



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA, IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA (MIP)
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E BIOCÊNCIAS

MARIANA MARASCHIN DA ROCHA

**Estudo dos mecanismos de tolerância do mosquito *Aedes aegypti*
infectado com o Dengue vírus**

FLORIANÓPOLIS
2024

MARIANA MARASCHIN DA ROCHA

**Estudo dos mecanismos de tolerância do mosquito *Aedes aegypti*
infectado com o Dengue vírus**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Biotecnologia e Biociências.

Orientador: Prof. Dr. José Henrique Maia Campos de Oliveira.

Coorientador: Prof. Dr. Daniel Santos Mansur.

Florianópolis

2024

Ficha catalográfica gerada por meio de sistema automatizado gerenciado pela BU/UFSC.
Dados inseridos pelo próprio autor.

Maraschin da Rocha, Mariana

Estudo dos mecanismos de tolerância do mosquito *Aedes aegypti* infectado com o Dengue vírus / Mariana Maraschin da Rocha ; orientador, José Henrique Maia Campos de Oliveira, coorientador, Daniel Santos Mansur, 2024.
70 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós Graduação em Biotecnologia e Biociências, Florianópolis, 2024.

Inclui referências.

1. Biotecnologia e Biociências. 2. *Ae. aegypti*. 3. Competência Vetorial. 4. Dengue vírus. 5. Glutamina Sintetase. I. Maia Campos de Oliveira, José Henrique. II. Santos Mansur, Daniel. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências. IV. Título.

Mariana Maraschin da Rocha
**Estudo dos mecanismos de tolerância do mosquito *Aedes aegypti*
infectado com o Dengue vírus**

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca
examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Pedro Lagerblad de Oliveira
Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)

Dr. Rafael Maciel de Freitas
Instituto Oswaldo Cruz - Fiocruz

Prof.(a) Dr(a). Patricia Hermes Stoco
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi
julgado adequado para obtenção do título de doutora em Biotecnologia e Biociências.

Prof. Dr. Aguinaldo Roberto Pinto
Coordenador do Programa

Prof. Dr. José Henrique Maia Campos de Oliveira
Orientador

Florianópolis, junho de 2024.

Este trabalho é dedicado à minha mãe, à minha irmã e minha avó, mulheres fortes e inspiradoras em minha vida.

AGRADECIMENTOS

Durante esses mais de quatro anos de doutorado, enfrentando diversos desafios, pandemia e mudanças consideráveis, gostaria de agradecer de coração ao meu orientador Prof. Dr. José Henrique Oliveira. Obrigada pela confiança no desafio de realizar esse trabalho, pela parceria no dia-a-dia, pelas várias conversas sobre nossa pesquisa, pelos ensinamentos e conselhos sobre a vida e sobre como essa sociedade maluca funciona! Agradeço por ter convivido com um orientador diferente da maioria, que se preocupa genuinamente com o bem-estar de seus alunos, procurando sempre nos ensinar o que muitos não ensinam. Obrigada por me fazer pensar diferente e se preocupar com a minha carreira na ciência e me incentivar a buscar o melhor sempre. Muito obrigada pelo apoio e grande aprendizado e por dividir comigo e os alunos do “laboratório do Zé” o convívio com o Nico e Cecília.

Agradeço ao Prof. Dr. Daniel Santos Mansur, meu orientador no mestrado e co-orientador nesse trabalho. Obrigada pelas conversas, pelo incentivo à ciência.

Aos professores Dr. André Báfica e Dr. Edroaldo Lummertz pelas importantes conversas em seminários e laboratório.

Um obrigada especial à minha melhor amiga e colega de bancada, Lucilene Granella, pelo apoio incondicional durante esses anos. Obrigada por ser meu suporte, por secar minhas lágrimas, por me tranquilizar em vários momentos difíceis dessa jornada. Obrigada por me fazer rir, por me ajudar nas longas horas no insetário, catando pupa, nas titulações e em vários outros experimentos. Obrigada por todo o ensinamento, apoio e parceria e por ser uma amiga para a vida toda.

Obrigada também ao meu querido amigo e colega Daniel Patrício pelas conversas sobre minha pesquisa, experimentos e sobre a vida.

Obrigada as amigas e amigos do coração: Ruth Fernandes, Carolina Eto, Greicy Malaquias, Aline Melro Muradi, Daiane Bobermin, Yonne Menezes, Eduarda Munari, Daniel Mendes, Diego Novak, Juliano Vieira e Taíssa Ricciardi Jorge. Agradeço pelas conversas, apoio e momentos de diversão proporcionados por vocês.

Agradeço também a minha amiga querida e parceira de laboratório, Luiza Hubner, obrigada pelo apoio, conversas e risadas de sempre. Nunca vou esquecer nossas noites de pizza e bar junto com a Luci, após longos dias de experimentos. Sem o suporte de vocês esse trabalho não teria sido o mesmo.

Agradeço às alunas de iniciação científica do “Lab Zé”, Giovana Jover e Athina Reina Medeiros.

Agradeço com muito amor e carinho a minha mãe Luiza Maraschin que sempre me apoiou e ouviu minhas histórias engraçadas ou indignadas dessa aventura que foi o doutorado. Mãe dedicada que possibilitou muitas conquistas no decorrer da minha vida. Obrigada por ser uma mãe maravilhosa e ter me ensinado todos os valores que carrego comigo até hoje. Agradeço também a minha irmã Tatiana, pelo amor e apoio incondicional de sempre. Ao meu cunhado Araby e aos meus sobrinhos Valentina, Vincenzo e Lorenzo, por me acolherem e tornarem meus momentos mais felizes, leves e engraçados.

Agradeço a minha vó Nely, matriarca da família, que sempre foi guerreira e tem orgulho de dizer que terá uma neta doutora.

Agradeço também aos meus amigos Susa Weege, Analice Pereira, Alexandre Machado e Juliana Burger, pelo apoio de sempre.

Agradeço com muito amor e carinho ao meu namorado, Rodrigo Ferreira Neves, pela paciência e apoio nos momentos difíceis nessa etapa final do doutorado. Obrigada por proporcionar momentos inesquecíveis durante esse turbilhão todo!

Um agradecimento muito especial a todos os doadores de sangue que contribuíram para a realização deste trabalho. Principalmente à Carol que coletou vários tubos de sangue dos doadores e juntamente com a Greicy e Luci me ensinaram a arte de coletar sangue!

Agradeço também as agências de fomento Capes, Serrapilheira e INCTEM, à UFSC e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências por viabilizarem meu doutorado.

RESUMO

O mosquito *Aedes aegypti* consome grande quantidade de sangue como fonte de nutrientes para a produção de seus ovos e ao mesmo tempo se infecta com arbovírus de relevância médica. Essa dieta representa um desafio metabólico/oxidativo e imune para o mosquito. Como adaptação a esse desafio, os mosquitos desenvolveram mecanismos de resposta ao estresse que atuam protegendo o inseto de possíveis danos teciduais, garantindo sua homeostase. O *Aedes aegypti* é o principal vetor do vírus dengue (DENV) e sua capacidade de transmitir o vírus está diretamente relacionada à tolerância a esse vírus. A compreensão molecular da relação entre mosquito vetor e os arbovírus – por ele transmitido – é essencial para entender sua competência vetorial, e assim desenvolver estratégias para bloquear a transmissão de arboviroses. Nossa hipótese é que os mecanismos de proteção antioxidante disparados pela alimentação com sangue no mosquito *Aedes aegypti* promovem tolerância durante a infecção por dengue. Desafiamos os mosquitos com duas cepas de DENV-4; a cepa TVP/360, derivada direta de uma cepa isolada na República Dominicana em 1981, e a cepa LRV 13/422, isolada no sul do Brasil em 2013 e avaliamos o fitness/adaptabilidade dos mosquitos a partir de curvas de sobrevivência. Nossos resultados demonstraram que as infecções DENV não impactaram negativamente o tempo de vida dos mosquitos. A intensidade da infecção para a cepa TVP/360 apresentou prevalência de 89,28% no 21 dia pós infecção (dpi). Para os mosquitos infectados com a cepa LRV 13/422 foi observada prevalência de infecção de 33,33% no 21 dpi. Em seguida, avaliamos o perfil de expressão de genes antioxidantes e de resposta ao estresse celular durante a alimentação sanguínea. Os mosquitos foram infectados com a cepa TVP/360 e a expressão dos genes foi avaliada 24hpi, 4 e 7dpi, no intestino e carcaça. O gene da Glutamina Sintetase 1 (GS1) (AAEL001887), essencial na detoxificação do excesso de grupamentos amino derivados da dieta rica em proteínas, apresentou expressivo aumento no RNAm no epitélio do intestino do mosquito 24 horas após a alimentação, independente da presença do vírus. O RNAm do gene Nrf2 apresentou aumento de 4x, no grupo infectado, 24 hpi. Os genes da GS1 e Nrf2 (AAEL019563) foram selecionados para o silenciamento através da técnica de RNA de interferência (RNAi) em mosquitos infectados com a cepa TVP/360. Não observamos alteração da carga viral no corpo todo do inseto 7 dias após desafio com DENV, sugerindo que o silenciamento desses genes não altera a resistência ao vírus em *Aedes aegypti*. Experimentos em andamento estão avaliando o impacto na fisiologia dos mosquitos após redução da expressão de GS1 e Nrf2, bem como a indução compensatória de outras vias associadas ao metabolismo de nitrogênio em *Aedes aegypti* durante a infecção pelo DENV.

Palavras-chave: *Aedes aegypti*, dengue vírus, competência vetorial, tolerância, fitness, antioxidantes, Glutamina Sintetase.

ABSTRACT

The *Aedes aegypti* mosquito consumes a large amount of blood as a nutrient source for egg production and simultaneously becomes infected with medically relevant arboviruses. This diet represents a metabolic/oxidative and immune challenge for the mosquito. As an adaptation to this challenge, mosquitoes have developed stress response mechanisms that protect the insect from potential tissue damage, ensuring its homeostasis. *Aedes aegypti* is the main vector of the dengue virus (DENV), and its ability to transmit the virus is directly related to its tolerance to the virus. Understanding the molecular relationship between the mosquito vector and the arboviruses it transmits is essential to comprehend its vector competence and thus develop strategies to block the transmission of arboviruses. Our hypothesis is that the antioxidant protection mechanisms triggered by blood feeding in the *Aedes aegypti* mosquito promote tolerance during dengue infection. We challenged the mosquitoes with two strains of DENV-4: the TVP/360 strain, directly derived from a strain isolated in the Dominican Republic in 1981, and the LRV 13/422 strain, isolated in southern Brazil in 2013, and evaluated the fitness/adaptability of the mosquitoes through survival curves. Our results demonstrated that DENV infections did not negatively impact the lifespan of the mosquitoes. The infection intensity for the TVP/360 strain showed a prevalence of 89.28% on day 21 post-infection (dpi). For mosquitoes infected with the LRV 13/422 strain, an infection prevalence of 33.33% was observed on day 21 dpi. Next, we evaluated the expression profile of antioxidant and cellular stress response genes during blood feeding. Mosquitoes were infected with the TVP/360 strain, and gene expression was assessed at 24 hours post-infection (hpi), 4, and 7 dpi, in the gut and carcass. The Glutamine Synthetase 1 (GS1) gene (AAEL001887), essential in detoxifying excess amino groups derived from the protein-rich diet, showed a significant increase in mRNA in the mosquito gut epithelium 24 hours after feeding, regardless of the virus presence. The Nrf2 gene mRNA showed a 4-fold increase in the infected group at 24 hpi. The GS1 and Nrf2 (AAEL019563) genes were selected for silencing using RNA interference (RNAi) technique in mosquitoes infected with the TVP/360 strain. We did not observe a change in viral load in the whole body of the insect 7 days after DENV challenge, suggesting that silencing these genes does not alter the resistance to the virus in *Aedes aegypti*. Ongoing experiments are evaluating the impact on mosquito physiology after reducing GS1 and Nrf2 expression, as well as the compensatory induction of other pathways associated with nitrogen metabolism in *Aedes aegypti* during DENV infection.

Keywords: *Aedes aegypti*, dengue virus, vector competence, tolerance, fitness, antioxidants, Glutamine Synthetase.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida do mosquito <i>Aedes aegypti</i>	13
Figura 2. Anatomia do mosquito <i>Aedes aegypti</i>	16
Figura 3. Mosquitos <i>Aedes aegypti</i> infectados com diferentes concentrações de DENV-4 TVP/360.	35
Figura 4. Intensidade e prevalência da infecção de DENV-4 TVP/360 em mosquitos <i>Aedes aegypti</i>	37
Figura 5. Mosquitos <i>Aedes aegypti</i> infectados com diferentes concentrações de DENV-4 LRV 13/422.	39
Figura 6. Intensidade e prevalência da infecção do DENV-4 LRV 13/422 em mosquitos <i>Aedes aegypti</i>	41
Figura 7. Esquema representativo da seleção de genes candidatos a promotores de tolerância em mosquitos <i>Aedes aegypti</i>	43
Figura 8. Expressão relativa dos genes antioxidantes em <i>Aedes aegypti</i> infectados com DENV-4 TVP/360.	46
Figura 9. Expressão relativa dos genes e antioxidantes em <i>Aedes aegypti</i> infectados com DENV-4 TVP/360.	48
Figura 10. Silenciamento dos genes da Glutamina Sintetase 1 (GS1) e Nrf2 em mosquitos <i>Aedes aegypti</i>	50
Figura 11. Silenciamento da Glutamina Sintetase 1 (GS1) ou Nrf2 não afetam a infecção e nem a carga viral de DENV-4 TVP/360 em mosquitos <i>Aedes aegypti</i>	52
Figura 12. Destino dos aminoácidos da alimentação sanguínea durante o Ciclo Gonotrófico.....	54
Figura 13. Esquema representando a via GS/GltS de assimilação e fixação de amônia no mosquito <i>Aedes aegypti</i>	55
Figura 14. Biossíntese de Prolina em <i>Aedes aegypti</i>	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Diferença nas sequências de aminoácidos das cepas DENV - 4 TVP/360 e DENV- 4 LRV 13/422 comparadas com a cepa de referência DENV – 4/ 814669 – GenBank: AF326573.1	22
Tabela 2. Lista dos genes estudados em <i>Aedes aegypti</i>	31
Tabela 3. Lista de oligonucleotídeos utilizados para análise da expressão gênica por RT-qPCR.....	32
Tabela 4. Lista de oligonucleotídeos utilizados para a construção do dsRNA. Em vermelho está a sequência de ligação T7 para a RNA polimerase.	33
Tabela 5. Lista dos genes selecionados para o estudo em <i>Aedes aegypti</i>	44

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
1.1	ARBOVIROSES E EPIDEMIOLOGIA DE DENGUE	11
1.2	DENGUE VÍRUS E MOSQUITO <i>Aedes aegypti</i>	12
1.3	COMPETÊNCIA VETORIAL DOS MOSQUITOS <i>Aedes aegypti</i>	13
1.4	MECANISMOS DE RESISTÊNCIA E TOLERÂNCIA EM MOSQUITOS <i>Aedes aegypti</i>	16
1.5	DESAFIOS IMPOSTOS PELA ALIMENTAÇÃO SANGUÍNEA NOS MOSQUITOS <i>Aedes aegypti</i>	18
1.6	CEPAS DENV-4 TVP/360 E DENV-4 LRV 13/422	21
1.7	JUSTIFICATIVA.....	23
1.8	HIPÓTESE	23
1.9	OBJETIVOS	23
1.9.1	Objetivo Geral	23
1.9.2	Objetivos Específicos	23
2	MATERIAIS E MÉTODOS	25
2.1	CRIAÇÃO DOS MOSQUITOS <i>Aedes aegypti</i>	25
2.2	CULTIVO CELULAR.....	25
2.3	VÍRUS.....	26
2.3.1	Preparação de estoque viral	26
2.3.2	Concentração de DENV-4 TVP/360	26
2.3.3	Titulação do estoque viral por placas de lise	27
2.4	INFECÇÃO VIRAL DOS MOSQUITOS <i>Aedes aegypti</i> POR DENV-4	27
2.5	DINÂMICA DA INFECÇÃO E CURVA DE SOBREVIVÊNCIA DOS MOSQUITOS <i>Aedes aegypti</i> INFECTADOS COM DENV-4.....	28
2.6	QUANTIFICAÇÃO DA INFECÇÃO VIRAL DE MOSQUITOS <i>Aedes aegypti</i> INFECTADO POR DENV-4	29
2.7	DISSECÇÃO DO INTESTINO E CARÇA DOS MOSQUITOS <i>Aedes aegypti</i>	29
2.8	RT-qPCR.....	30
2.8.1	Extração de RNA e síntese de cDNA do intestino e carça dos mosquitos <i>Aedes aegypti</i> infectados com DENV-4 TVP/360	30

2.8.2	PCR quantitativo em tempo real (qPCR) para análise da expressão dos genes antioxidantes e redox em <i>Aedes aegypti</i>	31
2.9	SILENCIAMENTO POR RNAi DO GENE DA GLUTAMINA SINTETASE 1 E NRF2	32
2.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	33
3	RESULTADOS	34
3.1	INFECÇÃO DO <i>AEDES AEGYPTI</i> COM DIFERENTES DOSES DE DENV-4 TVP/360.....	34
3.2	DIFERENTES DOSES DE DENV-4 TVP/360 NÃO AFETAM A INTENSIDADE DA INFECÇÃO, MAS MODIFICAM A PREVALÊNCIA EM MOSQUITOS <i>AEDES AEGYPTI</i>	36
3.3	INFECÇÕES PELA CEPA DENV-4 LRV 13/422 NÃO ALTERAM A SOBREVIVÊNCIA DOS MOSQUITOS <i>AEDES AEGYPTI</i> DESAFIADOS POR DIFERENTES DOSES.....	38
3.4	DIFERENTES DOSES DE DENV-4 LRV 13/422 ALTERAM A INTENSIDADE DA INFECÇÃO E MODIFICAM A PREVALÊNCIA EM MOSQUITOS <i>AEDES AEGYPTI</i>	40
3.5	GENES CANDIDATOS A PROMOTORES DE TOLERÂNCIA EM <i>AEDES AEGYPTI</i>	42
3.6	EXPRESSÃO DOS GENES CANDIDATOS A TOLERÂNCIA EM <i>AEDES AEGYPTI</i>	44
3.7	SILENCIAMENTO DOS GENES DA GLUTAMINA SINTETASE 1 E NRF2 EM MOSQUITOS <i>AEDES AEGYPTI</i>	49
3.8	A GLUTAMINA SINTETASE 1 E O NRF2 NÃO ALTERAM A INFECÇÃO E NEM A CARGA VIRAL DE DENV-4 TVP/360 EM MOSQUITOS <i>AEDES AEGYPTI</i>	51
4	DISCUSSÃO	53
5	CONCLUSÃO	63
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64

1 INTRODUÇÃO

1.1 ARBOVIROSES E EPIDEMIOLOGIA DE DENGUE

Doenças virais transmitidas por artrópodes (arboviroses), como dengue, Zika, chikungunya e febre amarela são ameaças à saúde pública mundial, principalmente em regiões tropicais e subtropicais do mundo. A disseminação global dos arbovírus, especialmente aqueles transmitidos por mosquitos, está se tornando mais frequente no mundo todo, impulsionada pela combinação de fatores ecológicos, econômicos e sociais (LOURENÇO et al., 2017; WHO, 2023).

A dengue é uma doença tropical negligenciada que vem ganhando importância mundial (GUZMAN; HARRIS., 2015). Ela atinge aproximadamente 400 milhões de pessoas anualmente no mundo, sendo que dessas, 96 milhões manifestam algum sintoma (BHATT et al., 2013). As infecções por dengue em humanos são frequentemente assintomáticas, mas podem causar manifestações clínicas leves a severas e, em alguns casos, fatais (WHO, 2023).

No Brasil, considerando as primeiras 21 semanas epidemiológicas de 2024 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2024) foram registrados 6.226.716 casos prováveis de dengue, com 83.268 casos de dengue grave. Atualmente, o índice é de 3.066,4 para cada 100 mil habitantes. O número de óbitos confirmados foi de 4.333 casos e 2.683 ainda sob investigação.

Os estados brasileiros com maior índice da doença são Distrito Federal, Minas Gerais e Paraná. Santa Catarina é o quarto estado mais atingido pela incidência da doença. O número provável de casos no estado é de 353.901 e o número de óbitos confirmados é de 272, até o momento (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2024).

O combate ao mosquito vetor é a abordagem mais eficaz no controle das epidemias de dengue, já que não há tratamento específico ou vacinas para a maioria dos arbovírus. O aumento significativo nos casos de dengue em 2024 já ultrapassou o número de casos de 2023. Acredita-se que a expansão da doença esteja diretamente relacionada à adaptação do mosquito em áreas urbanas e ao crescimento desordenado da população, além de fatores climáticos que afetam a dinâmica de transmissão desses vírus (HARISH et al., 2024). Dessa forma, combater o mosquito ainda é a melhor estratégia contra os impactos negativos causados pelas infecções por arbovírus (ACHEE et al., 2019).

1.2 DENGUE VÍRUS E MOSQUITO *Aedes Aegypti*

O vírus da dengue é um arbovírus pertencente à família *Flaviviridae*, do gênero *Flavivirus*. Ele apresenta quatro sorotipos diferentes, denominados DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4, todos com genoma de RNA de sentido positivo e fita simples, com cerca de 11kb (FIELDS, 2013). Seu genoma codifica uma única poliproteína que apresenta três proteínas estruturais (C, capsídeo; pr/M, membrana; E, envelope) e sete proteínas não estruturais: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 (CHAMBERS, 1990). Esses vírus também possuem alta taxa de mutação, o que proporciona rápida evolução e adaptação entre diferentes hospedeiros (WEAVER, 2006).

O vírus da dengue, assim como Zika, febre amarela e chikungunya são transmitidos pelo mosquito *Aedes (Stegomyia) aegypti*, seu principal vetor (HAY et al., 1987; KRAEMER et al., 2019). Não por coincidência, o mosquito tem desempenhado historicamente o papel principal como vetor em quase todas as epidemias humanas relacionadas a esses quatro vírus (SOUZA-NETO; POWELL; BONIZZONI, 2019). Pesquisas apontam para a coevolução entre humanos, mosquitos e os arbovírus (dengue, Zika, febre amarela e chikungunya), uma vez que todos são originários da África e se espalharam ao redor do mundo (AUBRY et al., 2020).

O *Aedes aegypti* é um mosquito hematófago que está adaptado às áreas urbanas, o que torna mais fácil a transmissão viral (SCOTT; TAKKEN, 2012). Fêmeas adultas têm preferência pelo sangue humano (antropofílicas), possuem hábitos alimentares crepusculares e podem se alimentar de diferentes hospedeiros durante um único ciclo gonotrófico (ARMSTRONG et al., 2020; JANSEN; BEEBE, 2010; MARQUARDT et al., 2005).

O ciclo de vida do mosquito compreende quatro etapas: ovo, larva, pupa e mosquito adulto (Figura 1). Larvas e pupas são aquáticas. Em condições ambientais favoráveis, as fêmeas depositam seus ovos em água parada. Esses, podem permanecer viáveis por dias ou meses (OLIVEIRA, 1994). Uma vez que os ovos eclodem, inicia-se a etapa larval, que dura cerca de 7 dias até se converterem em pupas. As pupas vivem na água e levam cerca de 2 dias para emergir a mosquitos adultos (FIOCRUZ, 2024). Após emergirem, as fêmeas dos mosquitos se alimentam de néctar por alguns dias até estarem aptas a se alimentarem de sangue (ALMIRE et al., 2021; BARREDO; DEGENNARO, 2020; DE CARVALHO et al., 2021). A

alimentação sanguínea é uma etapa importante na reprodução do inseto, uma vez que o sangue é rico em proteínas essenciais para o ciclo de ovogênese (SCARAFFIA, 2016).

É durante o processo de alimentação sanguínea que as fêmeas dos mosquitos podem se infectar através de humanos infectados (fase febril aguda e virêmica da doença), iniciando o ciclo de transmissão (DUONG et al., 2015). O vírus infecta primeiro as células do intestino e então é disseminado para replicar em outros tecidos do corpo do inseto (SALAZAR et al., 2007). Uma vez presente nas glândulas salivares, o vírus pode ser transmitido para um indivíduo saudável, durante nova alimentação. O mosquito permanece infeccioso por toda a vida (GUZMAN et al., 2016; LAMBRECHTS; SALEH, 2019) e tem a capacidade de tolerar altos níveis de proliferação viral sem desenvolver patologia significativa (OLIVEIRA; BAHIA; VALE, 2020). Essa adaptação é fundamental para a competência vetorial e a propagação da doença.

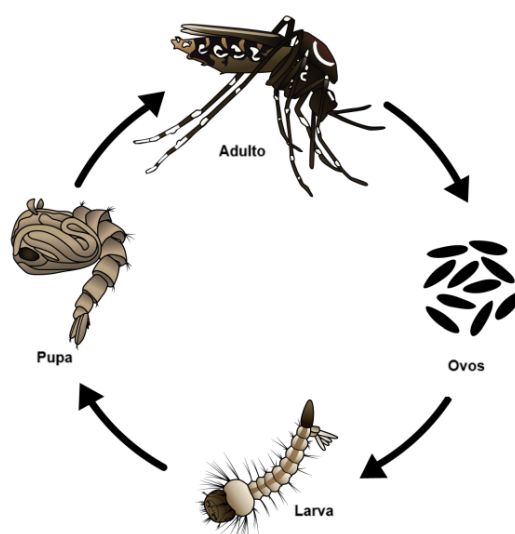


Figura 1. Ciclo de vida do mosquito *Aedes aegypti*.

Fêmeas de *Aedes aegypti* depositam ovos em água parada que eclodem liberando larvas que posteriormente convertem-se em pupas. Após um período de 2 a 3 dias as pupas transformam-se em mosquitos adultos. Adaptado de FIOCRUZ, 2024.

1.3 COMPETÊNCIA VETORIAL DOS MOSQUITOS *Aedes aegypti*

A competência vetorial é definida como a permissividade do artrópode vetor para a infecção, disseminação e transmissão de microorganismos (vírus e

protozoários) potencialmente patogênicos (HARDY et al., 1983; RÜCKERT; EBEL, 2018). Ela é determinada por fatores genéticos, ambientais e a interação entre genótipos e ambiente (RÜCKERT; EBEL, 2018). A competência vetorial dos mosquitos *Aedes aegypti* depende da relação entre cepas de mosquitos e genótipos virais (LAMBRECHTS et al., 2009; VEGA-RUA et al., 2014).

Um vetor competente possui características associadas às barreiras anatômicas e imunológicas impostas pelo organismo do inseto para conter o estabelecimento da infecção (Figura 2). Isso inclui as barreiras intestinais, denominadas MIB (do inglês *Midgut Infection Barrier*) e MEB (*Midgut Escape Barrier*) e as barreiras encontradas nas glândulas salivares SGIB (*Salivary Gland Infection Barrier*) e SGEB (*Salivary Gland Escape Barrier*). Em alguns vetores, a MIB pode atuar impedindo a infecção e replicação viral devido à mecanismos pouco claros e que podem envolver a ausência de receptores celulares para a internalização da partícula viral (BENNET ET AL., 2002; CRUZ-OLIVEIRA et al., 2015). Respostas imunológicas também podem diminuir a carga patogênica impedindo a replicação bem-sucedida do vírus dentro do epitélio intestinal (MERKLING et al., 2023). Quando a infecção viral se estabelece no intestino do mosquito, ela pode ser controlada pela MEB, a qual pode atuar impedindo a disseminação do vírus para o corpo do inseto (RÜCKERT; EBEL, 2018). A lâmina basal, que dá suporte às células epiteliais do intestino, também pode contribuir para a redução da disseminação da carga viral de arbovírus em mosquitos do gênero *Aedes* sp (DONG et al., 2017; THOMAS et al., 1993).

Para alcançar as glândulas salivares e posteriormente ser secretado na saliva, é necessário que o vírus consiga ultrapassar a SGIB e SGEB. Porém, até o momento, não se sabe ao certo como essas barreiras bloqueiam o vírus, impedindo que ele seja expelido na saliva do mosquito (RÜCKERT; EBEL, 2018; TABACHNICK, 2013). Os hemócitos também podem participar tanto da disseminação viral e imunidade dos arbovírus, na disseminação entre intestino e glândula salivar (HALL et al., 2024; LEITE et al., 2021).

Todas essas barreiras de infecção podem variar amplamente entre as populações de *Aedes aegypti*, influenciando na competência vetorial desses mosquitos frente às infecções pelos diferentes sorotipos de DENV. (BENNET et al., 2002). As vias imunológicas dos mosquitos, a digestão sanguínea e a microbiota também interferem na suscetibilidade do vetor à infecção (TABACHNICK, 2013).

Estudos sobre a regeneração do epitélio intestinal do mosquito *Aedes aegypti* demonstram a capacidade do inseto em responder e se defender contra o estresse oxidativo e infecções bacterianas e pelo dengue vírus. A capacidade de regeneração tecidual é crucial para manter a homeostase do intestino e evitar a infecção viral. Mosquitos refratários as infecções por DENV possuem uma regeneração tecidual mais eficiente, mantendo a integridade do intestino e o estabelecimento da infecção. Já os mosquitos suscetíveis, possuem uma regeneração tecidual mais lenta, são mais propensos a desenvolver lesões e, conseqüentemente, a transmitir o vírus (AYERS et al., 2021; CHOWDHURY et al., 2020; JANEH; OSMAN; KAMBRIS, 2017; TARACENA et al., 2018).

Outro fator importante para o estabelecimento da infecção por dengue no intestino dos mosquitos *Aedes* é a microbiota bacteriana (DONG et al., 2017). A colonização do intestino do *Aedes aegypti* pela bactéria *Chromobacterium* sp atua degradando proteínas do envelope viral do vírus da dengue e dessa forma, reduzindo a infectividade do mosquito. Além disso, bactérias de gênero como *Proteus* e *Paenibacillus* também promovem proteção contra infecções por dengue, ativando a expressão de peptídeos antimicrobianos (AMPs - *Antimicrobial Peptides*) no intestino do inseto via mecanismos ainda desconhecidos (RAMIREZ et al., 2012; SARAIVA et al., 2018). Por outro lado, também existem bactérias capazes de aumentar a susceptibilidade de mosquitos *Aedes* sp. durante infecções por DENV, como a *Serratia odorifera* que interage com proteínas envolvidas na ativação de vias imunológicas do mosquito (APTE-DESHPANDE et al., 2012).

Outro elemento importante na competência vetorial está envolvido na digestão sanguínea (MOLINA-CRUZ et al., 2005). O sangue do hospedeiro infectado por DENV ingerido pelo mosquito pode impactar na replicação e disseminação do vírus no corpo do inseto (ZHU et al., 2019). Por exemplo, o heme, que é encontrado em altas concentrações no sangue, atua em vias de sinalização e redes reguladoras de transcrição no intestino do mosquito (BOTTINO-ROJAS et al., 2015). Estudos sugerem que o heme influencia na replicação viral de DENV-2 no intestino de mosquitos suscetíveis e refratários ao vírus (BOTTINO-ROJAS et al., 2015).

Outros aspectos que podem impactar na transmissão das arboviroses estão relacionadas com a patogenicidade das cepas virais, a distribuição geográfica dos mosquitos e vírus, as mudanças climáticas e a densidade populacional de mosquitos

e hospedeiros humanos. Todos esses elementos também podem influenciar as infecções por dengue (SONI et al., 2020; TULADHAR et al., 2019).

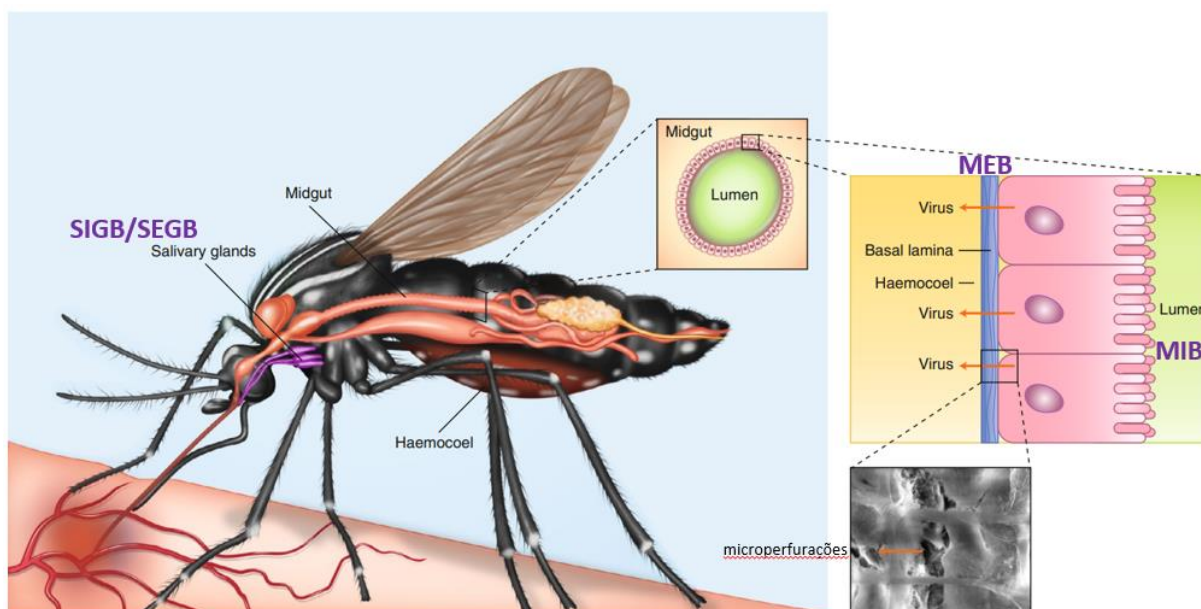


Figura 2. Anatomia do mosquito *Aedes aegypti*.

Barreiras anatômicas que determinam a infecção de artrópodes por arbovírus. MIB - Barreira Intestinal, MEB - Barreira de escape intestinal, SEGB/SIGB - Barreiras salivares, cabeça, tórax e abdome. Adaptado de Weaver et al., (2020).

1.4 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA E TOLERÂNCIA EM MOSQUITOS *Aedes Aegypti*

É possível dividir a resposta de defesa dos mosquitos *Aedes aegypti* contra infecções por arbovírus em resistência e tolerância. A resposta de resistência compreende um conjunto de mecanismos que atuam restringindo o crescimento viral e potencialmente eliminando o microorganismo invasor. O sistema imune dos mosquitos possui vias de sinalização associadas à resistência que promovem uma resposta celular conduzida por hemócitos e uma resposta humoral regulada pelas vias Toll, IMD (*Immune Deficiency*), JAK/STAT (JAK - *Janus Kinase* /STAT - *signal transduction and activators of transcription*) e RNAi (*RNAi – RNA interference*) (CHENG et al., 2016; SHAW et al., 2018). Dentre as defesas do mosquito, a via de RNAi é a principal via antiviral e leva à degradação do material genético do vírus, inibindo a replicação e promovendo sua eliminação (CHENG et al., 2016; MERKLING, 2022; MERKLING et al., 2023). Embora as estratégias moleculares que levem à eliminação viral sejam cruciais para a proteção do hospedeiro, a eliminação do

microorganismo invasor também pode gerar danos teciduais, processo conhecido como imunopatologia (MEDZHITOV; SCHNEIDER; SOARES, 2012).

Outro conjunto de mecanismos que atuam de forma independente ou em cooperação com a resposta de resistência são os mecanismos de tolerância (SOARES; GOZZELINO; WEIS, 2014). A tolerância é definida como uma estratégia de defesa que promove proteção tecidual e é essencial para limitar o impacto negativo na saúde do hospedeiro, sem eliminar o patógeno invasor (AYRES; SCHNEIDER, 2012; MARTINS et al., 2019; MEDZHITOV; SCHNEIDER; SOARES, 2012; SOARES; TEIXEIRA; MOITA, 2017). Durante as interações entre mosquito e vírus, podem ocorrer altas taxas de replicação viral, porém, essas infecções tipicamente não geram um grande impacto no *fitness* ou saúde do inseto. Dessa forma, os mosquitos podem ser considerados tolerantes às infecções arbovirais (LAMBRECHTS; SALEH, 2019). Organismos que possuem uma maior eficiência em reparar as lesões causadas pelos patógenos são capazes de suportar altas cargas patogênicas, alterações e estresse metabólico do que indivíduos menos tolerantes (LAMBRECHTS; SALEH, 2019; VALE; FENTON; BROWN, 2014).

A tolerância é uma estratégia evolutivamente conservada e composta por mecanismos ainda pouco elucidados. Esses mecanismos controlam danos teciduais e permitem o equilíbrio entre a homeostasia celular, a imunopatologia e a resposta imunológica, mantendo as infecções virais em níveis não letais (LEE et al., 2019). Essa estratégia de defesa atua ainda no reparo e substituições de macromoléculas e organelas celulares, restabelecendo a funcionalidade celular apesar da infecção. A resposta a danos e ao estresse limitam os impactos negativos gerados tanto pelos patógenos como pela imunopatologia no metabolismo do hospedeiro infectado (SCHNEIDER; AYRES, 2008; SOARES; GOZZELINO; WEIS, 2014; WIPT; GEORGE, 2008).

Para o vírus, a resposta de tolerância é benéfica, uma vez que altas cargas virais associadas à sobrevivência do inseto são fundamentais para a transmissão viral (LAMBRECHTS; SALEH, 2019). Um exemplo de mecanismo de tolerância é o promovido pelo fator de transcrição CrebA, em *Drosophila melanogaster*, que está ativado na presença de infecções por bactérias. Moscas deficientes para CrebA são mais propensas a morrer da infecção apesar de carregarem a mesma quantidade de bactérias que as moscas selvagens. A perda de CrebA gera estresse no retículo endoplasmático, tornando as moscas mais sensíveis à infecção. Isto sugere que o

sistema imune pode modular a fisiologia do hospedeiro, prevenindo efeitos danosos associados ao estresse celular causado pela infecção (TROHA et al., 2018). Outros trabalhos realizados com *Drosophila melanogaster* demonstraram que o regulador G9a da via imune JAK-STAT tem uma função importante na tolerância a infecções por *Drosophila C virus* (DCV). Moscas que apresentam mutação em G9a exibiram aumento de mortalidade frente à infecções por DCV, mesmo não havendo diferenças na carga viral quando comparada ao grupo controle (VALE; GUPTA, 2017). O gene G9a codifica uma proteína com atividade de histona metiltransferase que em *Drosophila melanogaster* também demonstrou importância na tolerância ao estresse oxidativo (RIAHI et al., 2019). Recentemente, demonstrou-se em *Aedes aegypti* que modulações epigenéticas podem estar envolvidas no controle da competência vetorial apontando para uma possível correlação com resposta de tolerância dos mosquitos durante o estresse oxidativo e infeccioso (AMARANTE et al., 2022; OLMO et al., 2023). Outro dado relevante é a importância da formação de vDNA (DNA derivado do vírus) para a tolerância dos mosquitos à infecção por arbovírus. A inibição da formação de vDNA é crucial para a redução da replicação viral e eliminação de pequenos RNAs virais (sRNA) pela resposta imune do mosquito. A inibição da formação de vDNA leva a aumento da suscetibilidade às infecções virais, redução de sRNA e perda de tolerância viral. Isso sugere que o vDNA é um mecanismo importante para a tolerância dos mosquitos à infecção (GOIC et al., 2016).

Hospedeiros que exibem alta tolerância à infecção estão associados à maior transmissão viral (ABDULJALIL; ABD AL GALIL, 2022; SEAL; DHARMARAJAN; KHAN, 2021). Dessa forma, a compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na tolerância dos mosquitos pode identificar alvos para reduzir a competência vetorial e bloquear a transmissão de arbovírus (OLIVEIRA; BAHIA; VALE, 2020). Acreditamos que esses alvos estão envolvidos na manutenção da integridade fisiológica, reparo tecidual e redução do processo inflamatório no mosquito vetor durante as infecções por arbovírus (OLIVEIRA; BAHIA; VALE, 2020).

1.5 DESAFIOS IMPOSTOS PELA ALIMENTAÇÃO SANGUÍNEA NOS MOSQUITOS *Aedes aegypti*

Mosquitos ingerem uma grande quantidade de sangue, a qual representa aproximadamente 2 a 3 vezes o seu peso (FRIEND; CHOY; CARTWRIGHT, 1965;

GRAÇA-SOUZA et al., 2006). O sangue é a fonte de nutrientes necessária para a produção de seus ovos (MARQUARDT et al., 2005). O sangue do hospedeiro é composto majoritariamente por proteínas como hemoglobina, albumina e imunoglobulinas, além de lipídios e carboidratos que são encontrados em menores quantidades (HELMER; EMERSON, 1934). Durante a digestão sanguínea, as proteínas são convertidas em peptídeos e aminoácidos, que são utilizados para a síntese de proteínas dos ovos e proteínas maternas, bem como para fornecer substratos para a produção de energia e reserva de nutrientes. Além disso, o processo também resulta na produção de açúcares e síntese de lipídeos. Esses processos fisiológicos compreendem um período que inicia na alimentação sanguínea até a postura dos ovos, denominado ciclo gonotrófico (SCARAFFIA, 2016; ZHOU et al., 2004). Uma grande quantidade de aminoácidos (~70%) é destinado para o metabolismo oxidativo e excretado como resíduos metabólicos. A oxidação dos aminoácidos para produção de energia, síntese de carboidratos e lipídeos gera amônia como subproduto do metabolismo de nitrogênio. Os mosquitos possuem mecanismos capazes de regular a síntese e ou a excreção de resíduos de nitrogênio de forma eficiente para evitar o acúmulo em seus tecidos, o que poderia ser tóxico (ISOE; SCARAFFIA, 2013; WEIHRAUCH; O'DONNELL, 2021).

A alimentação sanguínea possui altas concentrações de moléculas pro-oxidantes e potencialmente tóxicas para o mosquito vetor, como o heme e o ferro (GRAÇA-SOUZA et al., 2006). A hemoglobina é a mais abundante proteína presente no sangue dos mamíferos e alcança concentrações aproximadas de 150 mg/mL e representa 60% do conteúdo proteico (GRAÇA-SOUZA et al., 2006; SCARAFFIA, 2016). Durante a hidrólise da hemoglobina uma grande quantidade de heme, grupo prostético responsável por ligar oxigênio, é liberado no intestino desses insetos. O heme é uma molécula tóxica devido à habilidade de amplificar a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS – *Reactive oxygen species*) (STERKEL et al., 2017). ROS são um grupo de moléculas reativas contendo oxigênio em sua estrutura e capazes de oxidar biomoléculas. As ROS são divididas em dois tipos de moléculas: as espécies oxidantes não radicalares, como o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e os radicais livres, que possuem elétrons desemparelhados em sua estrutura, tornando-as instáveis e capazes de reagir rapidamente com outras moléculas, como o superóxido (O^{•-}) e o radical hidroxil (OH[•]). Quando as ROS estão em excesso podem levar ao estresse oxidativo, gerando danos celulares e desequilíbrio fisiológico (STERKEL et al., 2017).

Os insetos hematófagos desenvolveram mecanismos de proteção antioxidante que garantem seu sucesso evolutivo (STERKEL et al., 2017). Embora essas estratégias de defesa atuem limitando a ação de heme e espécies reativas de oxigênio, uma quantidade reduzida pode entrar em contato com as células intestinais e com a hemolinfa, colocando esses tecidos sob potencial estresse oxidativo (STERKEL et al., 2017). De fato, os mosquitos precisam administrar os efeitos pró-oxidantes da presença de heme e sua interação com o sistema imunológico, uma vez que ROS podem ser geradas como parte da resposta imune contra patógenos invasores (OLIVEIRA et al., 2011a).

A adaptação dos mosquitos à digestão do sangue envolve a indução da Catalase (Cat1a), uma enzima antioxidante que protege os tecidos da ação de radicais livres. Mosquitos que tiveram a catalase silenciada e foram desafiados com uma alimentação sanguínea suplementada com vírus dengue, apresentaram redução na taxa de prevalência de infecções por este arbovírus. Esses resultados sugerem que o metabolismo redox pode ter funções diferentes na competência vetorial dos mosquitos frente às infecções arbovirais. Um cenário possível é que após o silenciamento da catalase, ocorra acúmulo de peróxido de hidrogênio e essa exerça efeito anti-dengue (OLIVEIRA et al., 2017). O consumo de sangue pelos mosquitos é acompanhado por mudanças hormonais, alterações na fisiologia reprodutiva e na permeabilidade do intestino, o que afeta a capacidade do vetor de lidar com infecções. A homeostase intestinal e o metabolismo energético são influenciados pelo consumo de sangue, podendo impactar a capacidade do vetor de manter a saúde. Esses mecanismos tipicamente não são entendidos como parte da resposta imune mas são críticos na determinação da competência vetorial (TALYULI et al., 2021).

A adaptação do *Aedes aegypti* às condições de estresse decorrentes da ingestão de sangue rico em moléculas pró-oxidantes e, ainda assim, aproveitar os nutrientes como fonte para a ovogênese e para o metabolismo energético é um fenômeno ainda não totalmente elucidado. Essa adaptação é fundamental para manter a saúde do mosquito e sua fertilidade (DEJONG et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2017). Simultaneamente, microorganismos invasores também são submetidos ao mesmo desafio oxidativo. Dessa forma, é possível que genes antioxidantes protejam ao mesmo tempo o hospedeiro mosquito e seus microorganismos associados (microbiota, arbovírus, protozoários), promovendo tolerância e impedindo danos teciduais causados pelos patógenos e mantendo a saúde do vetor.

1.6 CEPAS DENV-4 TVP/360 E DENV-4 LRV 13/422

O primeiro registro de dengue no Brasil ocorreu em 1685, no Recife (SALLES et al., 2018). No entanto, foi apenas em 1981 que a doença começou a circular amplamente no país, com os sorotipos DENV-1 e DENV-4 sendo responsáveis por essas epidemias (SALLES et al., 2018). Desde então, a doença se disseminou com rapidez e força significativa em todo o país (SALLES et al., 2018).

A introdução de novos sorotipos e genótipos do vírus da dengue no Brasil é um fenômeno preocupante. O DENV-2 foi introduzido no Rio de Janeiro em 1990, e o DENV-3 foi isolado em 2000, causando uma epidemia entre 2001 e 2003. O DENV-4 foi detectado pela primeira vez em 1982, mas novas infecções foram registradas em 2010 (SALLES et al., 2018; VILLABONA-ARENAS; ZANOTTO, 2011). Análises filogenéticas demonstraram a co-circulação de dois diferentes genótipos de DENV-4 (genótipo I e II) no Brasil (NUNES et al., 2012).

A rotação de diferentes sorotipos e genótipo do vírus da dengue aumenta o potencial para novos surtos no país (SALLES et al., 2018). Isso é preocupante pois pode ocasionar o fenômeno conhecido como aumento da infectividade dependente de anticorpos (ADE - do inglês *Antibody-dependent enhancement*) e agravamento da doença de forma dependente de anticorpos sub neutralizantes (LEAH et. al, 2017).

A dengue é uma doença com ampla distribuição global, alta taxa de transmissão e graves manifestações clínicas. Além disso, a distribuição do mosquito *Aedes aegypti* é prevista para aumentar de 10-30% globalmente até o final deste século. Essa previsão depende do cenário de emissões de gases de efeito estufa e pode acelerar após 2050 (SUN et al., 2018). A compreensão da relação entre as cepas virais e seu principal vetor é essencial para o desenvolvimento de novas estratégias no combate à doença.

Neste trabalho, avaliamos se diferentes cargas virais de duas cepas de DENV-4 poderiam impactar de maneira diferenciada a sobrevivência dos mosquitos *Aedes aegypti* em condições laboratoriais. O DENV-4 TVP/360 (GenBank - KU513442), genótipo II, é uma cepa de referência adaptada ao laboratório. Foi inicialmente isolada de um paciente em fase aguda da infecção em Porto Rico no ano de 1982. Ela foi primeiramente designada como TVP/376, conforme evidências de estudos conduzidos por Sarathy et al.,(2015). Em nossos estudos, optamos por manter o nome

TVP/360, pois nos baseamos nas descobertas apresentadas por Kuczera et al.,(2016).

A cepa DENV-4 LRV 13/422 (GenBank - KU513441), genótipo II, foi isolada no Município de Santa Fé no Paraná-PR em 2013, de um paciente que apresentou sintomas clássicos de dengue e manifestações hemorrágicas, além de uma alta carga viral. O LRV13/422 é o primeiro vírus da dengue, sorotipo 4 completamente sequenciado e isolado no Sul do Brasil.

Ambas as cepas foram escolhidas porque apresentam diferentes taxas de infectividade *in vitro* em células de vertebrados e mosquitos e capacidades imunomoduladoras em células de vertebrados (KUCZERA et al., 2016).

Em parceria com o pesquisador Dr. Tiago Graf, realizamos a busca pelas diferenças nas sequências de aminoácidos entre as duas cepas, elas são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Diferença nas sequências de aminoácidos das cepas DENV - 4 TVP/360 e DENV- 4 LRV 13/422 comparadas com a cepa de referência DENV – 4/ 814669 – GenBank: AF326573.1

DENV4 Genes	Cepa DENV4 - TVP/360	Cepa DENV4 - LRV13/422
C		F49L
prM	S2H	S2H
E		S64L, M163T, A222T, K346R, I351V, S354A
NS1		K11R, V108A, L153F, K214R, D290N
NS2A		V35A, I72T, M77I, V112T, P159S
NS2B		V116I
NS3	K14Q	K14Q, R594K
NS4B	V109A, A240V	
NS5	R23K	T5A, R23K , T269I, K649R, T826I, P885S

1.7 JUSTIFICATIVA

O mosquito *Aedes aegypti* é um dos principais vetores na transmissão de arbovírus como dengue, Zika, febra amarela e chikungunya. Esses vírus constituem uma ameaça à saúde pública mundial, causando diversas morbidades e mortalidade em regiões tropicais e subtropicais. Atualmente, não há vacinas para a maioria dos arbovírus ou tratamento específico. O combate ao mosquito vetor ainda é a melhor estratégia para diminuir os impactos negativos causados por esses vírus. O *Aedes aegypti* possui a capacidade de tolerar altas cargas virais sem sofrer grande impacto em sua adaptabilidade (“fitness”) e sobrevivência (MARASCHIN et al., 2023). Esta adaptação está relacionada com a competência do mosquito vetor e a disseminação das arboviroses no mundo. Dessa forma, entender os mecanismos de tolerância é essencial para o desenvolvimento de novas estratégias no combate às arboviroses.

1.8 HIPÓTESE

Os mecanismos de proteção antioxidante disparados pela alimentação com sangue no mosquito *Aedes aegypti* promovem tolerância durante a infecção por dengue vírus.

1.9 OBJETIVOS

1.9.1 Objetivo Geral

Determinar o impacto na sobrevivência do *Aedes aegypti* infectado com as cepas de DENV4 TVP/360 e LRV 13/422 e como a inibição de vias de resposta ao estresse oxidativo modulam a infecção dos mosquitos.

1.9.2 Objetivos Específicos

- Determinar o perfil de infecção e sobrevivência do mosquito *Aedes aegypti* infectado com as cepas de DENV-4 TVP/360 e DENV-4 LRV 13/422.
- Definir o perfil de expressão de genes antioxidantes em mosquitos infectados com DENV-4.

- Inibir a ação dos genes Glutamina Sintetase 1 (GS1) e Nrf2 em *Aedes aegypti* infectado com DENV4 e estudar seu impacto na competência vetorial do mosquito.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 CRIAÇÃO DOS MOSQUITOS *Aedes aegypti*

Fêmeas de *Aedes aegypti* (cepa *Red Eyes*) foram criadas no insetário do Laboratório de Imunologia – Lidi, da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Os mosquitos adultos e as larvas foram mantidos em ciclos de fotoperíodos de 12h claro/12h escuro, 70% - 80% umidade relativa e temperatura de 28°C. As larvas foram alimentadas com ração canina (*Pedigree*) e os mosquitos foram mantidos em gaiolas e alimentados com solução de sacarose 10%, embebida em algodão e oferecida “*ad libitum*”. Todos os mosquitos fêmeas usados nos experimentos tinham entre 4 e 9 dias de vida.

2.2 CULTIVO CELULAR

As células da linhagem Vero e Vero E6 (células epiteliais de rim de macaco verde africano *Cercopithecus aethiops* – ATCC®, CCL-81™ - CRL-1586™) foram mantidas e propagadas em meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12* (DMEM F-12 1X, GIBCO - Thermo Fisher Scientific) suplementado com: 5% de soro fetal bovino (SFB, - GIBCO, Thermo Fisher Scientific), 1% de penicilina/estreptomicina (P/S – GIBCO, Thermo Fisher Scientific) e 1% de glutamina (GIBCO), definido como DMEM F12 1X - completo. As células foram incubadas em estufa à 37°C e atmosfera de 5% de dióxido de carbono (CO₂). Também foram utilizadas células da linhagem C6/36 (células de mosquitos *Aedes albopictus* – ATCC, CRL-1660), mantidas em meio *Leibovitz's L15* (L-15) (GIBCO) e suplementado com 5% de SFB, 1% de P/S e 0,26% de triptose (Thermo), incubadas à temperatura de 28°C. Ambas as linhagens celulares foram testadas mensalmente para contaminação por micoplasma.

2.3 VÍRUS

2.3.1 Preparação de estoque viral

Células de mosquitos *Aedes albopictus*, da linhagem C6/36 foram mantidas e propagadas em meio L-15 1X, pH 7,4, suplementado com 5% SFB, 1% P/S e 0,26% triptona, à temperatura de 28°C em estufa *Biochemical oxygen demand* (B.O.D.).

O vírus foi multiplicado em garrafa de 150 cm² contendo 80% de confluência de células C6/36 que foram mantidas a 28°C *overnight*. No dia seguinte, as células foram infectadas com Multiplicidade de infecção (MOI) de 0,01 e permaneceram por 90 minutos à temperatura de 28°C em estufa B.O.D. Após o período de adsorção viral, o meio foi removido e adicionado meio L-15 1X completo. As células foram mantidas por 5 dias à temperatura de 28°C para a produção de DENV-4 (cepa TVP/360 - GenBank: KU513442) ou DENV-4 (cepa LRV 13/422 - GenBank: KU513441). Após esse período, o sobrenadante das células contendo partículas virais, foi coletado, centrifugado a 460 x g por 10 minutos a 4°C, aliquoteado e armazenado a -80°C. O ensaio de placa (item 2.3.3) foi realizado para determinar o título viral, sendo para DENV-4 TVP/360: $9,5 \times 10^7$ PFU/mL ou $3,65 \times 10^6$ PFU/mL e DENV-4 LRV 13/422: $1,13 \times 10^7$ PFU/mL.

2.3.2 Concentração de DENV-4 TVP/360

A concentração viral da cepa DENV-4 TVP/360 foi realizada conforme técnica descrita por Richard et al., (2015). A amplificação viral em células C6/36 seguiu o protocolo descrito no item 2.2.1 até a etapa da coleta do sobrenadante das células contendo partículas virais. O sobrenadante foi coletado e centrifugado a 3.200 x g por 10 minutos a 4°C e em seguida, pré-filtrado em filtro de 0,22 µm. O sobrenadante pré-filtrado foi adicionado em Centricon Plus CFD (100K NMWL) (Millipore, Germany) e filtrado através de centrifugação a 3.200 x g a 4°C. O concentrado de vírus foi recuperado invertendo-se o dispositivo do filtro e centrifugado a 2.000 x g por 2 minutos. Após a centrifugação, o concentrado da cepa DENV-4 TVP/360 foi aliquoteado e armazenado até titulação viral. O título do vírus concentrado foi realizado por ensaio de placa conforme item 2.3.3. A titulação viral ficou em $2,5 \times 10^9$ PFU/mL.

2.3.3 Titulação do estoque viral por placas de lise

Para a titulação da cepa DENV-4 TVP/360, células Vero foram semeadas em uma densidade de 5×10^4 células/poço em placa de 24 poços e mantidas a 37°C e 5% CO₂. No dia seguinte, as alíquotas virais a serem tituladas foram descongeladas e as diluições seriadas dos vírus (10^{-1} a 10^{-7}) em meio DMEM F-12 1X com 1% P/S e 5% SFB, foram preparadas. Em seguida, as células Vero foram incubadas com 200 µL de cada diluição de vírus por poço. O mesmo foi feito para o grupo controle (*Mock*) utilizando 200 µL de meio sem adição de vírus. As placas permaneceram incubadas por 90 minutos, a 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂. Após esse período, o meio foi removido e acrescentado 700 µL de meio semissólido: meio DMEM F-12 2X com 1% SFB, 1% P/S e 3,2% de CMC (Carboximetilcelulose de sódio – Sigma-Aldrich) por poço. Em seguida, as células foram mantidas em estufa a 37°C, 5% de CO₂ por 5 dias. Passado esse tempo, as células foram fixadas com 700 µL de solução de Paraformaldeído 3% (PFA – Sigma-Aldrich) por 20 minutos a temperatura ambiente (T.A.). As células foram então lavadas em água corrente em fluxo baixo e incubadas com solução de cristal violeta 0,8% por 30 minutos a T.A. Em seguida, as placas foram lavadas novamente em água corrente e após sua secagem, as mesmas foram contadas e os valores adicionados na fórmula do cálculo do título viral. O resultado é expresso por PFU/mL (do inglês, *plaque forming unit*, Unidades Formadoras de Placa/mL).

Para a titulação da cepa DENV-4 LRV 13/422 foram semeadas células Vero E6 em uma densidade de 1×10^5 células/poço em placa de 24 poços. O protocolo utilizado foi o mesmo descrito acima.

2.4 INFECÇÃO VIRAL DOS MOSQUITOS *Aedes Aegypti* POR DENV-4

Para a infecção dos mosquitos, foi coletado sangue humano de doadores saudáveis (UFSC - CAAE: 89894417.8.0000.0121) utilizando tubo contendo reagente EDTA. Para obtenção das células vermelhas (RBC), 1 mL de sangue foi centrifugado por 4 minutos, 6.400 rpm em T.A. Após a centrifugação, o soro foi descartado e as células foram lavadas gentilmente com solução de PBS 1X estéril (GIBCO). Esse processo foi realizado por 2 vezes. Na última lavagem, após o descarte do PBS 1X,

as células foram gentilmente homogeneizadas e então as alimentações foram preparadas.

Fêmeas de *Aedes aegypti* foram mantidas com acesso a água, mas em jejum de sacarose por 18-24h e então foram oferecidas alimentações contendo: uma mistura 1:1 células RBC e meio L-15 contendo vírus DENV-4 TVP/360 ($9,5 \times 10^7$ PFU/mL ou $3,65 \times 10^6$ PFU/mL) ou DENV-4 LRV 13/422 ($1,13 \times 10^7$ PFU/mL). Também foram oferecidas alimentações contendo: uma mistura 1:1 RBC e meio L-15 contendo uma diluição de 10X de cada cepa de DENV-4. O grupo controle (*Mock*) recebeu uma mistura 1:1 RBC e o sobrenadante de células C6/36. ATP, pH7,4 na concentração final de 1mM foi incluído como fagoestimulante.

Essas soluções foram oferecidas às fêmeas utilizando um alimentador artificial de vidro aquecido por água a 37°C durante aproximadamente 40 minutos na sala de infecção do insetário. Em seguida, os mosquitos foram anestesiados por frio (-20°C), por aproximadamente 1 minuto e 30 segundos e somente as fêmeas totalmente ingurgitadas foram separadas em pequenas gaiolas e mantidas em B.O.D, à 28°C até o final do experimento. Cada gaiola recebeu 20 mosquitos e solução de sacarose 10% embebida em algodão e oferecido “*ad libitum*”.

2.5 DINÂMICA DA INFECÇÃO E CURVA DE SOBREVIVÊNCIA DOS MOSQUITOS *Aedes aegypti* INFECTADOS COM DENV-4

Para os experimentos de dinâmica da infecção, os mosquitos foram infectados com DENV-4 TVP/360 ou DENV-4 LRV 13/422, conforme descrito no item 2.4. As fêmeas de *Aedes aegypti* foram coletadas nos dias zero (dia da infecção), 7, 14 e 21 dias após infecção (dpi), sendo cada dia correspondente a um grupo de 20 mosquitos. Cada grupo, então, foi eutanasiado por frio (aproximadamente 10 minutos à -20°C), coletado em tubos de 1,5 mL e armazenado à -80°C até o dia da quantificação viral.

Para os experimentos de curva de sobrevivência, após a infecção pelas diferentes cepas de DENV-4 e suas diluições correspondentes, os mosquitos foram separados em grupos, cada um com 20 mosquitos e a sobrevivência foi acompanhada diariamente. Um grupo controle, em paralelo, correspondente ao 14 dpi da cepa viral LRV 13/422 e suas diferentes diluições foi utilizado para verificar a carga viral desse grupo na curva de sobrevivência.

2.6 QUANTIFICAÇÃO DA INFECÇÃO VIRAL DE MOSQUITOS *Aedes Aegypti* INFECTADO POR DENV-4

Para a realização desta técnica, células Vero (DENV-4 TVP/360) e Vero E6 (DENV-4 LRV 13/422) foram semeadas em uma densidade de 5×10^4 células/poço e 1×10^5 células/poço, respectivamente, em placa de 24 poços e mantidas a 37°C e 5% CO₂, previamente. No dia seguinte, as amostras de mosquitos a serem tituladas, foram descongeladas. Cada mosquito passou por um processo de descontaminação sendo: 1 x 45" em álcool 70%, 1 x 45" em hipoclorito 1%, 1 x 45" em álcool 70% e 1 x 45" em salina 0,9% estéril. Em seguida, cada mosquito foi colocado em um tubo de 1,5 mL contendo 200 µL de meio DMEM F-12 1X completo e mantidos no gelo. Cada mosquito foi macerado com o auxílio de vórtex manual com pistilo estéril e individual para cada amostra. Em seguida, o homogenato foi centrifugado a 3.200 x g por 5 minutos a 4°C.

Cada homogenato de mosquito individual foi diluído (10^{-1} a 10^{-5}) em meio DMEM F-12 - 1X completo e as células foram incubadas com 200 µL de cada diluição por 60 minutos, à 37°C e 5% CO₂. O mesmo foi feito para o *Mock* utilizando 200 µL de meio DMEM F-12 - 1X completo. Após o período de adsorção viral, o meio foi removido e foram adicionados 700 µL de meio semissólido (item 2.3.3). As placas permaneceram por 5 dias em estufa a 37°C e 5% CO₂. Passado esse período, as placas foram reveladas e a titulação quantificada por PFU/mL.

O cálculo da titulação foi realizado através da contagem do N° de PFU/ poço x diluição. O valor gerado foi multiplicado por 5, uma vez que foi utilizado 1/5 do homogenato dos mosquitos para as diluições experimentais.

2.7 DISSECÇÃO DO INTESTINO E CARÇA DOS MOSQUITOS *Aedes Aegypti*

Mosquitos fêmeas previamente alimentadas com sangue humano e/ou infectados com DENV-4 TVP/360, conforme descrito no item 2.4, totalmente ingurgitadas, foram selecionadas para dissecção do intestino em diferentes tempos (24 horas após infecção, 4 e 7 dpi).

Os mosquitos foram anestesiados por aproximadamente 1 minuto à temperatura de -20°C. Após, foram colocados em placa de petri e mantidos no gelo

durante todo o processo. A dissecação foi realizada em 300 μL de álcool 50% adicionado em uma lâmina histológica sob estereomicroscópio (*Olympus SZ51*). Com auxílio de pinças o intestino foi removido e posteriormente lavado em PBS 1X estéril para a remoção completa do bolo sanguíneo. Um pool de 10 intestinos por grupo foi homogeneizado com auxílio de vórtex manual em 500 μL de Trizol (*Ambion - Life Technologies*). A carcaça (tórax e abdome) dos mosquitos que tiveram seus intestinos removidos, foi separada em um pool de 10 amostras e homogeneizadas em 700 μL de Trizol. Em seguida, as amostras foram mantidas em -80°C até a extração do RNA total.

2.8 RT-QPCR

2.8.1 Extração de RNA e síntese de cDNA do intestino e carcaça dos mosquitos *Aedes aegypti* infectados com DENV-4 TVP/360

Um pool de 10 intestinos ou 10 carcaças de fêmeas de *Aedes aegypti* foram macerados em 500 μL e 700 μL de Trizol, com auxílio de vórtex manual, respectivamente. O homogenato foi incubado por 10 minutos à T.A. e em seguida, foi adicionado 200 μL de clorofórmio (Merck) e os tubos foram homogeneizados por inversão (aproximadamente 15 vezes). Uma incubação de 2 minutos à T.A. foi realizada e as amostras centrifugadas a 4°C , por 15 minutos a 12.000 x g. A fase aquosa, contendo o RNA total, foi coletada e separada em um novo tubo de 1,5 mL. Foi adicionado 200 μL de isopropanol (Merck) e novamente, as amostras foram homogeneizadas por inversão, aproximadamente 10 vezes. Em seguida, o RNA foi incubado por 10 minutos à T.A. Uma nova centrifugação foi realizada a 4°C , por 10 minutos a 12.000 x g. O sobrenadante foi descartado e a etapa de lavagem foi iniciada com 500 μL de álcool P.A. (Merck) e centrifugado a 4°C , por 5 minutos a 10.000 x g. O sobrenadante foi mais uma vez descartado e então adicionado 500 μL de álcool 75% e o RNA foi centrifugado a 4°C , por 5 minutos a 8.000 x g. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi seco por inversão do tubo em papel absorvente. Após a secagem do RNA, este foi homogeneizado com 10 μL de água livre de nucleases.

O RNA foi quantificado através do *NanoDrop Lite* (Thermo Scientific) e o tratamento com DNase foi realizado utilizando o Kit (*RQ1 RNase - Free DNase - Promega*), seguindo o protocolo de acordo com as especificações do fabricante.

Em seguida, a síntese de cDNA foi realizada utilizando o *kit High Capacity* (Applied #4368814) conforme as recomendações do fabricante e as amostras foram armazenadas à -20°C.

2.8.2 PCR quantitativo em tempo real (qPCR) para análise da expressão dos genes antioxidantes e redox em *Aedes aegypti*

Os genes antioxidantes e redox selecionados em *Aedes aegypti* são apresentados a Tabela 2.

Tabela 2. Lista dos genes estudados em *Aedes aegypti*.

Genes	Genes <i>Aedes aegypti</i>	Nome
apex1	AAEL010781	ap endonuclease
erp44	AAEL013845	endoplasmic reticulum resident protein (ERp44)
dnajc16	AAEL002502	putative chaperone
glrx	AAEL001109	glutaredoxin
GS1	AAEL001887	glutamine synthetase 1, 2 (glutamate-amonia ligase) (GS)
p4hb	AAEL000641	protein disulfide isomerase
pdia3	AAEL001432	protein disulfide isomerase
pdia6	AAEL010065	protein disulfide-isomerase A6 precursor
prdx1	AAEL019408	2-Cys thioredoxin peroxidase
txn	AAEL010777	thioredoxin
gsto1	AAEL017085	glutathione transferase
park7	AAEL004081	dj-1 protein (park7)
sod1	AAEL019938	putative SOD
LOC5576166	AAEL012368	putative SOD
Cat1a	AAEL013407	catalase protein
Nrf2	AAEL019563	segmentation protein cap'n'collar

Os experimentos de qPCR foram realizados no *StepOnePlus Real Time PCR System* (Applied Biosystems) usando o *kit GoTaq® qPCR Master Mix* (Promega). Todas as reações foram preparadas em placas do tipo *MicroAmp® Fast Optimal 96-well – Reaction Plate* (Applied Biosystems®).

As análises foram realizadas utilizando o método $2^{-\Delta\Delta Cq}$ calculado em relação ao gene de referência 60S ribossomal proteína L32 (RLp32) de *Aedes aegypti*. A eficiência dos iniciadores foi testada utilizando diluições seriadas das diferentes

amostras de cDNA. Os testes foram realizados em duplicata e a concentração dos iniciadores foi definida em 100nM. Os oligonucleotídeos utilizados neste estudo estão representados na Tabela 5. Os dados de *threshold*, *baseline* e *Cq*, foram obtidos e analisados inicialmente através do software *StepOne™ Software v2.1*. Os gráficos plotados com os dados foram de acordo com a expressão relativa de cada gene em relação a mosquitos alimentados com açúcar - SF (*Sugar Fed*) de cada experimento, ao qual foi atribuído o valor de 1. Todas as análises foram realizadas através do software GraphPad Prism 9.0 (Graphpad® Software).

Tabela 3. Lista de oligonucleotídeos utilizados para análise da expressão gênica por RT-qPCR.

Genes	Primer senso	Primer anti-senso
apex1	ACAAATCCGCAACCGACTAC	GCACAGAATGTCCGGTTTTT
erp44	GGCAACGAATCTCAAGGAAG	GTCAGTTCTTCGGCGTTCTC
dnajc16	GCAATCTCGCAACAAACTGA	TCGGGTTGATCTTCATCTCC
glrx	TTCTGCAGAGTGATGCCTTG	CCGACCTTCTTCAGCTCATC
GS1	TATTGATGGAAGGCCTTTGG	GATATCGTCAGCGCACTTCA
p4hb	GCTCTGCCACTGATTGTTGA	CTTCTCGCGGTACTTCTTGG
pdia3	ATTGTACCGAAGGTGGCAAG	CTTCGAAAGCCTCCAGTGTC
pdia6	ATCGCCGGTAGATTACAACG	CCAACCAAATGTCGTCACTG
prdx1	AAGATCGGCTGCTCTGTGAT	CTGGCGGAGATTCTGCTTAC
txn	CTCGTCGTGGTGGACTTTTT	ACAGGAAGGTGGGCATACTG
gsto1	CGTTTAAGAAGGCGCAAGAC	CCACGGGTTTTGAGTTCTGT
park7	TGACGTCGTATCCCTCCTTC	TTGCGACTTGCTTGGTCTTA
sod1	AGGTCTCTCTCCGGGTAAGC	GCCAACCAGCGTTATTTTTGT
LOC5576166	GGGTGAGGTTTACGACTCCA	TCGTCCCAAATCGTAACTCC
Cat1a	CAATGAACTGCACCGACAAC	AGCCTCATCCAGAACACGAC
Nrf2	CGCTACCGTCAGCTACCAAT	CGGCTCCCTCTAAGTGACTG
RLp32	GCTATGACAAGCTTGCCCCCA	TCATCAGCACCTCCAGCT

2.9 SILENCIAMENTO POR RNAi DO GENE DA GLUTAMINA SINTETASE 1 E NRF2

Um fragmento de 485 pb do gene da Glutamina Sintetase 1 (AAEL001887) e um fragmento de 445 pb do gene Nrf2 (AAEL019563) foram amplificados a partir do cDNA do epitélio intestinal de mosquitos BF (*Blood Fed*), 24 horas após alimentação. Os iniciadores utilizados para essa amplificação possuem a sequência T7 na porção 5' para a ligação da RNA polimerase. Como controle, foi utilizado um fragmento de 452 pb do gene LacZ, amplificado do plasmídeo pAAV LacZ Vector.

Os produtos da amplificação foram purificados utilizando o *kit QIAquick® PCR Purification Kit* (Qiagen) e utilizados como molde para a reação de transcrição *in vitro* para a síntese da dupla fita de RNA (dsRNA), utilizando o *Kit MEGAscript RNAi Kit* (Ambion), seguindo as recomendações do fabricante. As sequências de oligonucleotídeos são apresentados na Tabela 4.

Os experimentos de silenciamento gênico foram feitos através da injeção de 69 nL de dsGS1 ou dsNrf2 (3µg/µL) ou dsLacZ (gene não relacionado ao dsRNA) no tórax de fêmeas de *Aedes aegypti* com 4 a 5 dias de adultas, utilizando microinjetor (Nanoject II – Drummond Scientific). Dois dias após a injeção, os mosquitos foram desafiados com sangue humano ou sangue contendo a cepa DENV-4 TVP/360 na concentração de 1x10⁶ PFU/mL, conforme item 2.4. O silenciamento foi confirmado 24 horas após alimentação ou infecção, seguindo item 2.8.1. e 2.8.2. Um grupo de 20 mosquitos silenciados para dsGS1, dsNrf2 e dsLacZ foram separados em gaiolas após a infecção com TVP/360 e tiveram sua carga viral quantificada em 7dpi, conforme item 2.6.

Tabela 4. Lista de oligonucleotídeos utilizados para a construção do dsRNA. Em vermelho está a sequência de ligação T7 para a RNA polimerase.

Genes	5' - 3'	Oligonucleotídeos
GS1	Primer senso	taatacgactcactatagggCCTATGTGTGGATCGATGG
	Primer anti-senso	taatacgactcactatagggGTCAACTCCAGCATAGAG
LacZ	Primer senso	taatacgactcactatagggGTGTGATCATCTGGTCGC
	Primer anti-senso	taatacgactcactatagggGTCAACTCCAGCATAGAG
Nrf2	Primer senso	taatacgactcactatagggGAACAGCGCTTTCAGGATCT
	Primer anti-senso	taatacgactcactatagggCGCATGGTGTACATACCCTC

2.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os experimentos foram analisados através do software GraphPad Prism 9, utilizando teste não pareado Kruskal – Wallis, Teste Log-rank (Mantel Cox) para curva de sobrevivência, teste T de *Student* de acordo com o desenho experimental. As barras representam a média ou mediana juntamente com erro padrão da média, como detalhado na legenda das figuras.

3 RESULTADOS

3.1 INFECÇÃO DO *Aedes aegypti* COM DIFERENTES DOSES DE DENV-4 TVP/360.

O *Aedes aegypti* é suscetível às infecções por diversos arbovírus, como DENV, Zika e CHIKV. A infecção não gera um grande impacto na saúde geral do mosquito (OLIVEIRA; BAHIA; VALE, 2020). Essa adaptação está relacionada à competência vetorial do inseto (LAMBRECHTS; SALEH, 2019; OLIVEIRA; BAHIA; VALE, 2020). Estudos realizados por Long et al., (2019) mostraram que mosquitos *Aedes aegypti* se infectam com doses entre 10^2 e 10^6 PFU/mL de soro. Diante disso, decidimos investigar o impacto de diferentes doses da cepa laboratorial DENV-4 TVP/360 na sobrevivência dos mosquitos *Aedes aegypti*. Para isso, fêmeas foram alimentadas oralmente com sangue humano suplementado com diferentes concentrações virais - 10^5 , 10^6 e 10^7 PFU/mL de sangue (Figura 3A). Os mosquitos totalmente ingurgitados foram selecionados para a determinação da carga viral logo após a alimentação (tempo zero, T=0), através do ensaio de placa (Figura 3B e 3C). Em seguida, avaliamos o impacto dessas infecções na sobrevivência dos mosquitos, monitorando diariamente a curva de sobrevivência até que todos os mosquitos estivessem mortos.

Nenhuma das diferentes concentrações testadas de TVP/360 resultou em redução significativa na longevidade dos mosquitos infectados (Figura 3D e 3E).

Nossos dados sugerem que o *Aedes aegypti* possui uma alta capacidade de defesa (resistência e tolerância) quando desafiado com diferentes doses da cepa DENV-4 TVP/360, uma vez que não houve impacto negativo na longevidade dos mosquitos testados.

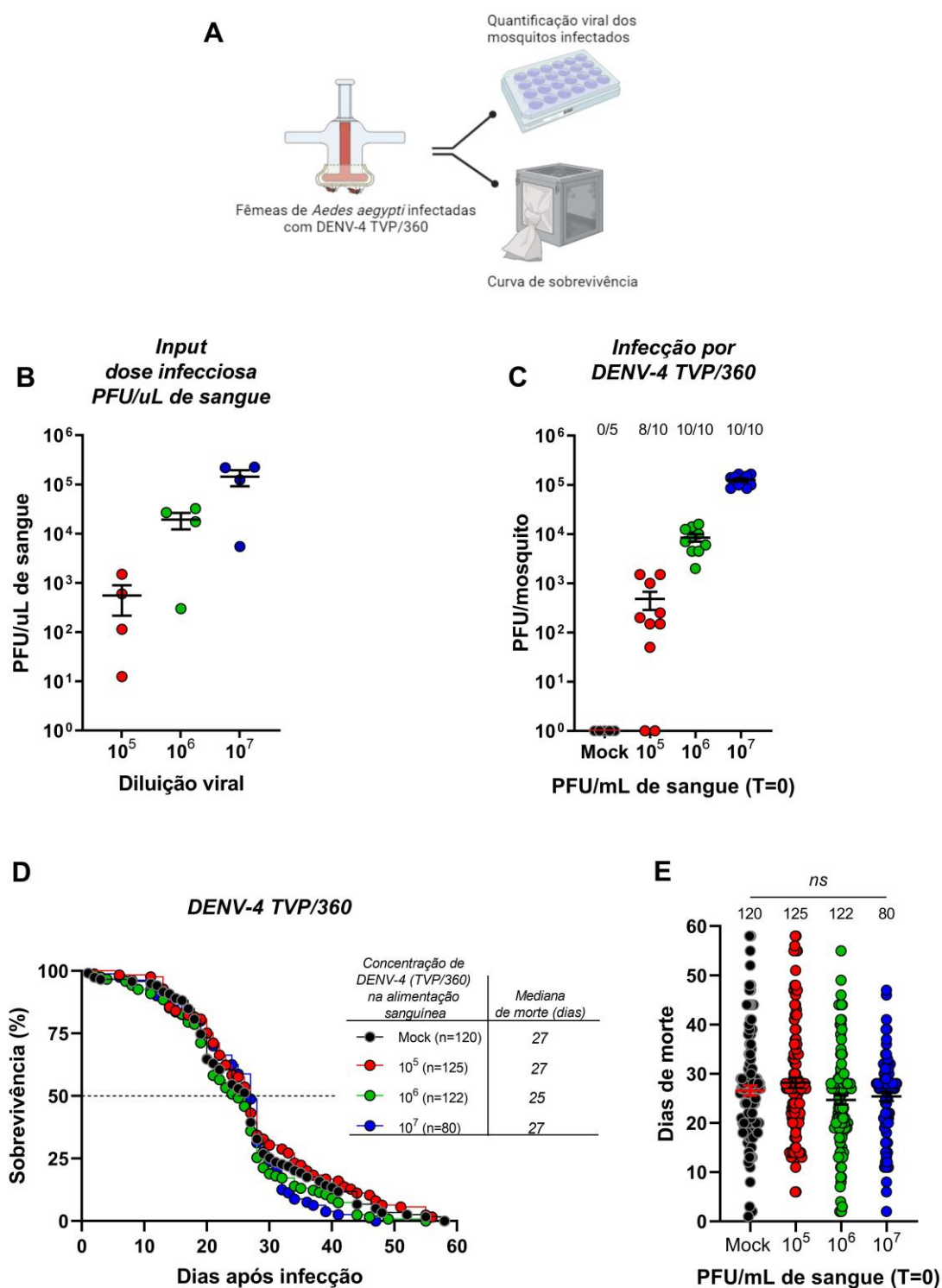


Figura 3. Mosquitos *Aedes aegypti* infectados com diferentes concentrações de DENV-4 TVP/360.

(A) Desenho experimental. Fêmeas de *Aedes aegypti* foram alimentadas com sangue humano suplementado com diferentes concentrações do vírus DENV-4 TVP/360. (B) *Input* - é definido como a concentração de partículas infecciosas presentes na alimentação sanguínea oferecida aos mosquitos (PFU/ μ L de sangue). (C) Cada ponto refere-se a um mosquito fêmea que teve sua carga viral quantificada através de ensaio de placa, no tempo zero (T=0), dia da infecção. (D) Sobrevivência dos mosquitos desafiados com diferentes concentrações de DENV-4. A sobrevivência dos mosquitos foi registrada diariamente ao longo de toda a vida do inseto. A linha

preta pontilhada representa 50% da mortalidade dos insetos. Esse experimento foi realizado de forma independente 6 vezes e o dado apresentado é o somatório de todas as replicatas. (E) Dia de morte de cada mosquito submetido às diferentes doses. (C) Resultado representativo de 2 experimentos independentes. O número de amostras testadas está indicado na parte superior de cada coluna. Todos os experimentos possuem média com +/- erro padrão. (D) Teste Log-rank (Mantel Cox) para curva de sobrevivência, (E) A significância estatística foi determinada pelo teste de Kruskal-Wallis.

3.2 DIFERENTES DOSES DE DENV-4 TVP/360 NÃO AFETAM A INTENSIDADE DA INFECÇÃO, MAS MODIFICAM A PREVALÊNCIA EM MOSQUITOS *Aedes Aegypti*

O estudo da intensidade e prevalência da infecção em mosquitos *Aedes aegypti* infectados com DENV é crucial para o entendimento da dinâmica da infecção e competência vetorial (NOVELO et al., 2019).

Dessa forma, selecionamos duas concentrações virais da cepa TVP/360 - 10^6 e 10^7 PFU/mL de sangue, ambas testadas nos experimentos de sobrevivência. A concentração viral de 10^7 PFU/mL corresponde ao valor máximo da titulação viral em células C6/36. As fêmeas do mosquito foram alimentadas com sangue humano suplementado com TVP/360 e após a infecção, os mosquitos foram separados em grupos de 0, 7, 14 e 21 dias após infecção (dpi) (Figura 4). Cada grupo de mosquitos teve sua carga viral quantificada por ensaio de placa, os dados são apresentados na Figura 4B e 4C.

Nossos resultados de intensidade da infecção para a maior dose da cepa TVP/360 mostraram uma pequena oscilação na carga viral ao longo do tempo (7 e 14 dpi), não apresentando grandes diferenças no título viral e sugerindo um baixo grau de resistência e uma possível saturação da capacidade de crescimento (10^5 PFU/mL de sangue) (Figura 4B). No grupo de mosquitos alimentados com 10^6 PFU/mL de TVP/360, foi constatado um aumento na carga viral nos mosquitos do 21 dpi, fato esse que difere do *Input* e demais grupos testados (Figura 4C).

A prevalência da infecção para a maior dose, nos dias 7, 14 e 21 dpi foi de 53,33%, 84% e 89,28%, respectivamente (Figura 4D). Para a dose de 10^6 PFU/mL a prevalência para o 7 dpi foi de 26,66%, enquanto que para o 14 e 21 dpi esse resultado foi ainda menor - 16,66% e 13,63%, respectivamente (Figura 4E).

Identificamos uma variação na dinâmica da infecção ao comparar as duas doses virais testadas para a cepa TVP/360. Esses resultados apontam que,

independentemente da concentração viral fornecida aos mosquitos, a carga viral tende a se manter próxima à dose inicial ou até aumentar ao longo do tempo. Já a prevalência da infecção é diretamente influenciada pela dose inicial de vírus: quanto maior a dose, maior será a prevalência da infecção, fenômeno já observado em diversos estudos relacionados à infecção de DENV em *Aedes* (DUONG et al., 2015; NGUYEN et al., 2013; NOVELO et al., 2019).

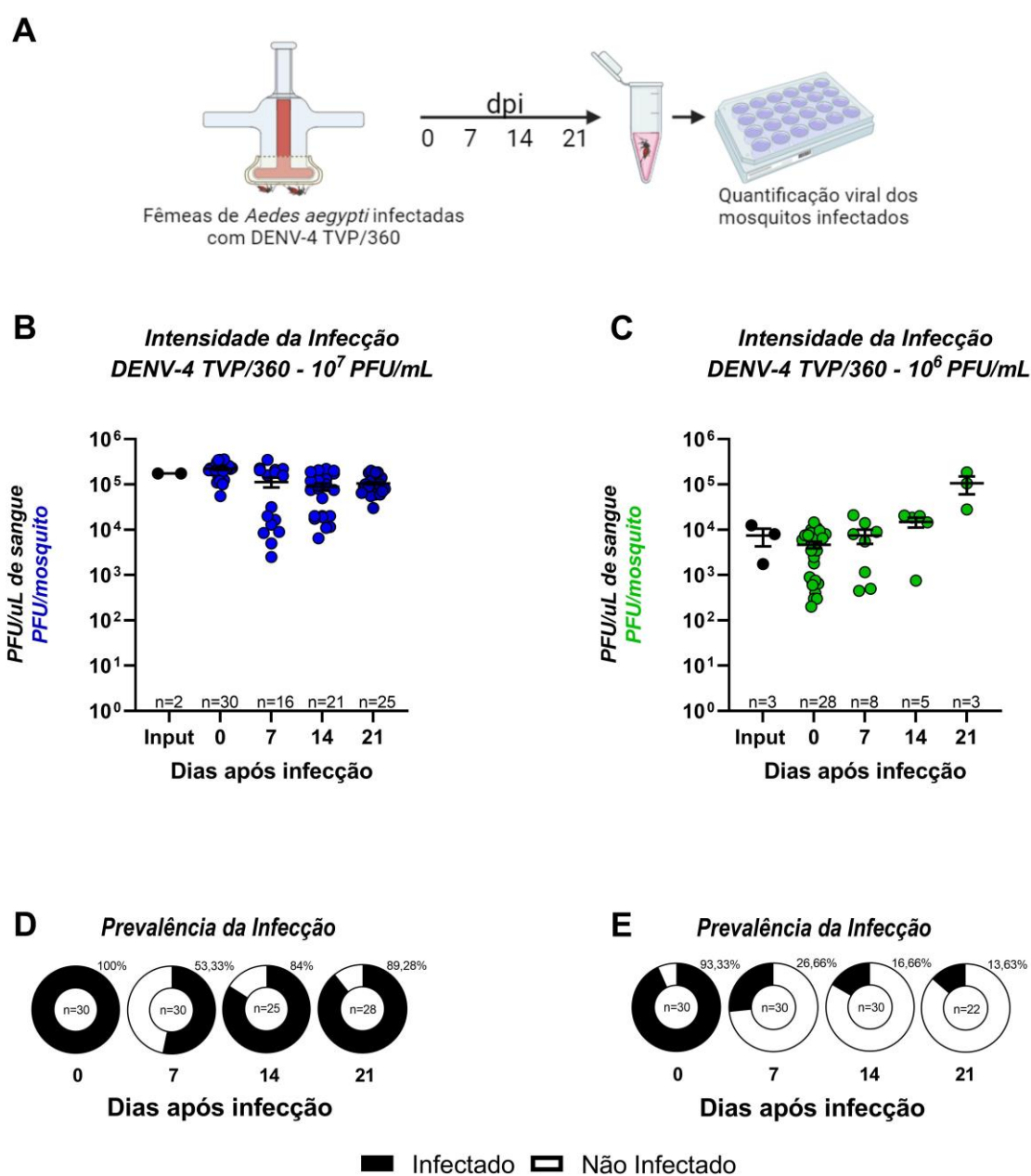


Figura 4. Intensidade e prevalência da infecção de DENV-4 TVP/360 em mosquitos *Aedes aegypti*.

(A) Desenho experimental. (B-C) Os mosquitos foram alimentados com sangue humano contendo diferentes concentrações do DENV-4, sendo 10^6 e 10^7 PFU/mL. Cada ponto refere-se a um mosquito fêmea que teve sua carga viral quantificada através de ensaio de placa em diferentes

dias após infecção (0, 7, 14 e 21 dpi). O *Input* representa a quantidade de vírus oferecido aos mosquitos por μL de sangue. (D-E) O gráfico de setores indica a prevalência da infecção por DENV-4 em cada grupo em diferentes dias após a infecção. O número de amostras testadas está indicado abaixo de cada coluna. Estes resultados apresentam média e +/- erro padrão e são representativos de 3 experimentos independentes para cada grupo.

3.3 INFECÇÕES PELA CEPA DENV-4 LRV 13/422 NÃO ALTERAM A SOBREVIVÊNCIA DOS MOSQUITOS *Aedes Aegypti* DESAFIADOS POR DIFERENTES DOSES

A resposta de defesa do mosquito vetor pode ser diferente dependendo da interação com outras cepas virais (NOVELO et al., 2023). Por esse motivo, uma vez que as infecções pela cepa DENV-4 TVP/360 (cepa adaptada ao laboratório), não afetaram o tempo de vida dos mosquitos, foi realizada uma nova curva de sobrevivência utilizando a cepa clínica DENV-4 LRV 13/422. Fêmeas de mosquito foram infectadas com duas doses da cepa LRV 13/422 – 10^5 e 10^6 PFU/mL (Figura 5A). A concentração viral de 10^6 PFU/mL corresponde ao valor máximo da titulação viral em células C6/36. As fêmeas totalmente ingurgitadas foram selecionadas para a determinação da carga viral logo após a alimentação sanguínea ($T=0$), através do ensaio de placa (Figuras 5B e 5C).

Os experimentos de sobrevivência com mosquitos infectados pela cepa LRV 13/422 não apresentaram diferença estatística na sobrevivência dos insetos testados (Figura 5D e 5E). A mediana de morte para o grupo controle foi de 42 dias, enquanto que para os mosquitos infectados com doses em 10^5 e 10^6 foi de 33 e 40 dias, respectivamente.

Esses resultados são os mesmos encontrados para as infecções com a cepa TVP/360 (Figura 3D e 3E).

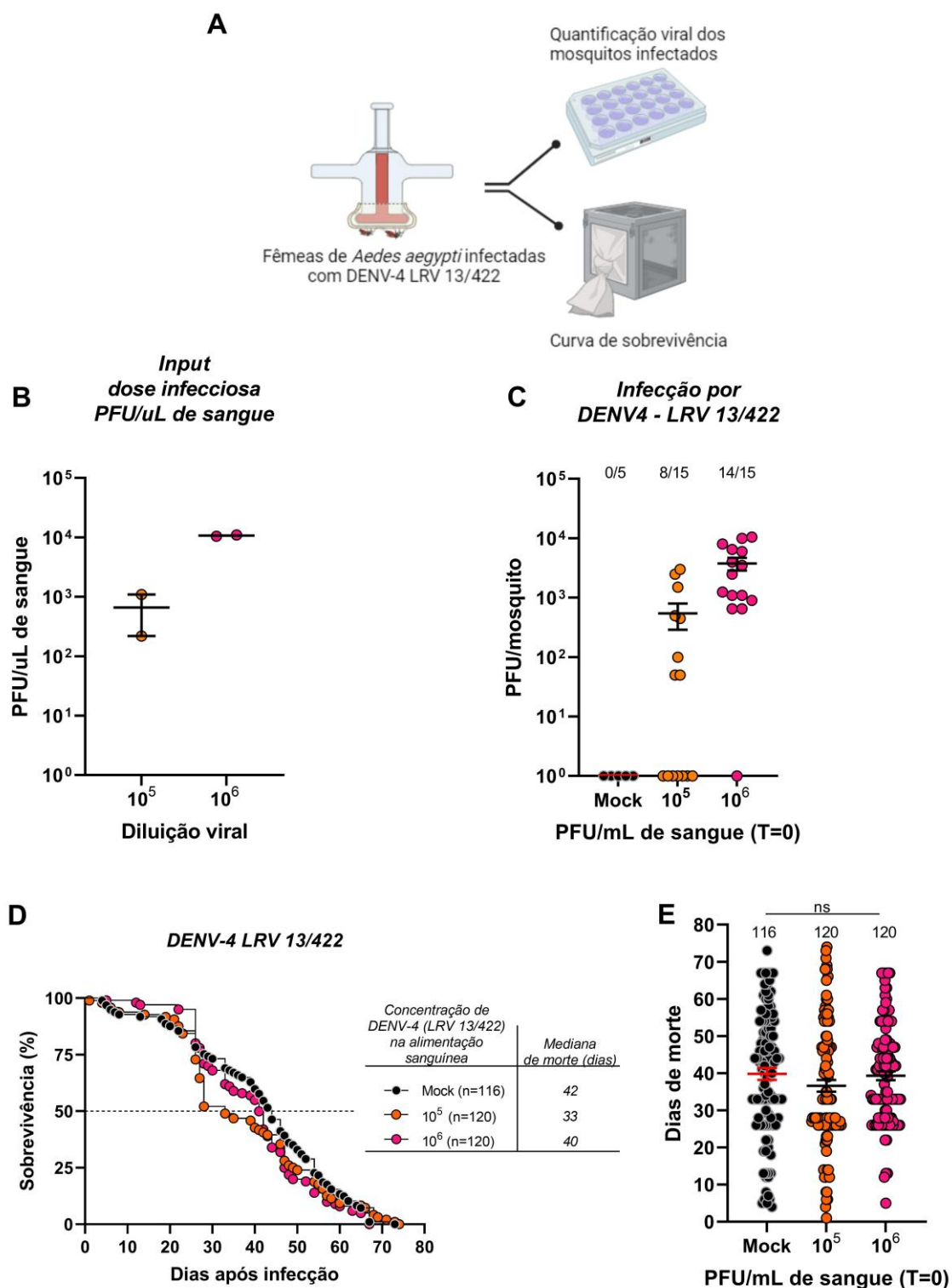


Figura 5. Mosquitos *Aedes aegypti* infectados com diferentes concentrações de DENV-4 LRV 13/422.

(A) Desenho experimental. Fêmeas de *Aedes aegypti* foram alimentadas com sangue humano suplementado com diferentes concentrações do vírus DENV-4 LRV 13/422. (B) *Input* - é definido como a concentração de partícula infecciosa presente na alimentação sanguínea oferecida aos mosquitos (PFU/ μ L de sangue). (C) Cada ponto refere-se a um mosquito fêmea que teve sua carga viral quantificada através de ensaio de placa, no tempo zero (T=0), dia da infecção. (D) Curva dose-resposta apresentando a sobrevivência dos mosquitos desafiados com diferentes

concentrações de DENV-4. A sobrevivência dos mosquitos foi registrada diariamente ao longo de toda a vida do inseto. A linha preta pontilhada representa 50% da mortalidade dos insetos. Esse experimento foi realizado de forma independente 4 vezes e o dado apresentado é o somatório de todas as replicatas. (E) Dia de morte de cada mosquito submetido às diferentes doses. (C) Resultado representativo de 2 experimentos. O número de amostras testadas está indicado na parte superior de cada coluna. Todos os experimentos possuem média com +/- erro padrão. (D) Teste Log-rank (Mantel Cox) para curva de sobrevivência, (E) A significância estatística foi determinada pelo teste de Kruskal-Wallis.

3.4 DIFERENTES DOSES DE DENV-4 LRV 13/422 ALTERAM A INTENSIDADE DA INFECÇÃO E MODIFICAM A PREVALÊNCIA EM MOSQUITOS *AEDES AEGYPTI*

Após os resultados obtidos para a curva de sobrevivência da cepa LRV 13/422, decidimos avaliar a intensidade e prevalência da infecção dos mosquitos infectados em diferentes dias após a infecção. Para esses experimentos, infectamos os mosquitos com a dose mais alta para o LRV 13/422, sendo de 10^6 PFU/mL de sangue. Após a infecção, somente as fêmeas totalmente ingurgitadas foram separadas em gaiolas e tiveram sua carga viral quantificada por ensaio de placa nos dias 0, 7, 14 e 21 dpi. (Figura 6A).

A Figura 6B apresenta os resultados obtidos para a intensidade da infecção. Observamos que houve um aumento na carga viral dos mosquitos quantificados nos dias 7 e 14 dpi quando comparados aos valores do *Input* e T=0. O 21 dpi apresentou carga viral média de 10^4 PFU/mosquito. Também foi verificada uma variação na carga viral entre os grupos de mosquitos testados, sendo um valor mínimo de 10^2 PFU/mosquito e uma concentração maior próxima a 10^6 PFU/mosquito, superando a carga viral quantificada no *Input* e no dia da infecção (T=0). Verificamos uma oscilação na carga viral média no decorrer dos 21 dias.

A baixa na prevalência da infecção foi notada para os grupos de 7 dpi com 23,33% e 14 dpi com 36,66% (Figura 6C). A prevalência da infecção determinada para o 21 dpi foi de 33,33%.

A prevalência da infecção mostrou-se diferente entre a cepa laboratorial e o isolado clínico (Figura 4E e Figura 6C). A partir do 14 dpi a prevalência da infecção foi maior para a cepa LRV 13/422, sendo de 36,66% contra 16,66% da cepa TVP/360. Para o dia 21 após infecção, o TVP/360 apresentou prevalência de 13,63% e o LRV 13/422 de 33,33%.

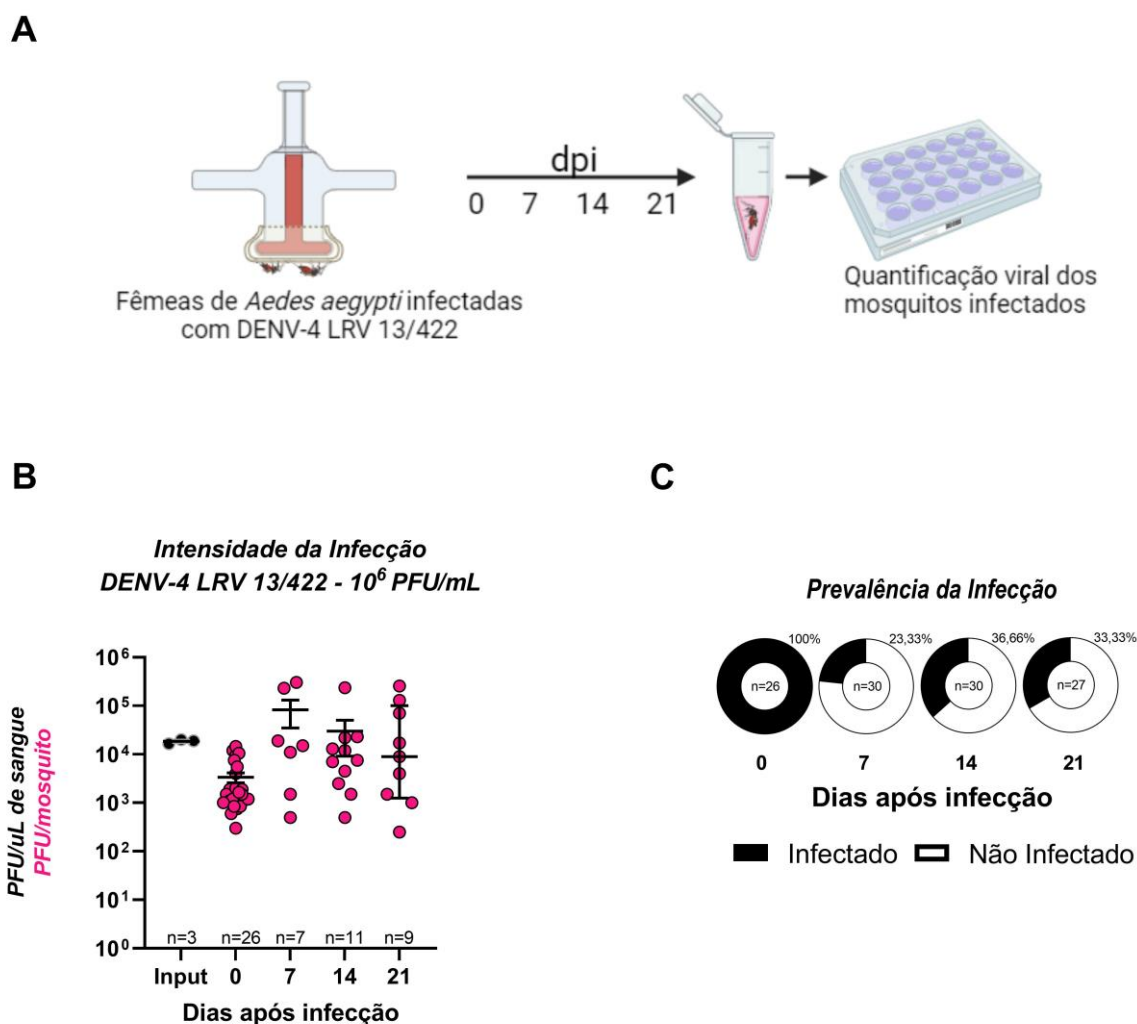


Figura 6. Intensidade e prevalência da infecção do DENV-4 LRV 13/422 em mosquitos *Aedes aegypti*.

(A) Desenho experimental. (B) Os mosquitos foram alimentados com sangue humano contendo DENV-4 na concentração de 10^6 PFU/mL. Cada ponto refere-se a um mosquito fêmea que teve sua carga viral quantificada através de ensaio de placa em diferentes dias após infecção (0, 7, 14 e 21 dpi). O *Input* representa a quantidade de vírus oferecido aos mosquitos por μ L de sangue. (C) O gráfico de setores indica a prevalência da infecção por DENV-4 em cada grupo em diferentes dias após a infecção. O número de amostras testadas está indicado abaixo de cada coluna. Estes resultados apresentam média e +/- erro padrão e são representativos de 3 experimentos independentes para cada grupo.

O primeiro conjunto de experimentos confirmou a alta capacidade de defesa do *Aedes aegypti* contra diferentes concentrações e cepas virais. Mesmo quando desafiados com a maior dose administrada de vírus, que foi de 10^7 PFU/mL de sangue (TVP/360), os mosquitos testados não tiveram seu tempo de vida impactado em condições controladas no insetário. A variação da carga viral em todo o corpo do mosquito também revelou como diferentes cepas (laboratorial e isolado clínico) interagem com o vetor durante a infecção.

Esses resultados nos impulsionaram a buscar novas abordagens na tentativa de entender a resposta de tolerância do *Aedes aegypti*, que é um importante disseminador das arboviroses no país. O mosquito parece tolerar infecções persistentes por arbovírus sem sofrer grandes impactos na saúde e na sobrevivência, o que sugere que a infecção ativa mecanismos de tolerância no mosquito.

Por isso, o segundo conjunto de experimentos buscou identificar essas defesas adaptativas e inibir vias metabólicas que podem levar à mortalidade do mosquito vetor. Nós avaliamos um grupo de genes associados ao metabolismo e à defesa antioxidante, considerados candidatos a promotores de tolerância nos mosquitos infectados com o vírus dengue.

3.5 GENES CANDIDATOS A PROMOTORES DE TOLERÂNCIA EM *Aedes aegypti*

Para investigar o mecanismo biológico envolvido no processo de tolerância dos mosquitos *Aedes aegypti*, foi selecionado um grupo de genes redox e antioxidantes, como candidatos a promotores de tolerância.

A busca pelos genes de interesse foi baseada na reanálise de dados publicados por ZANINI e colaboradores (2018), que empregaram a técnica viscRNA-seq para analisar o transcriptoma de células únicas infectadas com DENV. Nesse estudo, células de hepatócito humano (Huh7) foram infectadas com o vírus DENV-2, e seus transcriptomas foram examinados ao longo do tempo, *in vitro* durante a infecção. Os dados foram então re-analisados através de filtragem computacional utilizando o algoritmo CellRouter (LUMMERTZ DA ROCHA et al., 2018), que é capaz de agrupar subpopulações de células com respostas transcricionais semelhantes. Essa análise resultou na identificação de 9 grupos de células com respostas transcricionais coordenadas/similares (Figura 7A), dos quais os grupos 2, 3, 4, 8 e 9 demonstraram uma prevalência significativa de células infectadas por DENV-2 (Figura 7B). Em seguida, utilizamos a ferramenta *Gene Ontology* para filtrar os termos relacionados ao metabolismo redox e antioxidantes, com a premissa de que esses genes são candidatos a promotores de tolerância pois protegem o tecido do ataque inespecífico de espécies reativas de oxigênio durante a resposta imune à infecção (SOARES; RIBEIRO, 2015). Identificamos 27 genes diferencialmente expressos nas células Huh7 infectadas com DENV-2 e procuramos seus ortólogos em *Aedes aegypti*.

Observamos que os 14 genes candidatos já haviam sido flagrados como diferencialmente expressos em *Aedes aegypti* infectado com arbovírus em transcriptomas de tecido total (e não células únicas), o que validou nossa abordagem utilizado as células Huh7 e o Cell Router (Tabela 5). Além disso, incluímos na lista os genes da catalase (*cat1a*) e do regulador transcricional Nrf2 (*nuclear factor erythroid-derived factor 2*), totalizando 16 genes de interesse.

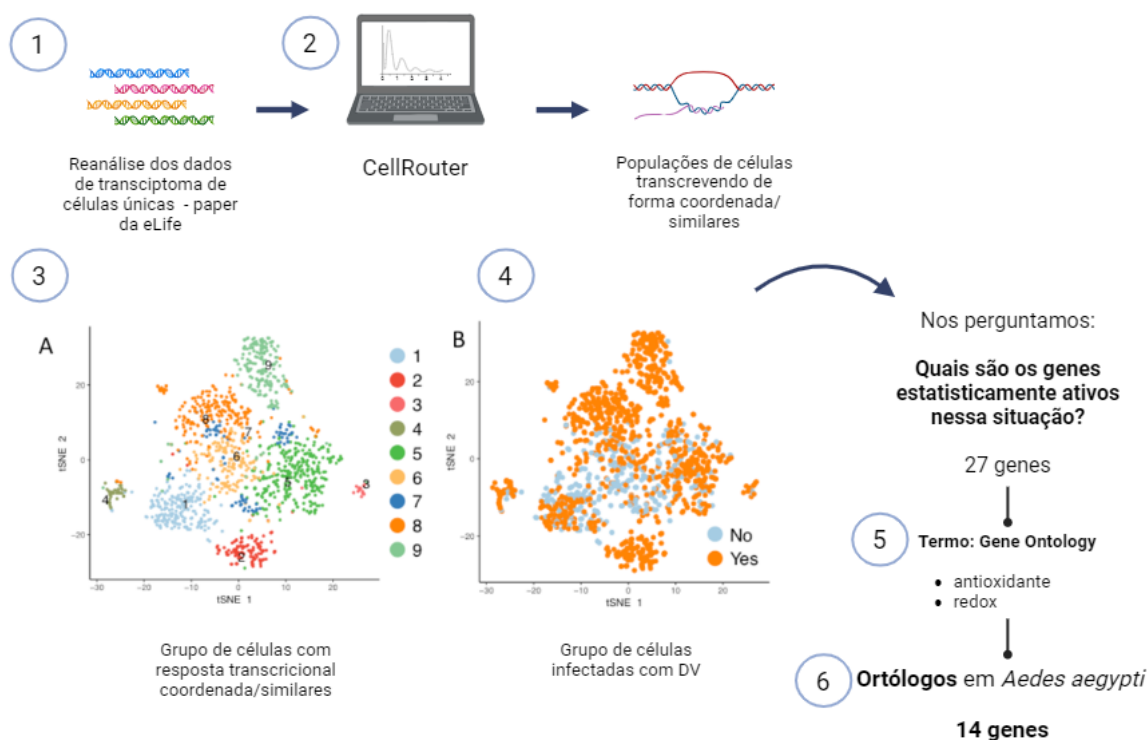


Figura 7. Esquema representativo da seleção de genes candidatos a promotores de tolerância em mosquitos *Aedes aegypti*.

(1) Reanálise dos dados publicados por ZANINI et al., (2018). (2) Identificação da transcrição coordenada de células infectadas através do algoritmo CellRouter (LUMMERTZ DA ROCHA et al., 2018). (3) Grupos de células com respostas transcricionais similares. (4) Identificação dos grupos infectados com dengue. (5) Ferramenta *Gene Ontology* para os termos redox e antioxidante e seleção dos genes. (6) Genes ortólogos em mosquito *Aedes aegypti*.

Tabela 5. Lista dos genes selecionados para o estudo em *Aedes aegypti*.

Genes	Genes <i>Aedes aegypti</i>	Nome	Bulk-transcriptomes DENV
apex1	AAEL010781	ap endonuclease	Raquin et al., 2017
erp44	AAEL013845	endoplasmic reticulum resident protein (ERp44)	Colpitts et al., 2011
dnajc16	AAEL002502	putative chaperone	Behura et al., 2011
glrx	AAEL001109	glutaredoxin	Colpitts et al., 2011
GS1	AAEL001887	glutamine synthetase 1, 2 (glutamate-ammonia ligase)	Raquin et al., 2017
p4hb	AAEL000641	protein disulfide isomerase	Colpitts et al., 2011
pdia3	AAEL001432	protein disulfide isomerase	Colpitts et al., 2011
pdia6	AAEL010065	protein disulfide-isomerase A6 precursor	Suzuki et al., 2017
prdx1	AAEL019408	2-Cys thioredoxin peroxidase	Raquin et al., 2017
txn	AAEL010777	thioredoxin	Behura et al., 2014
gsto1	AAEL017085	glutathione transferase	Raquin et al., 2017
park7	AAEL004081	dj-1 protein (park7)	Colpitts et al., 2011
sod1	AAEL019938	putative SOD	Colpitts et al., 2011
sod ?	AAEL012368	putative SOD	Colpitts et al., 2011

3.6 EXPRESSÃO DOS GENES CANDIDATOS A TOLERÂNCIA EM *Aedes Aegypti*

Uma vez que os 16 genes antioxidantes foram previamente selecionados, analisamos a expressão de cada gene no intestino e na carcaça (tórax e abdome – que contém a maior parte do corpo gorduroso) do mosquito *Aedes aegypti* em 24 horas após infecção (hpi), e aos 4 e 7 dias após infecção (dpi). Utilizamos três grupos de mosquitos: Grupo Não Infectado, alimentado somente com sangue; Grupo Infectado, alimentado com sangue e inóculo viral de 10^7 PFU/mL de DENV-4 TVP/360; e o Grupo Controle SF (Sugar Fed), alimentado com sacarose a 10%. Em todas as alimentações contendo sangue, foi utilizado 1% de ATP (1mM) como fagoestimulante. Após a alimentação/infecção, as fêmeas totalmente ingurgitadas foram selecionadas e mantidas em gaiolas, sendo dissecadas nos diferentes tempos. Em seguida, o RNA total de um conjunto de 10 intestinos ou carcaças foi extraído e a síntese de cDNA foi realizada. Para avaliar a expressão dos genes, as amostras foram analisadas por RT-qPCR.

Nossos dados revelaram que nas primeiras 24 horas houve um aumento de cerca de 120x (vezes) do RNAm do gene da Glutamina Sintetase 1 (GS1) no intestino do grupo infectado. Para o grupo não infectado o aumento foi de aproximadamente

100x, o que indica que a GS1 é modulada positivamente no momento da alimentação sanguínea, independente da presença do vírus (Figura 8A). Analisamos também a expressão do RNAm codificante para o gene Nrf2, o qual apresentou um aumento na presença do vírus (4x). Para o RNAm da enzima antioxidante catalase observamos um aumento na transcrição na presença de sangue de 11x em ambos os grupos testados. As demais sequências gênicas analisadas variaram em seus níveis de expressão entre 2x e 10x na presença ou não do vírus.

Ao avaliarmos a expressão do RNAm dos genes selecionados no intestino dos mosquitos no 4 dpi, a maioria deles não apresentou expressão maior que 2x quando comparada ao grupo controle (SF). Observou-se também que os grupos Não Infectado e Infectado mostraram um perfil de expressão similar entre eles (Figura 8B).

No dia 7 dpi, ambos os grupos - Infectado e Não infectado - apresentaram um perfil de expressão próximo ou igual ao grupo controle (Figura 8C). Esses resultados indicam que os níveis de RNAm no intestino do inseto foram modulados positivamente na presença de sangue e/ou vírus e após o término da digestão sanguínea eles retornaram ao seu nível basal de expressão. A Figura 8D demonstra o aumento do RNAm de TVP/360 no decorrer do tempo, confirmando a presença do vírus no intestino do inseto.

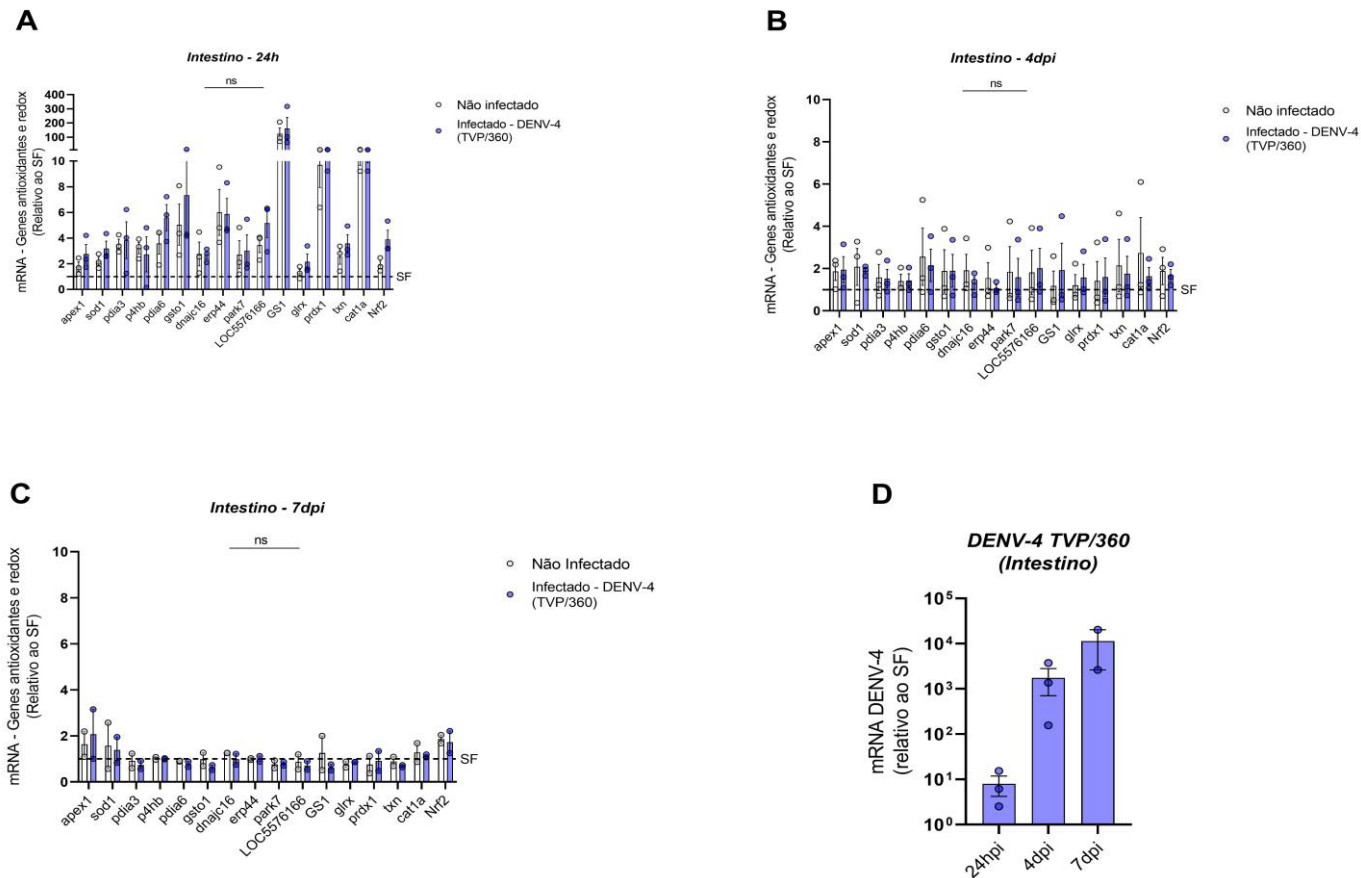


Figura 8. Expressão relativa dos genes antioxidantes em *Aedes aegypti* infectados com DENV-4 TVP/360.

Os mosquitos foram alimentados com sangue humano contendo 10^7 PFUs/mL de DV4 TVP/360 e o fagoestimulante ATP (1mM). Um pool de 10 intestinos foi dissecado (A) 24 horas após infecção (hpi), (B) 4 dpi e (C) 7 dpi. O RNAm total foi extraído e o cDNA foi testado através RT-qPCR para detectar a expressão relativa dos genes redox e antioxidantes. O Grupo Não Infectado foi alimentado com sangue humano mais o sobrenadante de células C6/36 e ATP. O grupo controle, SF (*Sugar Fed*), foi alimentado com solução de sacarose 10%. (D) Controle positivo para a presença de DENV-4 TVP/360. Esses resultados apresentam média e +/- erro padrão e são representativos de 2 a 3 experimentos independentes. A significância estatística foi determinada entre os grupos Não Infectado e Infectado com TVP/360 através do teste T de *Student* para cada um dos genes.

Também foi avaliada a expressão dos genes de interesse na carcaça (tórax e abdome) dos mosquitos *Aedes aegypti*, sendo selecionado apenas os tempos 4 e 7 dpi (Figura 9). No grupo 4 dpi, os genes *gst1* e *prdx1* aumentaram suas transcrições em até 8x na presença do vírus e 4x a 6x somente no grupo alimentado com sangue (Figura 9A). Para o RNAm do gene *Nrf2* o aumento foi de 6x para ambos os grupos quando comparado ao controle. O gene *dnajc16* apresentou uma expressão de 4x e 5x no grupo Não Infectado e Infectado, respectivamente. Os demais genes apresentaram oscilações entre 1x a 4x em seus níveis de transcrição.

As análises de expressão gênica no 7 dpi mostraram que o gene *apex1* obteve um aumento de 4x, em ambos os grupos, em relação ao grupo alimentado com açúcar. Os demais genes oscilaram entre 1x a 2x o aumento da expressão em relação ao SF (Figura 9B). A Figura 9C apresenta o controle positivo para a presença de TVP/360 nas amostras testadas.

Esses resultados indicam que o gene da GS1 está altamente expresso no intestino dos mosquitos durante a alimentação sanguínea do inseto vetor independente da presença do vírus. Além disso, o gene *Nrf2* também apresenta um aumento frente à infecção viral. Observou-se também outros genes que oscilam em menor grau durante a alimentação e infecção. Os genes GS1 e *Nrf2* foram selecionados para o silenciamento através da técnica de RNA de interferência.

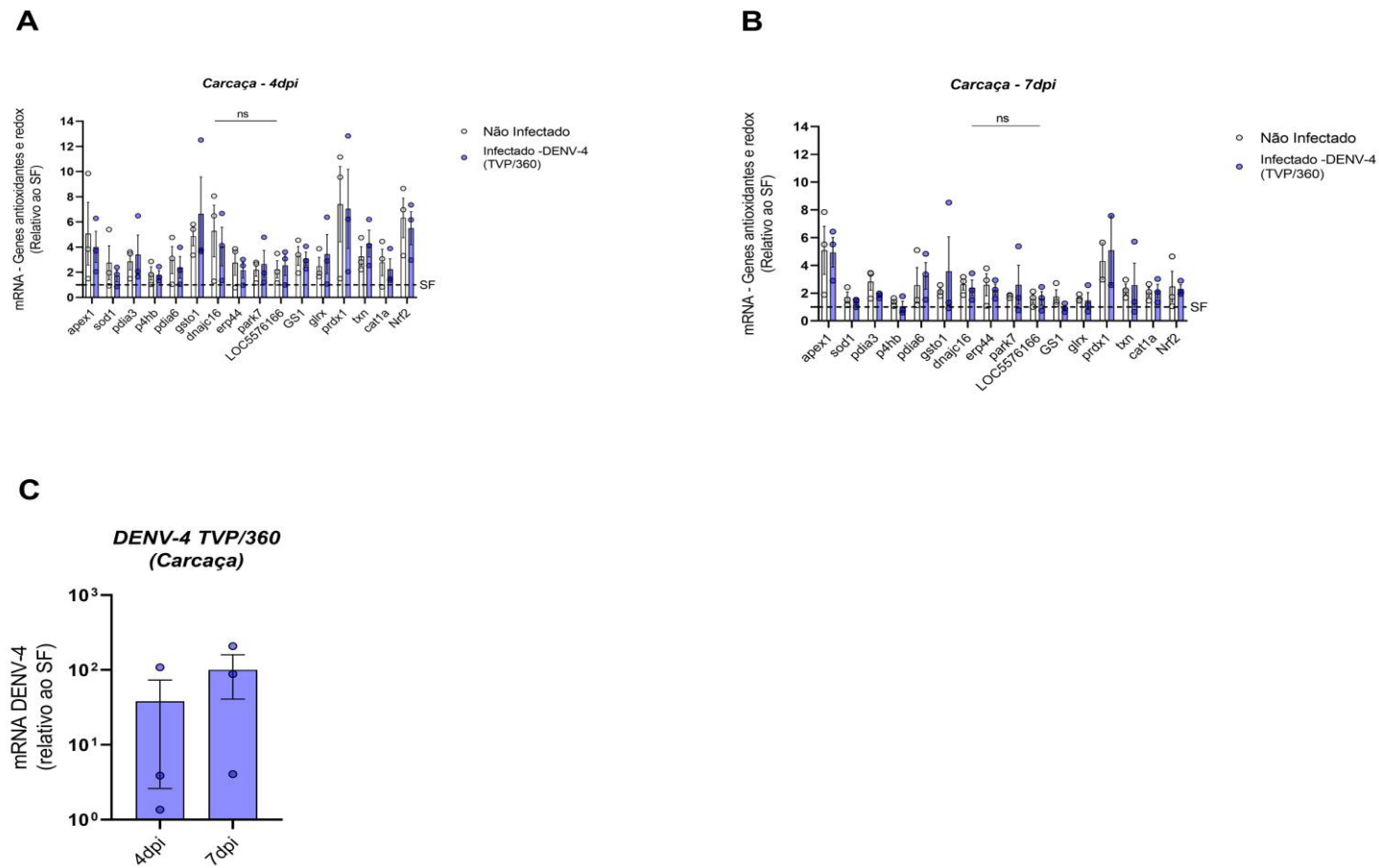


Figura 9. Expressão relativa dos genes e antioxidantes em *Aedes aegypti* infectados com DENV-4 TVP/360.

Os mosquitos foram alimentados com sangue humano contendo 10^7 PFUs/mL de DV4 TVP/360 e o fagoestimulante ATP (1mM). Um pool de 10 carcaças foram dissecadas (A) 4 dpi e (B) 7 dpi. O RNAm total foi extraído e o cDNA foi testado através RT-qPCR para detectar a expressão relativa dos genes redox e antioxidantes. O Grupo Não Infectado foi alimentado com sangue humano mais o sobrenadante de células C6/36 e ATP. O grupo controle, SF (*Sugar Fed*), foi alimentado com solução de sacarose 10%. (C) Controle positivo para a presença de DENV-4 TVP/360. Esses resultados apresentam média e +/- erro padrão e são representativos de 2 a 3 experimentos independentes. A significância estatística foi determinada entre os grupos Não Infectado e Infectado com TVP/360 através do teste T de *Student* para cada um dos genes.

3.7 SILENCIAMENTO DOS GENES DA GLUTAMINA SINTETASE 1 E NRF2 EM MOSQUITOS *Aedes aegypti*

A expressão do gene da Glutamina Sintetase 1 está altamente expressa no intestino do mosquito *Aedes aegypti* após alimentação sanguínea com e sem DENV-4 TVP/360. Isso sugere que o gene pode ter uma função importante no metabolismo do sangue, pois a GS1 é responsável pela síntese de glutamina, essencial na detoxificação do excesso de amônia no mosquito após alimentação sanguínea (SCARAFFIA, 2016). Além disso, hipotetizamos que sua modulação poderia impactar na infectividade do *Aedes aegypti* frente ao DENV-4. Para entender melhor a função do gene, realizamos o silenciamento por RNAi para avaliar como a ausência da GS1 pode afetar o crescimento do vírus no corpo do mosquito.

O gene Nrf2 também apresentou aumento na expressão do RNAm nas primeiras 24h após a alimentação/infecção com TVP/360. Esse gene desempenha um papel importante na fisiologia do mosquito, principalmente na homeostasia intestinal. O Nrf2 ajuda a manter a integridade da mucosa intestinal e atua na resistência à inseticidas e na invasão de patógenos (BOTTINO-ROJAS et al., 2018). O silenciamento deste gene pode gerar perturbações importantes no intestino do inseto e dessa forma impactar na infecção viral e competência do vetor.

Para avaliar o impacto do silenciamento em mosquitos *Aedes aegypti*, foram administrados dsRNA direcionados aos genes da GS1 e Nrf2. Após 48h do silenciamento, os mosquitos foram alimentados com sangue humano contendo 1% de ATP (1mM) como fagoestimulante. Em 24h e 4 dias após alimentação sanguínea (dpa), os mosquitos foram dissecados (cada cDNA foi formado por um “pool” de 10 intestinos ou 10 carcaças), o RNA total extraído e a síntese de cDNA realizada. Em seguida, os níveis de RNAm da GS1 e Nrf2 foram analisados por RT-qPCR. Como controle negativo, utilizamos uma parte da sequência do gene LacZ que não está presente no genoma do mosquito e por esse motivo não iria silenciar nenhum gene endógeno no inseto vetor. Além disso, funciona como agonista em potencial da via de RNAi por ser apresentado ao mosquito na forma de dsRNA.

Observou-se uma redução nos níveis transcricionais do gene da GS1 em torno de 80% ($p=0.0010$) no intestino dos mosquitos 24 horas após alimentação sanguínea (hpa). O efeito do silenciamento ficou próximo de 55% em 4 dpa (Figura 10A e 10C).

Na carcaça dos mosquitos, o efeito do dsRNA foi de 80% ($p=0.0005$) após 24h e de 42% após 4 dias (Figura 10B e 10D).

Quanto ao gene *Nrf2*, houve uma redução de 60% do transcrito no epitélio intestinal dos mosquitos em 24h e 4 dias após alimentação (Figura 10E e 10G). O efeito do dsRNA na carcaça foi de aproximadamente 60% enquanto em 4 dpa, apenas 10% (Figura 10F e 10H).

O silenciamento dos genes da GS1 e *Nrf2* em *Aedes aegypti* foi bem-sucedido, resultando em uma redução significativa da expressão desses genes. Esses resultados nos permitem avaliar o impacto do silenciamento da GS1 e *Nrf2* durante a infecção pela cepa DENV-4 TVP/360 no mosquito vetor.

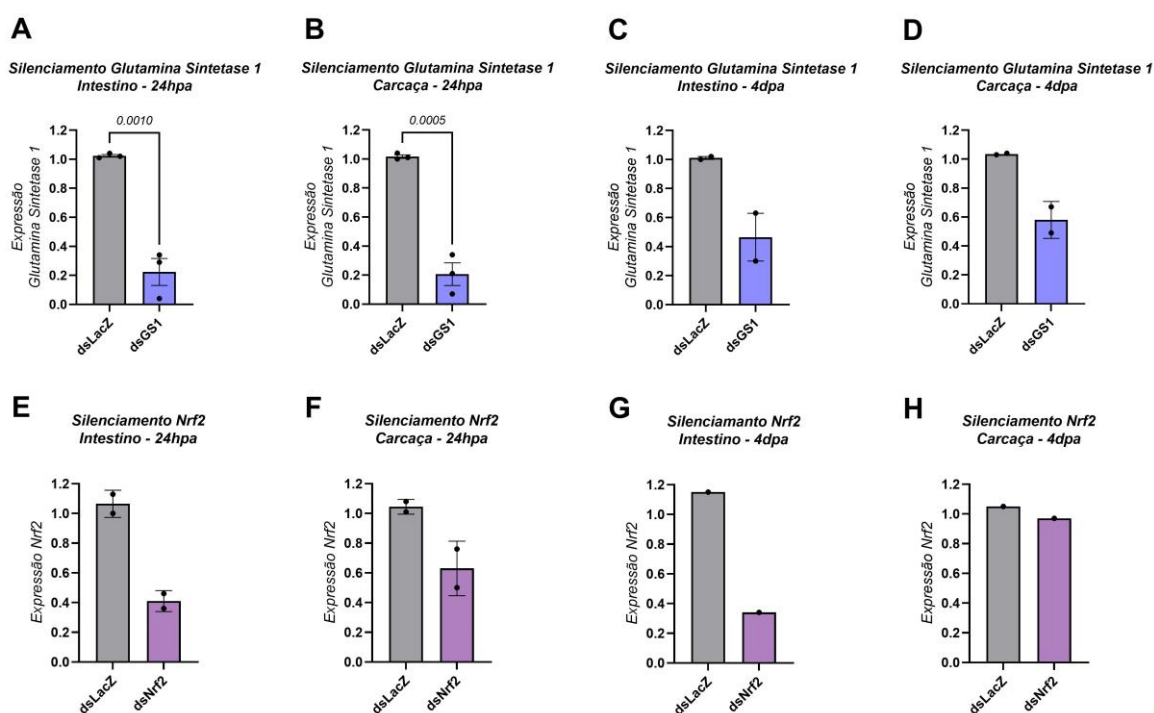


Figura 10. Silenciamento dos genes da Glutamina Sintetase 1 (GS1) e *Nrf2* em mosquitos *Aedes aegypti*.

Fêmeas de mosquitos com 4 a 5 dias de adulto, foram silenciadas por RNAi e 48h após o silenciamento foram alimentadas com sangue humano contendo fagoestimulante ATP (1mM). Um pool de 10 intestinos ou carcaças foram dissecadas em 24 horas após alimentação (hpa) e 4 dias após alimentação (dpa). O RNAm total foi extraído e o cDNA foi testado através RT-qPCR para detectar a expressão relativa dos genes *GS1* e *Nrf2*. Esses resultados apresentam média e +/- erro padrão e são representativos de 1 a 3 experimentos independentes. A significância estatística foi determinada através do teste T de *Student*.

3.8 A GLUTAMINA SINTETASE 1 E O NRF2 NÃO ALTERAM A INFECÇÃO E NEM A CARGA VIRAL DE DENV-4 TVP/360 EM MOSQUITOS *Aedes Aegypti*

Após realizarmos o silenciamento dos genes da GS1 e Nrf2 e confirmarmos sua eficácia, decidimos verificar se a redução da expressão desses genes afetaria a infecção viral no mosquito vetor. Para isso, fêmeas silenciadas para dsGS1 ou dsNrf2 foram infectadas com a cepa DENV-4 TVP/360 nas concentrações de 10^6 ou 10^9 PFU/mL de sangue. Após infecção os mosquitos foram separados em gaiolas e no 7 dpi suas cargas virais foram quantificadas por ensaio de placa (Figura 11).

O silenciamento do gene da GS1 e do gene Nrf2 em mosquitos *Aedes aegypti* não afetou a carga viral após a infecção com a cepa TVP/360 na concentração de 10^6 PFU/mL de sangue (Figura 13A). Ao realizar uma infecção com 10^6 PFU/mL de sangue, os mosquitos ingeriram aproximadamente 10^3 PFU/ μ L de DENV-4, o que consideramos uma quantidade muito baixa de vírus. Decidimos então, aumentar a dose da infecção (10^9 PFU/mL de sangue – vírus concentrado artificialmente) de forma que os mosquitos ingerissem uma quantidade de 10^6 PFU/ μ L de vírus e testamos qual seria o efeito do silenciamento da GS1 e Nrf2 em uma concentração viral mais alta (Figura 11B).

Observamos que mesmo aumentando a dose de vírus para a infecção, o silenciamento de ambos os genes não alterou a carga viral nos mosquitos testados. Todos os grupos, dsLacZ, dsGS1 e dsNrf2, apresentaram 100% de infecção após 7dpi e carga viral próxima de 10^5 PFU/mosquito.

Nossos resultados sugerem que a GS1 e o Nrf2 não afetaram a prevalência da infecção ou a carga viral dos mosquitos infectados pela cepa DENV-4 TVP/360 nas doses testadas.

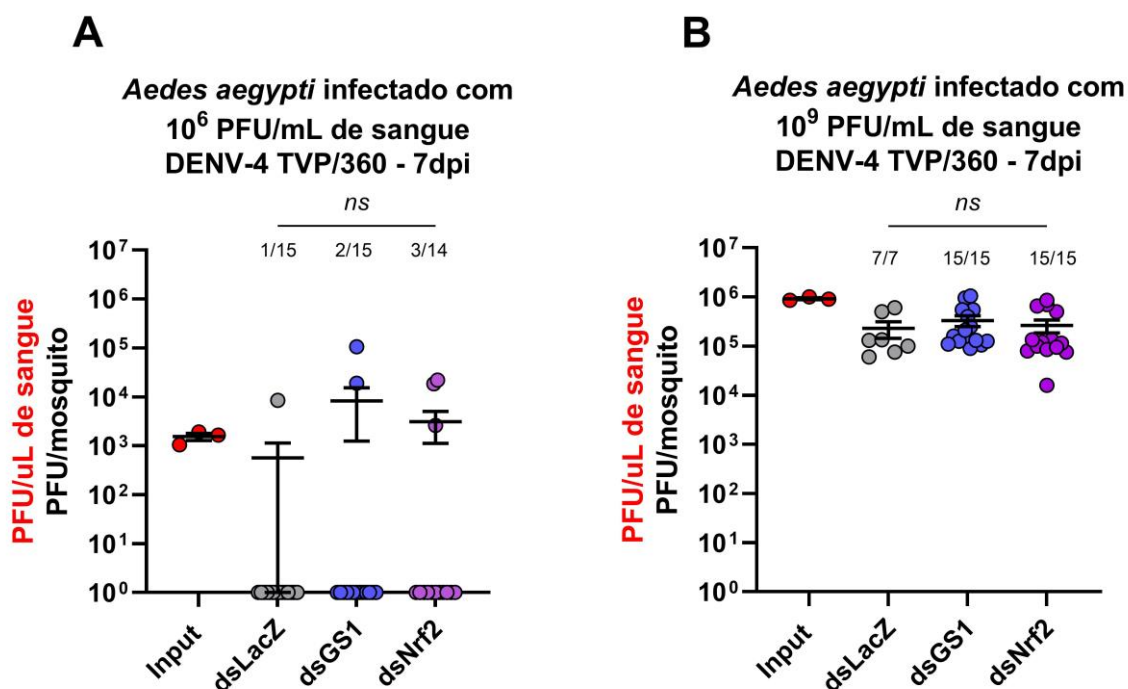


Figura 11. Silenciamento da Glutamina Sintetase 1 (GS1) ou Nrf2 não afetam a infecção e nem a carga viral de DENV-4 TVP/360 em mosquitos *Aedes aegypti*.

Fêmeas de mosquitos com 4 a 5 dias de adulto, foram silenciadas por RNAi e 48h após o silenciamento foram alimentadas com sangue humano contendo (A) 10^6 ou (B) 10^9 PFU/mL de sangue de DENV-4 TVP/360 e fagoestimulante ATP (1 mM). Cada ponto refere-se a um mosquito fêmea que teve sua carga viral quantificada através de ensaio de placa após 7 dias de infecção. O *Input* representa a quantidade de vírus oferecido aos mosquitos por μ L de sangue. Esses resultados apresentam média e +/- erro padrão e são representativos de 2 experimentos independentes. A significância estatística foi determinada pelo teste de Kruskal-Wallis.

4 DISCUSSÃO

Nossa hipótese inicial era que os mecanismos de proteção antioxidante disparados pela alimentação com sangue no mosquito *Aedes aegypti* promoveriam tolerância durante infecções por DENV. Para investigar essa hipótese, utilizamos análises geradas por biologia computacional para identificar genes antioxidantes expressos durante infecções por DENV em células de vertebrados. Em seguida, buscamos genes ortólogos em *Aedes aegypti* e os selecionamos como candidatos a tolerância no mosquito vetor. Identificamos que o gene da Glutamina Sintetase 1 estava altamente expresso na presença de sangue, independente da infecção viral. Essa descoberta nos levou a investigar o papel da enzima GS1 no mosquito vetor, revelando que ela atua na síntese do aminoácido Glutamina (Gln), essencial para a detoxificação, assimilação e fixação de amônia no corpo do inseto.

A Glutamina Sintetase possui duas isoformas diferentes no mosquito *Aedes aegypti*: GS1 (AAEL001887) e GS2 (AAEL013458) e ambas atuam no metabolismo de nitrogênio (SCARAFFIA et al., 2010). Porém, a GS1 está aumentada nas primeiras 24h após alimentação sanguínea, sendo seu pico máximo nas primeiras 4 a 6 horas, no intestino do mosquito. Por essa razão, escolhemos essa isoforma para a realização dos nossos experimentos (BUCHON LAB; HIXSON et al., 2021). O fato da glutamina ser um dreno do excesso de grupamento amino, que são citotóxicos, nos motivou a explorar o envolvimento da GS1 e do metabolismo da glutamina na tolerância do mosquito à infecção por DENV.

Fêmeas do mosquito *Aedes aegypti* são capazes de digerir o sangue dos hospedeiros, absorver os nutrientes e eliminar produtos tóxicos decorrentes dessa alimentação (Figura 12). As proteínas presentes no sangue são hidrolisadas e convertidas em aminoácidos que serão utilizados para a síntese de lipídios, proteínas, açúcares e para a produção de energia durante o ciclo gonotrófico. (SCARAFFIA, 2016; WRIGHT, 1995; ZHOU; MIESFELD; MIESFELD, 2009). A maior parte dos aminoácidos (~70%) é oxidada para a produção de energia. Nesse processo ocorre a liberação de amônia (NH₃ ou NH₄⁺ ou ambos).

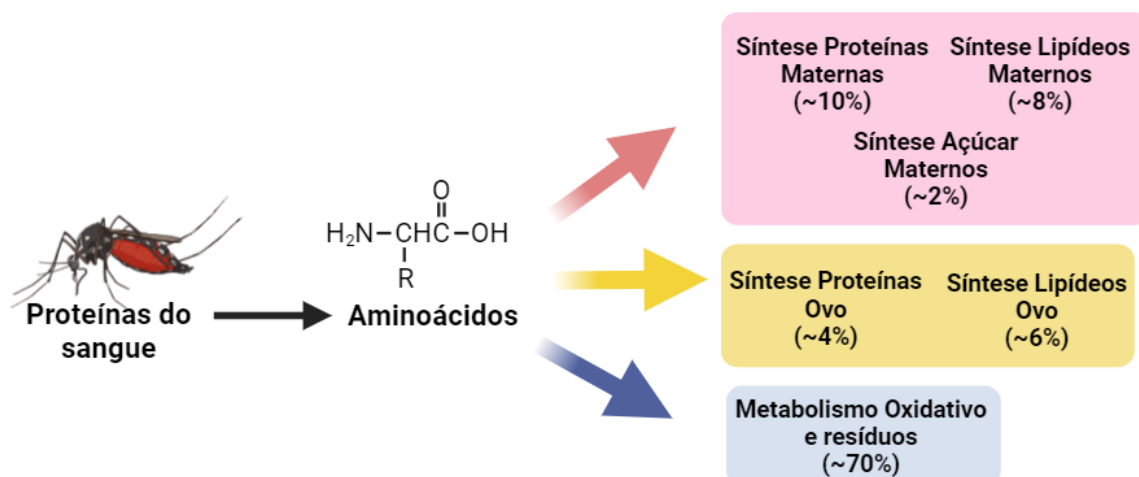


Figura 12. Destino dos aminoácidos da alimentação sanguínea durante o Ciclo Gonotrófico.

Adaptado de Scaraffia et al., (2016).

A amônia é um dos principais resíduos do metabolismo de aminoácidos e, por ser tóxica para os tecidos, precisa ser rapidamente incorporada como produto não tóxico (SCARAFFIA, 2016; SCARAFFIA et al., 2005). Ela é removida através da síntese de glutamina a partir do aminoácido Glutamato (Glu) pela enzima Glutamina Sintetase. A amônia, subproduto do metabolismo de nitrogênio, é capaz de alterar o pH intracelular e extracelular, interferir no equilíbrio eletrolítico e iônico, alterando diversos aspectos do funcionamento celular (DASARATHY et al., 2017).

A glutamina é um aminoácido essencial envolvido no metabolismo do nitrogênio em *Aedes aegypti*. Estudos demonstram que a glutamina, a Prolina (Pro) e Alanina (Ala) são encontradas em altas concentrações na hemolinfa do mosquito, aproximadamente 18 horas após a alimentação com sangue (SCARAFFIA et al., 2005). Tanto a glutamina quanto a prolina têm a capacidade de estocar a amônia livre, possuindo, respectivamente, 2 e 1 átomo de nitrogênio em sua estrutura, permitindo ao inseto neutralizar altas concentrações de uma dieta rica em proteínas. Além disso, os mosquitos são capazes de eliminar elevadas quantidades de amônia nas fezes, o que sugere que a amônia pode ser excretada ou metabolizada na forma de ácido úrico e ureia.(SCARAFFIA, 2016; SCARAFFIA et al., 2005).

No corpo gorduroso, órgão análogo ao fígado de vertebrados, a fixação e assimilação da amônia ocorre através da via Glutamina Sintetase/ Glutamato Sintase (GS/GltS). A GltS pode metabolizar a glutamina e produzir glutamato que pode ser convertido à prolina. A glutamina e prolina são os principais responsáveis pela remoção de amônia no corpo gorduroso (SCARAFFIA et al., 2005). A via GS/GltS é

ativa apenas no corpo gorduroso, não atuando no intestino do inseto vetor (Figura 13) (SCARAFFIA et al., 2006, 2010). Quando a GltS é inibida, ocorre o bloqueio da produção dos aminoácidos glutamato e prolina, resultando no acúmulo de glutamina na hemolinfa do mosquito (LEA; MIFLIN, 2003; SCARAFFIA et al., 2005, 2006, 2010).

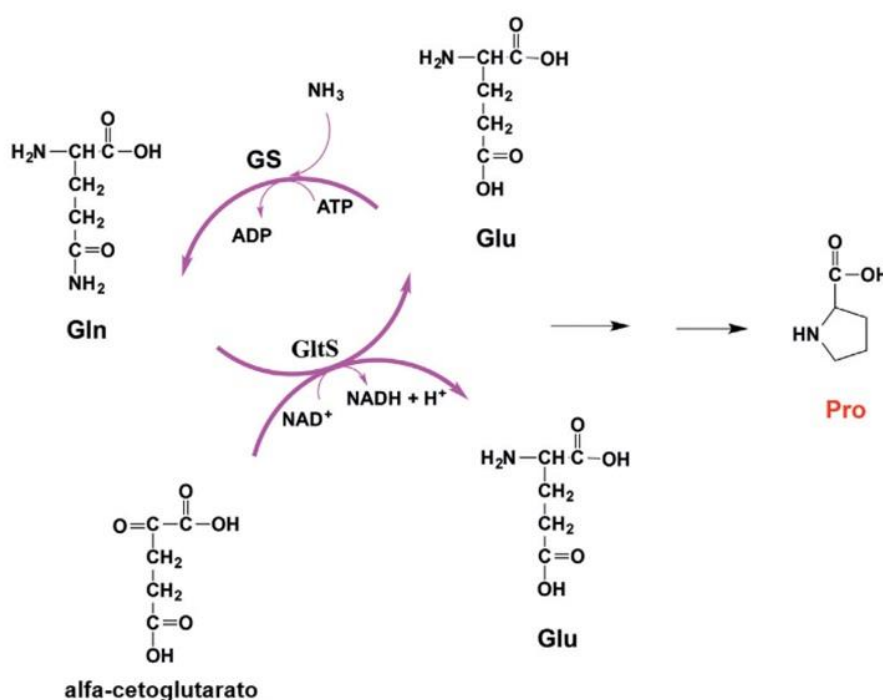


Figura 13. Esquema representando a via GS/GltS de assimilação e fixação de amônia no mosquito *Aedes aegypti*.

A amônia em excesso é fixada pela conversão de Glutamato para Glutamina pela Glutamina Sintetase. A Glutamina e o alfa-cetoglutarato são metabolizados pela Glutamato Sintase para gerar duas moléculas de Glutamato, as quais podem ser utilizadas para a síntese de Prolina. Adaptado de Scaraffia et al., (2016).

Outros estudos demonstram que a prolina pode ser oxidada durante o voo dos mosquitos, removendo amônia através da síntese de alanina, a qual atua como um transportador entre o músculo de voo e o corpo gorduroso. Também foi sugerido que a glutamina esteja envolvida neste processo, como um mecanismo alternativo de transporte da amônia (SCARAFFIA; WELLS, 2003).

Nossos resultados demonstraram que o gene da enzima GS1 apresentou um maior nível de expressão durante a digestão do sangue, independente da presença do vírus no intestino dos mosquitos, 24h após infecção (Figura 8A). Além disso, nossos dados corroboram outros estudos que avaliaram a expressão da GS no intestino do mosquito nas primeiras 40 horas após alimentação (SMARTT et al.,

1998). Esses processos metabólicos ocorrem juntamente com o estabelecimento e progressão das infecções por arbovírus nos mosquitos *Aedes aegypti*. Ao silenciar o gene da GS1 e desafiar os mosquitos com diferentes doses da cepa DENV-4 TVP/360, foi possível observar que não houve diferença na infecção e nem na carga viral em 7dpi. Verificamos também, um número muito pequeno de mosquitos positivos para a infecção. Acreditamos que a dose de vírus oferecida aos mosquitos foi muito baixa, gerando uma infecção pouco eficiente e dificultando uma melhor resolução dos resultados (Figura 11A). Embora nossos resultados não tenham demonstrado que o silenciamento da GS1 influenciou na intensidade e prevalência da infecção nos mosquitos testados, ainda acreditamos que ela possa ter um papel importante no contexto de genes imuno-metabólicos, o que ainda não foi explorado. A interação entre o sistema imunológico e o metabolismo celular é conhecido como imunometabolismo (VOSS et al., 2021). Muitos genes associados ao metabolismo celular e que não são classificados como genes imunológicos também são capazes de modular infecções (TALYULI et al., 2021).

A expressão diferencial de genes imuno-metabólicos entre mosquitos resistentes e suscetíveis à infecção por *Plasmodium* sugere que esses genes desempenham um papel crítico na regulação da suscetibilidade do vetor. A ativação de vias metabólicas específicas, como a glicólise e a respiração mitocondrial, pode influenciar a capacidade do mosquito de lidar com a infecção, possivelmente mediante a modulação da resposta imune e da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). Portanto, a compreensão da regulação dos genes imunometabólicos pode fornecer novas abordagens para o desenvolvimento de estratégias de controle dos mosquitos vetores (OLIVEIRA et al., 2011b).

Ao desafiar os mosquitos com uma concentração viral mais alta da cepa TVP/360, a infecção se estabeleceu e todos os mosquitos testados ficaram infectados. Nossas análises também mostraram que uma dose alta de vírus influencia diretamente na infecção e prevalência do vírus (DABO et al., 2024; NOVELO et al., 2019). Observamos também, que os mosquitos apresentaram uma carga viral aproximada de 10^5 PFU/mosquito após 7 dias de infecção (Figura 11B). Essa concentração viral mais alta resultou em 100% de prevalência da infecção no 7 dpi, o que pode ter mascarado o efeito do silenciamento da GS1, devido à saturação do sistema com uma carga infecciosa muito alta.

Nossas análises de biologia computacional indicaram o gene da GS1 como induzido durante infecção por DENV. Dado sua função de tamponamento da amônia e redução de sua toxicidade, hipotetizamos que a GS1 pode estar envolvida na indução do fenótipo de tolerância em *Aedes aegypti*. Porém, o silenciamento da GS1 não parece ter gerado perturbações no metabolismo do inseto ao ponto de alterar o curso da infecção por DENV. Observações preliminares não apontaram para redução de sobrevivência do grupo dsGS1 após alimentação com sangue infectado. Mais estudos estão em andamento para avaliar potenciais efeitos da inibição da GS1 no metabolismo do *Aedes aegypti* durante a digestão do sangue. Estudos anteriores já demonstraram que genes de proteção antioxidantes podem atuar modificando a prevalência da infecção em mosquitos *Aedes aegypti*. O silenciamento da enzima catalase, responsável pela detoxificação de H₂O₂, gerou redução significativa na prevalência de dengue no intestino dos mosquitos *Aedes aegypti* (OLIVEIRA et al., 2017). Diversas evidências mostram que a capacidade de evitar estresse oxidativo confere tolerância aos hospedeiros infectados pois a detoxificação de ROS previne dano tecidual durante a resposta imune (SOARES et al., 2015).

Uma vez que a enzima responsável pela síntese da glutamina estivesse silenciada, a diminuição desse aminoácido poderia gerar um impacto importante a nível tecidual, podendo dificultar o estabelecimento da infecção viral. Porém, dados da literatura apontam um possível sistema compensatório na diminuição da síntese de glutamina (Figura 14).

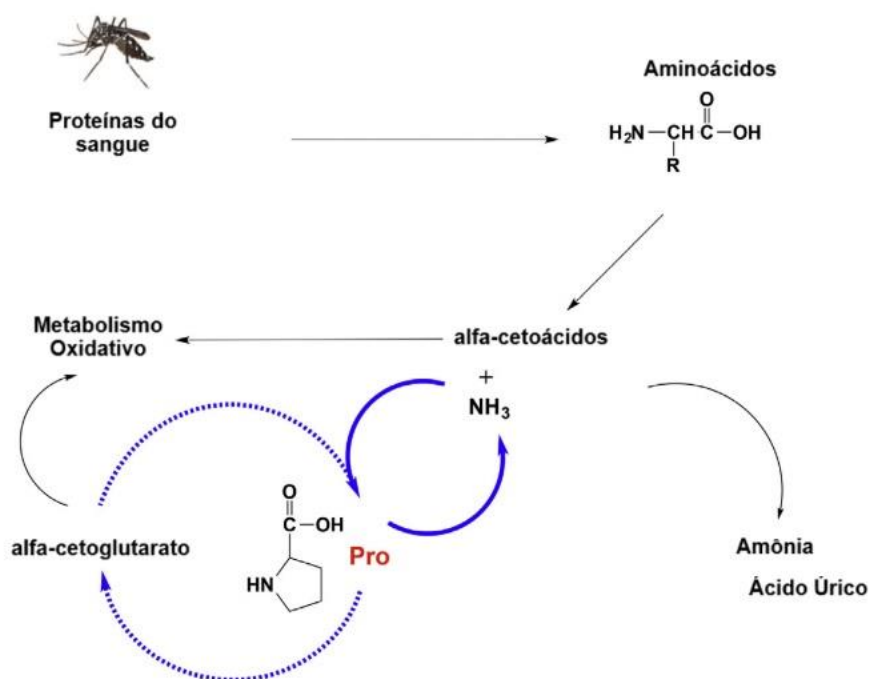


Figura 14. Biossíntese da Prolina em *Aedes aegypti*.

A prolina estoca amônia de forma transitória através da desaminação dos aminoácidos derivados da alimentação sanguínea. A amônia pode ser recuperada da prolina e excretada como subproduto do nitrogênio, enquanto que o esqueleto de carbono pode ser usado para produção de energia ou na síntese de carboidratos, lipídeos e proteínas. Adaptado de Scaraffia et al., (2016).

Mosquitos que receberam uma dieta contendo sacarose e Cloreto de Amônio (NH_4Cl), apresentaram aumento na concentração de prolina, quando a GS foi inibida pelo DL-methionine-DL-sulfoximine, o que gerou uma diminuição significativa de glutamina na hemolinfa do mosquito (SCARAFFIA et al., 2005). Quando a atividade da GS foi inibida, a enzima Glutamato desidrogenase (GDH) apresentou papel importante, pois é através da GDH que ocorre a formação do glutamato, e pode levar o aumento da síntese de prolina via delta-1-pirrolina-5-carboxilato sintase (P5CS). No intestino e no corpo gorduroso, ambas GS e GDH são altamente ativas e em ambos os tecidos o glutamato pode ser convertido para glutamina pela GS (EISENBERG et al., 2000; MEISTER, 1985; SCARAFFIA, 2016)

Nossos dados sugerem que o silenciamento da GS1, pode ter gerado uma diminuição na concentração de glutamina, porém a amônia livre pode ter sido estocada pelo aminoácido prolina, impedindo possíveis danos teciduais durante a infecção por dengue. Experimentos futuros pretendem bloquear as duas vias de

detoxificação da amônia para observar os efeitos sobre a fisiologia do *Aedes aegypti* alimentado com sangue na presença e ausência de DENV.

Esses resultados nos proporcionaram novas ideias para causar perturbações significativas na fisiologia do inseto e, possivelmente, observar um impacto na infecção por DENV. Sugerimos o silenciamento duplo das enzimas GS1 e GDH ou P5CS, uma vez que elas são responsáveis pela síntese dos aminoácidos glutamina e prolina, cruciais para a detoxificação, assimilação e fixação de amônia no corpo do inseto. Além disso, após o silenciamento e infecção, é importante avaliar a sobrevivência dos mosquitos até o 21 dpi e realizar a quantificação viral nos tempos 7, 14 e 21dpi.

A GS apresenta duas isoformas, GS1 (AAEL001887) e GS2 (AAEL013458), que estão localizadas em regiões diferentes na célula do mosquito. Enquanto a GS1 está presente na mitocôndria (NCBI, 2024), a GS2 está no citoplasma (NCBI, 2024). Nossa análise do silenciamento da GS1 em mosquitos infectados com DENV-4 não mostrou impacto significativo na infecção e carga viral no corpo do mosquito. Isso pode ser explicado pelo fato de que a GS1 está localizada na mitocôndria, o que sugere que sua função não impacta na infecção viral. No entanto, isso também sugere que a GS2, localizada no citoplasma, pode ter um papel mais importante na infecção. Portanto, especulamos que o silenciamento da GS2 poderia mostrar um fenótipo diferente nos mosquitos infectados, indicando que essa isoforma pode ser mais crítica durante a infecção viral. Por esse motivo, o silenciamento da GS2 é uma abordagem interessante que permitirá avaliarmos se ela pode causar alterações na infecção, carga viral e impactar a sobrevivência dos mosquitos *Aedes aegypti* infectados com DENV-4.

Quando os mosquitos ingeriram sangue contendo TVP/360, no tempo de 24h, foi observado um aumento de 4x nos níveis transcricionais do gene Nrf2 comparado ao grupo controle (Figura 8A). Os mosquitos que receberam sangue não infectado apresentaram um aumento de 2x. Apesar de estatisticamente essa diferença não ser significativa, esse é um gene responsável por uma via de sinalização transcricional conservada que atua na regulação do sistema antioxidante e na resposta de defesa contra o estresse oxidativo (BOTTINO-ROJAS et al., 2018). A presença de heme pode induzir uma resposta transcricional associada às vias de sinalização de Nrf2 (BOTTINO-ROJAS et al., 2018). Dessa forma, podemos sugerir que a presença do vírus criou um ambiente mais estressante, requerendo uma resposta direcionada ao

patógeno e ou aos danos causados pela infecção. Os radicais livres de oxigênio também são utilizados pela resposta imune no controle dos patógenos (BOTTINO-ROJAS et al., 2018). Estudos mostram o papel das ROS como mediadores na sinalização da resposta imune inata dos mosquitos *Anopheles* ao parasita *Plasmodium* (KUMAR et al., 2003; MOLINA-CRUZ et al., 2008). Durante o silenciamento do gene Nrf2, também verificamos que não houve diferença no número de mosquitos infectados ou qualquer redução na carga viral em 7 dias após infecção.

Um aumento na expressão do gene da catalase foi observado nas primeiras 24h (Figura 8A). A catalase é uma enzima antioxidante envolvida na detoxificação do H₂O₂, durante ingestão sanguínea de *Aedes aegypti*. Esse dado corrobora estudos realizados por Oliveira et al., (2017), quando foi registrado um aumento do RNAm dessa enzima em 24h, 36h e 48h após alimentação e o nível máximo de atividade em 24h. A expressão do RNAm dos demais genes nos tempos 4 e 7 dpi, para o intestino e carcaça do mosquito vetor, diminuiu para a maioria dos genes, alcançando seus níveis basais (Figuras 8 e 9).

Avaliamos também a sobrevivência dos mosquitos frente às infecções por duas cepas de DENV-4 (TVP/360 e LRV 13/422). Nas condições testadas, os mosquitos não exibiram aumento de mortalidade em decorrência do desafio infeccioso (Figura 3D e 3E). Esse fenótipo reforça a capacidade do vetor em tolerar altas cargas virais sem sofrer grande impacto no seu fitness, o que é essencial para a transmissão do vírus (LAMBRECHTS; SALEH, 2019; MARASCHIN et al., 2023). Acreditamos que fatores como a ativação de via imunológicas, adaptações metabólicas, vias de resposta ao estresse e a reparação de danos teciduais são fatores fundamentais para a tolerância do mosquito infectado durante a ingestão sanguínea (LAMBRECHTS; SALEH, 2019; TALYULI et al., 2022).

Os resultados obtidos na Figura 4 demonstram que a intensidade da infecção também pode variar dependendo da dose de vírus administrada inicialmente, como observado por Novelo et al., (2019). Para ambas as doses de TVP/360, foi possível observar que quanto maior a dose administrada maior foi o número de mosquitos infectados. A carga viral permaneceu igual em praticamente todos os tempos testados (Figura 4B). Verificamos que, embora a dose inicial seja menor (Figura 4C) a carga viral máxima alcança o título de 10⁵ PFU/mosquito em 21dpi, quantidade de vírus igual ao encontrado na maior dose em todos os tempos. Isso demonstrou que independente

do *Input* inicial ou o número de mosquitos infectados, a infecção se estabeleceu e se disseminou pelo corpo do inseto, podendo garantir o sucesso na transmissão viral.

A prevalência da infecção também foi maior quando os mosquitos foram infectados com uma dose mais alta do vírus, além disso, alguns mosquitos foram capazes de eliminar completamente a infecção, como já relatado por outros laboratórios (Figura 4D e 4E) (OLMO et al., 2018).

Durante a infecção, os mecanismos de resistência e tolerância operam juntos. Porém, o que definirá uma maior intensidade na resposta de resistência ou coexistência com o vírus, ainda não está bem entendido. Especulamos que talvez o gasto energético da resposta de resistência seja mais caro para o metabolismo do inseto do que reparar os danos causados pelo vírus. Manter um limiar de tolerância mais alto pode ser vantajoso tanto para o vírus quanto para o inseto. É importante salientar que essa relação entre resistência e tolerância terá variações na população de mosquitos, uma vez que a competência vetorial depende de fatores genéticos, ambientais e a interação entre genótipos e ambiente (DHARMARAJAN; WALKER; LEHMANN, 2019).

Para os mosquitos infectados com a cepa DENV- 4 LRV 13/422 o fenótipo encontrado foi semelhante. A curva dose-resposta mostrou que não houve impacto na sobrevivência dos mosquitos (Figura 5D e 5E).

Ao avaliarmos a intensidade da infecção da cepa LRV 13/422 para a dose de 10^6 PFU/mL de sangue, observamos uma oscilação na carga viral a partir do tempo zero até o 21 dpi. Consideramos que possíveis variações experimentais possam ter impactado a precisão dos resultados (Figura 6B).

A diferença observada na prevalência da infecção entre a cepa laboratorial e o isolado clínico a partir do 14 dpi (TVP: 16,66% e LRV 36,66%) e o 21 dpi (TVP:13,63% e LRV 33,33%) foram interessantes. A cepa DENV-4 TVP/360 é filogeneticamente mais próxima a cepa parental DENV-4 /814669, do que a cepa LRV 13/422. Podemos supor que as alterações genéticas tenham conferido vantagens evolutivas à cepa LRV 13/422, tornando-a mais eficaz na infecção e evasão do sistema imunológico do mosquito vetor, assegurando assim o sucesso na transmissão viral (Tabela 1).

Os resultados apresentados sugerem que, embora o gene da GS1 seja crucial para os processos de detoxificação, fixação e assimilação de amônia no mosquito vetor, seu silenciamento não afeta a infecção por engue. O silenciamento da GS1 parece ativar um mecanismo compensatório que previne danos teciduais devido ao

acúmulo de amônia no corpo do inseto. No entanto, acreditamos que a modulação de outra enzima, como a GDH e/ou a via de síntese de prolina (P5CS/P5CR), possa ter um impacto mais significativo quando silenciada em conjunto com a GS1. Além disso, a localização da GS1 pode estar relacionada com o fenótipo observado, sendo necessário o silenciamento da GS2 para avaliarmos se há um impacto negativo na infecção viral. Dessa forma, podemos supor que a inibição simultânea de duas importantes enzimas envolvidas no metabolismo do nitrogênio ou o silenciamento da GS2 poderiam causar um impacto substancial na fisiologia do mosquito. Esse impacto pode afetar negativamente a infectividade ou tolerância do *Aedes aegypti* e impedir a transmissão viral.

5 CONCLUSÃO

1. A infecção com diferentes doses testadas pelas cepas DENV-4 TVP/360 e LRV 13/422 não alteram o tempo de vida dos mosquitos *Aedes aegypti*.
2. Os genes candidatos à tolerância são modulados pelo sangue, independentemente da presença do vírus.
3. O silenciamento dos genes da Glutamina Sintetase 1 e Nrf2 não impactou a carga viral de DENV-4 TVP/360 nas condições estudadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDULJALIL, J. M.; ABD AL GALIL, F. M. Molecular pathogenesis of dengue virus infection in *Aedes* mosquitoes. **Journal of Insect Physiology**, v. 138, n. October 2021, p. 104367, 2022.

ACHEE, N. L. et al. Alternative strategies for mosquito-borne arbovirus control. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 1, p. 1–22, 2019.

ALMIRE, F. et al. Sugar feeding protects against arboviral infection by enhancing gut immunity in the mosquito vector *Aedes aegypti*. **PLoS Pathogens**, v. 17, n. 9, p. 1–26, 2021.

AMARANTE, A. DE M. et al. Zika virus infection drives epigenetic modulation of immunity by the histone acetyltransferase CBP of *Aedes aegypti*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 16, n. 6, p. 1–17, 2022.

APTE-DESHPANDE, A. et al. *Serratia odorifera* a midgut inhabitant of *Aedes aegypti* mosquito enhances its susceptibility to dengue-2 virus. **PLoS ONE**, v. 7, n. 7, 2012.

ARMSTRONG, P. M. et al. Successive blood meals enhance virus dissemination within mosquitoes and increase transmission potential. **Nature Microbiology**, v. 5, n. 2, p. 239–247, 2020.

AUBRY, F. et al. Enhanced Zika virus susceptibility of globally invasive *Aedes aegypti* populations. **Science**, v. 370, n. 6519, p. 991–996, 2020.

AYERS, J. B. et al. Clustered rapid induction of apoptosis limits ZIKV and DENV-2 proliferation in the midguts of *Aedes aegypti*. **Communications Biology**, v. 4, n. 1, p. 1–9, 2021.

AYRES, J. S.; SCHNEIDER, D. S. Tolerance of infections. **Annual Review of Immunology**, v. 30, p. 271–294, 2012.

BARREDO, E.; DEGENNARO, M. Not Just from Blood: Mosquito Nutrient Acquisition from Nectar Sources. **Trends in Parasitology**, v. 36, n. 5, p. 473–484, 2020.

BENNET ET AL. **Variation in vector competence for dengue 2 virus among 24 collections of *Aedes aegypti* from Mexico and the United States**. , 2002.

BHATT, S. et al. The global distribution and burden of dengue. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 504–507, 2013.

BOTTINO-ROJAS, V. et al. Heme signaling impacts global gene expression, immunity and dengue virus infectivity in *Aedes aegypti*. **PLoS ONE**, v. 10, n. 8, p. 1–19, 2015.

BOTTINO-ROJAS, V. et al. The redox-sensing gene Nrf2 affects intestinal homeostasis, insecticide resistance, and Zika virus susceptibility in the mosquito *Aedes aegypti*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 293, n. 23, p. 9053, 8 jun. 2018.

BUCHON, L. **Aegypti-Atlas**. Disponível em: <http://aegyptiatlas.buchonlab.com/data?category=gene_name&gene=AAEL013458%0D%0AAAEL001887%0D%0A%0D%0A>. Acesso em: 13 jun. 2024.

CHAMBERS, T. J. ET AL. **FLAVIVIRUS GENOME AND REPLICATION ORGANIZATION, EXPRESSION**. *Microbiol*, v. 44, p. 649-688, 1990.

CHENG, G. et al. Mosquito defense strategies against viral infection. **Trends in Parasitology**, v. 32, p. 177–186, 2016.

CHOWDHURY, A. et al. JNK pathway restricts DENV2, ZIKV and CHIKV infection by activating complement and apoptosis in mosquito salivary glands. **PLoS Pathogens**, v. 16, n. 8, p. 1–24, 2020.

CRUZ-OLIVEIRA, C. et al. Receptors and routes of dengue virus entry into the host cells. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 39, n. 2, p. 155–170, 2015.

DABO, S. et al. Extensive variation and strain-specificity in dengue virus susceptibility among African *Aedes aegypti* populations. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 18, n. 3, p. 1–14, 2024.

DASARATHY, S. et al. Ammonia toxicity: from head to toe? **Metabolic Brain Disease**, v. 32, n. 2, p. 529–538, 2017.

DE CARVALHO, S. S. et al. *Aedes aegypti* post-emergence transcriptome: Unveiling the molecular basis for the hematophagic and gonotrophic capacitation. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 15, n. 1, p. 1–32, 2021.

DEJONG, R. J. et al. Reactive oxygen species detoxification by catalase is a major determinant of fecundity in the mosquito *Anopheles gambiae*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 7, p. 2121–2126, 2007.

DHARMARAJAN, G.; WALKER, K. D.; LEHMANN, T. Variation in Tolerance to Parasites Affects Vectorial Capacity of Natural Asian Tiger Mosquito Populations. **Current Biology**, v. 29, n. 22, p. 3946–3952.e5, 2019.

DONG, S. et al. Chikungunya virus dissemination from the midgut of *Aedes aegypti* is associated with temporal basal lamina degradation during bloodmeal digestion. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 9, p. 1–26, 2017.

DUONG, V. et al. Asymptomatic humans transmit dengue virus to mosquitoes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 47, p. 14688–14693, 2015.

EISENBERG, D. et al. Structure-function relationships of glutamine synthetases. **Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1477, n. 1–2, p. 122–145, 2000.

Fiocruz, 2024. Disponível em: <<https://portal.fiocruz.br/pergunta/como-e-o-ciclo-de-vida-do-mosquito-aedes-aegypti>>. Acesso em: 13 jun. 2024.

FRIEND, W. G.; CHOY, C. T.; CARTWRIGHT, E. The effect of nutrient intake on the development and the egg production of *Rhodnius prolixus* Stål (Hemiptera: Reduviidae). **Canadian journal of zoology**, v. 43, n. 6, p. 891–904, 1965.

GOIC, B. et al. Virus-derived DNA drives mosquito vector tolerance to arboviral infection. **Nature Communications**, v. 7, p. 1–10, 2016.

GRAÇA-SOUZA, A. V. et al. Adaptations against heme toxicity in blood-feeding arthropods. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 36, n. 4 SPEC. ISS., p. 322–335, 2006.

GUZMAN, M. G. et al. Dengue infection. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 2, p. 1–26, 2016.

HALL, D. R. et al. Mosquito immune cells enhance dengue and Zika virus

dissemination in *Aedes aegypti*. **bioRxiv**, p. 2024.04.03.587950, 2024.

HARDY, J. L. et al. Intrinsic factors affecting vector competence of mosquitoes for arboviruses. **Annual review of entomology**. **Volume 28**, p. 229–262, 1983.

HARISH, V. et al. Human movement and environmental barriers shape the emergence of dengue. **Nature Communications**, v. 15, n. 1, p. 1–15, 2024.

HAY, J. et al. **Fields Virology**. 6^a ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer business., 1987. v. 1

HELMER, O. M.; EMERSON, C. P. the Iron Content of the Whole Blood of Normal Individuals. **Journal of Biological Chemistry**, v. 104, n. 1, p. 157–161, 1934.

HIXSON, B. et al. A transcriptomic atlas of *Aedes aegypti* reveals detailed functional organization of major body parts and gut regional specializations in sugar-fed and blood-fed adult females. **bioRxiv**, p. 2021.12.19.473372, 2021.

ISOE, J.; SCARAFFIA, P. Y. Urea Synthesis and Excretion in *Aedes aegypti* Mosquitoes Are Regulated by a Unique Cross-Talk Mechanism. 2013.

JANEH, M.; OSMAN, D.; KAMBRIS, Z. Damage-induced cell regeneration in the midgut of *aedes albopictus* mosquitoes. **Scientific Reports**, v. 7, n. March, p. 1–10, 2017.

JANSEN, C. C.; BEEBE, N. W. The dengue vector *Aedes aegypti*: what comes next. **Microbes and Infection**, v. 12, n. 4, p. 272–279, 2010.

KRAEMER, M. U. G. et al. Past and future spread of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. **Nature Microbiology**, v. 4, n. 5, p. 854–863, 2019.

KUCZERA, D. et al. Isolation of dengue virus serotype 4 genotype II from a patient with high viral load and a mixed Th1/Th17 inflammatory cytokine profile in South Brazil. **Virology Journal**, v. 13, n. 1, p. 1–8, 2016.

KUMAR, S. et al. The role of reactive oxygen species on *Plasmodium melanotic* encapsulation in *Anopheles gambiae*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. SUPPL. 2, p. 14139–14144, 2003.

LAMBRECHTS, L. et al. Genetic specificity and potential for local adaptation between dengue viruses and mosquito vectors. **BMC Evolutionary Biology**, v. 9, n. 1, p. 1–11, 2009.

LAMBRECHTS, L.; SALEH, M. C. Manipulating Mosquito Tolerance for Arbovirus Control. **Cell Host and Microbe**, v. 26, n. 3, p. 309–313, 2019.

LEA, P. J.; MIFLIN, B. J. Glutamate synthase and the synthesis of glutamate in plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 41, n. 6–7, p. 555–564, 2003.

LEAH ET. AL, 2017. Antibody-dependent enhancement of severe dengue disease in humans. **Jurnal Sains dan Seni ITS**, v. 6, n. 1, p. 51–66, 2017.

LEE, W. S. et al. Mosquito antiviral defense mechanisms: A delicate balance between innate immunity and persistent viral infection. **Parasites and Vectors**, v. 12, n. 1, p. 1–12, 2019.

LEITE, T. H. J. F. et al. Distinct Roles of Hemocytes at Different Stages of Infection by Dengue and Zika Viruses in *Aedes aegypti* Mosquitoes. **Frontiers in Immunology**, v. 12, n. May, p. 1–11, 2021.

LOURENÇO, J. et al. Epidemiological and ecological determinants of Zika virus transmission in an urban setting. **eLife**, v. 6, n. February 2015, 2017.

LUMMERTZ DA ROCHA, E. et al. Reconstruction of complex single-cell trajectories using CellRouter. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 1–13, 2018.

MARASCHIN, M. et al. Exploring dose–response relationships in *Aedes aegypti* survival upon bacteria and arbovirus infection. **Journal of Insect Physiology**, v. 151, n. October, 2023.

MARQUARDT, W. C. et al. **Biology of disease vectors**. 2^a ed. EUA: ElsevierCompany., 2005.

MARTINS, R. et al. Disease Tolerance as an Inherent Component of Immunity. **Annual Review of Immunology**, v. 37, p. 405–437, 2019.

MEDZHITOV, R.; SCHNEIDER, D. S.; SOARES, M. P. Disease tolerance as a defense strategy. **Science**, v. 335, n. 6071, p. 936–941, 2012.

MEISTER, A. Glutamine Synthetase from Mammalian Tissues. In: ACADEMIC PRESS (Ed.). **Methods in Enzymology**. 1. ed. [s.l: s.n.]. v. 13p. 185–199.

MERKLING, S. Multifaceted contributions of Dicer2 to arbovirus transmission by *Aedes aegypti*. 2022.

MERKLING, S. H. et al. Multifaceted contributions of Dicer2 to arbovirus transmission by *Aedes aegypti*. **Cell Reports**, v. 42, n. 8, 2023.

Ministério da Saúde, 2024. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/a/arbovirose/informe-semanal/informe-semanal-no-18.pdf/view>>. Acesso em: 13 jun. 2024.

MOLINA-CRUZ, A. et al. Effect of mosquito midgut trypsin activity on dengue-2 virus infection and dissemination in *Aedes aegypti*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 72, n. 5, p. 631–637, 2005.

MOLINA-CRUZ, A. et al. Reactive oxygen species modulate *Anopheles gambiae* immunity against bacteria and Plasmodium. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 6, p. 3217–3223, 2008.

NCBI,2024. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=AAEL001887>>. Acesso em: 11 jun. 2024a.

NCBI,2024. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=AAEL013458>>. Acesso em: 11 jun. 2024b.

NGUYEN, N. M. et al. Host and viral features of human dengue cases shape the population of infected and infectious *Aedes aegypti* mosquitoes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 22, p. 9072–9077, 28 maio 2013.

NOVELO, M. et al. Intra-host growth kinetics of dengue virus in the mosquito *Aedes aegypti*. **PLoS Pathogens**, v. 15, n. 12, p. 1–19, 2019.

NOVELO, M. et al. Dengue and chikungunya virus loads in the mosquito *Aedes aegypti* are determined by distinct genetic architectures. p. 1–21, 2023.

NUNES, M. R. T. et al. Phylogeography of dengue virus serotype 4, Brazil, 2010-2011. **Emerging Infectious Diseases**, v. 18, n. 11, p. 1858–1864, 2012.

OLIVEIRA, R. L. DE. **Mosquitos de importância sanitária do Brasil**. 1^o Reimpre ed. FIOCRUZ, 1994.

OLIVEIRA, J. H. et al. Catalase protects *Aedes aegypti* from oxidative stress and increases midgut infection prevalence of Dengue but not Zika. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 2017.

OLIVEIRA, J. H.; BAHIA, A. C.; VALE, P. F. How are arbovirus vectors able to tolerate infection? **Developmental and Comparative Immunology**, v. 103, 2020.

OLIVEIRA, J. H. M. et al. Blood meal-derived heme decreases ROS levels in the midgut of *Aedes aegypti* and allows proliferation of intestinal microbiota. **PLoS Pathogens**, v. 7, n. 3, 2011a.

OLIVEIRA, J. H. M. et al. Energy metabolism affects susceptibility of *Anopheles gambiae* mosquitoes to *Plasmodium* infection. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 41, n. 6, p. 349–355, 2011b.

OLMO, R. P. et al. Mosquito vector competence for dengue is modulated by insect-specific viruses. **Nature microbiology**, v. 8, n. 1, p. 135–149, 2023.

RAMIREZ, J. L. et al. Reciprocal tripartite interactions between the *Aedes aegypti* midgut microbiota, innate immune system and dengue virus influences vector competence. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 3, p. 1–11, 2012.

RIAHI, H. et al. The histone methyltransferase G9A regulates tolerance to oxidative stress–induced energy consumption. **PLoS Biology**, v. 17, n. 3, p. 1–26, 2019.

RICHARD, V.; VIALON, J.; CAO-LORMEAU, V. M. Use of centrifugal filter devices to concentrate dengue virus in mosquito per os infection experiments. **PLoS ONE**, v. 10, n. 9, p. 1–7, 2015.

RÜCKERT, C.; EBEL, G. D. How Do Virus–Mosquito Interactions Lead to Viral Emergence? **Trends in Parasitology**, v. 34, n. 4, p. 310–321, 2018.

SALAZAR, M. I. et al. Dengue virus type 2: Replication and tropisms in orally infected *Aedes aegypti* mosquitoes. **BMC Microbiology**, v. 7, p. 1–13, 2007.

SALLES, T. S. et al. History, epidemiology and diagnostics of dengue in the American and Brazilian contexts: a review. **BMC**, v. 11, p. 1–12, 2018.

SARAIVA, R. G. et al. Aminopeptidase secreted by *Chromobacterium* sp. Panama inhibits dengue virus infection by degrading the E protein. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 4, p. 1–16, 2018.

SARATHY, V. V. et al. Characterization of lethal dengue virus type 4 (DENV-4) TVP-376 infection in mice lacking both IFN- α/β and IFN- γ receptors (AG129) and comparison with the DENV-2 AG129 mouse model. **Journal of General Virology**, v. 96, n. 10, p. 3035–3048, 2015.

SCARAFFIA, P. Y. et al. Ammonia metabolism in *Aedes aegypti*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 35, n. 5, p. 491–503, 2005.

SCARAFFIA, P. Y. et al. Analysis of whole body ammonia metabolism in *Aedes aegypti* using [15N]-labeled compounds and mass spectrometry. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 36, n. 8, p. 614–622, 2006.

SCARAFFIA, P. Y. et al. Differential ammonia metabolism in *Aedes aegypti* fat body and midgut tissues. **Journal of Insect Physiology**, v. 56, n. 9, p. 1040–1049, 2010.

SCARAFFIA, P. Y. Disruption of Mosquito Blood Meal Protein Metabolism. In:

Genetic Control of Malaria and Dengue. 1ª edição ed. USA: Elsevier Inc., 2016. p. 253–275.

SCARAFFIA, P. Y.; WELLS, M. A. Proline can be utilized as an energy substrate during flight of *Aedes aegypti* females. **Journal of Insect Physiology**, v. 49, n. 6, p. 591–601, 2003.

SCHNEIDER, D. S.; AYRES, J. S. Two ways to survive infection: what resistance and tolerance can teach us about treating infectious diseases. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n. 11, p. 889–895, 2008.

SCOTT, T. W.; TAKKEN, W. Feeding strategies of anthropophilic mosquitoes result in increased risk of pathogen transmission. **Trends in Parasitology**, v. 28, n. 3, p. 114–121, 2012.

SEAL, S.; DHARMARAJAN, G.; KHAN, I. Evolution of pathogen tolerance and emerging infections: A missing experimental paradigm. **eLife**, v. 10, p. 1–30, 2021.

SHAW, D. K. et al. Vector Immunity and Evolutionary Ecology: The Harmonious Dissonance. **Trends in Immunology**, v. 39, n. 11, p. 862–873, 2018.

SMARTT, C. T. et al. Biochemical analysis of a blood meal-induced *Aedes aegypti* glutamine synthetase gene. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 28, n. 12, p. 935–945, 1998.

SOARES, M. P.; GOZZELINO, R.; WEIS, S. Tissue damage control in disease tolerance. **Trends in Immunology**, v. 35, n. 10, p. 483–494, 2014.

SOARES, M. P.; RIBEIRO, A. M. Nrf2 as a master regulator of tissue damage control and disease tolerance to infection. **Biochemical Society Transactions**, v. 43, n. Figure 1, p. 663–668, 2015.

SOARES, M. P.; TEIXEIRA, L.; MOITA, L. F. Disease tolerance and immunity in host protection against infection. **Nature Reviews Immunology**, v. 17, n. 2, p. 83–96, 2017.

SONI, M. et al. Experimental study of dengue virus infection in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*: A comparative analysis on susceptibility, virus transmission and reproductive success. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 175, 2020.

SOUZA-NETO, J. A.; POWELL, J. R.; BONIZZONI, M. *Aedes aegypti* vector competence studies: A review. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 67, n. November 2018, p. 191–209, 2019.

STERKEL, M. et al. The Dose Makes the Poison: Nutritional Overload Determines the Life Traits of Blood-Feeding Arthropods. **Trends in Parasitology**, v. 33, n. 8, p. 633–644, 2017.

SUN, H. et al. Determining environmental and anthropogenic factors which explain the global distribution of *aedes aegypti* and *Ae. Albopictus*. **BMJ Global Health**, v. 3, n. 4, p. 1–11, 2018.

TABACHNICK, W. J. Nature, nurture and evolution of intra-species variation in mosquito arbovirus transmission competence. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 10, n. 1, p. 249–277, 2013.

TALYULI, O. A. C. et al. Non-immune Traits Triggered by Blood Intake Impact Vectorial Competence. **Frontiers in Physiology**, v. 12, n. March, p. 1–21, 2021.

TARACENA, M. L. et al. Regulation of midgut cell proliferation impacts *Aedes*

aegypti susceptibility to dengue virus. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 5, p. 1–21, 2018.

THOMAS, R. E. et al. Midgut basal lamina thickness and dengue-1 virus dissemination rates in laboratory strains of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). **Journal of medical entomology**, v. 30, n. 2, p. 326–331, 1993.

TROHA, K. et al. Comparative transcriptomics reveals CrebA as a novel regulator of infection tolerance in *D. melanogaster*. **PLoS Pathogens**, v. 14, n. 2, p. 1–34, 2018.

TULADHAR, R. et al. Climatic factors influencing dengue incidence in an epidemic area of Nepal. **BMC Research Notes**, v. 12, n. 1, p. 1–7, 2019.

VALE, P. F.; FENTON, A.; BROWN, S. P. Limiting Damage during Infection: Lessons from Infection Tolerance for Novel Therapeutics. **PLoS Biology**, v. 12, n. 1, 2014.

VALE, P. F.; GUPTA, V. Nonlinear disease tolerance curves reveal distinct components of host responses to viral infection. **Royal Society Open Science**, 2017.

VEGA-RUA, A. et al. High Level of Vector Competence of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from Ten American Countries as a Crucial Factor in the Spread of Chikungunya Virus. **Journal of Virology**, v. 88, n. 11, p. 6294–6306, 2014.

VILLABONA-ARENAS, C. J.; ZANOTTO, P. M. DE A. Evolutionary history of Dengue virus type 4: Insights into genotype phylodynamics. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 11, n. 5, p. 878–885, 2011.

VOSS, K. et al. A guide to interrogating immunometabolism. **Nature Reviews Immunology**, v. 21, n. 10, p. 637–652, 2021.

WEAVER, S. C. Evolutionary influences in arboviral disease. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 299, p. 285–314, 2006.

WEAVER, S. C. Incrimination of mosquito vectors. **Nature Microbiology**, v. 5, n. 2, p. 232–233, 2020.

WEIHRAUCH, D.; O'DONNELL, M. J. Mechanisms of nitrogen excretion in insects. **Current Opinion in Insect Science**, v. 47, p. 25–30, 2021.

WHO, W. H. O. **Dengue and severe dengue**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>>. Acesso em: 10 abr. 2023.

WIPT, P.; GEORGE, K. M. Stress, inflammation, and defense of homeostasis. **Bone**, v. 23, n. 1, p. 1–7, 2008.

WRIGHT, P. A. Nitrogen excretion: Three end products, many physiological roles. **Journal of Experimental Biology**, v. 198, n. 2, p. 273–281, 1995.

ZHOU, G. et al. Metabolic fate of [14C]-labeled meal protein amino acids in *Aedes aegypti* mosquitoes. **Journal of Insect Physiology**, v. 50, n. 4, p. 337–349, 2004.

ZHOU, G.; MIESFELD, R.; MIESFELD, R. Differential utilization of blood meal amino acids in mosquitoes. **Insect Physiology**, 2009.

ZHU, Y. et al. Host serum iron modulates dengue virus acquisition by mosquitoes. **Nature Microbiology**, v. 4, n. 12, p. 2405–2415, 2019.