin* proteico e fatores de transcrição (Zhang et al. 2019). Além disto, esta proteína tem função de se ligar a proteínas mal dobradas (*foldin*), sinalizando estas para degradação (Sun et al. 2019b).

Em *D. melanogaster* e *Tribolium castaneum*, a proteína *Hsp83* auxilia no desenvolvimento dos estágios imaturos da larva, atuando juntamente com o Hormônio Juvenil (HJ), prevenindo a apoptose celular decorrente de processos citotóxicos e de estresse (Zhao e Jones, 2012; He et al. 2014). Nos adultos, atua como auxiliadora nos processos de tolerância a estresse, juntamente com outras *Hsp* e proteínas celulares (Zhao et al. 2009; He et al. 2017)

Segundo Bukau e Horwich (1998), outras *Hsp*, tais como *Hsp60* e *Hsp70* compartilham funções, auxiliando outras proteínas a se ligarem em regiões hidrofóbicas de proteínas transmembranas e facilitando os processos de transporte transmembrana. A chaperona *Hsp60* auxilia na dobra de proteínas nativas translocadas, de forma a atingir a sua estrutura tridimensional funcional.

Ensaio com *Drosophila melanogaster* (Shukla et al. 2014a) demonstraram a capacidade de uma *Hsp* em modular a desordem de células neurológicas, acometidas por Doença de Parkinson (DP), induzido por paraquat (PQ), um herbicida amplamente utilizado. As células estimuladas a produzirem *Hsp70*, apresentaram significativa tolerância a neurodegeneração, induzida por (PQ). Desta forma, verifica-se que proteínas *Hsp70* constitui um grupo de proteínas ligadas a mecanismos de proteção contra distúrbios celulares.

*Hsc70* é uma chaperona expressa quando ocorre o estresse térmico, assim como as demais chaperonas moleculares (Rafael et al. 2004; Zhao et al. 2009; Sivan et al. 2017). Sua principal função é auxiliar o transporte de proteínas transmembranas, assessorando a dissociação de proteínas não funcionais e controlando atividades biológicas, incluindo fatores de transcrição, além de atuar como mediador da manutenção das atividades de reparo da transcrição de proteínas (Gross et al. 2009, Sun et al. 2019a). Está também relacionada aos domínios bioquímicos de ATP, polipeptídeos e cadeia de carbono (Sun et al. 2019a). Além disso, esta proteína também apresenta funções importantes ligadas à alimentação e sobrevivência em diversas espécies, pois conduz estímulos ligados a busca de alimentação sanguínea e conseqüentemente, ao tempo de vida (Wang et al. 2019).

As proteínas *Heat shock* estão relacionadas a diversos processos que conduzem e garantem a sobrevivência de *A. aegypti* e outros eucariotos aos diversos fatores de estresse ambiental e celular. Deste modo, a investigação dos padrões de expressão das *Hsp* poderá fornecer indícios moleculares e biológicos, quanto ao seu comportamento e adaptação aos diferentes cenários climáticos que, eventualmente, o planeta terra enfrentará com o agravamento das mudanças climáticas.

## **2. Justificativa**

A relevância dos estudos com *A. aegypti* frente à sua elevada capacidade como transmissor de arboviroses urbanas, o torna preferencial candidato a modelagens que vislumbrem o espelhamento de cenários futuros que, eventualmente, possam estimular a sua expansão populacional. Além disso, sua alta versatilidade em relação às

adaptações ao ambiente e às populações humanas, reforçam a necessidade de tais modelagens (Forattini 2002).

Atividades antrópicas têm ocasionado severas modificações no ambiente, alterando de maneira significativa e acelerada o processo adaptativo do *A. aegypti*. As alterações nos ambientes naturais e artificiais afetam diretamente a biologia do mosquito, modificando seu ciclo biológico e, conseqüentemente, a frequência como as doenças, por ele transmitidas ocorrerem nas populações humanas (Girvetz et al. 2009).

Os genes que codificam as proteínas *Hsp* estão intimamente ligados à homeostase proteica do *A. aegypti* e podem auxiliar a sua sobrevivência em ambientes com elevada temperatura e concentração de gás carbônico, similar as condições previstas para o fim do século XXI. Estas fazem parte de vários processos celulares chaves que asseguram a estabilidade desta espécie em locais fortemente impactados.

Estas proteínas apresentam forte interação com os processos de restauração celular parcial, essenciais quando as células são expostas a fatores de estresse ambiental. No futuro, estes mecanismos podem ser explorados como medidas que reduzam a tolerância dos mosquitos a estressores agressivos, tornando o *A. aegypti* mais vulnerável às medidas de controle e/ou menos adaptado às variações ambientais (Shukla et al. 2014).

Estudar mosquitos vetores de doenças em saúde pública, como o *A. aegypti*, é de extrema relevância pois os casos de óbitos relacionados as doenças transmitidas por este vetor são extremamente significativos. Com base nestas considerações, este trabalho propõe-se analisar a expressão dos genes *Hsp26*, *Hsp83* e *Hsc70*, em laboratório, sob condições climáticas previstas pelo IPCC, para o ano de 2100.

### 3. Hipóteses

- Hipótese Nula ( $H_0$ ) – Não há variação significativa na expressão de genes codificantes das *Hsp* em *A. aegypti*, sob condições climáticas intermediárias (A1B) e extremas (A2), mantendo-se constante em relação ao cenário climático atual.
- Hipótese alternativa ( $H_1$ ) - Há variação significativa na expressão de genes codificantes das *Hsp* sob condições climáticas intermediárias (A1B) e extremas (A2), ocorrendo modificações em relação ao cenário climático atual.

## 4. Objetivos

### 4.1 Objetivo Geral

- Analisar a influência das mudanças climáticas previstas pelo IPCC (*Intergovernmental Panel on Climate Change*), para o ano de 2100, na transcrição de genes codificantes das proteínas *Hsp26*, *Hsp83* e *Hsc70*, em *A. aegypti*.

### 4.2 Específicos

- Avaliar a influência do aumento da temperatura, da concentração de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) e da umidade, nos níveis de expressão dos genes *Hsp26*, *Hsp83* e *Hsc70* na 1<sup>a</sup>, 4<sup>a</sup> e 8<sup>a</sup> geração de *A. aegypti*, criados no microcosmo, considerando as salas 1 (controle), sala 3 (cenário A1B) e 4 (cenário A2).
- Verificar as diferenças de transcrição gênica entre os mosquitos machos e fêmeas da sala 1 (controle), sala 3 (cenário A1B) e sala 4 (cenário A2).

## 5. Materiais e métodos

### 5.1 Local do Experimento

Os experimentos foram conduzidos nos seguintes locais: Laboratório de Ecofisiologia e Evolução Molecular - LEEM/INPA, onde foram mantidas as colônias dos grupos experimentais em Microcosmos das três colônias de *A. aegypti*. No Laboratório de Malária e Dengue – LMD/INPA, onde foram realizados o processamento das amostras de RNA. E laboratório de Biotecnologia – UFAM, onde foi realizado o processamento e análises dos ensaios com PCR quantitativa em Tempo Real (qPCR).

### 5.2 Manutenção das gerações de *Aedes aegypti* no Microcosmo

As linhagens de *A. aegypti* mantidas nas três salas do microcosmo procederam da colônia do Laboratório de Malária e Dengue do INPA – denominada “MAO”. A colônia foi composta por amostras de *A. aegypti* coletados dos diversos bairros de Manaus, entre os anos de 2010 e 2011, situados nas seis zonas da cidade. A partir destas, foram

retirados exemplares para formar a colônia no simulador climático do tipo microcosmo, onde são criados até os dias atuais.

Na realização dos experimentos, os ovos foram obtidos a partir das linhagens previamente mantidas em cada sala, por mais de cinco anos, partindo das seguintes gerações: sala 1 – 46<sup>a</sup> geração, sala 3 – 48<sup>a</sup> geração e sala 4 – 65<sup>a</sup> geração. Destas gerações, foram feitas as coletas das formas adultas para os ensaios experimentais.

As tiras de papel filtro contendo os ovos de *A. aegypti* foram colocados em bacias de polietileno telado, contendo 500 ml de água de poço artesiano sem cloro. Após a eclosão das larvas, estas foram alimentadas diariamente com aproximadamente 0.5 gramas de ração para gato (Whiskas®) e roedores (Teklad®), triturados e misturados na proporção 1:1. Três vezes por semana foi feita a troca da água dos recipientes, nos quais as larvas foram mantidas. Ao atingir o estágio de pupa, estas eram coletadas com pipeta Pasteur e transferidas para copos plásticos de 50 ml, contendo água sem cloro, em seguida os copos eram acondicionados dentro das gaiolas de papelão teladas (18 cm de diâmetro por 17 cm de altura). Machos e fêmeas eram alimentados com algodão embebido em solução de açúcar (sacarose) a 10 %. Adicionalmente, as fêmeas receberam alimentação com sangue de *hamster*, por meio de repasto sanguíneo durante 30 minutos, em hamster *Mesocricetus auratus*, devidamente anestesiados, (CEUA: 033/2018 – Manutenção de colônia de vetores em condições de laboratório), seguindo o protocolo de criação de *A. aegypti* do Laboratório de Malária e Dengue (Pinheiro e Tadei 2002).

### **5.3 Microcosmo**

#### **5.3.1 Cenários Climáticos**

O microcosmo é constituído por salas onde os valores de temperatura, concentração de CO<sub>2</sub>, umidade e foto período são controlados por computadores, afim de simular os cenários climáticos previstos pelo IPCC (2007), para o ano de 2100. A estrutura instalada no microcosmo é composta por quatro salas: a sala 1 representa as condições atmosféricas atuais e locais (Temperatura, CO<sub>2</sub> atmosférico, Umidade e fotoperíodo (doze horas dia e doze horas noite), da cidade de Manaus/Amazonas nos anos de 2017 e 2018. Estes parâmetros são mensurados em intervalos de 2 minutos e refletidos para o interior da sala 1. A sala 2, simula o cenário brando (B1), com aumento de 1,5 °C na

temperatura do ambiente e um aumento de 200 ppm de CO<sub>2</sub>; a sala 3 representa o cenário intermediário (A1B), com aumento da temperatura ambiente em 2,5 °C e 400 ppm de CO<sub>2</sub>; e sala 4 reflete as condições extremas, atingindo um aumento na temperatura de aproximadamente 4,5 °C e 850 ppm de CO<sub>2</sub>. Os incrementos nos parâmetros das salas 2, 3 e 4 têm como referencial os dados apresentados na sala 1, que oscilam durante o dia em intervalos de 2 minutos afim de refletir as características intrínsecas da região Amazônica.

### 5.3.2 Preparo dos Grupos Experimentais

Os mosquitos da criação pré-estabelecida de *A. aegypti* nas salas do microcosmo (ADAPTA/LEEM/INPA) para os cenários atual (sala 1: 46<sup>a</sup> geração), cenário A1B (sala 3: 48<sup>a</sup> geração) e cenário A2 (sala 4: 65<sup>a</sup> geração) foram usados como ponto de partida para as análises de expressão. A partir destas gerações mantidas isoladas, foram feitas três amostragens para a análise de expressão gênica na sala 1 (48<sup>a</sup>, 51<sup>a</sup> e 55<sup>a</sup> geração); sala 3 (49<sup>a</sup>, 52<sup>a</sup> e 56<sup>a</sup> geração) e sala 4 (67<sup>a</sup>, 70<sup>a</sup> e 74<sup>a</sup> geração). A sala 2, não contém colônia estabelecida, tendo em vista que as variações em relação a sala 1 são baixas, portanto, foi suprimida desse estudo.

A partir das colônias mantidas em cada sala, foram coletados ao acaso, trinta machos e trinta fêmeas em triplicata das gerações estudadas para a extração de RNA total. Os adultos de *A. aegypti* foram coletados com o capturador de castro e em seguida foram separados por sexo e armazenados em copo parafinado telado. Ao término da coleta os espécimes foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido (N<sub>2</sub>), a fim de evitar variações na expressão gênica, que eventualmente o estresse da coleta pudesse provocar.

Os mosquitos congelados foram transferidos para microtubos de 2 ml contendo 1 ml de *TRIzol*<sup>TM</sup> reagente (Invitrogen), previamente aliquotado. Os mosquitos foram homogeneizados por sucção usando pipeta e ponteiras de 1 ml com filtro, livres de *RNAse*. Em seguida, foram depositados em cilindro contendo nitrogênio líquido (N<sub>2</sub>) e transportados até o laboratório de Controle Biológico e Biotecnologia da Malária e Dengue (LMD-INPA), para serem armazenados em ultracongelador a - 80 °C até a etapa de extração do RNA.

#### 5.4 Extração de RNA Total e Síntese de cDNA

O RNA total foi extraído utilizando o reagente *TRIzol™* (Invitrogen™), seguindo-se as recomendações do fabricante em cabine de segurança previamente preparada com consumíveis livres de *RNAse*. A quantificação prévia da extração e verificação da integridade do RNA, foi realizada no equipamento *NanoDrop 2000c* (Thermo Scientific™) nos comprimentos de onda 260/280 e 260/230. A integridade do RNA foi verificada em 1 % gel de agarose, corado com brometo de etídio 5 µg/ml. Todas as mostras de RNA total, para construção das bibliotecas de cDNA, foram tratadas com DNase I (Invitrogen™ by Thermo) seguindo as recomendações do fabricante. Na construção das bibliotecas de cDNA, foi utilizado o kit de transcrição *High-Capacity cDNA Reverse* (Applied Biosystems™), seguindo as recomendações do fabricante.

#### 5.5 PCR quantitativa em Tempo Real (qPCR)

Os ensaios em qPCR foram realizados no equipamento *QuantStudio 6* (Applied Biosystems™). Todos os ensaios foram conduzidos em triplicata e as reações em qPCR foram preparadas utilizando a química *Power SYBR™ Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems™) com ROX. Para um volume final de 10 µl: 5 µl de *2X Power SYBR™ Green Master Mix*; 0,10 µM de cada primer; 200 ng de cDNA e água ultra pura q.s.p.

As condições do equipamento seguiram os parâmetros recomendados para o *Master Mix*: pré-corrída a 50 °C 2 min e 95 °C a 10 min; 40 ciclos de 95 °C 15 s, 60 °C 1 min. Finalizando com a curva de dissociação (*Melting curve*): de 60 °C a 95 °C 0.05 °/s.

Os *primers* (iniciadores) para a detecção dos genes codificadores das proteínas *Hsp26*, *Hsp83* e *Hsc70* e normalizadores ACTIN,  $\alpha$ -tubulina, RPS17, RPL32 e eEF1 $\alpha$ , foram desenhados com base nos trabalhos de (Dzaki et al. 2017) e (Zhao et al. 2010), utilizando-se a ferramenta *PrimerQuest* da empresa *IDT Integrated DNA Technologies* (Tabela 2).

Tabela 2. **Sequências dos primers para qPCR**, desenhados para os ensaios em qPCR e seus respectivos *amplicons* para *A. aegypti*.

Gene	Sequência primers	Amplicon
ACTIN	FW 5' CTGTATGCCAACACAGTATTAT RV 5' CGATCCAGACGGAGTATTT	148 pb
a-tubulin	FW 5' ATTACGGCAAGAAATCCAAG RV 5' ACGGCAGATGTCATAGATAG	164 pb
RPS17	FW 5' AAGGTCATTATTGAGAAATACTACA RV 5' ACGAAACCAGCGATCTT	122 pb
RPL32	FW 5' CGTAAGCCGAAAGGTATTG RV 5' TTGTGGACCAGGAACTT	137 pb
eEF1a	FW 5' GTGTTGGACAAACTGAAGG RV 5' GGTAATCATGTTCTTGATGAAATC	138 pb
<i>Hsp26</i>	FW 5' GACCATTCTGTTCAGTGATTT RV 5' TTGCTTGTTTCCTTCGTTT	196 pb
<i>Hsp83</i>	FW 5' AGAGAAGAAGGACAAGAAGAA RV 5' GTTGGTGAGCGATTTGTAG	145 pb
<i>Hsc70</i>	FW 5' AACGGTATCCTGAATGTGA RV 5' TGGTTTCCTTCTGCTTCT	160 pb

Os iniciadores foram desenhados a partir das sequências de referência do mRNA, depositadas nos bancos de dados do NCBI. Os parâmetros estabelecidos para a construção dos *primers* foram: oligos na concentração de 0.2  $\mu$ M; 50 mM NaCl; 3 mM MgCl<sub>2</sub>; 0.2 mM dNTP; conteúdo GC entre 20 e 50 %; comprimento dos *primers* entre 17 e 25 pb; tamanho dos *amplicons* entre 100 e 300 pb; temperatura de *melting* (pareamento) entre 59 e 61°C e *Hairprin*, *SelfDimer* e *HeteroDimer* com valores de  $\Delta$ G (energia livre de Gibbs) maiores que - 5.

As curvas de titulação dos *primers* foram realizadas a fim de validar as concentrações ideais dos iniciadores nos ensaios, priorizando menor Ct e maior  $\Delta$ Rn, com ausência de dímeros observáveis à curva *Melting*. Os níveis de expressão relativa foram determinados pelo método  $\Delta\Delta$ Ct (Livak e Schmittgen 2001), com utilização de múltiplos controles endógenos para normalização.

## 6. Análise Estatística

Foram primeiramente realizados teste de normalidade e homogeneidade para determinação dos testes estatísticos a serem empregados. Utilizou-se a ANOVA de dois fatores para os cenários climáticos e os sexos. Os testes foram expressos em média e desvio padrão ( $n = 60$  para cada tratamento). O nível de significância utilizado em todas as análises foi de 95 % ( $\alpha = 0,05$ ). As análises estatísticas foram feitas no *software SigmaStat v.3.5* (<https://systatsoftware.com/products/sigmastat/>) e os gráficos foram gerados no *software SigmaPlot v.11.0* (<https://systatsoftware.com/products/sigmaplot/>).

## 7. Resultados

### 7.1 Microcosmo

Durante a condução dos experimentos no microcosmo foram realizadas medições diárias dos valores de CO<sub>2</sub>, temperatura do ambiente e umidade, em intervalos de 2 minutos, no período de outubro de 2017 a novembro de 2018 (Figuras 1, 2 e 3, respectivamente).

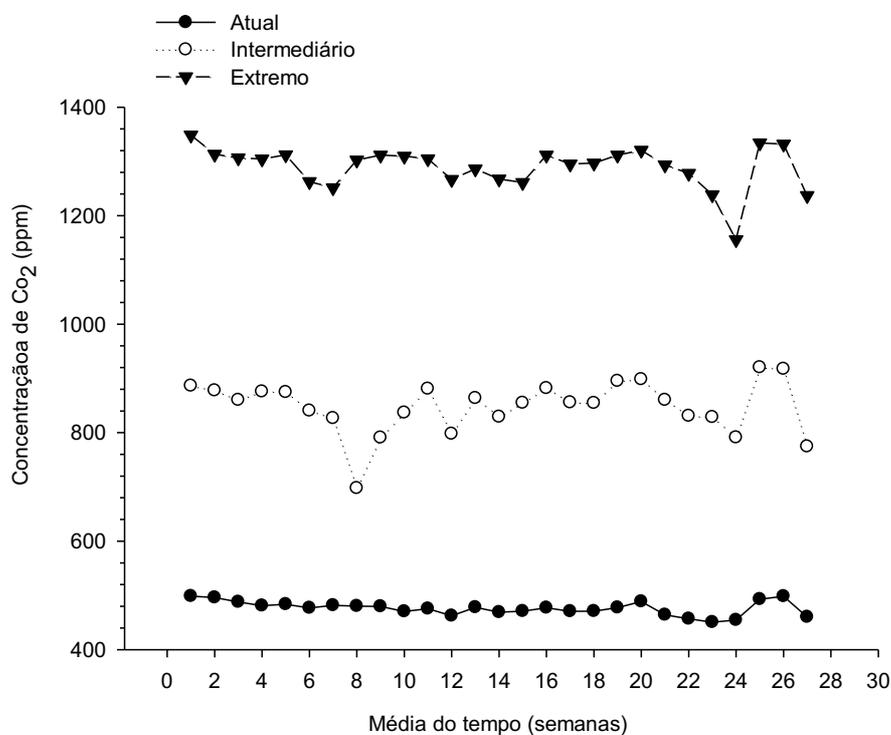


Figura 1. **Concentração de CO<sub>2</sub> nos cenários climáticos.** Média dos valores diários de CO<sub>2</sub> atmosférico, para as condições climáticas atuais, intermediárias e extremas, registradas no período de outubro de 2017 a novembro de 2018. Desvio padrão:  $\pm 26,9$  ppm CO<sub>2</sub>.

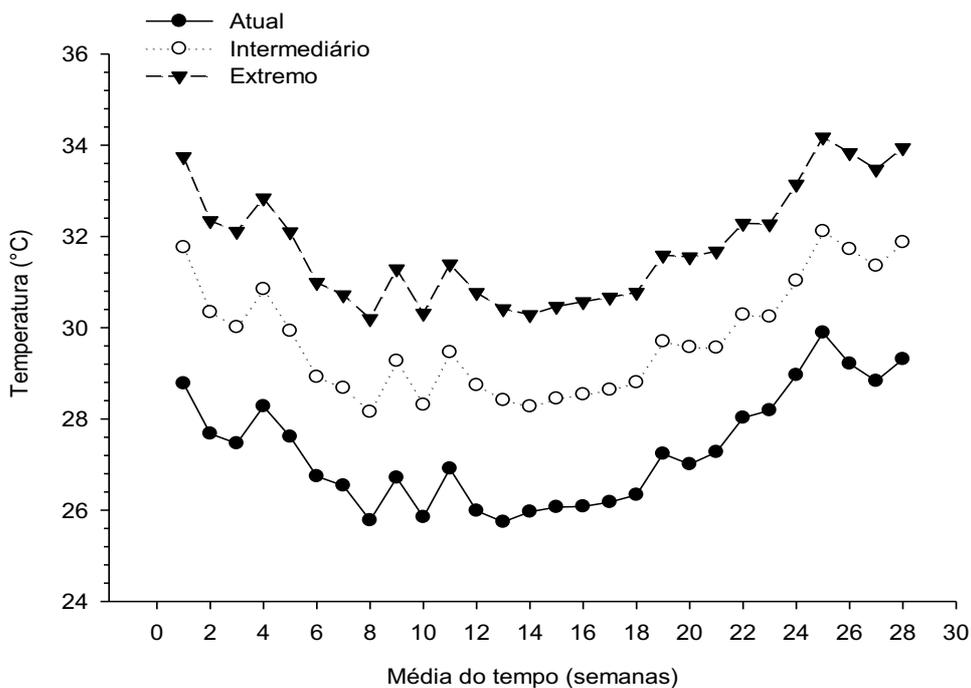


Figura 2. **Temperatura do ar nos cenários climáticos.** Média dos valores diários da temperatura do ar, para as condições climáticas atuais, intermediárias e extremas, registradas no período de outubro de 2017 a novembro de 2018. Desvio padrão:  $\pm 1,57$  °C.

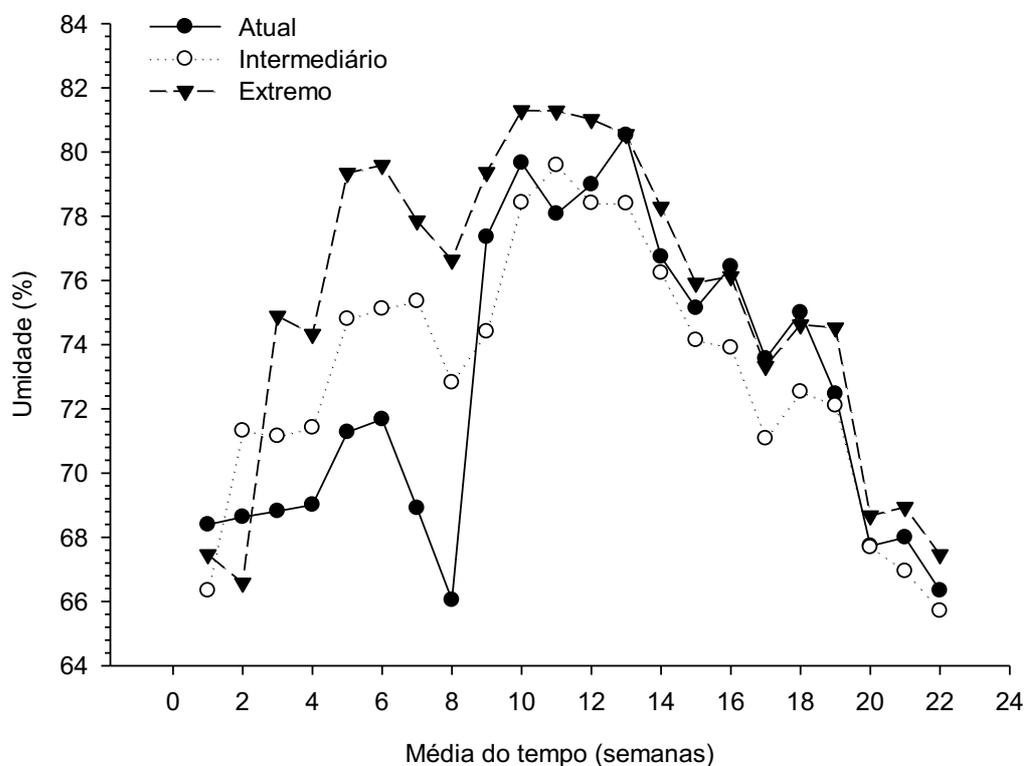


Figura 3. **Concentração da umidade do ar.** Média dos valores diários da umidade do ar, para as condições climáticas atuais, intermediárias e extremas, registradas no período de outubro de 2017 a novembro de 2018. Desvio padrão:  $\pm 4,68$  %.

Ao longo dos ensaios, a umidade foi mantida constante em todos os cenários, mantendo-se somente as oscilações em relação à sala 1, cenário atual, refletindo as variações da umidade durante o dia.

## 7.2 Teste de especificidade e eficiência dos *primers* para qPCR

O teste de especificidade e eficiência dos *primers* para os genes alvos e normalizadores para as proteínas *Heat shock*, indicou que o par cujo alvo é o gene RPS17 não apresentou o perfil de amplificação satisfatório, podendo comprometer a relação de eficiência ( $\pm 10\%$ ) com os outros marcadores, com isso foi retirado das análises. O fator de diluição do *template* foi de 1:4, com 6 pontos em triplicata técnica, com eficiências em torno de 91% a 102%, e  $R^2$  mínimo de 0,996 (Figs. 4 - 10).

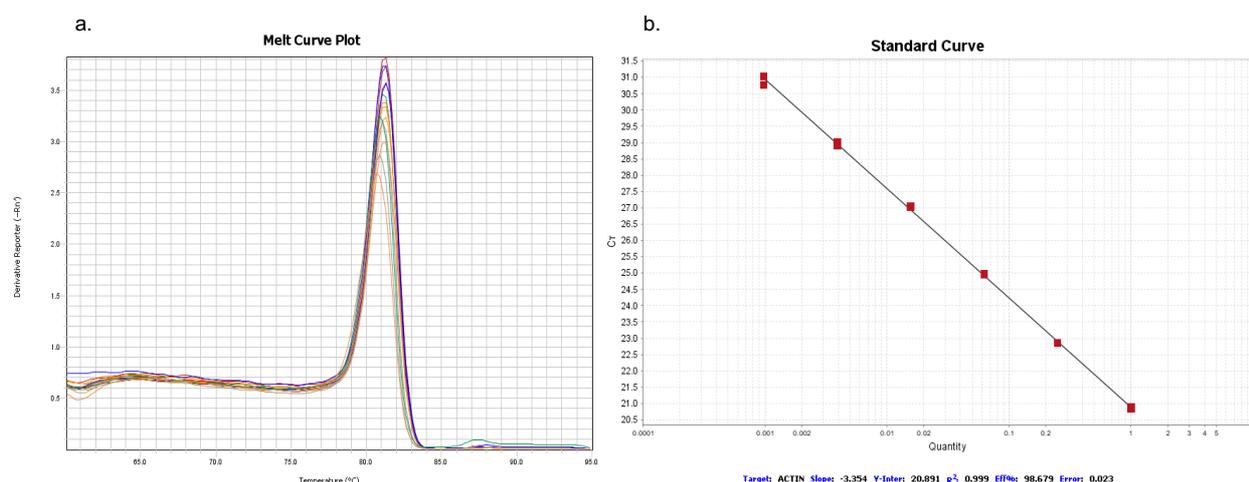


Figura 4. Teste de eficiência dos *primers* para o gene ACTIN. (a) gráfico da curva *Melting* Derivativa para o gene ACTIN. (b) curva padrão relativa ao gene ACTIN, em diluições seriadas, com fator de (1:4) com 6 pontos em triplicada. Slope: -3,354;  $R^2$ : 0,999; eficiência: 98,679%; erro: 0,023.

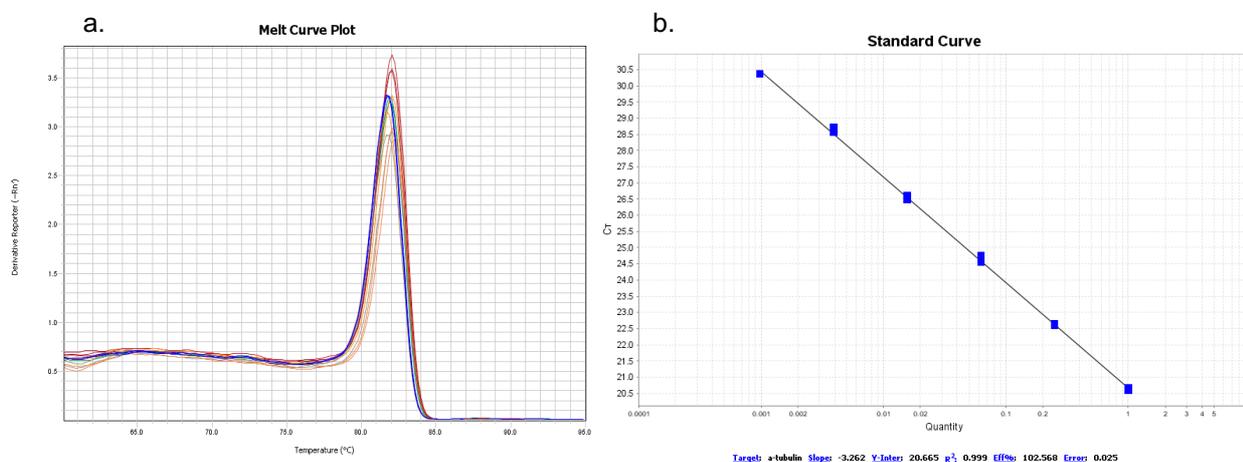


Figura 5. Teste de eficiência dos *primers* para o gene a-tubulin. (a) gráfico da curva *Melting* Derivativa para o gene a-tubulin. (b) curva padrão relativa ao gene a-tubulin, em diluições seriadas, no fator de (1:4) com 6 pontos em triplicada. Slope: -3,262;  $R^2$ : 0,999; eficiência: 102,568% e erro: 0,025.

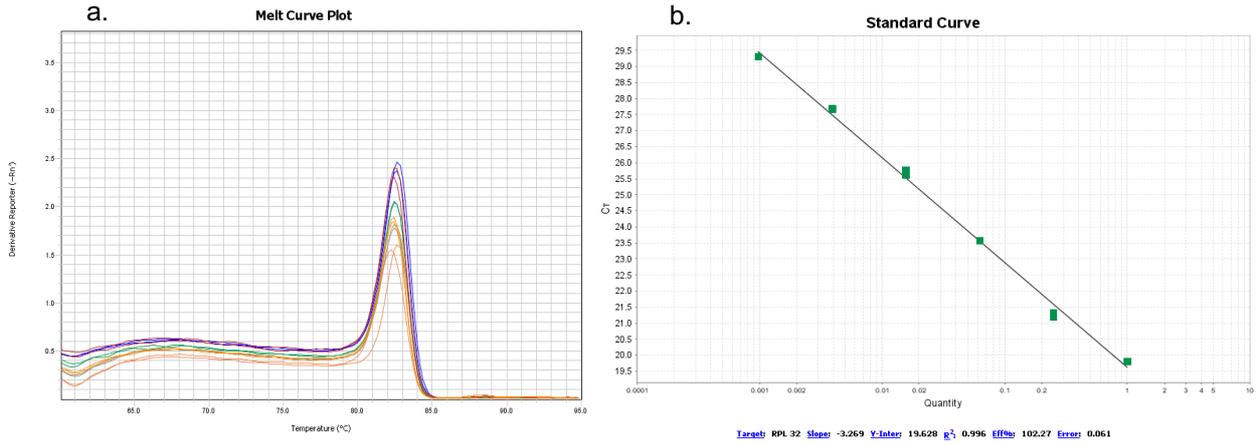


Figura 6. Teste de eficiência dos *primers* para o gene RPL 32. (a) gráfico da curva *Melting* Derivativa para o gene RPL 32. (b) curva padrão relativa ao gene RPL 32, em diluições seriadas, no fator de (1:4) com 6 pontos em triplicada. Slope: -3,269; R<sup>2</sup>: 0,996; eficiência: 102,27 % e erro: 0,061.

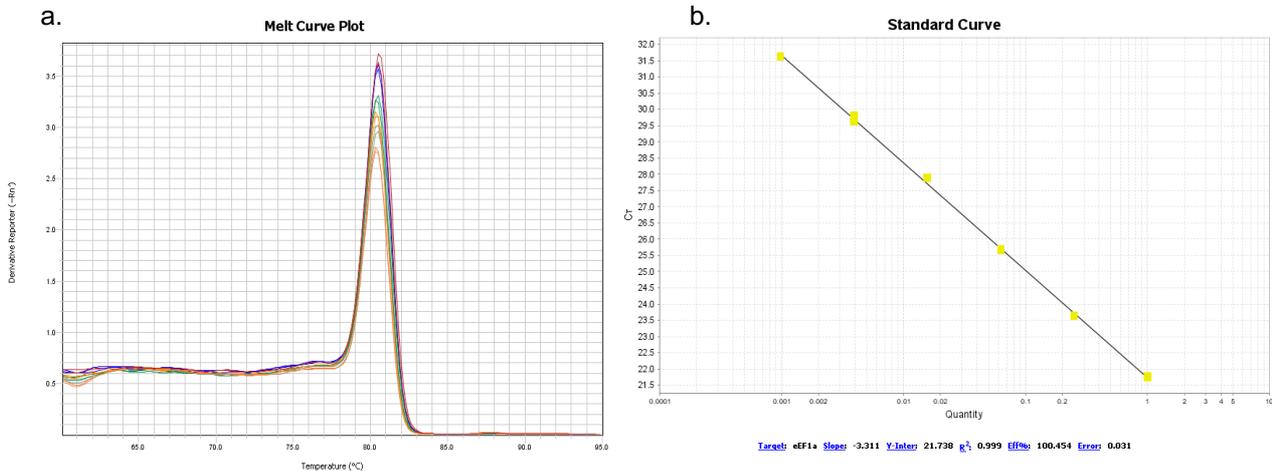


Figura 7. Teste de eficiência dos *primers* para o gene eEF1α. (a) gráfico da curva *Melting* Derivativa para o gene eEF1α. (b) curva padrão relativa ao gene eEF1α, em diluições seriadas, no fator de (1:4) com 6 pontos em triplicada. Slope: -3,311; R<sup>2</sup>: 0,999; eficiência: 100,454 % e erro: 0,031.

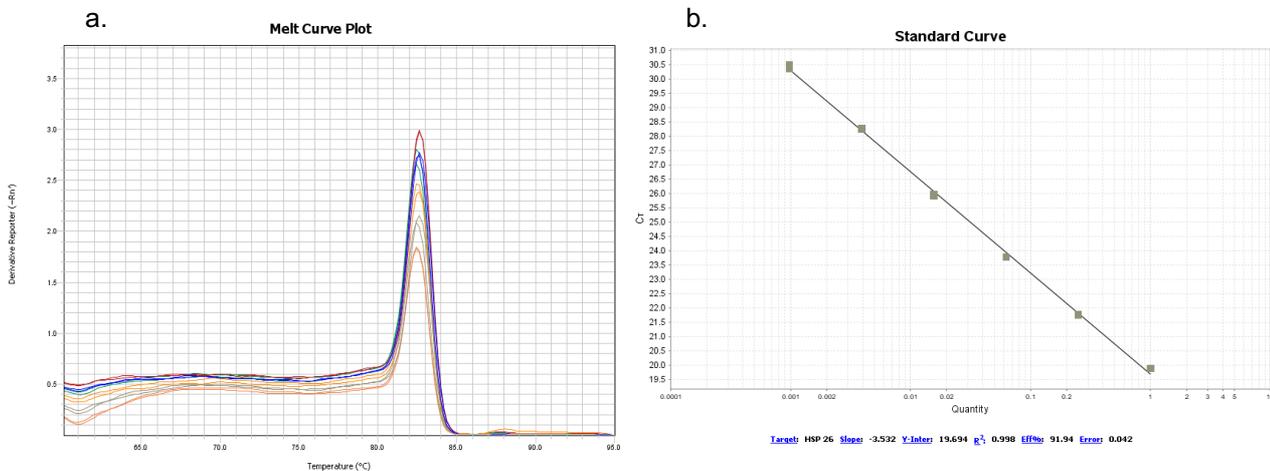


Figura 8. Teste de eficiência dos *primers* para o gene *Hsp26*. (a) gráfico da curva *Melting* Derivativa para o gene *Hsp26*. (b) curva padrão relativa ao gene *Hsp26*, em diluições seriadas, no fator de (1:4) com 6 pontos em triplicada. Slope: -3,532; R<sup>2</sup>: 0,998; eficiência: 91,94 % e erro: 0,042.

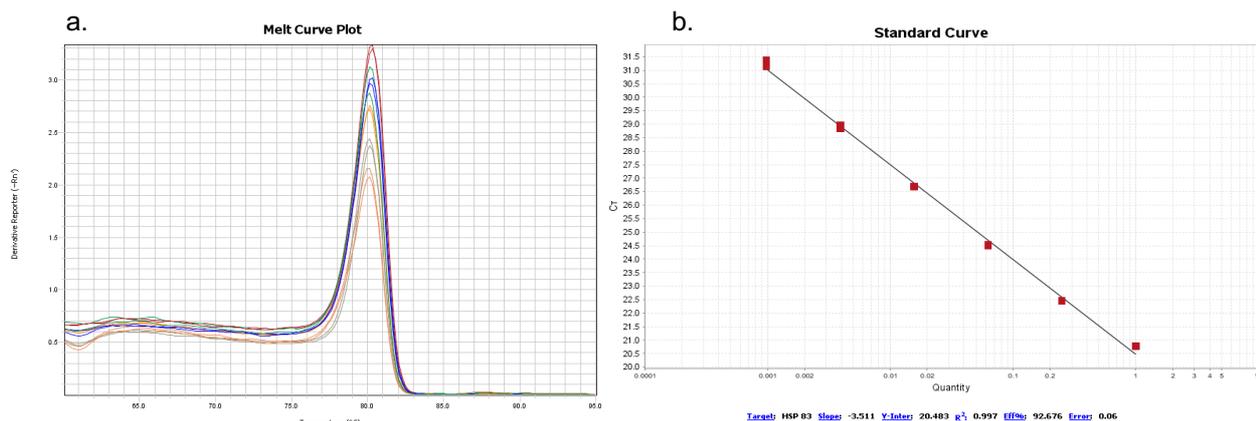


Figura 9. Teste de eficiência dos *primers* para o gene *Hsp83*. (a) gráfico da curva *Melting* Derivativa para o gene *Hsp83*. (b) curva padrão relativa para o gene *Hsp83*, em diluições seriadas, no fator de (1:4) com 6 pontos em triplicada. Slope: -3,511;  $R^2$ : 0,997; eficiência: 92,676 % e erro: 0,06.

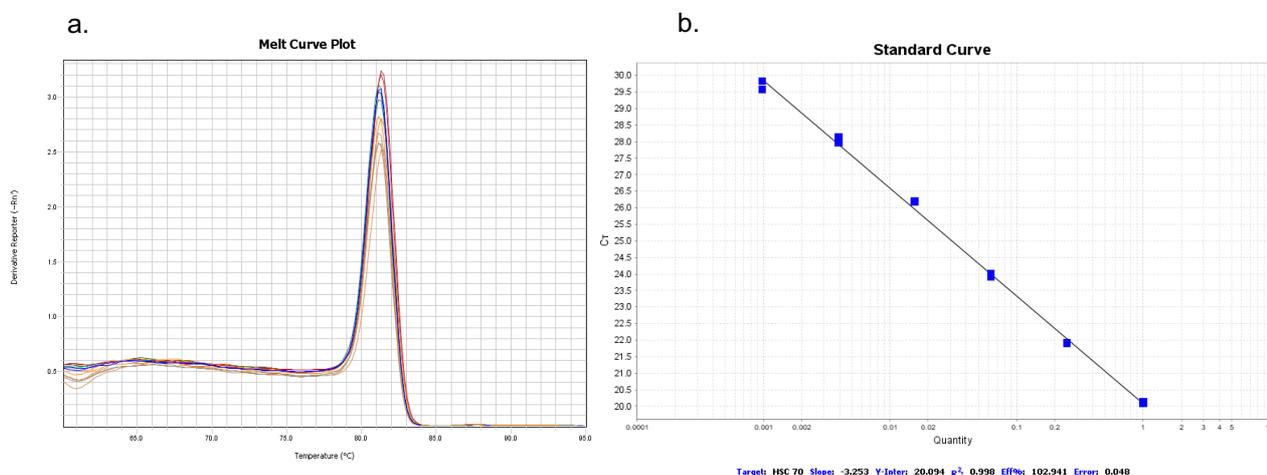


Figura 10. Teste de eficiência dos *primers* para o gene *Hsc70*. (a) gráfico da curva *Melting* Derivativa para o gene *Hsc70*. (b) curva padrão relativa ao gene *Hsc70*, em diluições seriadas, no fator de (1:4) com 6 pontos em triplicada. Slope: -3,253;  $R^2$ : 0,998; eficiência: 102,941 % e erro: 0,048.

### 7.3 Ensaios quantitativos com PCR em Tempo Real (qPCR)

As figuras abaixo apresentam os dados de expressão gênica de *A. aegypti*, mantido sob condições climáticas previstas pelo relatório do IPCC (2007), para o ano de 2100. Os ensaios da expressão gênica das proteínas *Heat shock* foram realizados considerando o cenário atual, intermediário e o cenário extremo. Os níveis de expressão foram analisados pelo método  $\Delta\Delta C_t$  (Livak e Schmittgen 2001) e os resultados estão representados em médias de expressão gênica das três gerações analisadas e dos tratamentos para cada proteína.

Os níveis de expressão do gene *Hsp26*, tanto para macho como para fêmea, em condições climáticas do microcosmos estão representados na (Fig.11). Os resultados mostraram que existe diferença significativa da influência dos cenários climáticos sobre

os sexos ( $p < 0,001$ ) e as diferenças de expressão dos genes entre os sexos ( $p < 0,001$ ). A expressão de *Hsp26* foi diferente significativamente entre os cenários atual e extremo ( $p = 0,010$ ) e intermediário e extremo ( $p = 0,005$ ). Contudo, não foram observadas diferenças expressivas entre os cenários atual e o intermediário ( $p = 0,554$ ).

A expressão deste gene para os machos foi significativa nos cenários: atual e intermediário ( $p = 0,004$ ), atual e extremo ( $p = 0,005$ ) e intermediário e extremo ( $p < 0,001$ ). Apesar de no cenário atual e intermediário existir uma forte tendência para separação dos dados para as fêmeas ( $p = 0,053$ ), essa predisposição não é observada no cenário atual e extremo ( $p = 0,320$ ) e intermediário e extremo ( $p = 0,217$ ). As diferenças entre machos e fêmeas são significativas em todas as condições climáticas estudadas: atual ( $p = 0,003$ ), intermediária ( $p = 0,022$ ) e extrema ( $p < 0,001$ ). Conforme mostra Fig. 11.

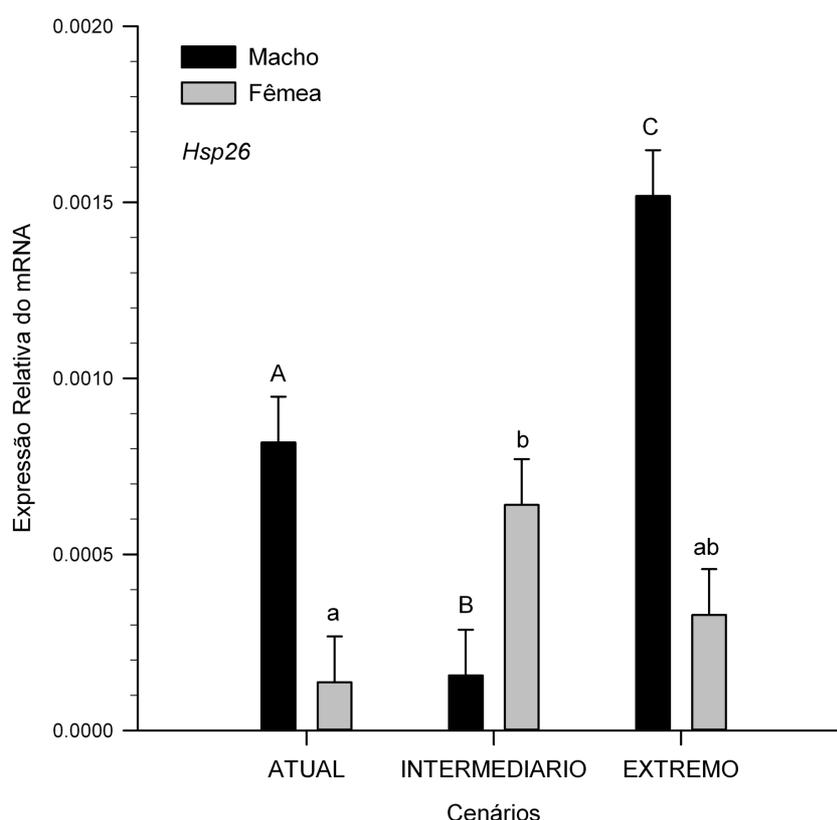


Figura 11. Expressão relativa em *fold change* do gene *Hsp26* de machos e fêmeas de *A. aegypti*, adultos sob condições climáticas do microcosmos durante o período experimental. Letras maiúsculas (machos) e letras minúsculas (fêmeas) iguais, indicam ausência de diferença estatística significativa entre os três cenários e os sexos.

Ao examinar os dados de expressão para *Hsp83* (Fig. 12), são observadas variações significativas entre os sexos ( $p < 0,001$ ). Contudo, a interação entre os cenários climáticos não apresenta diferenças significativas ( $p = 0,097$ ), nem da influência dos cenários sobre os sexos ( $p = 0,080$ )

As diferenças entre os cenários não apresentam variações significativas sobre a expressão do gene *Hsp83*: cenário atual e intermediário ( $p = 0,248$ ), atual e extremo ( $p = 0,436$ ) e intermediário e extremo ( $p = 0,105$ ). As diferenças de expressão para os machos não foram significativas entre nenhuma das condições estudadas: atual e intermediário ( $p = 0,977$ ), atual e extremo ( $p = 0,997$ ) e intermediário e extremo ( $p < 1,000$ ). O mesmo foi observado para as fêmeas nas condições: atual e intermediário ( $p = 0,097$ ) e atual e extremo ( $p = 0,253$ ). Entretanto, foram registradas diferenças entre os cenários intermediário e extremo ( $p = 0,022$ ). As variações na expressão entre machos e fêmeas foram significativas somente nas condições climáticas atual ( $p = 0,023$ ) e intermediária ( $p = 0,001$ ), não havendo diferenças no cenário extremo ( $p = 0,202$ ).

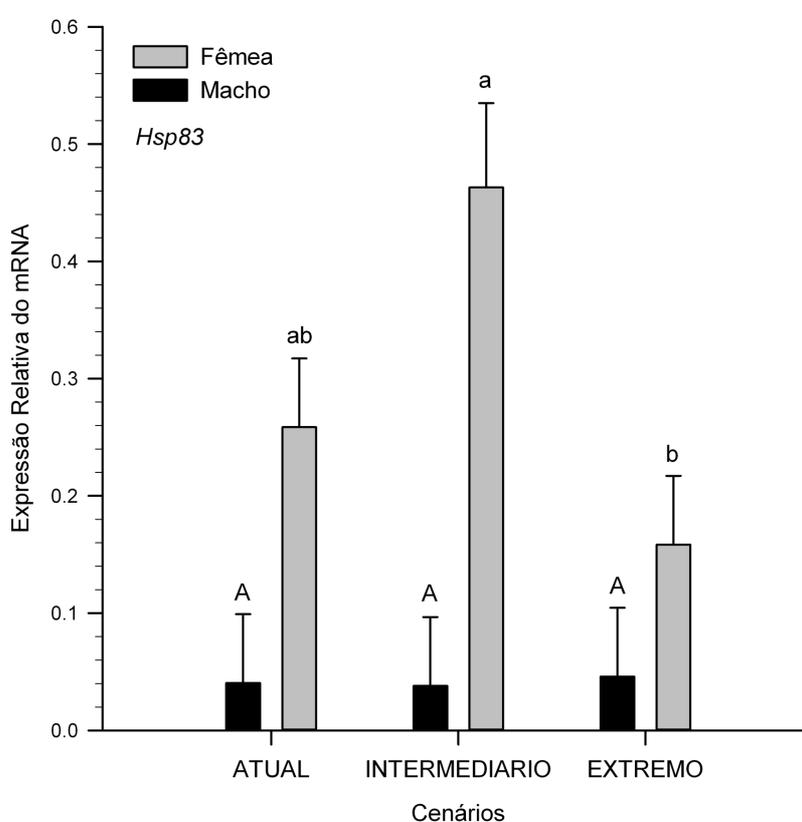


Figura 12. Expressão relativa em *fold change* do gene *Hsp83* de machos e fêmeas de *A. aegypti*, adultos sob condições climáticas do microcosmos durante o período experimental. Letras maiúsculas (machos) e letras minúsculas (fêmeas) iguais, indicam ausência de diferença estatística significativa entre os três cenários e os sexos.

A Figura 13 apresenta o nível de expressão do gene *Hsc70* para machos e fêmeas, mantidos sob as condições climáticas do microcosmos. Foi detectada interação com precisão estatística entre os sexos e os cenários climáticos ( $p < 0,001$ ). Contudo, a influência dos sexos nas diferenças de expressão entre os cenários climáticos não foi significativa ( $p = 0,123$ ). Ao analisar a interação entre os cenários climáticos, não são observadas diferenças entre os cenários atual e intermediário ( $p = 0,293$ ), atual e extremo ( $p = 0,502$ ) e intermediário e extremo ( $p = 0,139$ ).

A expressão do gene *Hsc70* para o macho (Fig.13), não foi significativa entre nenhum dos cenários analisados: atual e intermediário ( $p = 0,738$ ), atual e extremo ( $p = 0,824$ ) e intermediário e extremo ( $p = 0,934$ ). A influência sobre as fêmeas não foi significativa entre os cenários atual e intermediário ( $p = 0,185$ ) e atual e extremo ( $p = 0,191$ ). Entretanto, para a condição intermediária e extrema foi significativo ( $p = 0,023$ ). As desigualdades entre machos e fêmeas foram significativas no cenário atual ( $p = 0,002$ ) e intermediária ( $p < 0,001$ ), exceto no cenário extremo ( $p = 0,185$ ).

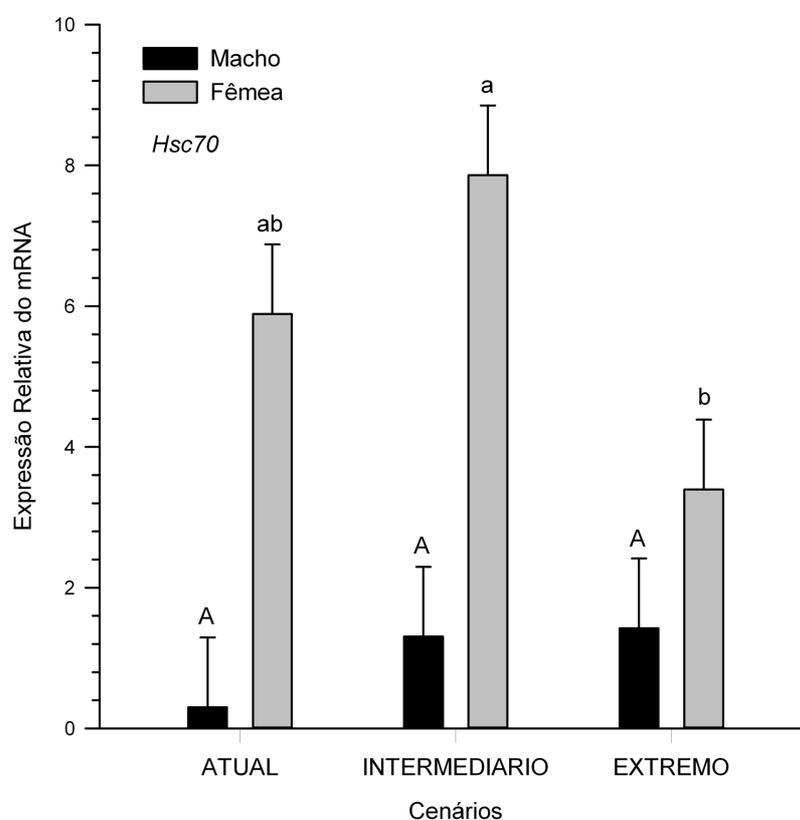


Figura 13. Expressão relativa em *fold change* do gene *Hsc70* de machos e fêmeas de *A. aegypti*, adultos sob condições climáticas do microcosmos durante o período experimental. Letras maiúsculas (machos) e letras minúsculas (fêmeas) iguais, indicam ausência de diferença estatística significativa entre os três cenários e os sexos.

Ao analisar a expressão global das proteínas *Hsp26*, *Hsp83* e *Hsc70* (Fig. 14), as diferenças entre machos e fêmeas são significativas ( $p = 0,005$ ). No entanto, não são apresentadas diferenças entre os cenários ( $p = 0,518$ ), nem nas interações entre os sexos e cenários ( $p = 0,574$ ).

Ao analisar individualmente cada condição climática isoladamente, existe baixa influência dos cenários na expressão global em cenário atual ( $p = 0,082$ ) e extremo ( $p = 0,397$ ). Entretanto, a diferença foi expressiva na condição intermediária ( $p = 0,019$ ).

As variações na expressão para os machos, não é significativa entre nenhuma condição estudada: atual e intermediária ( $p = 0,964$ ), atual e extremo ( $p = 0,999$ ) e intermediário e extremo ( $p = 0,997$ ).

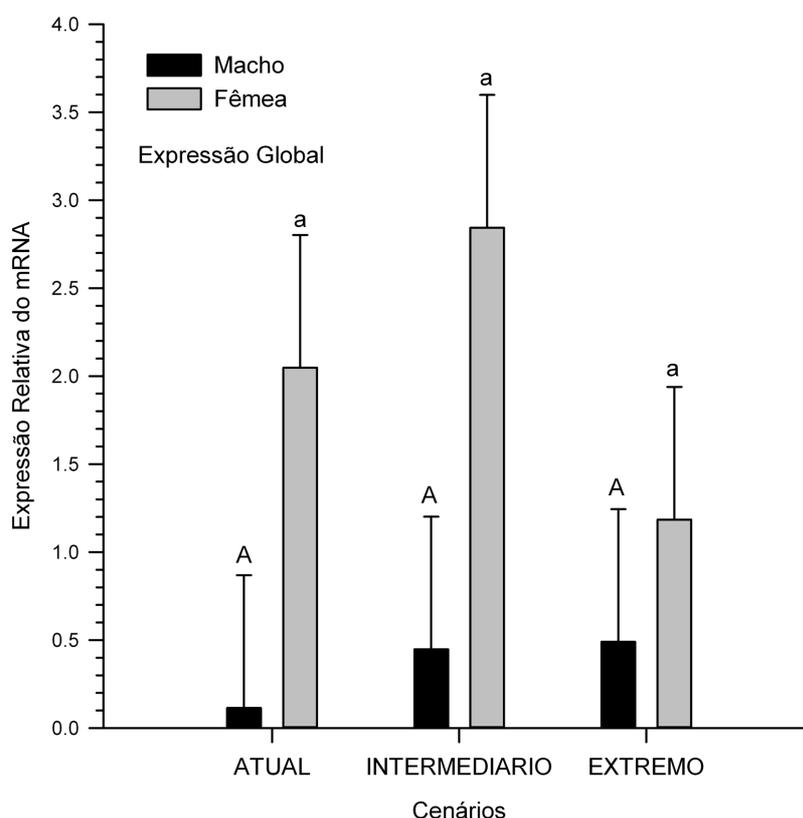


Figura 14. Expressão global em *fold change* dos genes das proteínas *Hsp26*, *Hsp83* e *Hsc70*, de machos e fêmeas de *A. aegypti* adultos, sob condições climáticas do microcosmos durante o período experimental. Letras maiúsculas (machos) e letras minúsculas (fêmeas) iguais, indicam ausência de diferença estatística significativa entre os três cenários e os sexos.

O mesmo foi observado para as fêmeas entre condições: atual e intermediário ( $p = 0,457$ ), atual e extremo ( $p = 0,664$ ) e intermediário e extremo ( $p = 0,343$ ). As desigualdades na expressão entre machos e fêmeas são significativas somente na

condição climática intermediária ( $p = 0,019$ ), não havendo diferenças no cenário atual ( $p = 0,082$ ) e extremo ( $p = 0,397$ ).

## 8. Discussão

As *Heat shock proteins* (*Hsp*) constituem um grupo de proteínas amplamente conservadas nos eucariotos e estão relacionadas à diversas respostas, as quais estão associadas ao estresse intracelular. Entre as funções principais das *Hsp*, ressalta-se a capacidade de manter a estabilidade dos diversos sistemas proteicos, relacionados ao metabolismo celular e transcricional, os quais proporcionam a viabilidade de *A. aegypti*, para sobreviver aos diversos fatores de estresse do ambiente.

Zhao et al. (2010) realizaram experimentos no qual pupas e fêmeas adultas de *A. aegypti* foram expostas em diferentes temperaturas: 23 e 42 °C, e foram mantidos por 0, 15, 30, 60 e 180 min. Estes autores constataram que as larvas de 1° estágio foram mais sensíveis às mudanças da temperatura do que as pupas e adultos. Neste experimento verificou-se que os genes *Hsp26* e *Hsp83* a 42 °C, tiveram expressão alterada, variando de 10 a 50 e 2 a 10 vezes maiores, respectivamente, em comparação ao controle a 23 °C. Ainda segundo estes autores, nas fêmeas adultas a expressão gênica foi elevada com 15 min a 42 °C, no entanto, após 30 min diminuiu bruscamente até valores próximos ao controle (23 °C). Esse comportamento sugere que a expressão dos genes *Hsp26* e *Hsp83* estão associados às respostas rápidas do estresse, entretanto os adultos são pouco tolerantes a longos períodos de exposição, à elevadas temperaturas. Os dados de expressão observados por Zhao et al. (2010) fornecem indícios aos resultados observados no estudo em microcosmo, em função da baixa expressão encontrada em fêmeas para os genes *Hsp26* e *Hsp83*, entretanto, os machos apresentaram elevada expressão do gene *Hsp26*, no cenário extremo.

Como já discutido anteriormente, a exposição à elevadas temperaturas contribui positivamente para a expressão do gene *Hsp83*. No entanto, foi registrado por Muturi et al. (2012) que temperaturas em torno de 10 °C, também elevam a expressão do gene *Hsp83*, evidenciando a atividade desta gene em temperaturas baixas e elevadas. A alta expressão é observada para fêmeas, no cenário intermediário do microcosmo. Porém, na condição extrema, foi menor que os valores registrados no cenário controle. Desta

forma, estes resultados contrastantes indicam variações nos processos regulatórios, associados à expressão do gene *Hsp83* no *A. aegypti*.

Ainda segundo Zhao et al. (2010), a proteína *Hsc70* também é uma *Heat shock* associada às respostas do estresse térmico, no *A. aegypti*. Nesta vertente, Zhao et al. (2010) testaram a expressão deste gene a 23 e 42 °C e verificaram pequeno incremento na expressão do gene após 15 min de exposição, a 42 °C. No entanto, após 1 hora de exposição a 42 °C, o gene *Hsc70* manteve a expressão elevada, quando comparado ao controle a 23 °C. Estes dados indicam que este gene pode apresentar expressão significativa em tratamento com choque térmico intermitente, o que pode estar correlacionado com climas de regiões tropicais com altos registros na temperatura.

Helms Cahan et al. (2017) investigaram a expressão de *Hsp83*, *Hsp40* e *Hsc70-4*, em duas espécies de formigas: uma de clima frio (*Aphaenogaster picea*) e outra de clima quente (*Aphaenogaster rudis*), em áreas geográficas amplamente sobrepostas, nas Montanhas Apalaches dos Estados Unidos. Estes autores observaram que durante os testes de aclimação a 25 e 37 °C, *Hsc70-4* apresentou maior expressão em *A. rudis*, enquanto que *Hsp83* e *Hsp40* apresentaram expressão similar, tanto em *A. rudis* quanto em *A. picea*. Os resultados para *Hsc70* corroboram somente com os ensaios no cenário climática intermediária do microcosmo, enquanto que no cenário extremo constatou-se baixa expressão, tanto para machos quanto para fêmeas. Estes resultados sugerem que há ocorrência de mecanismos de adaptação diferenciados, em indivíduos mantidos por muitas gerações, em condições de estresse contínuo.

Sharma et al. (2018) verificaram alterações na expressão dos genes *Hsp26* e *Hsp27*, ao longo de vinte e oito gerações expostas ao químico benzeno. Constatam que inicialmente (Geração 0) há um incremento na expressão do gene *Hsp26* e, nas gerações seguintes (entre a 10 e 20 gerações), a expressão sofre redução e torna a subir até atingir a geração 28, com níveis próximos ao verificados na geração 0. Enquanto isto, a expressão de *Hsp27* aumentou gradativamente, ao longo das gerações. No entanto, a mortalidade das moscas mostrou comportamento a parte. Ou seja, foi elevada até a 10 geração e, após esse período, entre as gerações 22 a 28, a mortalidade reduziu para valores próximos de 20 %. Este comportamento instável na expressão do gene *Hsp26*, também foi registrado em machos e fêmeas de *A. aegypti*, mantidos no microcosmo.

Nski et al. (2015) trabalharam com ambientes impactados por queimadas avaliando a expressão dos genes: *Hsp22*, *Hsp26*, *Hsp27*, *Hsp70* e *Hsp83* em fêmeas de

*Megaselia scalaris*, espécie de mosca amplamente distribuída em áreas quente do globo terrestre. Durante os ensaios de exposição a diferentes temperaturas, Nski et al. (2015) verificaram que o gene *Hsp70* apresentou alta expressão a partir de 37 °C. Enquanto que *Hsp26* e *Hsp27* foram significativamente expressos entre 35 a 42 °C. Estes resultados sugerem maior sensibilidade das pequenas *Hsp* a temperaturas mais baixas, quando comparadas com as temperaturas de expressão de *Hsp70* e *Hsp83*. Estes dados são parcialmente semelhantes aos verificados nos estudos com *A. aegypti*, no microcosmos. Entretanto, o cenário intermediário, mostrou-se mais significativo na expressão dos genes *Hsp83* e *Hsc70*, do que o cenário extremo do microcosmo. A expressão de *Hsp26* no macho foi fortemente evidenciada no cenário extremo, apresentando um perfil diferenciado quando comparado aos estudos de Nski et al. (2015).

A relação de *Hsp* envolvidas em mecanismos que facilitam a infecção viral, como para o vírus Chikungunya (CHIKV), são retratados nos estudos de Ghosh et al. (2017), onde avaliaram os receptores de membrana para *Hsc70*, em células de mosquitos infectados em laboratório com o vírus CHIKV. Ao tratarem as células com *anti-Hsc70* foi bloqueada a entrada do CHIKV, enquanto que células não tratadas tiveram interação com o vírus. A baixa expressão *Hsc70* é observada em fêmeas no cenário extremo do microcosmos, podendo esta relação ser um indício da influência nos cenários climáticos, sobre a disseminação do CHIKV, em populações de *A. aegypti* no futuro. Estas evidências são altamente significantes, tendo em vista a importância deste vírus para a saúde pública.

Ao verificar a interação de *Hsc70* e outras *Hsp* durante a tautopatia (tau), uma classe de doença neurodegenerativa, que leva à perda da função neural e morte, Yu et al. (2019) constataram a queda de receptores proteolíticos, em coelhos acometidos por tau. Ao expressarem de forma compensatória *Hsc70*, em células acometidas por tau, verificaram a normalização da rede proteolítica, em função da expressão compensatória de *Hsc70*. A expressão deste gene atuou sobre os receptores neurais, regredindo a disfunção neural ocasionada por tau. A alta expressão de *Hsc70* foi significativamente expressa no cenário intermediário do microcosmo, apresentando baixa expressão, tanto para machos quanto para fêmeas, quando comparado ao cenário atual. Esta condição pode ter relação com a capacidade de sobrevivência do *A. aegypti* nos diversos cenários

futuros, desta forma faz-se necessários estudos mais profundos a fim de investigar tais relações.

O estresse causado pela privação do sono, induz a expressão de *Hsp83*, como observado por Rodrigues et al. (2018). No entanto, em condições de laboratório, causou a privação do sono de *D. melanogaster*. Considerando ainda os dados de Rodrigues et al. (2018), constata-se que em seus estudos foi documentado que a exposição à luz constante por 12 horas, altera o ciclo de sono e vigília das moscas, modificando o ciclo normal destes indivíduos. Esses dados, apesar de não serem correlacionados com o estudo em microcosmo, possuem associação com o ciclo biológico do *A. aegypti*. Considerando que a presença de luz dos ambientes naturais e artificiais, influenciam sobre a biologia desta espécie de mosquito. A luz constante é característica dos centros urbanos, podendo este ter influência sobre o período de alimentação das fêmeas e, conseqüentemente, com a transmissão de arboviroses por esse vetor.

Ainda considerando *D. melanogaster*, Li et al. (2018) verificaram as interações nos níveis de expressão de *Hsp83* com grupos proteicos relacionados à expressão do hormônio juvenil (HJ), necessário durante a metamorfose. O hormônio juvenil também é um dos reguladores do ciclo circadiano em *A. aegypti*, estando a expressão do gene *Hsp83* associado à maturação das formas imaturas do mosquito. Os elevados níveis de expressão deste gene são observados no cenário intermediário do microcosmo. Contudo, no cenário extremo, a expressão foi abaixo dos valores verificados no cenário atual. Estes resultados, podem fornecer pistas sobre o ciclo biológico do *A. aegypti* em cenários climáticos futuros.

Ao avaliar a expressão de *Hsc70*, em diversos órgãos e nos ovos de *Rhipicephalus haemaphysaloides*, uma espécie de carrapato, Wang et al. (2019) observaram que ao silenciar a expressão *Hsc70* por RNAi, o índice de mortalidade de *R. haemaphysaloides*, após 48 h, foi próximo de 100 %. Além disso, foi registrado a diminuição da alimentação sanguínea, sugerindo a influência deste gene sobre a taxa de alimentação sanguínea e morte, neste organismo. Os resultados de mortalidade verificados por Wang et al. (2019), corroboram com os dados de Azevedo (2015), ao verificar elevada mortalidade de *A. aegypti*, em cenários extremos do microcosmo. Os baixos níveis de expressão do gene *Hsp83*, também foram verificados em fêmeas no cenário extremo, corroborando com os dados de mortalidade de Azevedo (2015) e Wang et al. (2019).

A supressão de *Hsp83* também é relacionada à processos ligados a vida no pulgão de ervilha (*Acyrtosiphon pisum*). Ao suprimir a expressão de *Hsp83* por RNAi, Will et al. (2017) documentaram alterações sobre a longevidade, fecundidade e embriogênese deste pulgão. A supressão do gene *Hsp83* teve impacto negativo sobre o ciclo de vida de *A. pisum*, sugerindo a influência deste gene, na resposta dos estímulos ambientais, revelando ser essencial para a sobrevivência de *A. pisum*. As diversas funções do gene *Hsp83*, sobre o ciclo biológico de *A. pisum*, pode apresentar associação com o ciclo biológico do *A. aegypti*, tendo em vista que, esta espécie, realiza a alimentação sanguínea para a maturação dos ovos.

Os efeitos do silenciamento gênico de *Hsp83* também são observados sobre a biologia *Leishmania major*. Ao fazer o *knockdown* na expressão do gene relacionado à proteína fosfatase 5 (PP5), em *L. major*, Norris-Mullins et al. (2018) constataram a regulação negativa na expressão de *Hsp83*, diminuindo a capacidade deste parasita em lidar com o estresse no hospedeiro.

Os efeitos dos genes *Hsp*, associados às respostas dos ambientes, em organismos vivendo sob condições climáticas do microcosmo, por muitas gerações, são variados. Além disso, são relevantes as alterações ambientais, como as previstas para o fim do século, as quais podem ser relevantes na sobrevivência do *A. aegypti*, e também para uma previsão sobre a disseminação das arboviroses.

## 9. Conclusão

As mudanças ambientais simuladas no microcosmo tiveram efeitos significativos na expressão dos genes *Hsp*, relacionados ao estresse celular. Durante as investigações, a expressão de *Hsp26*, *Hsp83* e *Hsc70* para machos e fêmeas, nos diferentes cenários estudados, mostraram perfil diferenciado ao que foi verificado na literatura. Os resultados encontrados sugerem que a expressão diferencial dos genes *Hsp*, mediada pelas alterações climáticas, podem ser responsáveis por futuras diferenças no ciclo biológico e padrão genético do *A. aegypti*. Em decorrência das pressões climáticas mais extremas, podem estabelecer mecanismos de adaptação não diretamente dependentes de proteínas *Heat shock*. Estes resultados em microcosmos, podem direcionar para novos estudos associados à genética e a biologia do vetor, pois estes ambientes simulados são os mais próximos que, possivelmente, poderão ser

encontrados nos ambientes naturais e artificiais, em anos futuros. As alterações genéticas encontradas neste estudo, sugerem que há influência dos fatores climáticos sobre os diversos aspectos do ciclo de vida e competência vetorial de *A. aegypti*. No entanto, estudos futuros são necessários para abordar essas possibilidades, com maior riqueza de detalhes. O objetivo é entender com maior precisão, o funcionamento das proteínas *Heat shock*, associadas à transmissão de doenças e suas adaptações genéticas, a fim de criar medidas preventivas, inclusive de controle vetorial, envolvendo o *A. aegypti*.

## 10. Referências

- Aguilera-Pesantes, D.; Robayo, L.E.; Méndez, P.E.; Mollocana, D.; Marrero-Ponce, Y.; Torres, F.J.; et al. 2017. Discovering key residues of dengue virus NS2b-NS3-protease: New binding sites for antiviral inhibitors design. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 492: 631–642.
- AZEVEDO, J.B.; Lima, J.B.P.; Tadei, W.P. 2015. Análise do ciclo biológico do *Aedes aegypti* ( Diptera : Culicidae ) exposto a cenários de mudanças climáticas previstas pelo IPCC ( Intergovernmental Panel on Climate Change ) Análise do ciclo biológico do *Aedes aegypti* ( Diptera : Culicidae ) exposto a c. : 53.
- Barcellos, C.; Monteiro, A.M.V.; Corvalán, C.; Gurgel, H.C.; Carvalho, M.S.; Artaxo, P.; et al. 2009. Mudanças climáticas e ambientais e as doenças infecciosas: cenários e incertezas para o Brasil. *Epidemiologia e Serviços de Saúde* 18: 285–304.
- Bonaldo, M.C.; Ribeiro, I.P.; Lima, N.S.; dos Santos, A.A.C.; Menezes, L.S.R.; da Cruz, S.O.D.; et al. 2016. Isolation of Infective Zika Virus from Urine and Saliva of Patients in Brazil. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 10: e0004816.
- Braga, I.; Valle, D. 2007. *Aedes aegypti* : histórico do controle no Brasil \*. *Epidemiologia e Serviços de Saúde* 16: 113–118.
- Bukau, B.; Horwich, A.L. 1998. The Hsp70 and Hsp60 Chaperone Machines. 92: 351–366.
- CABRAL, S.D.S.; Silva, I.G. da. 2015. ATIVIDADE LARVICIDA DO EXTRATO BRUTO DE *Swinglea glutinosa* EVIDENCIADA PELAS ALTERAÇÕES MORFOHISTOLÓGICAS EM LARVAS DE *Aedes aegypti* ( DIPTERA , CULICIDAE

- ). Goiânia. : 44.
- Carvalho, F.D.; Moreira, L.A. 2017. Why is *Aedes aegypti* Linnaeus so Successful as a Species? *Neotropical Entomology* 46: 243–255.
- Castree, N. 2010. Book Review: The Politics of Climate Change. *The Sociological Review* 58: 156–162.
- Chaves, L.F.; Scott, T.W.; Morrison, A.C.; Takada, T. 2014. Hot temperatures can force delayed mosquito outbreaks via sequential changes in *Aedes aegypti* demographic parameters in autocorrelated environments. *Acta Tropica* 129: 15–24.
- Chouin-Carneiro, T.; Vega-Rua, A.; Vazeille, M.; Yebakima, A.; Girod, R.; Goindin, D.; et al. 2016. Differential Susceptibilities of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from the Americas to Zika Virus. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 10: e0004543.
- Choutka, C.; DeVorkin, L.; Go, N.E.; Hou, Y.-C.C.; Moradian, A.; Morin, G.B.; et al. 2017. Hsp83 loss suppresses proteasomal activity resulting in an upregulation of caspase-dependent compensatory autophagy. *Autophagy* 13: 1573–1589.
- Church, J.A.; White, N.J. 2006. A 20th century acceleration in global sea-level rise. *Geophysical Research Letters* 33: n/a-n/a.
- Da Costa Vasconcelos, P.F. 2003. Febre amarela. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 36: 275–293.
- Couret, J.; Dotson, E.; Benedict, M.Q. 2014. Temperature, Larval Diet, and Density Effects on Development Rate and Survival of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *PLoS ONE* 9: e87468.
- Couto-Lima, D.; Madec, Y.; Bersot, M.I.; Campos, S.S.; Motta, M. de A.; Santos, F.B. dos; et al. 2017. Potential risk of re-emergence of urban transmission of Yellow Fever virus in Brazil facilitated by competent *Aedes* populations. *Scientific Reports* 7: 4848.
- Derkzen, M.L.; van Teeffelen, A.J.A.; Verburg, P.H. 2017. Green infrastructure for urban climate adaptation: How do residents' views on climate impacts and green infrastructure shape adaptation preferences? *Landscape and Urban Planning* 157: 106–130.
- Dias, V.; Fisch, G.; Fisch, S.T.V. 2016. Simulações de clima futuro no domínio da mata atlântica: transecto Ubatuba, SP e Extrema, MG, Brasil. *Ambiente e Agua - An Interdisciplinary Journal of Applied Science* 11: 1042.
- Donalisio, M.R.; Freitas, A.R.R. 2015. Chikungunya no Brasil: um desafio emergente.

- Revista Brasileira de Epidemiologia* 18: 283–285.
- Dzaki, N.; Ramli, K.N.; Azlan, A.; Ishak, I.H.; Azzam, G. 2017. Evaluation of reference genes at different developmental stages for quantitative real-time PCR in *Aedes aegypti*. *Scientific Reports* 7: 43618.
- Farjana, T.; Tuno, N. 2013. Multiple Blood Feeding and Host-Seeking Behavior in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology* 50: 838–846.
- Fearnside, P.M. 2008. Mudanças climáticas globais e a floresta amazônica. *In: Biologia e Mudanças Climáticas no Brasil: 27*.
- Folland, C.K.; Rayner, N.A.; Brown, S.J.; Smith, T.M.; Shen, S.S.P.; Parker, D.E.; et al. 2001. Global temperature change and its uncertainties since 1861.pdf. *Geophysical Research Letters* 28: 2621–2624.
- Forattini, O. P. 2002. *Culicidologia Médica. Identificação, Biologia, Epidemiologia*. Vol. 2. São Paulo, Editora Universidade de São Paulo, 860 p.
- Ghosh, A.; Desai, A.; Ravi, V.; Narayanappa, G.; Tyagi, B.K. 2017. Chikungunya Virus Interacts with Heat Shock Cognate 70 Protein to Facilitate Its Entry into Mosquito Cell Line. *Intervirology* 60: 247–262.
- Glasser, C.M.; Gomes, A.D.C. 2002. Clima e sobreposição da distribuição de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* na infestação do Estado de São Paulo. *Revista de Saúde Pública* 36: 166–172.
- Griggs, D.J.; Noguera, M. 2002. Climate change 2001: The scientific basis. Contribution of Working Group I to the Third Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. *Weather* 57: 267–269.
- Gross, T.L.; Myles, K.M.; Adelman, Z.N. 2009. Identification and Characterization of Heat Shock 70 Genes in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology* 46: 496–504.
- Gubler, D.J. 1997. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Seminars in Pediatric Infectious Diseases* 8: 3–9.
- Guerra, J.; Ferreira, J.G.; Schmidt, L.; Campos, I.S.; Penha-Lopes, G.; Vizinho, A. 2015. *Alterações climáticas nos municípios portugueses – resultados de um inquérito*. In: Isabel Corrêa da Silva, M.P. e S. de M.V. (Coord. . (Ed.) 1st ed. Nova Lisboa, 23p.
- Hamilton, L.C.; Hartter, J.; Lemcke-Stampone, M.; Moore, D.W.; Safford, T.G. 2015.

- Tracking Public Beliefs About Anthropogenic Climate Change. *PLOS ONE* 10: e0138208.
- Haslbeck, M. 1999. Hsp26: a temperature-regulated chaperone. *The EMBO Journal* 18: 6744–6751.
- He, Q.; Wen, D.; Jia, Q.; Cui, C.; Wang, J.; Palli, S.R.; et al. 2014. Heat Shock Protein 83 (Hsp83) Facilitates Methoprene-tolerant (Met) Nuclear Import to Modulate Juvenile Hormone Signaling. *Journal of Biological Chemistry* 289: 27874–27885.
- He, Q.; Zhang, Y.; Zhang, X.; Xu, D.; Dong, W.; Li, S.; et al. 2017. Nucleoporin Nup358 facilitates nuclear import of Methoprene-tolerant (Met) in an importin  $\beta$ - and Hsp83-dependent manner. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 81: 10–18.
- Helms Cahan, S.; Nguyen, A.D.; Stanton-Geddes, J.; Penick, C.A.; Hernáiz-Hernández, Y.; DeMarco, B.B.; et al. 2017. Modulation of the heat shock response is associated with acclimation to novel temperatures but not adaptation to climatic variation in the ants *Aphaenogaster picea* and *A. rudis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 204: 113–120.
- Honório, N.A.; Câmara, D.C.P.; Calvet, G.A.; Brasil, P. 2015. Chikungunya: uma arbovirose em estabelecimento e expansão no Brasil. *Cadernos de Saúde Pública* 31: 906–908.
- Intergovernmental Panel on Climate Change. 2014. *Climate Change 2014 Mitigation of Climate Change*. Cambridge University Press, Cambridge, 1454p.
- IPCC5 WGII. 2014. *Climate Change 2013*. 1535p.
- Kang, D.S.; Alcalay, Y.; Lovin, D.D.; Cunningham, J.M.; Eng, M.W.; Chadee, D.D.; et al. 2017. Larval stress alters dengue virus susceptibility in *Aedes aegypti* (L.) adult females. *Acta Tropica* 174: 97–101.
- King, A.M.; MacRae, T.H. 2015. Insect Heat Shock Proteins During Stress and Diapause. *Annual Review of Entomology* 60: 59–75.
- Kraemer, M.U.G.; Sinka, M.E.; Duda, K. a.; Mylne, A.; Shearer, F.M.; Brady, O.J.; et al. 2015. The global compendium of *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* occurrence. *Scientific Data* 2: 150035.
- Kubota, R.L.; Brito, M. de; Voltolini, J.C. 2003. Método de varredura para exame de criadouros de vetores de dengue e febre amarela urbana. *Revista de Saúde Pública* 37: 263–265.
- Kyle, J.L.; Harris, E. 2008. Global Spread and Persistence of Dengue. *Annual Review of*

- Microbiology* 62: 71–92.
- de la Fuente, A.; Rojas, M.; Mac Lean, C. 2017. A human-scale perspective on global warming: Zero emission year and personal quotas. *PLOS ONE* 12: e0179705.
- Lei, Y.; Liu, K.; Hou, L.; Ding, L.; Li, Y.; Liu, L. 2017. Small chaperons and autophagy protected neurons from necrotic cell death. *Scientific Reports* 7: 5650.
- Lemes, P.; Loyola, R.D. 2015. Mudanças climáticas e prioridades para a conservação da biodiversidade - Climate change and priorities for biodiversity conservation. *Revista de Biologia Neotropical* 11: 47.
- Li, K.; Jia, Q.-Q.; Li, S. 2019. Juvenile hormone signaling – a mini review. *Insect Science* 26: 600–606.
- Lima-Camara, T.N. 2016. Emerging arboviruses and public health challenges in Brazil. *Revista de Saúde Pública* 50: 1–7.
- Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. *Methods* 25: 402–408.
- Lytras, G.; Zacharioudakis, I.; Tzamarias, D. 2017. Asymmetric inheritance of the yeast chaperone Hsp26p and its functional consequences. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 491: 1055–1061.
- Majeed, S.; Hill, S.R.; Ignell, R. 2014. Impact of elevated CO<sub>2</sub> background levels on the host-seeking behaviour of *Aedes aegypti*. *Journal of Experimental Biology* 217: 598–604.
- Malewski, T.; Bogdanowicz, W.; Durska, E.; Łoś, M.; Kamiński, M.; Kowalewska, K. 2015. Expression profiling of heat shock genes in a scuttle fly *Megaselia scalaris* (Diptera, Phoridae). *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology* 323: 704–713.
- Marengo, J.A. 2008. Água e mudanças climáticas. *Estudos Avançados* 22: 83–96.
- Marques, G.R. a M.; Chaves, L.S.M.; Serpa, L.L.N.; Arduíno, M. de B.; Chaves, F.J.M. 2013. Água de abastecimento público de consumo humano e oviposição de *Aedes aegypti*. *Revista de Saúde Pública* 47: 579–587.
- Marrego, J.A. 2001. Mudanças climáticas globais e regionais: Avaliação do clima atual do Brasil e projeções de cenários climáticos futuros. : 01–18.
- de Melo, F.L.; Romano, C.M.; Zanotto, P.M. de A. 2009. Introduction of Dengue Virus 4 (DENV-4) Genotype I into Brazil from Asia? *PLoS Neglected Tropical Diseases* 3: e390.

- Mohammed, A.; Chadee, D.D. 2011. Effects of different temperature regimens on the development of *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) mosquitoes. *Acta Tropica* 119: 38–43.
- Muturi, E.J.; Nyakeriga, A.; Blackshear, M. 2012. Temperature-Mediated Differential Expression of Immune and Stress-Related Genes in *Aedes aegypti* Larvae. *Journal of the American Mosquito Control Association* 28: 79–83.
- Neal, S.J.; Karunanithi, S.; Best, A.; So, A.K.-C.; Tanguay, R.M.; Atwood, H.L.; et al. 2006. Thermoprotection of synaptic transmission in a *Drosophila* heat shock factor mutant is accompanied by increased expression of Hsp83 and DnaJ-1. *Physiological Genomics* 25: 493–501.
- Norris-Mullins, B.; Krivda, J.S.; Smith, K.L.; Ferrell, M.J.; Morales, M.A. 2018. Leishmania phosphatase PP5 is a regulator of HSP83 phosphorylation and essential for parasite pathogenicity. *Parasitology Research* 117: 2971–2985.
- Pinheiro, V.C.S.; Tadei, W.P. 2002. Evaluation of the residual effect of temephos on *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) larvae in artificial containers in Manaus, Amazonas State, Brazil. *Cadernos de Saúde Pública* 18: 1529–1535.
- Rafael, M.S.; Tadei, W.P.; Hunter, F.F. 2004. The Physical Gene *Hsp70* Map on Polytene Chromosomes of *Anopheles darlingi* from the Brazilian Amazon. *Genetica* 121: 89–94.
- Rockström, J.; Brasseur, G.; Hoskins, B.; Lucht, W.; Schellnhuber, J.; Kabat, P.; et al. 2014. Climate change: The necessary, the possible and the desirable Earth League climate statement on the implications for climate policy from the 5th IPCC Assessment. *Earth's Future* 2: 606–611.
- Rodrigues, N.R.; Macedo, G.E.; Martins, I.K.; Gomes, K.K.; de Carvalho, N.R.; Posser, T.; et al. 2018. Short-term sleep deprivation with exposure to nocturnal light alters mitochondrial bioenergetics in *Drosophila*. *Free Radical Biology and Medicine* 120: 395–406.
- Sharma, D.; Singh, M.P.; Vimal, D.; Kumar, S.; Jha, R.R.; Chowdhuri, D.K. 2018. Benzene induced resistance in exposed *Drosophila melanogaster*: Outcome of improved detoxification and gene modulation. *Chemosphere* 201: 144–158.
- Sheller, R.A.; Smyers, M.E.; Grossfeld, R.M.; Ballinger, M.L.; Bittner, G.D. 1998. Heat-shock proteins in axoplasm: High constitutive levels and transfer of inducible isoforms from glia. *The Journal of Comparative Neurology* 396: 1–11.

- Shukla, A.K.; Pragma, P.; Chaouhan, H.S.; Tiwari, A.K.; Patel, D.K.; Abdin, M.Z.; et al. 2014a. Heat Shock Protein-70 (Hsp-70) Suppresses Paraquat-Induced Neurodegeneration by Inhibiting JNK and Caspase-3 Activation in *Drosophila* Model of Parkinson's Disease. *PLoS ONE* 9: e98886.
- Shukla, A.K.; Pragma, P.; Chaouhan, H.S.; Tiwari, A.K.; Patel, D.K.; Abdin, M.Z.; et al. 2014b. Heat Shock Protein-70 (Hsp-70) Suppresses Paraquat-Induced Neurodegeneration by Inhibiting JNK and Caspase-3 Activation in *Drosophila* Model of Parkinson's Disease. *PLoS ONE* 9: e98886.
- Silva, H.H.G. da; Silva, I.G. da. 1999. Influência do período de quiescência dos ovos sobre o ciclo de vida de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae) em condições de laboratório. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 32: 349–355.
- Silva, H.H.G. Da; Silva, Ionizete G. da; Kênia Da Silva Lira; Ionizete Garcia da Silva. 1998. Metodologia de criação, manutenção de adultos e estocagem de ovos de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) em laboratório. *Revista de Patologia Tropical* 27: 53–63.
- Sivan, A.; Shriram, A.N.; Muruganandam, N.; Thamizhmani, R. 2017. Expression of heat shock proteins (HSPs) in *Aedes aegypti* (L) and *Aedes albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae) larvae in response to thermal stress. *Acta Tropica* 167: 121–127.
- Smith, C.; Baldwin, A.H.; Sullivan, J.; Leisnham, P.T. 2013. Effects of Elevated Atmospheric CO<sub>2</sub> on Competition Between the Mosquitoes *Aedes albopictus* and *Ae. triseriatus* via Changes in Litter Quality and Production. *Journal of Medical Entomology* 50: 521–532.
- Sorribas, M.V.; Paiva, R.C.D.; Melack, J.M.; Bravo, J.M.; Jones, C.; Carvalho, L.; et al. 2016. Projections of climate change effects on discharge and inundation in the Amazon basin. *Climatic Change* 136: 555–570.
- Sun, G.; Cao, Y.; Dai, X.; Li, M.; Guo, J. 2019a. Hsc70 Interacts with  $\beta$ 4GalT5 to Regulate the Growth of Gliomas. *NeuroMolecular Medicine* 21: 33–41.
- Sun, G.; Cao, Y.; Xu, Y.; Huai, D.; Chen, P.; Guo, J.; et al. 2019b. Overexpression of Hsc70 promotes proliferation, migration, and invasion of human glioma cells. *Journal of Cellular Biochemistry* 120: 10707–10714.
- Tedesco, P.A.; Oberdorff, T.; Cornu, J.-F.; Beauchard, O.; Brosse, S.; Dürr, H.H.; et al.

2013. A scenario for impacts of water availability loss due to climate change on riverine fish extinction rates. *Journal of Applied Ecology* 50: n/a-n/a.
- Wang, F.; Gong, H.; Zhang, H.; Zhou, Y.; Cao, J.; Zhou, J. 2019. Molecular characterization, tissue-specific expression, and RNA knockdown of the putative heat shock cognate 70 protein from *Rhipicephalus haemaphysaloides*. *Parasitology Research* 118: 1363–1370.
- Will, T.; Schmidtberg, H.; Skaljic, M.; Vilcinskas, A. 2017. Heat shock protein 83 plays pleiotropic roles in embryogenesis, longevity, and fecundity of the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. *Development Genes and Evolution* 227: 1–9.
- Yu, A.; Fox, S.G.; Cavallini, A.; Kerridge, C.; O'Neill, M.J.; Wolak, J.; et al. 2019. Tau protein aggregates inhibit the protein-folding and vesicular trafficking arms of the cellular proteostasis network. *Journal of Biological Chemistry* 294: 7917–7930.
- Zhang, J.; Xi, G.; Guo, Z.; Jia, F. 2019. RNA-Seq analysis of *Polyrhachis vicina* Roger and insights into the heat shock protein 90 and 70 families. *Cell Stress and Chaperones* 24: 45–58.
- Zhao, L.; Jones, W. a. 2012. Expression of heat shock protein genes in insect stress responses. *Invertebrate Survival Journal* 9: 93–101.
- Zhao, L.; Becnel, J.J.; Clark, G.G.; Linthicum, K.J. 2010. Expression of *AeaHsp26* and *AeaHsp83* in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Larvae and Pupae in Response to Heat Shock Stress. *Journal of Medical Entomology* 47: 367–375.
- Zhao, L.; Pridgeon, J.W.; Becnel, J.J.; Clark, G.G.; Linthicum, K.J. 2008. Cytochrome c gene and protein expression: developmental regulation, environmental response, and pesticide sensitivity in *Aedes aegypti*. *Journal of medical entomology* 45: 401–408.
- Zhao, L.; Pridgeon, J.W.; Becnel, J.J.; Clark, G.G.; Linthicum, K.J. 2009. Identification of Genes Differentially Expressed During Heat Shock Treatment in *Aedes aegypti*. *Journal of Medical Entomology* 46: 490–495.