

Título do projeto: **Efeitos de cenários de mudanças climáticas sobre *Aedes aegypti*: implicações para saúde e conservação da biodiversidade**

Tipo de bolsa solicitada: **Bolsa destinada a projeto de doutorado**

Instituição de Ensino/Programa: **Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS) – Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação**

Dados da aluna:

Nome: Ana Cláudia Piovezan Borges

Titulação: Mestre em Ecologia

Currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/9858929152957944>

Endereço profissional: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Instituto de Biociências.

Orientador do projeto:

Nome: Fabio de Oliveira Roque

Titulação: Doutor em Ecologia e Recursos Naturais

Cargo: Professor Adjunto

Tipo de vínculo com a IES: Servidor Público Federal

Currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/0569110274864876>

Endereço profissional: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Instituto de Biociências.

Detalhamento do projeto:

INTRODUÇÃO

Mudanças climáticas afetam diretamente a biodiversidade por alterar fatores abióticos como temperatura e precipitação. Esses fatores são responsáveis pelo aumento da frequência de eventos climáticos extremos, como secas prolongadas e inundações, e podem gerar efeitos indiretos na biodiversidade, alguns desses efeitos estão relacionados ao aumento da incidência de doenças transmitidas por vetores (Messina et al., 2015; IPCC, 2014), como por exemplo, perda de predadores e competidores que diminuem a transmissão de patógenos (WHO, 2015) e alteração na dinâmica do ecossistema, levando a criação de novos habitats para a reprodução dessas espécies (Gottwalt, 2013). Esses efeitos geram alterações nas taxas de sobrevivência e reprodução de espécies vetores de patógenos. Entender como mudanças climáticas afetam as espécies de vetores é fundamental para criação de estratégias de conservação da biodiversidade (Altizer et al., 2013), pois podem contribuir para a minimização de impactos de potenciais doenças tropicais em animais e humanos, e para um desenho de sistemas de unidades de conservação que considerem redução de riscos de invasão por espécies vetores e exóticas. Além disso, estudos sobre distribuição de espécies vetores, mudanças climáticas e usos do solo, são críticos para orientar políticas públicas de saúde e conservação, como recentemente preconizado pela Convenção Internacional de Diversidade Biológica e Organização Mundial da Saúde.

Mosquitos vetores de patógenos constituem um dos grupos cujos efeitos de mudanças climáticas podem acarretar fortes implicações para a saúde humana (Medlock e Leach, 2015). Segundo a Organização Mundial da Saúde, as doenças transmitidas por vetores representam 17% do total de doenças infecciosas e são responsáveis pela morte de mais de 700.000 pessoas por ano no mundo (WHO, 2017). Dentre as espécies de mosquitos vetores de patógenos, *Aedes aegypti* está presente em quase todas as regiões tropicais e subtropicais do mundo e é vetor primário dos vírus que causam zika, febre amarela, chikungunya e dengue. São estimados anualmente no mundo 96 milhões de casos de dengue, mais de 3,9 bilhões de pessoas correm o risco de contrair essa doença (WHO, 2017). Devido a ampla distribuição e o impacto causado na saúde pública, as arboviroses transmitidas pelo *A. aegypti* representam uma ameaça global à saúde (Kraemer et al., 2015; Lindsay et al., 2017).

Quando os organismos são expostos a condições críticas, como alterações climáticas, eles sofrem plasticidade fenotípica (Hoffmann et al., 2013), alterações fisiológicas e comportamentais (Araújo et al., 2013). Estas consequências podem alterar a incidência, transmissão e distribuição geográfica de doenças, gerando impacto na saúde humana (Degroote et al., 2008; Ezanno, 2015). Além disso, o aumento de populações de mosquitos nos trópicos é

previsto pelo Painel Intergovernamental de Mudanças Climáticas (IPCC, 2014) e a transmissão de doenças causadas por vetores e a sobrevivência do vetor estão positivamente associadas com aumento de temperatura global (Barrera et al., 2011). Portanto, entender os efeitos das alterações climáticas no metabolismo de mosquitos tropicais é um desafio fundamental não apenas em uma perspectiva de conhecimento científico, mas para subsidiar cenários de prevenção.

Os efeitos das mudanças climáticas em níveis organizacionais mais altos, como populações e comunidades, vêm sendo estudados (Chaves et al., 2010; Steiger et al., 2012), mas pouco se sabe sobre a influência desses fatores a nível celular. A primeira resposta dos organismos a impactos externos, ocorre a nível molecular e celular. Essa resposta pode variar de acordo com o tipo celular e com a intensidade com que os organismos são afetados, causando danos no DNA, proteínas e membrana lipídica, inibições enzimáticas, mutação e distúrbios reprodutivos, fisiológicos, comportamentais e na homeostase celular (Fent 2004; Hawlena e Schmitz 2010).

Portanto, uma das formas de evidenciar o impacto que as mudanças climáticas causam a nível celular nos mosquitos vetores de patógenos, é através da avaliação de biomarcadores de estresse oxidativo (Colin et al., 2016). O estresse oxidativo ocorre quando a produção de EROs (espécies reativas de oxigênio) ultrapassa a capacidade de defesa do sistema antioxidante. Nos organismos aeróbicos, as EROs como radical superóxido ($O_2^{\cdot -}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxil (OH^{\cdot}) podem ser geradas endogenamente ou por exposição a fatores bióticos e abióticos (Halliwell e Gutteridge, 2007).

Para proteção contra as EROs, os insetos possuem sistemas de defesa antioxidante enzimáticos e não-enzimáticos. Entre os componentes enzimáticos estão a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathione redutase (GR). A SOD dismuta $O_2^{\cdot -}$, que é um radical altamente reativo, em moléculas menos reativas, como o H_2O_2 ; a CAT degrada o H_2O_2 , reduzindo em água e oxigênio; e a GR reduz GSSG (glutathione oxidada) a GSH (glutathione reduzida), a GSH atua como um antioxidante de baixo peso molecular e como substrato para outras enzimas da família das glutathionas que catalisam a degradação de peróxidos (El-Missiry, 2012). Caso esses mecanismos de defesa sejam insuficientes, diferentes alvos celulares como proteínas, DNA e membrana lipídica podem sofrer danos causados pelas EROs. A atividade das enzimas e o dano causado nas células, são utilizados como biomarcadores de estresse oxidativo.

Portanto, a avaliação dos biomarcadores de estresse oxidativo nos organismos é importante para: i) fornecer respostas a nível celular/molecular; ii) auxiliar no melhor entendimento do funcionamento do metabolismo oxidativo das espécies; iii) fornecer *insights*

sobre os efeitos que as alterações climáticas podem gerar nessas espécies e iv) fornecer previsões das consequências que esses impactos podem causar a longo prazo (Altizer et al., 2013).

Os impactos das mudanças climáticas sobre a biodiversidade devem aumentar no próximo século, por isso, conhecer as respostas do sistema de defesa antioxidante de uma espécie de mosquito que é vetor de patógenos, frente a mudanças climáticas, pode fornecer *insights* sobre como populações e comunidades dessa espécie podem se comportar frente a eventos climáticos extremos (Moore et al., 2004). Essa resposta é muito importante pois pode auxiliar na tomada de decisões de políticas públicas para a saúde, já que podemos avaliar quais as consequências negativas que essa alteração pode causar nos próximos anos. Apenas como exemplo, entender como vetores podem fornecer respostas precoces (indicada pelo sistema de defesa antioxidante), pode ajudar na previsão de surtos e emergência de doenças como dengue, febre amarela, chikungunya e zika. Atualmente, os modelos de distribuição potencial e previsão de maior incidência de mosquitos em paisagens não consideram as respostas em nível molecular, os limiares de sobrevivência. Portanto, acoplar informações sobre estresse oxidativo e distribuição potencial é uma abordagem com implicações práticas para o planejamento em saúde e conservação.

Neste projeto iremos avaliar o efeito de diferentes cenários de mudanças climáticas preditos pelo Painel Intergovernamental de Mudanças Climáticas (IPCC) no sistema de defesa antioxidante, nas taxas de sobrevivência e no desenvolvimento de *A. aegypti*. Além disso, faremos modelos espaciais de distribuição projetando potenciais efeitos de mudanças climáticas no Brasil, com particular interesse nas relações entre ambientes naturais e antrópicos, como agricultura, pecuária e cidades.

JUSTIFICATIVA

As mudanças climáticas vêm gerando potenciais impactos à biodiversidade, como alterações na dinâmica populacional e na composição de comunidades, perda ou variação de interações bióticas, perda ou fragmentação de habitats (Shen e Ma, 2014). Esses distúrbios na biodiversidade criam condições ideais para a reprodução e disseminação de espécies vetores de patógenos e consequentemente causam alterações na prevalência ou gravidade de algumas doenças transmitidas por vetores (Gottwalt, 2013; Negev et al., 2015).

Um dos grupos cujos efeitos de mudanças climáticas pode acarretar fortes implicações para a saúde humana e de outros animais é o dos mosquitos vetores de patógenos (Medlock e Leach, 2015). Vetor é todo o ser vivo capaz de transmitir potenciais patógenos aos seres

humanos e a outros organismos (Kuno e Chang, 2005) e patógeno é o agente infeccioso que causa ou pode causar alguma doença, como vírus, bactérias, protozoários e vermes (Pirofski e Casadevall, 2012). Dentro da família Culicidae, alguns gêneros se destacam pela sua importância como transmissores de patógenos, entre eles está o gênero *Aedes*. O principal representante desse gênero e que é foco desse estudo é *A. aegypti* (L.), essa espécie se adapta a diferentes condições climáticas, ocupa diferentes nichos no ambiente e se reproduz em um curto período de tempo (Consoli e de Oliveira, 1998).

Avaliar a resposta a nível celular e o ciclo de desenvolvimento de uma espécie que é o vetor principal de muitas doenças, fornece *insights* sobre como as mudanças climáticas e os efeitos diretos e indiretos que ela causa na biodiversidade, podem afetar essa espécie. Uma das formas de evidenciar o impacto que as mudanças climáticas causam a nível celular nos mosquitos vetores de patógenos, é através da avaliação de biomarcadores de estresse oxidativo (Colin et al., 2016). Especificamente, neste projeto nós buscamos avaliar como uma das principais ameaças globais, mudanças climáticas, afeta o ciclo de desenvolvimento e o sistema de defesa antioxidante de *A. aegypti*. Esse conhecimento pode complementar estudos de elaboração de políticas para a vigilância e o planejamento de estratégias de intervenção das doenças transmitidas por vetores, evitando maiores danos à saúde humana.

OBJETIVOS

Objetivo geral

O objetivo geral desse projeto é avaliar como cenários de mudanças climáticas afetam o sistema de defesa antioxidante e o ciclo de desenvolvimento de *A. aegypti* e as implicações deste conhecimento para elaboração de estratégias de conservação e saúde pública no Brasil.

Objetivos específicos

- Avaliar, de forma experimental, o efeito de diferentes cenários de mudanças climáticas sobre o sistema de defesa antioxidante e a membrana lipídica de larvas e fêmeas adultas de *A. aegypti*.
- Avaliar, de forma experimental, os efeitos de diferentes cenários de mudanças climáticas sobre o ciclo de desenvolvimento de *A. aegypti*.
- Avaliar o efeito de mudanças climáticas futuras na distribuição potencial de populações naturais de *A. aegypti*. Essa avaliação será feita utilizando, como base, os dados do experimento de acompanhamento do ciclo de vida dessa espécie, nos diferentes cenários de mudanças climáticas - microcosmo, e os dados de ocorrência da espécie no Brasil, com base em registros de ocorrência.

METODOLOGIA

Fonte de ovos

Serão obtidas posturas de *A. aegypti* no Laboratório de Malária e Dengue do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), esses ovos serão cultivados em laboratório no simulador de mudanças climáticas (microcosmo).

Simulador de mudanças climáticas

Para avaliar como cenários de mudanças climáticas, combinações de aumento de temperatura e CO₂, podem alterar o ciclo de desenvolvimento e o metabolismo de estresse oxidativo de *A. aegypti* serão realizados experimentos no microcosmo, localizado no Centro para Estudos de Adaptações da Biota Aquática da Amazônia (ADAPTA) no Laboratório de Ecofisiologia e Evolução Molecular do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (LEEM/INPA). O microcosmo é composto de salas climatizadas projetadas de acordo com as previsões climáticas do IPCC (2007) desde os dias atuais até o ano de 2100, essas salas simulam a temperatura do ar e a concentração de CO₂ em relação a um controle em tempo real com condições climáticas atuais da cidade de Manaus. As 4 salas climatizadas são: i) Controle: temperatura $27,96 \pm 2,10^{\circ}\text{C}$ e concentração de CO₂ $369,45 \pm 18,71$ ppm; ii) Light: aumento de $\sim 1,5^{\circ}\text{C}$ e ~ 220 ppm; iii) Intermediário: aumento de $\sim 3,0^{\circ}\text{C}$ e ~ 420 ppm; iv) Extremo: aumento de $\sim 4,5^{\circ}\text{C}$ e ~ 870 ppm (Figura 1). O aumento na temperatura e concentração de CO₂ dos cenários ii, iii e iv é sempre com base no cenário controle. A umidade é de aproximadamente 70% em todas as salas, o fotoperíodo diário é de 12h:12h com monitoramento diário a cada 2 minutos (Martins et al., 2017a).

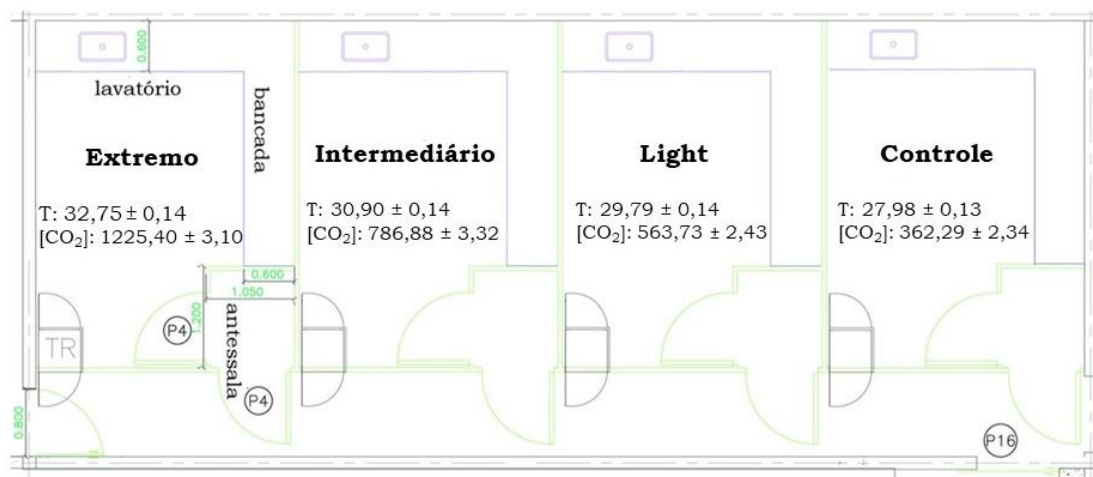


Figura 1. Planta baixa do microcosmo. O microcosmo é composto por 4 salas (4,05 m x 2,94 m). A antessala tem duas portas, uma porta abre apenas quando a outra está fechada, esse procedimento mantém as condições climáticas dentro das salas. P4 são as portas de acesso para as salas e a antessala; P16 porta que dá acesso aos corredores. Fonte: Martins et al. 2017b.

Cultivo de *A. aegypti*

Serão realizados 2 experimentos no microcosmo para posterior análise dos biomarcadores de estresse oxidativo. Em um experimento serão avaliadas apenas as larvas de *A. aegypti* e no outro apenas as fêmeas adultas.

Os experimentos conduzidos no microcosmo serão realizados com 80 larvas de *A. aegypti* por recipiente, cada sala terá 5 réplicas de cada experimento. Os recipientes de criação de larvas consistem em bandejas de plástico de 3 litros, contendo 2,7 litros de água de clorada e 0,12 g de comida para peixe (Tetramin), para manter o volume de água constante, será adicionada água de clorada conforme necessário (Leonel et al., 2015). Todos os recipientes são cobertos por uma malha fina. Os ovos serão colocados em um recipiente até eclosão e 24 horas após a eclosão, 80 larvas de 1º instar serão colocadas em cada um dos recipientes de criação. Três dias após a adição das larvas, será feita uma suplementação com mais 0,12 g de comida para peixe (Alto et al, 2008). O acompanhamento do desenvolvimento será feito diariamente em cada uma das salas. Após a mudança do 3º para o 4º instar no ciclo de desenvolvimento, será feito um *pool* de 30 larvas, para cada uma das réplicas/sala, para realização do extrato biológico e posterior análise dos biomarcadores de estresse oxidativo.

Uma nova fase de experimentos será feita com a mesma quantidade larval e os mesmo recursos alimentares, porém o acompanhamento do desenvolvimento será feito até a fase adulta. Assim que as pupas emergirem, mosquitos adultos serão retirados das bandejas com um aspirador entomológico, fêmeas e machos serão separados e será feito um *pool* de 30 fêmeas,

para cada uma das réplicas/sala, para realização do extrato biológico e posterior análise dos biomarcadores de estresse oxidativo.

Preparo do extrato biológico

Com cada *pool* de larvas e adultos de *A. aegypti* será realizado o preparo de um extrato biológico conforme Bertholdo-Vargas (2009). O extrato será feito utilizando o organismo inteiro (n=30). Após a preparação do extrato, o material será congelado à -20°C para determinação de proteínas totais pelo método de Bradford (1976), utilizando soro de albumina bovina como padrão, e para análise dos parâmetros bioquímicos de estresse oxidativo.

Análise dos biomarcadores de estresse oxidativo

Para a análise dos biomarcadores de estresse oxidativo serão utilizados os extratos feitos com cada *pool* de larvas. Serão medidos quatro biomarcadores de estresse oxidativo nas larvas e fêmeas adultas de *A. aegypti*, a atividade de três enzimas: catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutatona redutase (GR) e o nível de peroxidação lipídica pela determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).

A atividade da CAT será determinada com base na velocidade de degradação de H₂O₂ medida em 240 nm, conforme protocolo adaptado de Bertholdo-Vargas (2009).

A atividade da SOD será medida com base nos níveis de inibição da produção de adenocromo, o qual é gerado pela reação entre superóxido (O₂•⁻). O adenocromo pode ser detectado em 480 nm, esta medida será feita com um kit de ensaio estabelecido posteriormente.

A quantificação de GR será determinada com base no consumo de NADPH (340 nm). As reações serão realizadas na presença de tampão fosfato pH 7,0 (50 mM de Na₂HPO₄; 0,5 mM de EDTA), GSSG (5 mM), NADPH (0,25 mM) e extrato biológico, adaptada a partir do protocolo descrito por Ramos-Vasconcelos e Hermes-Lima (2003).

O nível de peroxidação lipídica será medido pela determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), conforme descrito por Esterbauer e Cheeseman (1990). Este método baseia-se na determinação colorimétrica (à 532 nm) da presença de malonaldeído (MDA) que é um dos produtos finais da peroxidação de lipídios. Os níveis de TBARS são expressos em nmol MDA.mg de proteína⁻¹.

Todas as análises de biomarcadores de estresse oxidativo serão realizadas no mínimo em triplicata para cada extrato biológico obtido.

Ciclo de vida de *A. aegypti*

Para acompanhar o ciclo de vida da espécie, será utilizado o mesmo experimento feito para a criação até a fase adulta. O ciclo de vida da espécie será acompanhado diariamente e serão realizadas contagens para verificar a porcentagem de eclosão dos ovos, o tempo de desenvolvimento do 1º instar até a pupa emergir. Também será calculada a taxa de sobrevivência de adultos e será realizada a contagem do número de fêmeas e machos/réplica em cada um dos cenários de mudanças climáticas do microcosmo.

Dados de ocorrência da espécie

Serão obtidos dados de ocorrência (coordenadas geográficas) de *A. aegypti* no Brasil através de plataformas de bases de dados, como Web of Science (<http://isiknowledge.com/>), periódicos Capes (<http://www.periodicos.capes.gov.br/>) e SciELO (<http://www.scielo.br/>). Todo o material coletado será conferido e trabalhos sem informações de latitude e longitude serão desconsiderados.

Análise de dados

Para avaliar o efeito dos diferentes cenários de mudanças climáticas sobre i) o ciclo de vida de *A. aegypti* e ii) os biomarcadores de estresse oxidativo (CAT, SOD, GR e TBARS) avaliado em larvas e fêmeas adultas de *A. aegypti*, serão utilizadas análises de variância e teste de Tukey para comparações posteriores (ambos com nível de significância de 5%).

A natureza dos dados será avaliada e caso necessário, esses dados podem ser transformados antes das análises. As análises de ambos os estudos, serão realizadas utilizando o pacote “vegan” (Oksanen et al., 2010) do software R (R Development Core Team, 2010).

Modelagem de distribuição potencial de *A. aegypti*

Será utilizada a estratégia analítica descrita por Silva et al. (2018). De forma resumida utilizaremos os procedimentos descritos abaixo.

Para a modelagem nos cenários de mudanças climáticas atuais e futuros serão utilizadas as variáveis bioclimáticas obtidas através do banco de dados WorldClim, são 19 variáveis no total, derivadas de valores de temperatura e precipitação. Para a modelagem de cenários futuros, será considerado o cenário mais extremo de mudança climática, previsto pelo IPCC (2014). Este é o mesmo cenário extremo proposto para o microcosmo, onde serão feitas as avaliações de taxa de sobrevivência, desenvolvimento e análises de biomarcadores de estresse oxidativo em *A. aegypti*. Também serão utilizados os dados das análises do sistema de defesa antioxidante

realizados no microcosmo. Para ambos os cenários, atual e futuro, serão feitas análises de correlação com as 19 variáveis bioclimáticas e todas as variáveis altamente correlacionadas serão excluídas do modelo. Nesse caso, serão mantidas no modelo apenas as variáveis consideradas mais significativas para a biologia de *A. aegypti*, essa escolha será feita com base em dados da literatura.

Os dados globais de ocorrência de *A. aegypti*, as variáveis bioclimáticas, dados de configuração e composição de usos do solo e as análises do sistema de defesa antioxidante em cenários atuais e futuros de mudanças climáticas serão utilizados como variáveis para a modelagem. Para avaliar a distribuição geográfica de *A. aegypti*, será utilizado o algoritmo de Máxima Entropia, com o auxílio do software MaxEnt, versão 3.3.3k (Phillips et al 2006; Phillips & Dudík 2008; Elith et al 2011). Esse software prediz precisamente a distribuição da espécie e produz dados robustos mesmo que a quantidade de registros para a espécie seja baixa (Pearson et al., 2007).

Discutiremos nossos resultados considerando o papel das áreas de vegetação nativa, áreas de unidades de conservação, cidades e agricultura na distribuição da espécie. Também abordaremos as implicações dos nossos achados para planejamento regional e estratégias de conservação da biodiversidade, buscando minimizar potenciais efeitos de espécies vetores de doenças tropicais.

ATIVIDADES PREVISTAS

1. Criação de *A. aegypti* no microcosmo: A criação de *A. aegypti* no microcosmo terá duração de no máximo 15 dias. O ciclo de vida da espécie será acompanhado diariamente, serão anotados quantos ovos eclodiram, qual é o tempo de desenvolvimento do 1º instar até a pupa emergir. Também será calculada a taxa de sobrevivência de adultos e a quantidade de machos e fêmeas.
2. Preparo do extrato biológico: Será feito um extrato biológico com 30 larvas no 4º instar larval e com 30 fêmeas adultas em cada uma das réplicas. Após a preparação, cada extrato será congelado e utilizado posteriormente para determinação das proteínas e para análise dos biomarcadores de estresse oxidativo.
3. Quantificação de proteínas: A quantificação de proteínas é uma análise necessária para iniciar qualquer teste com os biomarcadores de estresse oxidativo. É com base nessa análise que saberemos a quantidade de extrato necessária para realização das análises com os biomarcadores. Nesse projeto a quantificação de proteínas será feita pelo método de Bradford.

4. Análise de biomarcadores de estresse oxidativo: A análise de cada biomarcador é feita separadamente e cada um deles tem um resultado que complementa a resposta do outro. Por isso é importante testar essa gama de biomarcadores, pois facilita na explicação das respostas dos organismos frente a alterações climáticas.
5. Análise estatística: Após a criação dos organismos nos diferentes cenários de mudanças climáticas e com todos os resultados das análises bioquímicas e de desenvolvimento, serão realizadas análises estatísticas separadamente para cada avaliação feita. Essas serão feitas utilizando um software de domínio público.
6. Modelagem de distribuição potencial de *A. aegypti*: Assim que as análises dos biomarcadores de estresse oxidativo estiverem prontas, será iniciada a busca pelos dados de ocorrência de *A. aegypti*, dados que serão utilizados para as análises de modelagem de distribuição da espécie.
7. Redação de artigos: Após realizar as análises bioquímicas e estatísticas, será iniciada a redação de artigos para publicação.
8. Participação em congressos: Após obter todos os resultados, será feita a preparação de trabalhos para apresentação em congressos.
9. Possibilidade de doutorado sanduíche: A possibilidade de realizar parte do doutorado no exterior será uma experiência engrandecedora tanto profissional, quando pessoalmente.
10. Redação da tese: Após a obtenção de todos os resultados e com muita leitura de artigos da área, será iniciada a redação da tese.

DETALHAMENTO DA INFRAESTRUTURA FÍSICA E TECNOLÓGICA A SER UTILIZADA

Para a realização desse projeto, contamos com o apoio de três laboratórios:

- Laboratório de Dengue e Malária do INPA, onde serão cultivados os ovos utilizados para criação no microcosmo. Esse laboratório desenvolve pesquisas de mestrado e doutorado nas áreas de Entomologia, Ecologia, Biologia Molecular e Biotecnologia. Atualmente o laboratório tem insetários destinados a criação de *A. aegypti* e *Anopheles darlingi*, para que ovos dessas espécies possam ser utilizados em diferentes pesquisas.
- O microcosmo, onde será realizada a criação de *A. aegypti*, está localizado no Centro para Estudos de Adaptações da Biota Aquática da Amazônia (ADAPTA) no Laboratório de Ecofisiologia e Evolução Molecular do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (LEEM/INPA). O microcosmo é um conjunto de quatro salas climatizadas que reproduzem os cenários de mudanças climáticas previstos pelo IPCC (2007) desde os dias atuais até o ano de

2100. Essas salas estão ativas desde a sua implementação em 2010 e várias pesquisas já foram realizadas nesse ambiente.

- Laboratório de Bioquímica da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), onde serão realizadas todas as análises bioquímicas do projeto. Esse laboratório é diretamente ligado ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, nesse laboratório, além de outras pesquisas, são desenvolvidos alguns trabalhos com espécies reativas de oxigênio. O laboratório tem toda a infraestrutura e equipamentos necessários, centrífuga refrigerada, espectrofotômetro e leitora de microplacas, para a realização das análises de biomarcadores de estresse oxidativo.

LINHAS GERAIS DO CRONOGRAMA A SER CUMPRIDO

Atividades	Período em bimestres													
	2019						2020						2021	
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2
1.Criação de <i>A. aegypti</i> no microcosmo	X	X												
2.Preparo do extrato biológico	X	X												
3.Quantificação de proteínas			X	X	X									
4.Análise de biomarcadores de estresse oxidativo			X	X	X									
5.Análise estatística						X	X							
6.Modelagem de distribuição potencial de <i>A. aegypti</i>						X	X	X						
7.Redação de artigos							X	X	X	X	X			
8.Participação em congressos											X			
9.Possibilidade de doutorado sanduíche							X	X	X					
10.Redação da tese											X	X	X	
11.Conclusão do projeto														X

PLANILHA DE ORÇAMENTO COM ESTIMATIVA DOS GASTOS PREVISTOS

Orçamento da Pesquisa						
Categoria de despesa	Descrição dos itens	Material será cedido para Instituição (Sim ou Não)	Quantidade	Unidade (un; litro; metro; dia; km)	Valor Unitário (R\$)	Valor Total (R\$)
Uso e consumo (descrever cada item)	Hidróxido de sódio micropérolas PA - (1 kg)	Sim	1	unidade	R\$ 19,97	19,97
	Fosfato de sódio dibásico 7H ₂ O PA ACS - (500 g)	Sim	1	unidade	R\$ 26,95	26,95
	EDTA - Ethylenediaminetetraacetic acid - (100 g)	Sim	1	unidade	R\$ 142,00	142,00
	Phenylmethanesulfonyl fluoride - (1 g)	Sim	1	unidade	R\$ 374,00	374,00
	Bovine serum albumin - (10 g)	Sim	1	unidade	R\$ 433,00	433,00
	Coomassie brilliant Blue G - (25 g)	Sim	1	unidade	R\$ 432,00	432,00
	1,1,3,3-Tetramethoxypropane (MDA) - (100 mL)	Sim	1	unidade	R\$ 240,00	240,00
	Butilhidroxitoluol (BHT) P.A. - (500 g)	Sim	1	unidade	R\$ 75,00	75,00
	TBA 2-thiobarbituric acid, sodium derivate - (250 mg)	Sim	1	unidade	R\$ 551,00	551,00
	Fosfato de potássio monobásico anidro PA - (1 kg)	Sim	1	unidade	R\$ 63,08	63,08
	β-Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, reduced tetra(cyclohexylammonium) salt (NADPH) - (25 mg)	Sim	2	unidades	R\$ 924,00	1.848,00
	L-Glutathione oxidized (GSSG) - (500 mg)	Sim	2	unidades	R\$ 948,00	1.896,00
	Ácido fosfórico - O 85% PA	Sim	1	litro	R\$ 221,97	221,97
	Ácido sulfúrico PA ACS 95-98	Sim	1	litro	R\$ 45,82	45,82
	Ácido clorídrico 37% PA ACS	Sim	1	litro	R\$ 21,82	21,82
	Álcool iso-butílico PA ACS	Sim	1	litro	R\$ 37,39	37,39
	Álcool etílico 95% PA	Sim	1	litro	R\$ 96,08	96,08
	Peróxido de hidrogênio 50% puro	Sim	1	litro	R\$ 60,89	60,89
	Kit de ensaio SOD - 500 testes	Sim	2	kits	R\$ 2.699,00	5.398,00
	Ponteira natural de 0,5 - 10 ul - curta	Sim	2	pacotes	R\$ 130,00	260,00
	Ponteira amarela de 1 - 200 ul	Sim	2	pacotes	R\$ 113,00	226,00
	Ponteira de 100 - 1.000ul	Sim	2	pacotes	R\$ 98,00	196,00
	Racks vazios para armazenamento de ponteiras de 10ul	Sim	3	unidades	R\$ 5,23	15,69
	Racks vazios para ponteiras de 200ul	Sim	5	unidades	R\$ 13,30	66,50
	Racks vazios para ponteiras de 1000ul	Sim	5	unidades	R\$ 7,00	35,00
	Microtubo eppendorf graduado neutro 1,5ML	Sim	6	pacotes	R\$ 15,41	92,46
	Caixa com tampa alfa numérico para 100 microtubos	Sim	20	caixas	R\$ 15,25	305,00
	Cubeta padrão com tampa PTFE 1,7ml	Sim	1	unidade	R\$ 289,77	289,77
	Cubeta padrão com tampa de PTFE 3,5ml	Sim	1	unidade	R\$ 243,61	243,61

	Microplaca - 96 orifícios	Sim	3	unidades	R\$ 12,37	37,11
	Estante dupla face para 96 microtubos	Sim	10	unidades	R\$ 13,82	138,20
	Gral em porcelana com pistilo - 10,3 cm de diâmetro	Sim	10	unidades	R\$ 38,33	383,30
	Tubo de ensaio 16X150 mm sem borda - 20mL	Sim	60	unidades	R\$ 2,74	164,40
	Pipetas Eppendorf Research® plus 3-pack, monocanal, variável. Opção 1: 0,5 – 10 µL, 10 – 100 µL, 100 – 1.000 µl	Sim	1	conjunto	R\$ 3.143,64	3.143,64
	Micropipetador Eppendorf Research® Plus, Monocanal, Variável, 0.5 – 10 µL	Sim	1	unidade	R\$ 1.289,00	1.289,00
	Frasco âmbar 500ml com tampa e batoque	Sim	6	unidades	R\$ 5,48	32,88
	Pisseta graduada - 500ml	Sim	2	unidades	R\$ 8,00	16,00
	Tubo falcon de 50 ml estéril	Sim	1	pacote	R\$ 33,00	33,00
	Bandeja polietileno com capacidade de 3 litros	Sim	50	unidades	R\$ 11,99	599,50
	Tule para cobrir bandejas	Sim	10	m	R\$ 19,99	199,90
Serviço de Terceiros Pessoa Física	Tradução de artigos	Não	2	unidades	R\$ 1.000,00	2.000,00
Viagens	Passagens (Campo Grande/Manaus/Campo Grande)	Não	2	passagens	R\$ 1.232,00	2.464,00
	Hospedagem em Manaus	Não	120	diárias	R\$ 70,00	8.400,00
	Alimentação em Manaus	Não	120	refeições	R\$ 40,00	4.800,00
Equipamentos	Freezer Vertical 121 litros - 127 v	Sim	1	unidade	R\$ 1.299,00	1.299,00
TOTAL						38.712,93

RESULTADOS ESPERADOS E IMPACTO PREVISTO DO PROJETO

Como resultado deste projeto, espera-se entender o funcionamento do metabolismo de estresse oxidativo de *A. aegypti* frente a cenários de mudanças climáticas e verificar as mudanças que ocorrem no desenvolvimento dessa espécie em cada um dos cenários de mudanças climáticas. Com as análises com biomarcadores de estresse oxidativo, esperamos que a resposta desses biomarcadores não seja linear com o aumento da temperatura. Quando expostos a alterações climáticas extremas (considerando o cenário do microcosmo), todos os processos metabólicos dos indivíduos são estimulados até atingir um pico máximo, a partir desse pico as defesas antioxidantes do organismo começam a diminuir sua atividade, consequentemente causando danos em diferentes alvos celulares (Madeira et al., 2013; Madeira et al., 2014). No caso de mudanças climáticas, esperamos que com o aumento da temperatura, ocorra redução no tamanho dos mosquitos e na duração do ciclo de desenvolvimento de *A. aegypti* (Padmanabha et al., 2012). O principal impacto gerado com esse resultado é que, esse conhecimento pode complementar estudos de elaboração de políticas para a vigilância e intervenção das doenças transmitidas por vetores, evitando maiores danos à saúde humana.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Altizer S, Ostfeld RS, Johnson PTJ, Kutz S, Harvell D. 2013. Climate Change and Infectious Diseases: From Evidence to a Predictive Framework. **Science**, 341:514. doi: 10.1126/science.1239401.

Alto BW, Lounibos LP, Mores CN, Reiskind MH. 2008. Larval competition alters susceptibility of adult *Aedes* mosquitoes to dengue infection. **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, 275:463–471. doi: 10.1098/rspb.2007.1497.

Araújo MB, Ferri-Yáñez F, Bozinovic F, Marquet PA, Valladares F, Chown SL. 2013. Heat freezes niche evolution. **Ecology Letters**, 16:1206–1219. doi: 10.1111/ele.12155.

Barrera R, Amador M, MacKay AJ. 2011. Population dynamics of *Aedes aegypti* and dengue as influenced by weather and human behavior in San Juan, Puerto Rico. **PLoS Negl Trop Dis**, 5:e1378. doi: 10.1371/journal.pntd.0001378.

Bertholdo-Vargas LR, Martins JN, Bordin D, Salvador M, Schafer AL, De Barros NM, Barbieri L, Stirpe F, Carlini CR. 2009. Type 1 ribosome-inactivating proteins - Entomotoxic, oxidative and genotoxic action on *Anticarsia gemmatalis* (Hubner) and *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Insect Physiology**, 55:51-58. doi: 10.1016/j.jinsphys.2008.10.004.

Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, 72:248-254.

Chaves LF, Koenraadt CJ. 2010. Climate change and highland malaria: fresh air for a hot debate. **The Quarterly Review of Biology**, 85:27-55.

Colin N, Porte C, Fernandes D, Barata C, Padrós F, Carrassón M, Monroy M, Cano-Rocabavera O, de Sostoa A, Piña B, Maceda-Veiga A. 2016. Ecological relevance of biomarkers in monitoring studies of macro-invertebrates and fish in Mediterranean rivers. **Science of the Total Environment**, 540:307-323. doi: 10.1016/j.scitotenv.2015.06.099.

Consoli RAGB, de Oliveira RL. 1998. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. Ed. Fiocruz, 225p.

DeGroot JP, Sugumaran R, Brend SM, Tucker BJ, Bartholomay LC. 2008. Landscape, demographic, entomological, and climatic associations with human disease incidence of West Nile virus in the state of Iowa, USA. **International Journal of Health Geographics**, 7-19. doi: 10.1186/1476-072X-7-19.

El-Missiry MA. (ed). 2012. **Antioxidant enzyme**. 1 ed. Croatia: In Tech, pp.410.

Elith J, Phillips SJ, Hastie T, Dudík M, Chee YE, Yates CJ. 2011. A statistical explanation of MaxEnt for ecologists. **Diversity Distribution**, 17:43-57. doi: 10.1111/j.1472-4642.2010.00725.x.

Esterbauer H, Cheeseman KH. 1990. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. **Methods Enzymology**, 186:407-421.

Ezanno P, Aubry-Kientz M, Arnoux S, Cailly P, L'ambert G, Toty C, Balenghien T, Tran A. 2015. A generic weather-driven model to predict mosquito population dynamics applied to species of *Anopheles*, *Culex* and *Aedes* genera of southern France. **Preventive Veterinary Medicine**, 120:39-50. doi: 10.1016/j.prevetmed.2014.12.018.

Fent K. 2004. Ecotoxicological effects at contaminated sites. **Toxicology**, 205:223-240.

Gottwalt A. 2013. Impacts of Deforestation on Vector-borne Disease Incidence. **Global Journal of Health Science**, 3:16-19.

Halliwell B, Gutteridge JMC. 2007. **Free Radicals in biology and medicine**. 4 ed. New York: Oxford University Press Inc, pp.851.

Hawlena D, Schmitz OJ. 2010. Physiological stress as a fundamental mechanism linking predation to ecosystem functioning. **The American Naturalist**, 176:537-556. doi: 10.1086/656495.

Hoffmann AA, Chown SL, Clusella-Trullas S. 2013. Upper thermal limits in terrestrial ectotherms: How constrained are they? **Functional Ecology**, 27:934–949. doi: 10.1111/j.1365-2435.2012.02036.x.

IPCC. 2007. **Contribution of Working Group III to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change**. Metz B, Davidson OR, Bosch PR, Dave R, Meyer LA. (Eds.). Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA, pp.52.

IPCC. 2014. Synthesis Report. **Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change**. PACHAURI, R.K.; MEYER, L.A. (Eds.). Geneva, Switzerland, pp.151.

Kraemer MUG, Sinka ME, Duda KA, Mylne AQN, Shearer FM, Barker CM, Moore CG, Carvalho RG, Coelho GE, Bortel WV, Hendrick G, Schaffner F, Elyazar IRF, Teng H, Brady OJ, Messina JP, Pigott DM, Scott TW, Smith DL, Wint GRW, Golding N, Hay SI. 2015. The

global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. Albopictus*. **eLife**, 4:e08347. doi: 10.7554/eLife.08347.

Kuno G, Chang G-JJ. 2005. Biological transmission of arboviruses: reexamination of and new insights into components, mechanisms, and unique traits as well as their evolutionary trends. *Clinical Microbiology Reviews*, 18:608–637. doi: 10.1128/cmr.18.4.608-637.

Leonel BF, Koroiva R, Hamada N, Ferreira-Kepler RL, Roque FO. 2015. Potential effects of climate change on ecological interaction outcomes between two disease-vector mosquitoes: a mesocosm experimental study. **Journal of Medical Entomology**, v.52, p.866-872. doi: 10.1093/jme/tjv068.

Lindsay SW, Wilson A, Golding N, Scott TW, Takken W. 2017. Improving the built environment in urban areas to control *Aedes aegypti*-borne diseases. **Bull World Health Organ**, 95:607–608. doi: 10.2471/BLT.16.189688.

Madeira D, Narciso L, Cabral HN, Vinagre C, Diniz MS. 2013. Influence of temperature in thermal and oxidative stress responses in estuarine fish. **Comp. Biochem. Physiol. A**, v.166, p.237-243. doi: 10.1016/j.cbpa.2013.06.008.

Madeira D, Narciso L, Cabral H, Diniz M, Vinagre C. 2014. Role of thermal niche in the cellular response to thermal stress: lipid peroxidation and HSP70 in coastal crabs. **Ecological Indicators**, 36:601-606. doi: 10.1016/j.ecolind.2013.09.023.

Martins RT, Rezende RS, Gonçalves Júnior JF, Lopes A, Piedade MTF, Cavalcante HL, Hamada N. 2017a. Effects of increasing temperature and, CO₂ on quality of litter, shredders, and microorganisms in Amazonian aquatic systems. **PLoS ONE**, 12. doi: 10.1371/journal.pone.0188791.

Martins RT, Melo AS, Gonçalves JF, Campos CM, Hamada N. 2017b. Effects of climate change on leaf breakdown by microorganisms and the shredder *Phylloicus elektoros* (Trichoptera: Calamoceratidae). **Hydrobiologia**, v.789, p.31–44. doi: 10.1007/s10750-016-2689-7.

Medlock JM, Leach SA. 2015. Effect of climate change on vector-borne disease risk in the UK. **The Lancet Infectious Diseases**, 15:721-730. doi: 10.1016/S1473-3099(15)70091-5.

Messina JP, Brady OJ, Pigott DM, Golding N, Kraemer MU, Scott TW, Wint GR, Smith DL, Hay SI. 2015. The many projected futures of dengue. **Nature Reviews. Microbiology**, 13:230–239. doi: 10.1038/nrmicro3430.

Moore MN, Depledge MH, Readman JW, Leonard DRP. 2004. An integrated biomarker-based strategy for ecotoxicological evaluation of risk in environmental management. **Mutation Research**, 552:247-268.

Negev M, Paz S, Clermont A, Pri-Or NG, Shalom U, Yeger T, Green MS. 2015. Impacts of Climate Change on Vector Borne Diseases in the Mediterranean Basin — Implications for Preparedness and Adaptation Policy. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, 12:6745-6770. doi: 10.3390/ijerph120606745.

Oksanen J, Blanchet FG, Kindt R, Legendre P, O’hara RB, Simpson GL, Solymos P, Stevens MHH, Wagner H. 2010. Multivariate Analysis of Ecological Communities. In R: package “vegan”, 2010. <http://vegan.rforge.r-project.org/>.

Padmanabha H, Correa F, Legros M, Nijhout HF, Lord C, Lounibos LP. 2012. An eco-physiological model of the impact of temperature on *Aedes aegypti* life history traits. **Journal of Insect Physiology**, 58:1597-1608. doi: 10.1016/j.jinsphys.2012.09.015.

Pearson RG, Raxworthy CJ, Nakamura M, Peterson AT. 2007. Predicting species distributions from small numbers of occurrence records: a test case using cryptic geckos in Madagascar. **Journal of Biogeography**, 34:102-117.

Phillips SJ, Anderson RP, Schapire RE. 2006. Maximum entropy modeling of species geographic distributions. **Ecological Modelling**, 190:231–259. doi: 10.1016/j.ecolmodel.2005.03.026.

Phillips SJ, Dudík M. 2008. Modeling of species distributions with Maxent: new extensions and a comprehensive evaluation. **Ecography**, 31:161–175. doi: 10.1111/j.0906-7590.2008.5203.x.

Pirofski L-a, Casadevall BMC. 2012. Q&A: What is a pathogen? A question that begs the point. **BMC Biology**, 10:6 doi:10.1186/1741-7007-10-6.

R Development Core Team. 2016. A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna. Versão 3.0.2. ISBN 3-900051-07-0. Disponível em: <http://www.R-project.org>.

Ramos-Vasconcelos GR, Hermes-Lima M. 2003. Hypometabolism, antioxidant defenses and free radical metabolism in the pulmonate land snail *Helix aspersa*. **The Journal of Experimental Biology**, 206:675-685.

Shen Z, Ma K. 2014. Effects of climate change on biodiversity. **Chinese Science Bulletin**, 59:4637-4638. doi: 10.1007/s11434-014-0654-2.

Silva DP, Dias AC, Lecci LS, Simião-Ferreira J. 2018. Potential Effects of Future Climate Changes on Brazilian Cool-Adapted Stoneflies (Insecta: Plecoptera). **Neotropical Entomology**. doi: 10.1007/s13744-018-0621-8.

Steiger DM, Johnson P, Hilbert DW, Ritchie S, Jones D, Laurance SGW. 2012. Effects of landscape disturbance on mosquito community composition in tropical Australia. **Journal of Vector Ecology**, 37:69-76. doi: 10.1111/j.1948-7134.2012.00201.x.

WHO. World Health Organization. 2015. **Connecting global priorities: biodiversity and human health: a state of knowledge review**. Disponível em: <https://www.cbd.int/health/SOK-biodiversity-en.pdf>. Acesso em: 24 ago 2018.

WHO. World Health Organization. 2017. **Vector borne diseases**. Disponível em: <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/vector-borne-diseases>. Acesso em: 17 ago 2018.