



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA, IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA

CURSO DE GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

Giovana Jover Campos

**Tempo de recuperação do coma induzido pelo frio (CCRT) como parâmetro
para quantificar a tolerância do mosquito *Aedes aegypti* ao *Zika virus***

Florianópolis

2024

Giovana Jover Campos

**Tempo de recuperação do coma induzido pelo frio (CCRT) como parâmetro
para quantificar a tolerância do mosquito *Aedes aegypti* ao *Zika virus***

**Trabalho de Conclusão de Curso submetido ao
curso de Farmácia do Centro de Ciências da
Saúde da Universidade Federal de Santa
Catarina como requisito parcial para a
obtenção do título de Farmacêutica.**

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

**Coorientadora: Dra. Mariana Maraschin da
Rocha**

Florianópolis

2024

Jover Campo, Giovana

Tempo de recuperação do coma induzido pelo frio (CCRT) como parâmetro para quantificar a tolerância do mosquito *Aedes aegypti* ao Zika virus. / Giovana Jover Campo ; orientador, José Henrique Maia Campos de Oliveira, coorientador, Mariana Maraschin da Rocha, 2024.

58 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2024.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. mosquito. 3. tolerância à doença. 4. mudanças climáticas. 5. arbovírus. I. Maia Campos de Oliveira, José Henrique. II. Maraschin da Rocha, Mariana . III. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Farmácia. IV. Título.

Giovana Jover Campos

Tempo de recuperação do coma induzido pelo frio (CCRT) como parâmetro para quantificar a tolerância do mosquito *Aedes aegypti* ao *Zika virus*

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do título de Farmacêutica e aprovado em sua forma final pelo Curso de Graduação em Farmácia.

Florianópolis, 10 de dezembro de 2024.

Coordenação do Curso

Banca examinadora

Prof. Dr. José Henrique Maia Campos de Oliveira
Orientador
Universidade Federal de Santa Catarina

Dr^a. Mariana Maraschin da Rocha
Coorientadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Dr^a Izabel Galhardo Demarchi
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Carlos Peres Silva
Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 2024

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, Andrea Kern Jover e Jonas Ribeiro de Campos, por sempre fazerem tudo para me proporcionar a melhor educação possível e me darem todo amor e suporte que eu precisasse. À Eduarda Jover Campos, minha irmã, por estar sempre do meu lado. À Vitória Leite Gonçalves, por acompanhar de perto todo o meu esforço, me incentivar sempre e me confortar nas horas em que precisei.

Aos meus amigos do curso, Renata Idalino de Oliveira, Stefanie Pellegrini Bazzanella, Julianna Mineiro Soares, João Victor Soares Vieira, Samuel Nascimento dos Santos, Leonardo da Silveira Pessi, Thiago dos Santos Gonçalves, Isabéli Araújo Rissi, Heloisa Batista Abreu, Matheus Garcia Fabre, Kauana Neves Zuri e Cristine Machado por me acompanharem nessa jornada, compartilhando momentos únicos, me dando apoio e me proporcionando risadas sempre. Aos meus amigos da vida, Isadora Santana Fischer, Maria Eduarda Osório, Caroline Costa e Iago André Lopes. Aos meus amigos da escola, Sofia Godinho Eller, Manoela de Lima Ramos, Maria Eduarda Benhardt e Pedro Vendrame por me acompanharem até aqui.

Agradeço também aos meus colegas de laboratório Mariana Maraschin da Rocha, Diego Novak, Lucilene Wildner Granella, Valdorion Klein Junior, Athina Reina, Lara D'Alkmin Trombe, Emili Bortolon dos Santos, Luiza Johanna Hubner, Bianca Melissa Figueiredo, Luís Gonzaga, por toda a ajuda durante esses anos com a rotina de laboratório, e experimentos. Especialmente à Mariana, ao Júnior e ao Diego, por me ensinarem tudo que eu aprendi no laboratório, me tornando capaz de finalizar esse projeto. Ao meu orientador, Prof. Dr. José Henrique Maia Campos de Oliveira, por me proporcionar o entendimento do que é e como fazer ciência, por me acompanhar do lado na bancada, me ajudando a planejar os próximos passos de cada experimento.

À Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) pela oportunidade de bolsa no Programa de Iniciação Científica e por me fornecer um ensino de excelência, que com certeza me tornou uma profissional capaz de exercer a profissão com maestria. Ao Laboratório de Imunobiologia (Lidi) por fornecer todos os materiais e instrumentos necessários para a realização dos experimentos.

RESUMO

Os insetos vetores são tolerantes a infecções por arbovírus. A tolerância é uma estratégia de defesa conservada evolutivamente desde plantas até insetos e humanos que não visa a eliminação do patógeno, mas sim regular os efeitos deletérios metabólicos e teciduais causados por eles. O mosquito vetor *Aedes aegypti*, responsável por transmitir arbovírus, causando epidemias sazonais, tem grande impacto na saúde pública brasileira. No atual cenário de mudanças climáticas, esse mosquito vem se alastrando para áreas fora das zonas epidemiológicas tradicionais, em razão de vários fatores, dentre eles a aclimação ao frio. Buscando auxiliar no combate às epidemias e compreender a relação do mosquito com os arbovírus, é fundamental dissecar as bases fisiológicas da resposta de tolerância à doença do vetor, analisando parâmetros relacionados à fisiologia do inseto durante a infecção. Na falta de métricas bem estabelecidas e considerando o impacto das mudanças climáticas na epidemiologia das arboviroses, analisamos neste trabalho se a tolerância térmica de fêmeas de *Aedes aegypti* é afetada pela infecção por *Zika virus*, a partir do Tempo de Recuperação do Coma Induzido pelo Frio (CCRT). As infecções por *Zika virus* (ZIKV) foram realizadas de forma sistêmica, pelos métodos de micro-injeção e *pricking*. Nossos resultados demonstram que a alimentação com sangue e a infecção pelo ZIKV reduzem o CCRT, sugerindo que o estresse fisiológico causado pela alimentação com sangue somado à infecção sistêmica por ZIKV impactam na fisiologia do mosquito com relação à sua tolerância ao frio .

Palavras-chave: mosquito; tolerância à doença; arbovírus; mudanças climáticas; estresse térmico.

ABSTRACT

Vector insects are tolerant to arbovirus infections. Tolerance is an evolutionarily conserved defense strategy, present from plants to insects and humans, which does not aim to eliminate the pathogen but rather to regulate the metabolic and tissue damage caused by it. The vector mosquito *Aedes aegypti*, responsible for transmitting arboviruses and causing seasonal epidemics, has a significant impact on Brazilian public health. In the current context of climate change, this mosquito has been spreading to areas outside traditional epidemiological zones due to several factors, including acclimatization to cold. To assist in combating epidemics and understand the mosquito's relationship with arboviruses, it is essential to dissect the physiological basis of the vector's disease tolerance response, analyzing parameters related to insect physiology during infection. In the absence of well-established metrics and considering the impact of climate change on the epidemiology of arboviral diseases, we analyzed in this study whether the thermal tolerance of *Aedes aegypti* females is affected by Zika virus infection, using the Cold-Induced Coma Recovery Time (CCRT). Zika virus (ZIKV) infections were performed systemically using microinjection and pricking methods. Our results show that blood feeding and ZIKV infection reduce CCRT, suggesting that the physiological stress caused by blood feeding, combined with systemic ZIKV infection, impacts the mosquito's physiology regarding its cold tolerance.

Keywords: mosquito; disease tolerance; arboviruses; climate change; thermal stress.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ciclo de vida.....	12
Figura 2 - Dinâmica de infecção viral em <i>Aedes aegypti</i>	14
Figura 3 - Boletim Epidemiológico. Monitoramento das arboviroses urbanas: semanas epidemiológicas 1 a 35 de 2023.....	15
Figura 4 - Esquema ilustrativo do genoma e replicação do Zika virus.....	16
Figura 5 - Boletim epidemiológico da infecção por Zika vírus. Monitoramento das arboviroses urbanas: semanas epidemiológicas de 1 a 35 de 2023.....	19
Figura 6 - Esquema ilustrativo da tolerância imunológica à doença.....	21
Figura 7 - Micro-injetor Nanoject II - Drummond Scientific.....	27
Figura 8 - Mosquito sendo infectado com Zika virus por pricking.....	28
Figura 9 - Esquema representativo do método para avaliar a tolerância ao frio em <i>Aedes aegypti</i> submetido a diferentes condições fisiológicas.....	30
Figura 10 - A alimentação com sangue não interfere no CCRT.....	34
Figura 11 - Representação esquemática da disseminação do CHIKV do intestino médio do <i>Aedes aegypti</i>	37
Figura 12 - Média titulações por micro-injeção 7 d.p.i 106 PFU/mL.....	38
Figura 13 - Titulação tempo zero de infecção por micro-injetor - Injeções múltiplas.	39
Figura 14 - Titulações 102, 104, 106 PFU/mL 7 d.p.i.....	40
Figura 15 - Titulações 2, 4, 7 e 14 d.p.i por pricking.....	41
Figura 16 - CCR 7 d.p.i pricking.....	42
Figura 18 - Esquema ilustrativo CCRT ZIKV SF X ZIKV BF.....	47
Figura 19 - CCRT ZIKV SF X ZIKV BF.....	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Análise estatística BF X SF.....	35
Tabela 2 - Análise estatística BF X SF múltiplas comparações.....	36
Tabela 3 - Análise estatística ZIKV X MOCK comparação das variáveis.....	44
Tabela 4 - Análise estatística ZIKV X MOCK comparação entre os tempos da variável tempo.....	44
Tabela 5 - Análise estatística ZIKV SF X ZIKV BF.....	49
Tabela 6 - Análise estatística ZIKV SF X ZIKV BF múltiplas comparações.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA - Análise de Variância

ATP - Trifosfato de Adenosina

BF - *Blood feed*

CCRT - *Chill Coma Recovery Time*

CCO - Temperatura de Início do Coma do Frio

CHIKV - Vírus chikungunya

DENV - Vírus da dengue

D.P.I - Days Post Infection

ESPIN - Emergência em Saúde Pública de Importância Nacional

OMS - Organização Mundial da Saúde

NS1A - Proteína não Estrutural 1 do *Zika virus*

NS2A - Proteína não Estrutural 2A do *Zika virus*

NS2B - Proteína não Estrutural 2B do *Zika virus*

NS3 - Proteína não Estrutural 3 do *Zika virus*

NS4A - Proteína não Estrutural 4A do *Zika virus*

NS4B - Proteína não Estrutural 4B do *Zika virus*

NS5 - Proteína não Estrutural 5 do *Zika virus*

PBS - Salina tamponada com fosfato

PII - Período de incubação intrínseco

PIE - Período de incubação extrínseco

RNA - Ácido Ribonucleico

R_0 - Número básico de reprodução

SCZ - Síndrome Congênita associada à infecção pelo vírus Zika

SF - *Sugar feed*

SE - Semana Epidemiológica

T.A - Temperatura Ambiente

T0 - Tempo zero

YFV - Vírus da febre amarela

ZIKV - *Zika virus*

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	5
1. INTRODUÇÃO.....	12
1.1 AEDES AEGYPTI.....	12
1.2 ARBOVÍRUS.....	14
1.3 ZIKA VIRUS.....	15
1.4 RESISTÊNCIA IMUNOLÓGICA.....	19
1.6 COMA INDUZIDO PELO FRIO.....	23
2. JUSTIFICATIVA.....	25
3. OBJETIVO.....	25
3.1 OBJETIVO GERAL.....	25
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
4.1 CRIAÇÃO DOS MOSQUITOS.....	26
4.2 ALIMENTAÇÃO DOS MOSQUITOS COM SANGUE.....	26
4.3 INFECÇÃO DOS MOSQUITOS.....	26
4.3.1 Micro-injeção.....	26
4.3.2 Pricking.....	27
4.4 CURVA DE SOBREVIVÊNCIA.....	28
4.5 ENSAIO DE TOLERÂNCIA AO FRIO (Chill Coma Recovery Time - CCRT).....	29
4.6 CULTURA DE CÉLULAS.....	30
4.7 QUANTIFICAÇÃO DA CARGA VIRAL POR ENSAIO DE PLACA.....	31
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	32
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
5.1 PADRONIZAÇÃO DO PROTOCOLO CHILL COMA RECOVERY TIME (CCRT).....	33
5.2 MICROINJEÇÃO E PRICKING COMO MÉTODOS DE INFECÇÃO.....	36
5.3 ENSAIOS DE CHILL COMA RECOVERY TIME (CCRT) MOSQUITOS INFECTADOS COM ZIKA VIRUS ALIMENTADOS COM AÇÚCAR.....	41
5.4 CHILL COMA RECOVERY TIME (CCRT) EM MOSQUITOS INFECTADOS COM ZIKA VIRUS ALIMENTADOS COM AÇÚCAR X ALIMENTADOS COM SANGUE.....	46
5.5 LIMITAÇÕES DOS ENSAIOS COMPORTAMENTAIS.....	49
6. CONCLUSÃO.....	50
7. PERSPECTIVAS.....	50
REFERÊNCIAS.....	52

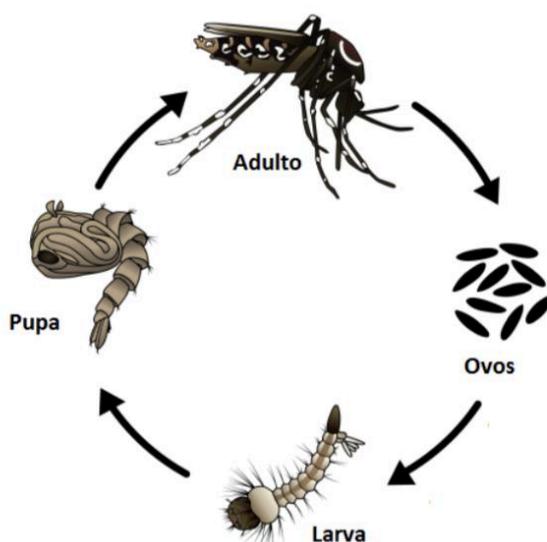
1. INTRODUÇÃO

1.1 *Aedes Aegypti*

O mosquito *Aedes aegypti* é da família *Culicidae*, pertence ao gênero *Aedes*, do subgênero *Stegomyia*. Inicialmente descrito na África, o *Aedes aegypti* é encontrado em diversas partes do mundo, majoritariamente em regiões de clima tropical e subtropical, devido às suas preferências por condições quentes e úmidas. Devido aos seus hábitos crepusculares, reprodução em criadouros artificiais e alimentação com sangue humano, o mosquito é amplamente prevalente em áreas urbanas (Consoli e Lourenço-de-Oliveira, 1994).

O ciclo de vida do inseto envolve duas fases distintas (Figura 1). Uma delas é a chamada imatura, que envolve os estágios de vida aquáticos (ovos, larvas e pupas). A outra fase ocorre quando o inseto passa pela maturação sexual, tratando-se do mosquito adulto. No estágio de mosquito, as fêmeas realizam o repasto sanguíneo (hematofagia) em animais vertebrados para adquirir nutrientes necessários para a maturação dos ovos (Bruce, 2004).

Figura 1 - Ciclo de vida



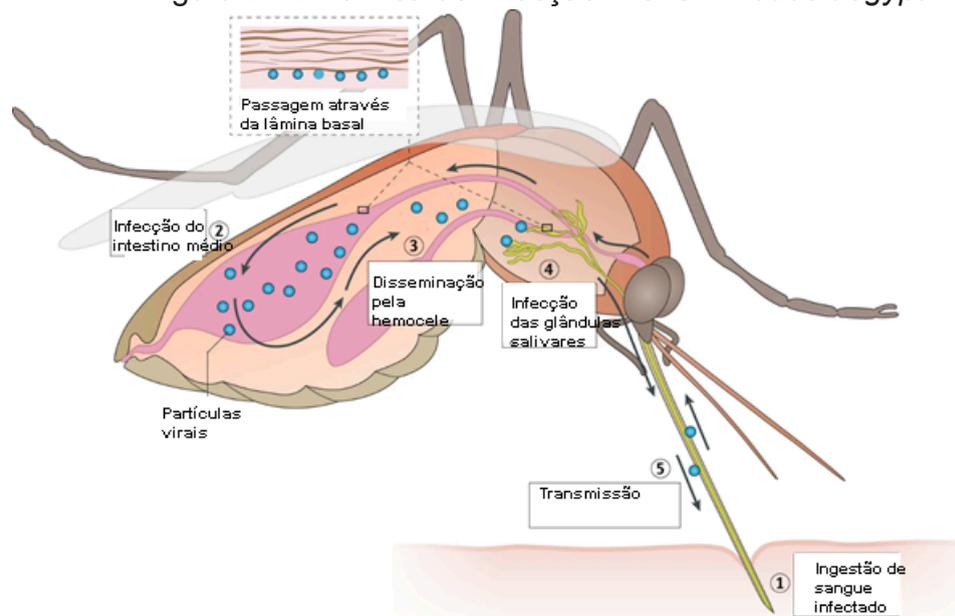
Fonte: Adaptado de Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz), 2019

O mosquito *Aedes aegypti* é o principal vetor global que transmite os vírus da dengue (DENV), febre amarela (YFV), chikungunya (CHIKV) e Zika (ZIKV) (Severson *et al.*, 2016). No Brasil, encontra-se disseminado em todos os estados, amplamente disperso em áreas urbanas (Consoli, Oliveira, 1994; Marcondes, Ximenes, 2016).

No processo de transmissão dos vírus, há um período de incubação intrínseco (PII), que ocorre no ser humano, e o extrínseco, no vetor. Esses períodos variam de acordo com o vírus envolvido na transmissão e, no caso do período de incubação extrínseco (PIE), também em função da temperatura ambiente (World Health Organization, 2009).

O vetor *Aedes aegypti* se infecta picando uma pessoa no período virêmico (presença do vírus no sangue), dando início ao PIE. Esse período compreende o tempo desde a ingestão de sangue virêmico pelo mosquito, até a presença do vírus na saliva do inseto (Duong *et al.*, 2015). No mosquito, a infecção se inicia no intestino médio. As partículas virais então se espalham através da hemolinfa para outros tecidos secundários como traquéia, ovários, corpo gorduroso e glândulas salivares (Figura 2) (Franz *et al.*, 2015; Hardy *et al.*, 1983). Após o vírus atingir a saliva do inseto, este permanece infectante até o fim de sua vida, que tem média de seis a oito semanas (Guzman *et al.*, 2016).

Figura 2 - Dinâmica de infecção viral em *Aedes aegypti*



O mosquito *Aedes aegypti* se infecta ingerindo sangue infectado (1). O sangue infectado chega ao intestino médio (2). As partículas virais se disseminam pela hemocele (3), atingindo as glândulas salivares (4). Com o vírus já tendo passado por todas as etapas de maturação, chegando às glândulas salivares, o inseto está apto a transmiti-lo (5). Fonte: Adaptado de Weaver *et al.*, (2021)

1.2 ARBOVÍRUS

Os arbovírus (do inglês, *Arthropod-borne virus*) são os vírus transmitidos aos animais vertebrados por vetores artrópodes, como mosquitos e carrapatos. Além de serem transmitidos, também têm parte do seu ciclo replicativo dentro do inseto (Lopes *et al.*, 2014). Entre os mosquitos, temos os gêneros *Aedes*, *Culex* e *Anopheles*, que adquirem o vírus picando uma pessoa já infectada e o transmitem picando novamente outra pessoa, num repasto sanguíneo subsequente. Dengue, chikungunya, febre amarela e Zika são arbovírus transmitidos pelas fêmeas do mosquito *Aedes aegypti* (Weaver *et al.*, 2021).

Os agentes etiológicos da dengue, chikungunya e Zika são, respectivamente, o vírus da dengue, o vírus chikungunya e o vírus Zika. Todos os arbovírus (DENV, CHIKV e ZIKV) possuem genoma de RNA de fita simples. O vírus Zika pode ser transmitido, além da forma vetorial, por transfusão sanguínea, transplante de órgãos e/ou transmissão sexual (Brasil Ministério da Saúde, 2021).

Os arbovírus transmitidos pelo *Aedes aegypti* são um problema de saúde pública grave, principalmente nas Américas. Tratando-se de doenças com sinais clínicos semelhantes, há uma dificuldade de suspeita inicial e conseqüentemente, de realização do diagnóstico diferencial e manejo clínico adequado. Isso colabora para o desenvolvimento de formas graves e óbitos (Calvo *et al.*, 2016).

Entre os arbovírus que circulam simultaneamente no Brasil, o DENV possui o maior número de notificações, com predomínio dos sorotipos 1 e 2 na última década (Figura 3) (Brasil, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente, 2023).

Figura 3 - Boletim Epidemiológico. Monitoramento das arboviroses urbanas: semanas epidemiológicas 1 a 35 de 2023



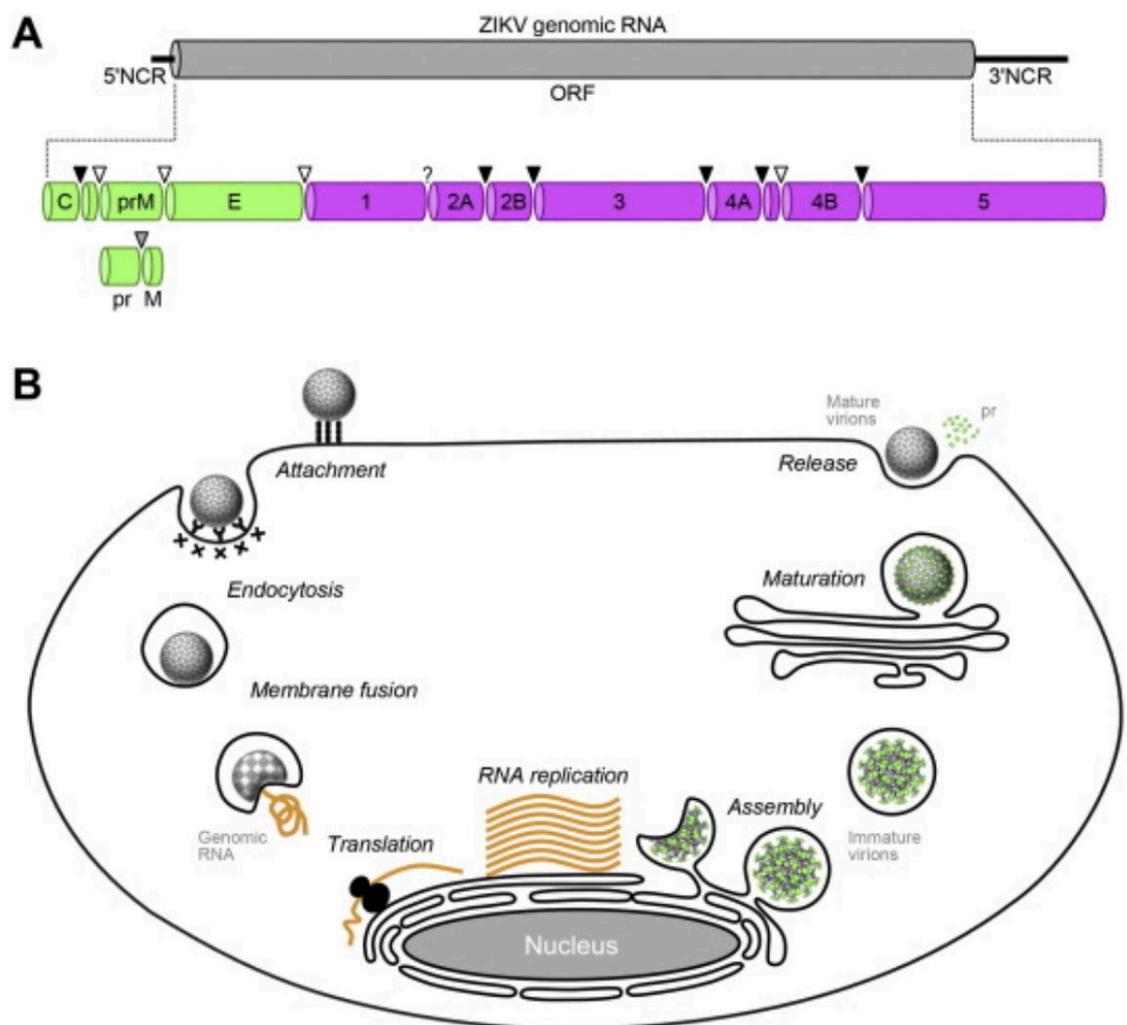
O gráfico expõe os números de casos prováveis e de óbitos confirmados pelas infecções por dengue, chikungunya, Zika e óbitos pela DCZ. Também compara as semanas epidemiológicas de 1 a 35, entre os anos de 2014 e 2023. DCZ (Doença Congênita Associada à infecção por *Zika virus*). Fonte: Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente; 2023.

1.3 ZIKA VIRUS

O *Zika virus* pertence ao gênero *Flavivirus*, assim como outros arbovírus como dengue e febre amarela. Seu material genético é composto por uma fita

simples de RNA de sentido positivo, não segmentado e envelopado. São codificadas três proteínas estruturais: Capsídeo (C), pré-membrana (Prm) e envelope (E) e sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) (Figura 4) (Chouin-Carneiro *et al.*, 2020, Song *et al.*, 2017). As três proteínas estruturais N-terminais participam da formação de vírions infecciosos, e as sete proteínas não estruturais C-terminais, da replicação do RNA genômico viral (Song *et al.*, 2017).

Figura 4 - Esquema ilustrativo do genoma e replicação do *Zika virus*



Estrutura do genoma e ciclo de replicação do ZIKV. (A) Ilustração do RNA genômico do ZIKV. Representação da região codificadora do genoma (ORF) em cinza. Em verde as três proteínas estruturais e em lilás, as sete proteínas não estruturais. NCR, região não codificadora. As setas marcam os locais de clivagem das proteínas. (B) Ciclo de vida do ZIKV. As etapas são: fixação, endocitose, fusão de membrana, tradução, replicação de RNA, montagem, maturação e liberação. Fonte: Song BH, *et al.*; 2017.

A entrada do vírus na célula acontece por ligação não específica com a superfície celular, seguido da internalização via endocitose mediada por clatrina de maneira dependente da glicoproteína viral E. Após os vírions serem entregues aos endossomos, ocorre uma fusão das membranas viral e endossomal e a liberação do genoma viral no citoplasma. Isso ocorre por alterações estruturais na glicoproteína E, induzidas por pH baixo. A replicação do RNA viral acontece por meio dos complexos de replicação, que contém o RNA viral e as proteínas, além de elementos da célula hospedeira necessários para a síntese. Os vírions no retículo endoplasmático e sua maturação ocorrem enquanto passam pela via secretora do hospedeiro, até serem liberados da célula por exocitose (Song *et al.*, 2017).

Em humanos, o vírus Zika infecta vários tipos celulares, incluindo células neurológicas imaturas, as células progenitoras neurais. O vírus também pode infectar células gliais, prejudicando o desenvolvimento neuronal. Foi detectado na placenta, cérebro, olhos, testículos, útero, vagina e fluidos corporais (sangue, lágrimas, saliva, sêmen, muco cervical e urina) (Ferraris *et al.*, 2019). Estudos também mostraram que as linhagens celulares derivadas da placenta ou do trato genital são suscetíveis à infecção pelo ZIKV, diferente de outros flavivírus, como o DENV, o que associa a infecção por ZIKV com o desenvolvimento de doenças congênitas (Chan *et al.*, 2019). O ZIKV também é capaz de se replicar no tecido testicular humano e nas células germinativas masculinas, persistindo no sêmen, explicando a transmissão sexual (Ferraris *et al.*, 2019).

A maior parte das infecções por Zika são assintomáticas ou manifestam uma doença febril autolimitada (Brasil, Ministério da Saúde, 2021). Os sintomas incluem febre abaixo de 38,5° C ou ausência, exantema, conjuntivite não purulenta, cefaleia, artralgia, astenia, mialgia, edema periarticular e linfonodomegalia (Brasil, Ministério da Saúde, 2021). Em casos mais graves, a infecção pelo vírus Zika pode causar a Síndrome de Guillain-Barré, que afeta os nervos periféricos, levando à fraqueza muscular e paralisia (Ferraris *et al.*, 2019). O período de incubação intrínseco do vírus Zika (ZIKV) é de dois a sete dias, em média. Estima-se que o período de viremia no homem se estende até o quinto dia do início dos sintomas (Pan American Health Organization, 2017).

O vírus foi identificado pela primeira vez em macacos na Floresta de Zika, em Uganda, em 1947, e em humanos, em 1952. Depois disso, foi detectado

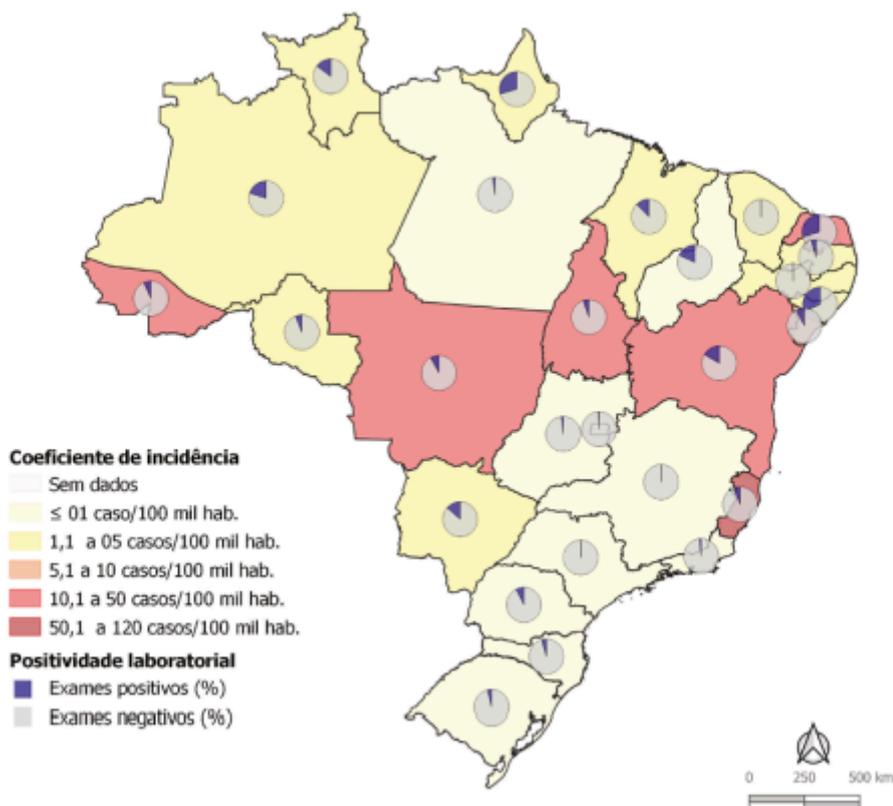
esporadicamente na Ásia e África. Em 2015, a infecção por *Zika virus* foi um problema sério de saúde pública em vários países, principalmente em gestantes, sendo responsável por causar malformações congênitas (microcefalia) e complicações neurológicas, como a Síndrome de Guillain Barré (GBS) (Chouin-Carneiro et al., 2020). Não existe tratamento nem vacina para a infecção por *Zika virus*, as formas de prevenção da doença se baseiam apenas em medidas de controle do vetor (Brasil. Ministério da Saúde, 2021).

A partir de 2015, no Brasil, o número de recém-nascidos diagnosticados com microcefalia aumentou em locais onde havia circulação do *Zika virus*. Em 2016, foi declarado pela OMS o estado de Emergência em Saúde Pública de Importância Nacional (ESPIN), em razão da Síndrome Congênita associada à infecção pelo vírus Zika. Os casos suspeitos passaram a ser monitorados por meio da notificação compulsória (Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente, 2023). Em 11 de maio de 2017, dezoito meses após a declaração de ESPIN, foi realizada uma nova avaliação de risco. E foi declarado o fim do estado de emergência resultante da infecção por *Zika virus* e sua associação com a microcefalia e outras alterações neurológicas pelo Ministério da Saúde do Brasil (Brasil. Ministério do Planejamento, Desenvolvimento e Gestão. IPEA; 2018).

Em 2023, entre a Semana Epidemiológica (SE) 1 a 32, foram notificados 8.425 casos prováveis de Zika no país, representando um aumento de 20,8% em relação ao ano anterior (6.972 casos prováveis). Não foram confirmados óbitos por Zika no ano de 2023, no Brasil. A taxa de positividade dos casos prováveis até a SE 32 foi de 4,0%, inferior às taxas de dengue e chikungunya no mesmo período. Os diagnósticos foram feitos a partir da pesquisa de anticorpos IgG e IgM no soro por ensaio imuno-enzimático (ELISA, do inglês *Enzyme-linked immunosorbent assay*) e detecção de RNA viral por biologia molecular, utilizando a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) com transcriptase reversa (RT-PCR) (Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente; 2024).

O Nordeste foi a região brasileira com maior coeficiente de incidência de Zika (Figura 5). Em relação às gestantes, no Brasil foram notificados 396 casos prováveis, dos quais 123 (31,0%) foram confirmados (Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente; 2023).

Figura 5 - Boletim epidemiológico da infecção por Zika vírus. Monitoramento das arboviroses urbanas: semanas epidemiológicas de 1 a 35 de 2023.



Fonte: Sinan On-line e E-SUS VS. Dados atualizados em 4/9/2023. GAL - dados acessados em 18/8/2023.

Fonte: Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente; 2024.

1.4 RESISTÊNCIA IMUNOLÓGICA

A resistência imunológica é a estratégia de defesa do hospedeiro contra infecções que se baseia na eliminação do patógeno. De maneira geral, a imunidade de resistência pode ser dividida em inata, que não depende de linfócitos e possui menor grau de especificidade e adquirida, que é baseada na seleção e proliferação de clones de linfócitos antígeno-específicos a partir da exposição aos agentes infecciosos ao longo da vida e geração de mecanismos efetores específicos, tais como anticorpos (Medzhitov, *et al.*, 2012).

A função imunológica é um processo energeticamente custoso, o que pode influenciar negativamente na adaptabilidade (*fitness*) do hospedeiro. Um efeito

negativo da imunidade de resistência é chamado de imunopatologia, quando há lesão tecidual mediada pelos mecanismos efetores da imunidade no próprio hospedeiro (Medzhitov, *et al.*, 2012).

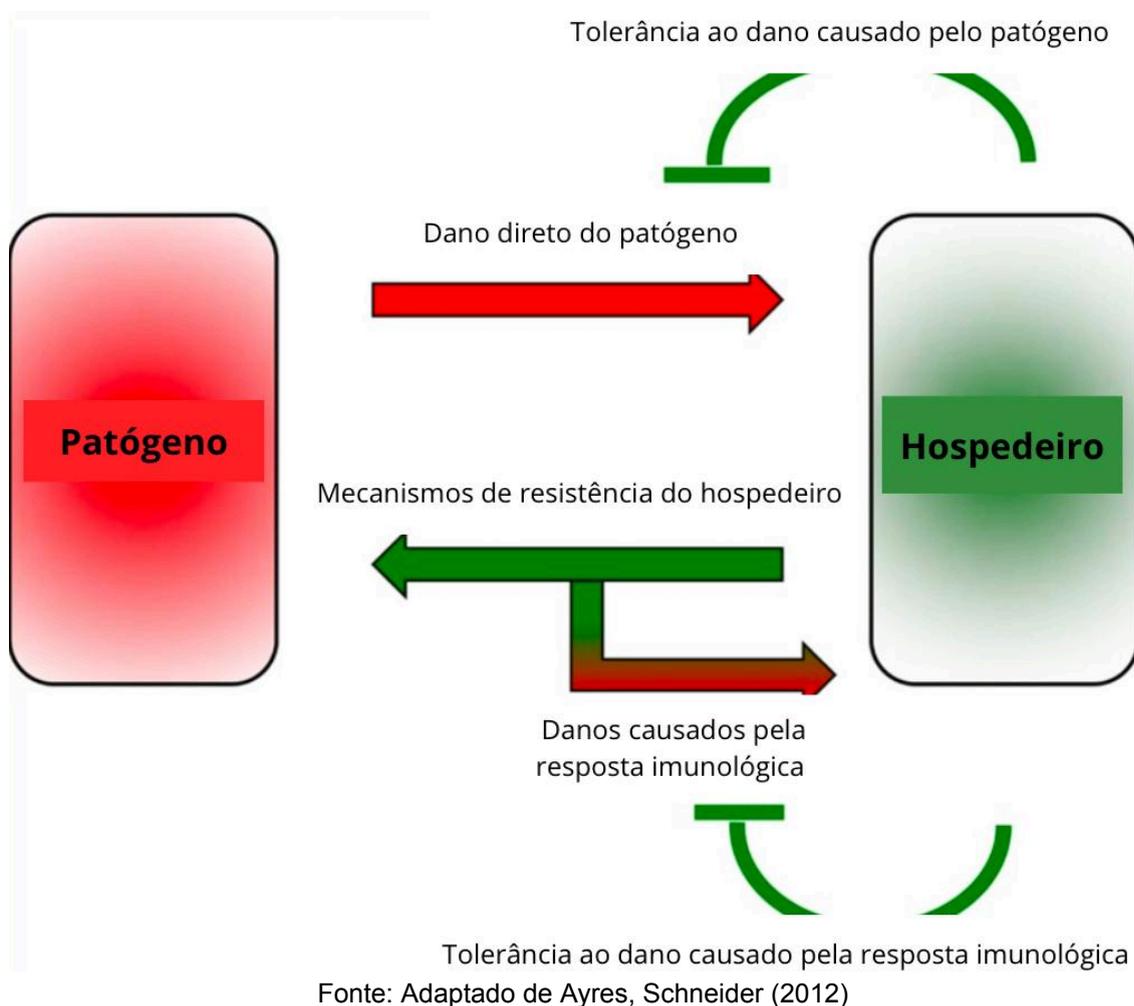
1.5 TOLERÂNCIA IMUNOLÓGICA À DOENÇA

A tolerância a doenças é uma estratégia de proteção do hospedeiro que compreende mecanismos que visam garantir a manutenção da fisiologia sem combater diretamente o microorganismo e a sua multiplicação. Esse conjunto de mecanismos diminui a susceptibilidade do hospedeiro à infecção e à resposta imunológica e inflamatória. Tanto o patógeno quanto a resistência imunológica podem causar dano tecidual pela morte celular e perda da homeostase e função do tecido (Medzhitov *et al.*, 2012, Ayres *et al.*, 2012).

Mesmo não regulando diretamente a carga de patógenos, o controle dos danos nos tecidos permite que os mecanismos de defesa imunológica se tornem mais eficazes, sem o aparecimento de imunopatologia. Portanto, o controle de danos teciduais pode funcionar regulando negativamente a virulência do patógeno (Soares, M *et al.*, 2017).

A tolerância à doença atua compensando os danos causados pela infecção por meio de diferentes mecanismos de reparo tecidual e resposta ao estresse, que variam de acordo com as vias relacionadas à patogenicidade do agente infeccioso e a resposta imunológica de resistência associada. O resultado disso é uma redução da mortalidade e morbidade relacionadas à doença infecciosa (Figura 6) (Medzhitov *et al.*; 2012).

Figura 6 - Esquema ilustrativo da tolerância imunológica à doença



A tolerância contribui para que o hospedeiro não desenvolva um quadro patológico que comprometa sua saúde de forma significativa. Esses mecanismos de proteção podem ser observados em artrópodes vetores de doenças, como o caso do mosquito *Aedes aegypti*. O mosquito é capaz de tolerar altos títulos virais sem comprometer sua fisiologia, garantindo a competência vetorial para a transmissão dos arbovírus (Oliveira *et al.*, 2020; Maraschin *et al.*, 2023 e 2024).

A competência vetorial é a capacidade intrínseca do inseto vetor de se infectar, sustentar o ciclo replicativo do agente patogênico e permitir sua transmissão. A tolerância ao patógeno está diretamente relacionada a esse processo, pois quanto maior a tolerância, maior a carga de patógenos o vetor é capaz de carregar e transmitir para novos hospedeiros (Ayres, Schneider, 2012).

Além da competência vetorial, existem outros fatores relacionados à transmissão de agentes patogênicos, como variabilidade no genoma do mosquito vetor, densidade populacional do inseto, taxa de picada e taxa de sobrevivência. A interação entre diferentes genótipos do mosquito e do vírus e de fatores ambientais influenciam a variação fenotípica na competência do vetor (Severson *et al.*, 2016).

O estudo da tolerância iniciou na botânica (Caldwell *et al.*, 1958; Schafer, 1971), e vem sendo descoberto no reino animal nas últimas décadas (Raberg *et al.*, 2009), como em moscas (Ayres, JS *et al.*, 2008) e roedores (Raberg *et al.*, 2007). A partir disso, é notória a presença desse mecanismo em animais. É importante salientar que componentes inatos e adaptativos do sistema imunológico regulam os mecanismos de controle de danos nos tecidos dos hospedeiros e contribuem para o estabelecimento da tolerância à infecção. Assim como, as interações hospedeiro-microrganismo comensal regulam a tolerância a doenças contra patógenos (Soares, M *et al.*, 2017).

Estudos revelaram que os vírus se beneficiam da infecção em insetos vetores, tendo sua replicação favorecida (Lambrechts, Saleh, 2019). O comportamento do hospedeiro também é manipulado, a fim de aumentar sua transmissão (Hughes, Libersat, 2019). Nos mosquitos, foram relatadas maior busca pelo hospedeiro e melhor desempenho na alimentação sanguínea (Murdock *et al.*, 2017).

Enquanto a resistência é medida a partir da queda da carga de patógenos, a tolerância pode ser avaliada por meio de uma curva dose-resposta, que relaciona a carga do patógeno e o impacto dessa carga na saúde do hospedeiro ao longo da infecção (Raberg *et al.*, 2009). A pergunta crítica é: como avaliar a saúde de um hospedeiro? Ao trabalharmos com o mosquito vetor *Aedes aegypti*, essa metodologia pode não ser suficiente para avaliar a saúde do inseto e medir sua tolerância às infecções (Loui, Alexandre *et al.*, 2016). Neste trabalho exploramos uma nova métrica que aborda o estado fisiológico específico do *Aedes aegypti*, o coma induzido pelo frio. A partir dela, buscamos avaliar se há efeito da infecção por *Zika virus* nesse parâmetro. Dessa forma, esperamos aprofundar o estudo da tolerância do mosquito vetor. É importante citar que essa métrica já foi avaliada em *Drosophila melanogaster* no contexto de infecções bacterianas (Linderman *et al.*, 2012).

Ao explorar novas abordagens para avaliar a tolerância do *Aedes aegypti* aos arbovírus, esperamos contribuir para o conhecimento necessário ao desenvolvimento de estratégias de controle das arboviroses por meio de intervenções no mosquito vetor.

1.6 COMA INDUZIDO PELO FRIO

O mosquito *Aedes aegypti* é um organismo pecilotérmico, variando sua temperatura corporal de acordo com a temperatura ambiente, não se adaptando às baixas temperaturas. Isso é notório ao observarmos os períodos de alta das epidemias de dengue, que ocorrem em períodos quentes e úmidos (Brasil, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente, 2023). A maior presença do inseto em regiões de clima tropical e subtropical evidencia isso. A habilidade do *Aedes aegypti* de sobreviver em regiões frias é limitada, o que restringe sua capacidade de colonizar essas regiões. Como outros ectotérmicos, as larvas do *Aedes aegypti* sofrem atraso e redução na pupação, além de uma maior mortalidade com a diminuição das temperaturas (De Majo *et al.*, 2017; Tun-Lin *et al.*, 2000). Os adultos também têm aumento na mortalidade, diminuição na postura de ovos e redução na fecundidade a 15 °C (Tun-Lin *et al.*, 2000). A sobrevivência do ovo até o estágio adulto cai de 92% a 20 °C para apenas 3% a 15 °C (Rueda *et al.*, 1990).

Levando em consideração as mudanças climáticas do último século, juntamente com o crescimento das áreas urbanas, o mosquito *Aedes aegypti* têm se dispersado em países que não pertenciam às áreas epidêmicas. Em uma era de alterações climáticas, a capacidade de aclimação ao frio pode facilitar a propagação desta espécie para latitudes mais elevadas. Compreender os limites de tolerância térmica do *Aedes aegypti* e sua capacidade de plasticidade fenotípica é importante para prever a propagação desta espécie, já que a temperatura ambiental está diretamente relacionada com a sua distribuição (Jass *et al.*, 2019).

O número básico de reprodução (R_0) é uma medida do potencial epidêmico de uma doença. Para doenças transmitidas por vetores, esse número é muito influenciado pela temperatura ambiente. Essa métrica estima quanto um caso infeccioso, durante sua fase de transmissão, pode gerar outros casos. Com $R_0 > 1$, a

epidemia tende a crescer e com $R_0 < 1$, tende a desaparecer. Foi descoberto que o risco de doenças, baseado no R_0 , atinge o pico nas temperaturas mais altas para patógenos transmitidos pelo mosquito *A. aegypti* (Wyk, Hannah *et al.*, 2022).

Nos últimos anos, o *A. aegypti* espalhou-se pelo nordeste dos EUA, atingindo o sul do Canadá. Esse fato sugere uma habilidade de adaptação térmica desenvolvida pelo vetor, em algum de seus estágios de maturação. O mosquito também conseguiu sobreviver no norte, em Washington Distrito de Columbia e Indiana, e no extremo sul, em Buenos Aires, na Argentina, e existem indícios de que essas populações estão se adaptando ao clima frio (Jass *et al.*, 2019).

Os insetos têm a capacidade de se adaptar ao frio se forem constantemente submetidos a temperaturas baixas. O coma induzido pelo frio se trata de um período reversível de imobilidade, que ocorre quando os insetos são expostos a baixas temperaturas (Linderman *et al.*, 2012). A capacidade de plasticidade térmica em baixas temperaturas já foi relatada em outros insetos, como moscas-das-frutas, baratas, gafanhotos e grilos (Andersen *et al.*, 2017; Coello Alvarado *et al.*, 2015; Colinet e Hoffmann, 2012; Košťál *et al.*, 2006).

O coma induzido pelo frio pode ser descrito como um estado de silêncio neuromuscular, que ocorre devido a uma perda local da homeostase iônica no sistema nervoso, levando à despolarização nervosa (MacMillan e Sinclair, 2011; Robertson *et al.*, 2017). A temperatura em que esse estado se inicia é chamada de temperatura de início do coma frio (CCO). Com a exposição prolongada a temperaturas baixas, os insetos vulneráveis ao frio experimentam desregulação iônica e hídrica, resultando em hipercalemia na hemolinfa (concentração elevada de K^+), o que leva a uma maior despolarização celular e a ativação dos canais de cálcio dependentes de voltagem, desencadeando um aumento descontrolado na apoptose celular (Bayley *et al.*, 2018 ; MacMillan *et al.*, 2015). O dano tecidual resultante dessa perda de homeostase pode aumentar devido a um maior tempo de exposição ou com temperaturas mais baixas (Overgaard e MacMillan, 2017).

A aclimatização térmica ou o desenvolvimento de maior tolerância ao frio resultam em maior plasticidade fenotípica do inseto. Os modelos preditivos da distribuição de *A. aegypti* não consideram atualmente a plasticidade nesta espécie, por ela ainda não ter sido descrita (Jass *et al.*, 2019). Levando em conta as problemáticas de uma maior disseminação do vetor, é de extrema importância que

estudos acerca desse parâmetro sejam feitos. Além de estimar previsões da ecologia do vetor e conseqüentemente, da epidemiologia das arboviroses, também acrescentaria uma métrica ao painel que avalia a capacidade do *Aedes aegypti* de responder e reagir ao seu ambiente, contribuindo para a compreensão da tolerância antiviral.

2. JUSTIFICATIVA

Este trabalho buscou estabelecer o método de coma induzido pelo frio em *Aedes aegypti* e analisar se ele é um parâmetro fisiológico afetado pela infecção por *Zika virus*. Esse método tem por objetivo contribuir para o estabelecimento do CCRT em avaliações que visam quantificar a tolerância do mosquito *Aedes aegypti* aos arbovírus que ele transmite. A inibição da resposta de tolerância pode proporcionar uma estratégia de interferência biotecnológica no combate às arboviroses.

3. OBJETIVO

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a tolerância térmica do mosquito *Aedes aegypti* ao frio, utilizando o tempo de recuperação do coma induzido pelo frio (CCRT).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Padronizar o protocolo de CCR em mosquitos *Aedes aegypti*.
- Testar diferentes técnicas de inoculação viral (microinjeção e pricking) como métodos para estabelecer a infecção de ZIKV em *Aedes aegypti*;
- Avaliar o impacto da infecção por ZIKV, bem como a alimentação com sangue no CCRT do mosquito *Aedes aegypti*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 CRIAÇÃO DOS MOSQUITOS

Mosquitos *Aedes aegypti* (cepa Red Eyes) foram criados no insetário do Laboratório de Imunologia - Lidi, da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Adultos e larvas foram mantidos em fotoperíodo de 12h claro/ 12h escuro, a aproximadamente 70-80% de umidade do ar e temperatura de 28 °C. Uma solução de sacarose a 10% era oferecida “*ad libitum*” aos adultos a cada três dias. Os ovos eram eclodidos semanalmente em recipientes plásticos contendo água filtrada e deaerada. As larvas eram transferidas para bandejas também de plástico e alimentadas com ração de cachorro (*Pedigree*®) triturada. Todos os mosquitos usados nos experimentos foram fêmeas entre três e dez dias de vida.

4.2 ALIMENTAÇÃO DOS MOSQUITOS COM SANGUE

Fêmeas de *Aedes aegypti* foram deixadas em jejum por um período entre 18 e 22 horas antes da alimentação. A alimentação foi feita com sangue humano adicionado de fagoestimulante ATP na concentração de 1mM pH 7. O sangue foi coletado de um indivíduo doador em tubos a vácuo contendo EDTA (número de protocolo aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa com Seres Humanos (CEPSH/UFSC) - CAAE: 89894417.8.0000.0121). Foi utilizado um alimentador artificial de vidro contendo a solução, aquecido por água a 37 °C (para mimetizar a temperatura corporal) durante uma hora. Após a alimentação, os mosquitos totalmente engorgitados foram separados em uma gaiola com solução aquosa 10% de sacarose, onde foram mantidos até a realização dos próximos experimentos.

4.3 INFECÇÃO DOS MOSQUITOS

4.3.1 Micro-injeção

As fêmeas de *Aedes aegypti* foram infectadas com o vírus Zika (ZIKV) (linhagem ZV BR 2016/16288 – Strottmann *et al.*, 2019). A preparação do estoque viral foi realizada conforme detalhado em Maraschin *et al.*, 2024. Para realizar a infecção, os mosquitos foram então imobilizados a -20° C, sendo passadas para uma placa de petri sobre o gelo em uma caixa de isopor, para as fêmeas serem separadas para o experimento. Com auxílio de um estereoscópio, os mosquitos foram submetidos a injeções intratorácicas. Cada injeção contém 69 nL de volume. Foram realizadas diluições seriadas do vírus em solução sobrenadante de células C6/36. As doses aplicadas foram de 1×10^6 , 1×10^5 e 1×10^4 PFU/mL. O micro-injetor utilizado foi o Nanoject II Microinjetor Drummond (Drummond Scientific, Filadélfia, EUA) (Figura 7). Todos os experimentos de infecção tiveram triplicata técnica e foram realizadas três replicatas biológicas.

Figura 7 - Micro-injetor Nanoject II - Drummond Scientific



Fonte: MedicalExpo. Automatic micro-injector Nanoject II. Drummond Scientific Company

4.3.2 Pricking

A infecção por meio do *pricking* consiste em inserir na cutícula/exoesqueleto do mosquito uma agulha mergulhada na diluição do vírus. Antes da infecção, os mosquitos foram imobilizados a frio e colocados em uma placa de petri sobre o gelo em uma caixa de isopor. Um estereoscópio foi usado para observar a área de incisão da agulha (Mondotte, Juan *et al.*, 2018). Foram realizadas injeções a partir de diluições da solução estoque de ZIKV (concentração: 8×10^6) com solução

sobrenadante de células C6/36, chamada aqui de solução mock (ou não infectada). As células C6/36 são células larvais embrionárias de *Aedes albopictus*.

Os mosquitos foram divididos em grupos com triplicatas para cada diluição, além de uma triplicata para o grupo Mock. Todos os experimentos de infecção tiveram triplicata técnica e foram realizadas três replicatas biológicas.

Figura 8 - Mosquito sendo infectado com *Zika virus* por pricking



Fonte: Dos autores (2024)

4.4 CURVA DE SOBREVIVÊNCIA

A curva de sobrevivência foi realizada com fêmeas entre 4 e 9 dias após eclosão. As fêmeas foram infectadas por micro-injeção ou por "pricking" e depois, imobilizados a frio para a separação em gaiolas, mantidas em uma incubadora a 28° C (+/- 2°C) e 80% (+/- 10%) de umidade, e alimentadas com solução de sacarose a 10% "ad libitum", trocada a cada dois dias. A sobrevivência foi registrada uma vez por dia, cinco vezes na semana (Maraschin *et al.*, 2023). Neste trabalho, acompanhamos a sobrevivência dos mosquitos em 4, 7 e 14 dias após a infecção (DPI), até a realização do ensaio de CCRT.

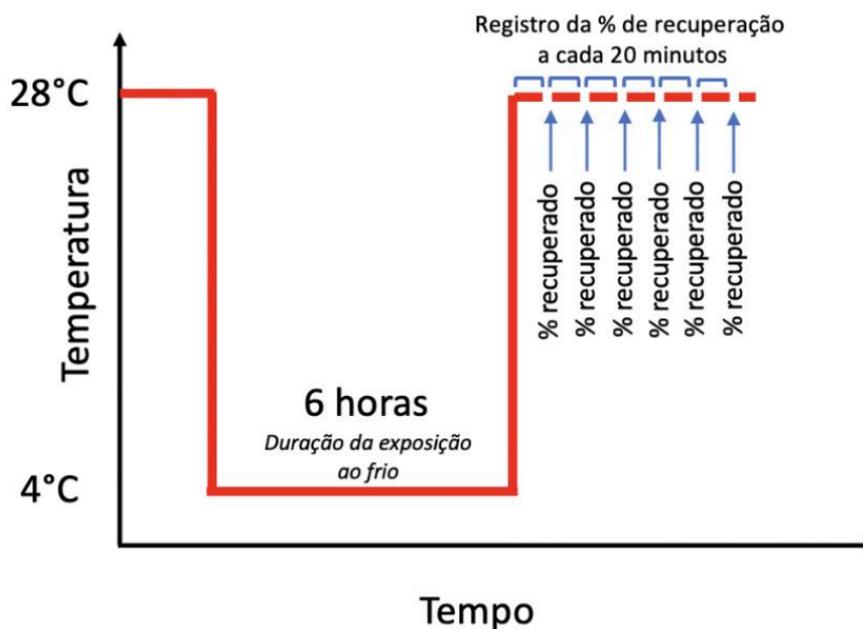
4.5 ENSAIO DE TOLERÂNCIA AO FRIO (*Chill Coma Recovery Time - CCRT*)

Este ensaio é realizado após aplicar diferentes estímulos aos insetos, como alimentação com açúcar, ingestão de sangue ou exposição à infecção. Em seguida, transferimos os mosquitos para um ambiente com uma temperatura entre 4 e 5° C (geladeira do laboratório), mantendo-os nesta condição por um período de seis horas para induzir um estado de coma induzido pelo frio. Esse tempo foi escolhido após experimentos preliminares nos quais tentamos determinar o tempo necessário para induzir completa paralisia no mosquito (coma). Após 6 horas no frio e indução de coma, os mosquitos são devolvidos ao ambiente de colônia com temperatura de 28° C e 80% de umidade. Monitoramos o tempo de recuperação do coma induzido pelo frio em intervalos de 20 minutos e sem tocar na gaiola ou alterar sua posição entre as avaliações (Figura 7). A intenção foi provocar a menor interferência nos mosquitos durante a medição do CCRT.

Consideramos que um mosquito se recupera quando ele é capaz de, espontaneamente, retomar sua posição normal, ou seja, ficar “de pé”, com as pernas em contato com a superfície da gaiola. É importante observar que este método foi adaptado com base em uma técnica previamente descrita por *Linderman et al.*, em 2012.

O ensaio é conduzido em grupos fêmeas de mosquito mantidos em gaiolas de cartolina com cerca de 470 mL de capacidade, que têm aproximadamente 10 centímetros de altura. Uma unidade experimental, ou replicata técnica, é formada por uma gaiola contendo 20 fêmeas. A porcentagem de mosquitos recuperados é registrada a partir desse número a cada 20 minutos, durante o ensaio.

Figura 9 - Esquema representativo do método para avaliar a tolerância ao frio em *Aedes aegypti* submetido a diferentes condições fisiológicas



Fonte: Elaborado pelos autores (2023).

4.6 CULTURA DE CÉLULAS

Células Vero (células de rim de macaco verde africano *Cercopithecus aethiops* - ATCC®, CCL-81™ - CRL-1586™) foram cultivadas em meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM 1x, GIBCO) suplementado com: 5% de soro fetal bovino (SFB, - GIBCO, Thermo Fisher Scientific), 1% de Glutamina (GIBCO) e 1% de penicilina e estreptomicina (P/S - GIBCO, Thermo Fisher Scientific). As células foram mantidas em estufa a 37° C e atmosfera de 5% de dióxido de carbono (CO₂). A linhagem celular foi testada mensalmente pela doutoranda Daiane Bobermin (Programa de Pós-graduação em Farmacologia - UFSC), por ensaio de PCR para contaminação por micoplasma.

4.7 QUANTIFICAÇÃO DA CARGA VIRAL POR ENSAIO DE PLACA

Para a realização do ensaio, as células Vero foram semeadas em uma densidade de 5×10^4 células/poço em placas de 24 poços e mantidas a 37° C e 5% CO₂ por 24 horas.

No dia seguinte, as amostras de mosquitos *Aedes aegypti* inteiros, infectados ou não com ZIKV foram higienizadas com etanol 70%, hipoclorito 1% e salina estéril 0,9%. Depois foram colocados individualmente em tubos (1,5 mL) com *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM 1x, GIBCO) para a preparação do homogenato. O homogenato foi preparado com o uso de pistilos estéreis (um por mosquito) e de um vórtex manual. Em seguida, o homogenato foi centrifugado a 3.200 x g por cinco minutos a 4 °C.

Os homogenatos foram diluídos em séries de 10 (10^{-1} a 10^{-4}) em meio DMEM 1x suplementado, e as células Vero foram incubadas com 200 µL de cada diluição contendo o homogenato de mosquitos contendo ZIKV por 60 minutos, à 37 °C e 5% CO₂. Após o período de infecção das células, o meio foi removido, e foi adicionado DMEM semissólido 1,6%. As placas permaneceram por quatro dias em estufa a 37 °C e 5% CO₂ e a titulação foi quantificada por PFU/mL (unidades formadoras de placa/mL). A revelação foi feita utilizando paraformaldeído 3%, para a fixação das células, e cristal violeta 0,8% para corar os poços. Todas as titulações foram realizadas com pelo menos 5 mosquitos infectados e quantificados individualmente e tiveram três replicatas biológicas.

O cálculo da titulação foi feito pela contagem de unidades formadoras de placas (PFU) por poço x diluição. O valor foi multiplicado por 5, pelo uso de $\frac{1}{5}$ do homogenato para as diluições.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram analisados utilizando o software GraphPad Prism 9.

Para realizar a análise estatística foi utilizada a Análise de Variância de dois termos para avaliar as diferenças estatisticamente significativas entre as condições experimentais. Os dois termos se referem às variáveis independentes que estamos investigando: tempo de recuperação do coma induzido pelo frio (20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160 minutos) e infecção por *Zika virus* (Mock e ZIKV) e/ou estado alimentar (SF e BF). A ANOVA de dois termos nos permite decompor a variação observada nos dados em componentes atribuíveis a cada uma das variáveis independentes, bem como à interação entre elas. Isso nos ajuda a determinar se existem efeitos principais significativos de cada variável e se a interação entre elas desempenha um papel relevante nas diferenças observadas nas respostas dos mosquitos. Para realizar a ANOVA de dois termos, utilizamos um nível de significância pré-determinado (geralmente $\alpha = 0,05$) e avaliamos se as diferenças observadas são estatisticamente significativas. Caso sejam, podemos realizar testes de comparações múltiplas para identificar quais grupos específicos apresentam diferenças significativas entre si. Essa análise estatística é fundamental para a interpretação dos resultados e permite quantificar o impacto das variáveis independentes nas respostas dos mosquitos, fornecendo uma base sólida para nossas conclusões no estudo.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PADRONIZAÇÃO DO PROTOCOLO *CHILL COMA RECOVERY TIME* (CCRT)

O mosquito *Aedes aegypti* é um animal pecilotérmico, portanto, sua temperatura corporal varia conforme o ambiente. Quando exposto a baixas temperaturas, o inseto entra em um estado de coma do frio, um período reversível de imobilidade (Linderman *et al.*, 2012; Overgaard e MacMillan, 2017).

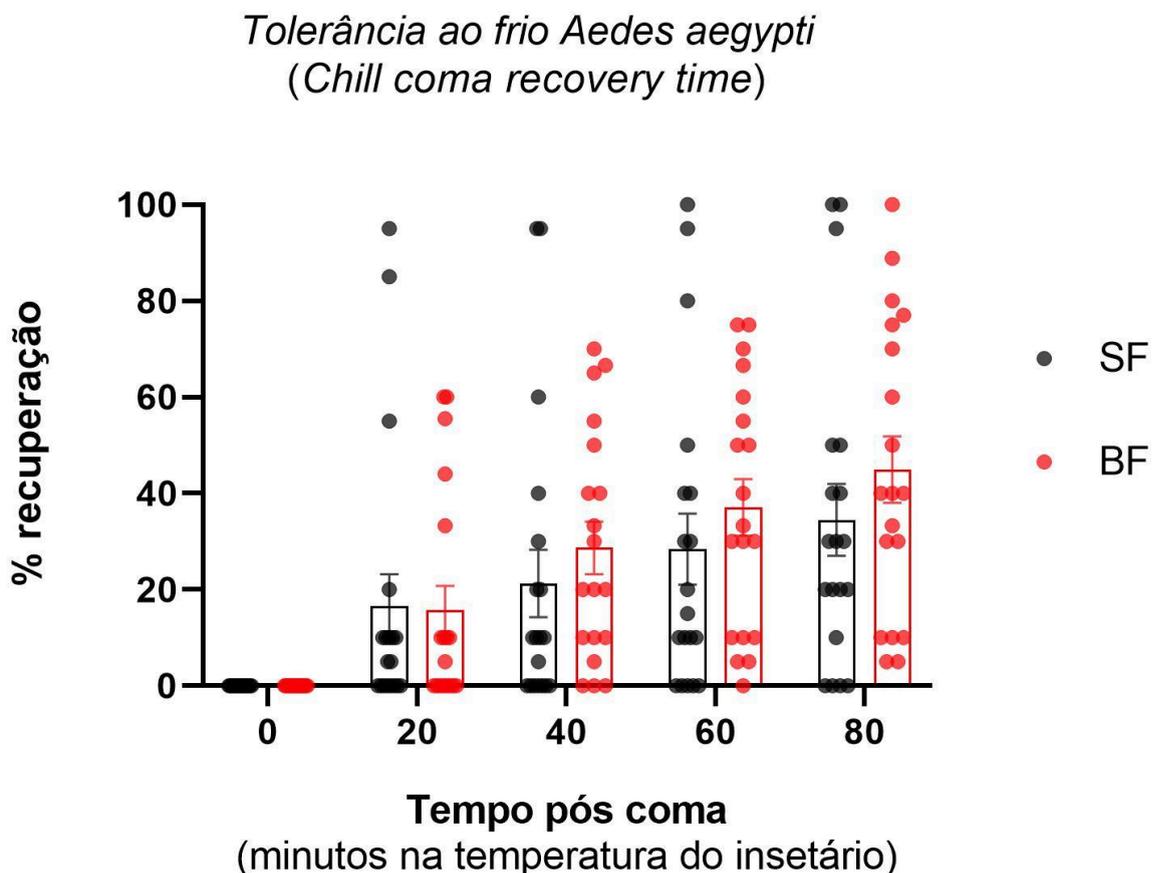
Com as mudanças climáticas do último século são esperadas alterações na fisiologia e na competência vetorial. Trabalhos evidenciaram que variações na temperatura tem múltiplos impactos na biologia do vírus e do mosquito, como na transmissão do vírus (Winokur *et al.*, 2020; Murrieta *et al.*, 2021). Neste trabalho não exploramos o impacto do aumento da temperatura, apenas da diminuição.

Primeiramente, criamos um protocolo para o experimento do “*Chill Coma Recovery*”. O método foi adaptado de Linderman, realizado em *Drosophila melanogaster* (Linderman *et al.*, 2012). Em experimentos preliminares não apresentados nesta monografia, testamos diferentes tempos e temperaturas para estabelecer o coma induzido pelo frio sem que ocorresse a morte do inseto.

Todos os ensaios de CCRT foram realizados no mesmo período do dia, durante a tarde. O motivo disso foi o impacto do ciclo circadiano no comportamento dos mosquitos (Shetty *et al.*, 2022). Outro importante procedimento foi a não movimentação das gaiolas durante todo o período do ensaio, para evitar que esse fator externo impactasse no experimento.

O primeiro experimento de CCRT realizado, foi com grupos de mosquitos não infectados, a fim de avaliar o impacto da alimentação com sangue no parâmetro de CCRT (Figura 10). Determinamos assim, que a alimentação com sangue não interfere no parâmetro de CCRT.

Figura 10 - A alimentação com sangue não interfere no CCRT



Fêmeas de *Aedes aegypti* foram alimentadas com sacarose 10% (*ad libitum*) (SF) ou sangue (BF) e submetidas ao CCRT 24 horas após alimentação. Cada ponto representa um grupo de 20 mosquitos pertencentes a uma mesma gaiola. Esse experimento foi repetido seis vezes. Quatro dos experimentos continham três replicatas técnicas, com n de 20 mosquitos. Os outros dois, cinco replicatas técnicas, com n de 20 mosquitos.

Fonte: Dos autores (2023)

A ingestão de sangue pelos mosquitos causa estresse no inseto. A hemoglobina presente nas hemácias é composta pelos grupamentos heme, que contém ferro (Fe). O heme é uma molécula pró-oxidante, liberada com a degradação da hemoglobina. A liberação dessa estimula a ação de espécies reativas de oxigênio (ROS), gerando dano tecidual (Oliveira *et al.*, 2011). O estresse também está relacionado com a temperatura do sangue ingerido. O sangue humano fica em torno de 36,5° C, enquanto a temperatura ideal para o desenvolvimento do *Aedes aegypti*

é entre 26 e 28° C. A microbiota intestinal também aumenta, devido ao grande valor nutritivo do sangue (Sterkel *et al.*, 2017).

Esse estresse gerado pela ingestão de sangue não influenciou no CCRT. Esperávamos que a alimentação com sangue pudesse pré-condicionar o *Aedes aegypti* ao estresse do frio. Isso porque, com a ingestão de sangue, a homeostasia do inseto é adaptada pela expressão de proteínas de estresse térmico, as chaperonas (King, MacRae, 2015). Sendo possível uma indução anterior das chaperonas, permitindo com que as proteínas celulares mantivessem uma conformação e a célula, sua funcionalidade adaptada a temperaturas estressantes ao inseto. Porém, isso não foi observado.

A análise estatística pelo ANOVA de 2 termos, não demonstrou diferença significativa entre os diferentes estados alimentares.

Tabela 1 - Análise estatística BF X SF

Variáveis	% variação total	Valor de P	Valor de P sumário	Significativo?
Tempo x alimentação	0.6656	0.3136	ns	Não
Tempo	23.32	<0.0001	****	Sim
Alimentação	0.8026	0.4742	ns	Não

Ns = não significativo. Fonte: Dos autores (2024)

Tabela 2 - Análise estatística BF X SF múltiplas comparações

Teste de variação múltipla Sidak	Diferença média	Intervalo de confiança 95%	Sumário	Valor de P ajustado
0	0.000	-	-	-
20	0.9011	-21.93 a 23.73	ns	<0.9999
40	-7.368	-31.52 a 16.77	ns	0.9299
60	-8.684	-34.33 a 16.96	ns	0.8956
80	-10.48	-38.14 a 17.17	ns	0.8444

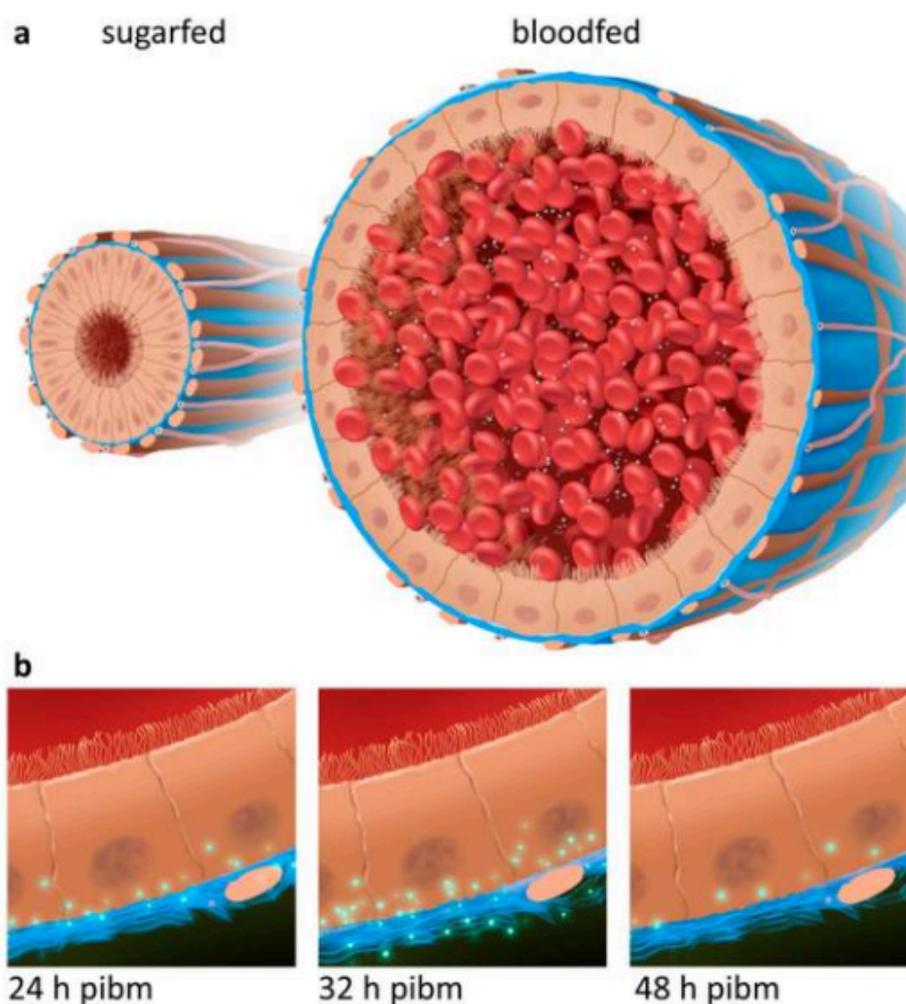
Ns = não significativo. Fonte: Dos autores (2024)

5.2 MICROINJEÇÃO E PRICKING COMO MÉTODOS DE INFECÇÃO

A micro-injeção e o pricking foram escolhidos como métodos de infecção, por se tratarem de formas de infecção sistêmica, garantindo que uma maior população de mosquitos submetida ao experimento se infecte. Na infecção oral, os mosquitos são alimentados com sangue infectado. Através dela, não é garantido que todos os mosquitos alimentados se infectem, havendo também uma grande variação no título viral (Hodoamede et al., 2022).

Para que as partículas virais ingeridas pelo *Aedes aegypti* consigam infectar com sucesso o artrópode, é necessário que atinjam as células epiteliais do intestino. As que permanecem na luz intestinal, não geram infecção (Kantor et al., 2018).

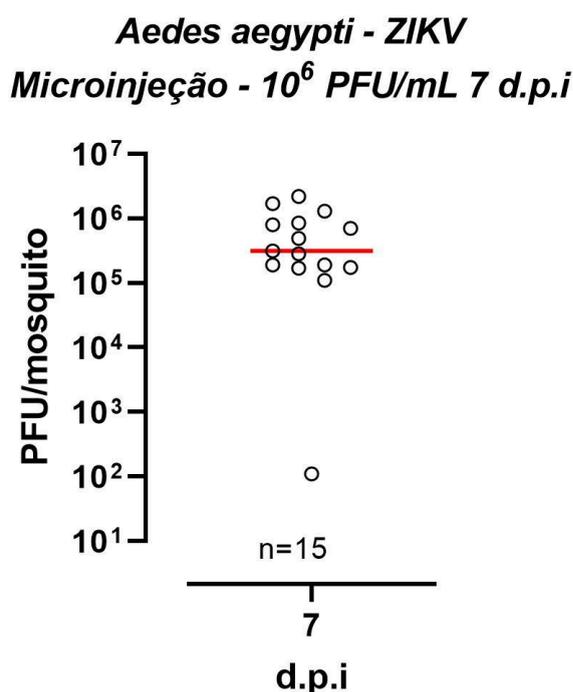
Figura 11 - Representação esquemática da disseminação do CHIKV do intestino médio do *Aedes aegypti*



Intestino médio do mosquito alimentado com açúcar (esquerda) e com sangue (direita) (a). Disseminação do CHIKV (verde) através do intestino médio (azul) em 24, 32 e 48 horas após-alimentação com sangue infeccioso. Em 48 horas o vírus atravessa o intestino médio (b).
Fonte: Kantor, et al., 2018.

Para determinar a carga viral em unidades formadoras de placas (PFU)/mosquito, foram feitas titulações dos mosquitos infectados por micro-injeção. Na figura 12 é possível observar a média das titulações dos três experimentos de infecção por microinjeção, por *Zika virus*. As titulações foram feitas com fêmeas no sétimo dia de infecção. A dose utilizada para infecção por *Zika virus* foi de 10^6 PFU/mL. Em cada experimento, cinco mosquitos infectados e um não infectado (controle) são titulados. Cada mosquito possui 4 diluições (-1 ao -4). Um poço é usado como controle das células Vero, recebendo apenas meio DMEM 1X suplementado.

Figura 12 - Média titulações por micro-injeção 7 d.p.i 10^6 PFU/mL



Fêmeas de *Aedes aegypti* foram infectadas através de microinjeção de *Zika virus* na concentração de 1×10^6 PFU/mL. Depois de 7 dias de infecção, foram feitas as titulações. O gráfico compila 3 experimentos, cada um com n de 10 mosquitos, sendo 5 deles usados para titulação.

Fonte: Dos autores (2023)

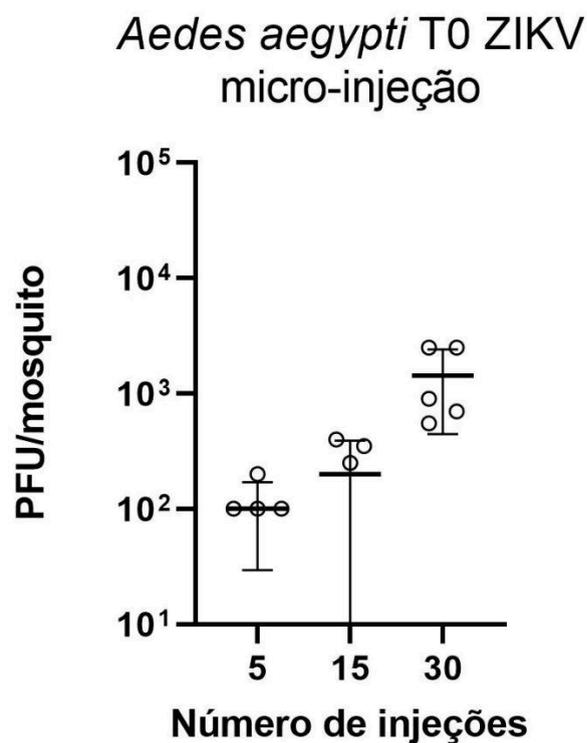
Para garantir que os mosquitos foram realmente infectados com a dose injetada (10^6 PFU/mL), separamos mosquitos recém infectados para realizar a

titulação do tempo zero (T0 = imediatamente após injeção). Ao realizarmos as titulações, notamos que não foi possível obter resultados, visto que a dose injetada a partir de um cálculo teórico do número de PFUs injetada era de aproximadamente 69 PFU, estando, portanto, abaixo da sensibilidade do ensaio de placa em PFU. Analisando resultados das titulações por ensaio de placa de outros estudos, podemos notar que o ensaio não possui sensibilidade para títulos virais abaixo de 100 PFU (Olukunle *et al.*, 2024).

$$\begin{aligned}
 1 \text{ mL} &= 1.000.000 \text{ nL} \\
 69 \text{ nL} &= 69 / 1.000.000 \text{ mL} \\
 69 \text{ nL} &= 0,000069 \text{ mL} \\
 \text{PFU} &= 10^6 \text{ PFU/mL} \times 0,000069 \text{ mL} \\
 \text{PFU} &= 10^6 \times 0,000069 \\
 \text{PFU} &= 69
 \end{aligned}$$

A partir disso decidimos testar quantas injeções seriam necessárias para conseguirmos obter o título viral através do ensaio de placa (Figura 13). Dividimos os mosquitos em quatro grupos: grupo controle (mosquitos não infectados); mosquitos infectados com 5 injeções; mosquitos infectados com 15 injeções e mosquitos infectados com 30 injeções. A solução de *Zika virus* utilizada foi de dose 10^6 PFU/mL. Foram separados cinco mosquitos de cada grupo infectado e três do grupo não infectado (grupo controle) para a titulação.

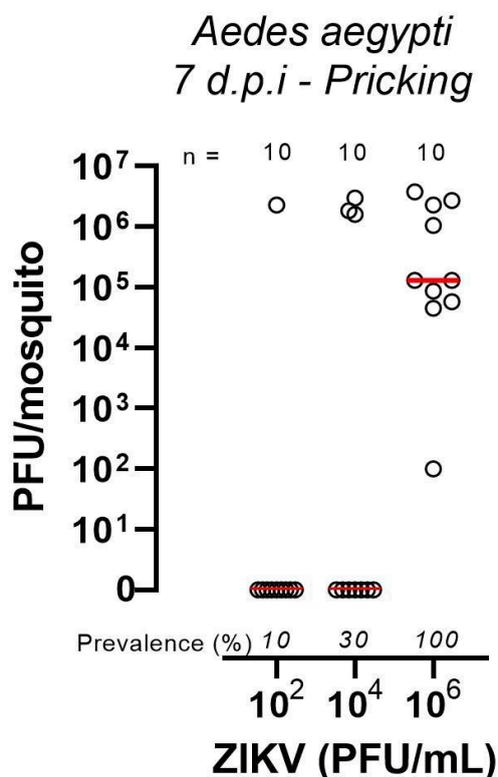
Figura 13 - Titulação tempo zero de infecção por micro-injetor - Injeções múltiplas



As titulações foram feitas com mosquitos inteiros individuais, no tempo 0 da infecção. Os mosquitos foram divididos em 3 grupos: os que receberam 5 injeções, 15 injeções e 30 injeções. Foram titulados 5 mosquitos de cada grupo. Cada mosquito recebeu 69 nL por injeção da solução de dose 10^6 PFU/mL de ZIKV.

Fonte: Dos autores (2023)

Com os experimentos de infecção por *pricking*, buscamos analisar a relação dose-prevalência de infecção dos mosquitos e a cinética de infecção, através da titulação viral por ensaio de placa (Figura 14).

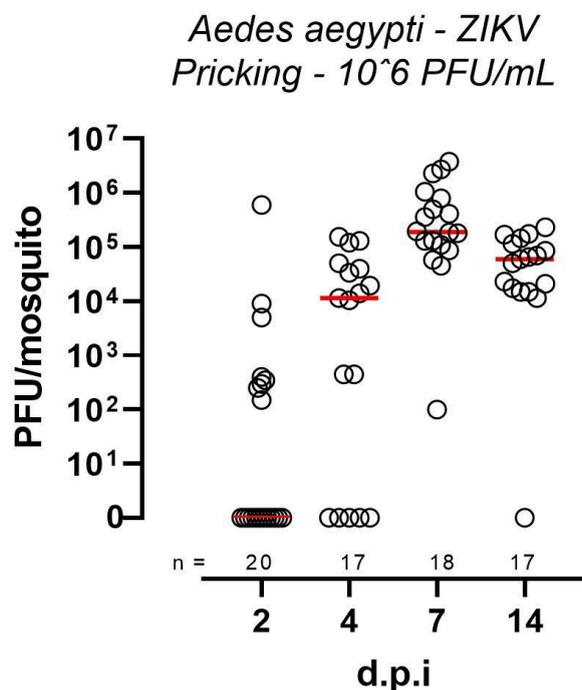
Figura 14 - Titulações 10^2 , 10^4 , 10^6 PFU/mL 7 d.p.i

As titulações foram feitas com mosquitos inteiros individuais, no dia 7 após infecção. Os mosquitos foram divididos em 3 grupos que receberam pricking das diluições virais do Zika vírus: $1,34 \times 10^2$, $1,34 \times 10^4$ e $1,34 \times 10^6$. Foram titulados 10 mosquitos de cada grupo.

Fonte: Dos autores (2024)

Na dose de $1,34 \times 10^6$ PFU/mL, 100% das fêmeas foram infectadas com o *pricking* quando avaliadas 7DPI. Já nas doses de 10^2 e 10^4 PFU/mL, a prevalência da infecção por *pricking* diminuiu proporcionalmente, revelando uma relação direta de dose x prevalência.

Em relação à cinética de infecção, é possível afirmar que a infecção sistêmica por meio do *pricking* gera infecção crônica, similar à obtida em mosquitos infectados pela via oral. No segundo dia pós-infecção não foi possível determinar o título viral da maioria dos mosquitos. De vinte fêmeas tituladas, apenas nove atingiram a sensibilidade do ensaio de placa. No quarto dia pós-infecção, a maioria das fêmeas está infectada com títulos virais entre 10^4 e 10^5 PFU. Podemos notar através do gráfico, que o sétimo dia é o momento em que a infecção atinge o pico, reduzindo, mas permanecendo até o décimo quarto dia após infecção.

Figura 15 - Titulações 2, 4, 7 e 14 d.p.i por *pricking*

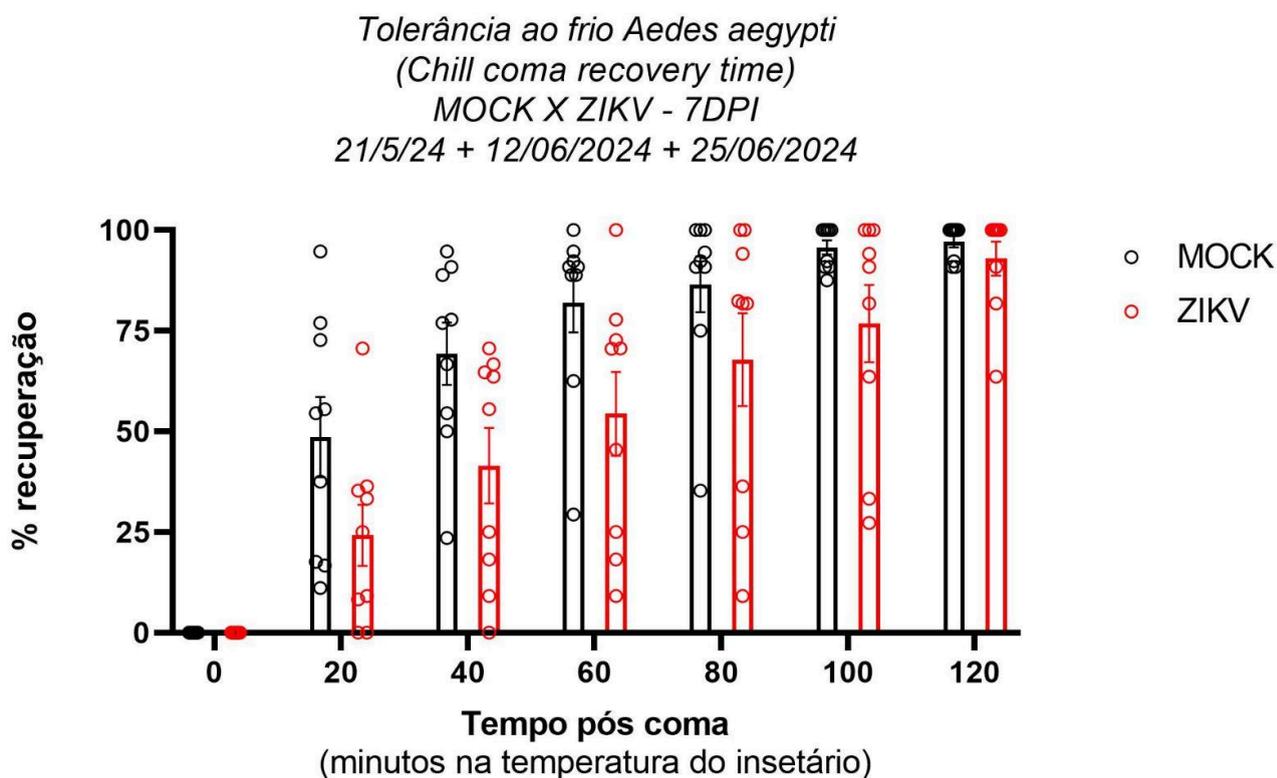
As titulações foram feitas com mosquitos inteiros individuais, nos dias 2, 4, 7 e 14 da infecção. Foram titulados respectivamente 20, 17, 18 e 17 mosquitos infectados com uma diluição de *Zika vírus* de $1,34 \times 10^6$ e um mosquito não infectado, por placa, como controle.

Fonte: Dos autores (2023)

5.3 ENSAIOS DE *CHILL COMA RECOVERY TIME* (CCRT) MOSQUITOS INFECTADOS COM ZIKA VIRUS ALIMENTADOS COM AÇÚCAR

Nos três experimentos de CCRT realizados sete dias após a infecção por *pricking* (Figura 16), foi possível notar que os mosquitos infectados pelo *Zika vírus* se recuperaram mais lentamente do coma induzido pelo frio, quando comparados com o grupo controle (Mock), sugerindo uma menor tolerância ao frio (Tabela 3). Os experimentos foram realizados com triplicada técnica e em três replicatas biológicas. A dose utilizada para infecção por *Zika vírus* foi de $1,34 \times 10^6$ PFU/mL.

Figura 16 - CCR 7 d.p.i pricking



Fêmeas de *Aedes aegypti* submetidas ao pricking com sobrenadante de células C6/36 (MOCK) e de $1,34 \times 10^6$ PFU/mL de Zika vírus (ZIKV) foram colocados na geladeira por 6 horas, 7 dias após a injeção. A temperatura da geladeira era de 5,3°C. O experimento foi feito em triplicata técnica, com 3 gaiolas de cada grupo. O experimento avalia e compara quanto tempo as fêmeas de cada grupo demoram para se recuperar do coma induzido pelo frio após voltarem às condições de temperatura e umidade do insetário (umidade de 76% e temperatura de 28,1°C).

Fonte: Dos autores (2024).

O ensaio de CCRT também foi realizado em grupos de mosquitos em 4 e 14 d.p.i, porém, não foi observada diferença entre os grupos Mock e ZIKV nesses ensaios.

Considerando que as fêmeas infectadas com *Zika virus*, no sétimo dia de infecção, se recuperaram mais lentamente do CCR, este parâmetro mostra-se afetado pela infecção, sendo uma possível lacuna da tolerância antiviral a ser explorada. Também sugere uma relação dose-resposta da tolerância ao frio, já que o sétimo dia de infecção foi o com maior título viral. Com quatro e quatorze dias de infecção, onde o título foi de um a dois logaritmos decimais a menos, essa redução da tolerância ao frio não foi observada.

De modo geral, o mosquito *Aedes aegypti* é considerado tolerante aos arbovírus, sendo a infecção por estes pouco danosa (Lambrechts e Scott, 2009),

não causando mortalidade no vetor (Barret e Higgs, 2007). Para isso, o mosquito sofre várias adaptações metabólicas, respostas ao estresse e reparo dos tecidos. Assim, mesmo com a replicação ativa do patógeno, sua saúde é mantida (Lambrechts e Saleh, 2019).

A curva de sobrevivência é um método bem descrito para avaliar a saúde do *Aedes aegypti* (Maraschin *et al.*, 2023; da Silveira *et al.*, 2018; Martin *et al.*, 2010). Porém, a alimentação dos mosquitos com sangue com altos títulos virais de dengue e Zika, não induziu mortalidade (Maraschin *et al.*, 2023). Essa medida é limitada, visto que seria necessário um dano enorme ao inseto, para culminar na sua morte. Assim, a avaliação de outros parâmetros fisiológicos do inseto se faz necessária.

Em recente artigo do nosso grupo, foram relatadas diferenças significativas na oviposição, na fertilidade dos ovos das fêmeas, e na atividade de voo dos mosquitos, quando infectados com DENV-4. A atividade de voo dos mosquitos infectados foi beneficiada, enquanto a fertilidade, prejudicada (Maraschin *et al.*, 2024). Esses resultados alterados na fisiologia do *Aedes aegypti* durante as infecções por arbovírus revelam que estas impactam na saúde do inseto, sendo necessários mais estudos para compreender esse processo.

No estudo de Linderman, usado como base para estruturação do protocolo do CCRT, não foi observada relação entre a carga bacteriana de infecção e a recuperação tardia do coma induzido pelo frio. (Linderman *et al.*, 2012). Outros estudos demonstraram que nos períodos de frio há regulação positiva de genes de resposta ao estresse, também induzidos durante a infecção. Um exemplo são as proteínas de choque térmico, como a Hsp70 (Colinet H, Lee SF, Hoffmann A, 2010; Udaka H, Ueda C, Goto SG, 2010; Schwan WR, Goebel W, 1994). Assim, Linderman conclui que a infecção e o frio, podem juntos sobrecarregar os mecanismos de proteção, tendo impacto na recuperação do coma (Linderman *et al.*, 2012).

Ao realizarmos a análise estatística dos dados da Figura 16, concluímos que a diferença no tempo de recuperação dos mosquitos infectados por ZIKV e não infectados se mostrou significativa.

Tabela 3 - Análise estatística ZIKV X MOCK comparação das variáveis

Variáveis	% total de variação	Valor de P	Valor de P sumário	Significativo?
Tempo X infecção	1.819	0.0482	*	Sim
Tempo	63.12	<0.0001	****	Sim
Infecção	5.174	0.0409	*	Sim

Fonte: Dos autores (2024)

O parâmetro com maior variação foi o tempo, porém, a estatística associada a variável tempo se torna menos importante. A estatística associada a variável infecção também se mostra significativa, e é de maior importância na análise, pois está mais relacionada à pergunta do efeito do CCRT no mosquito infectado, o que estamos avaliando nesse projeto.

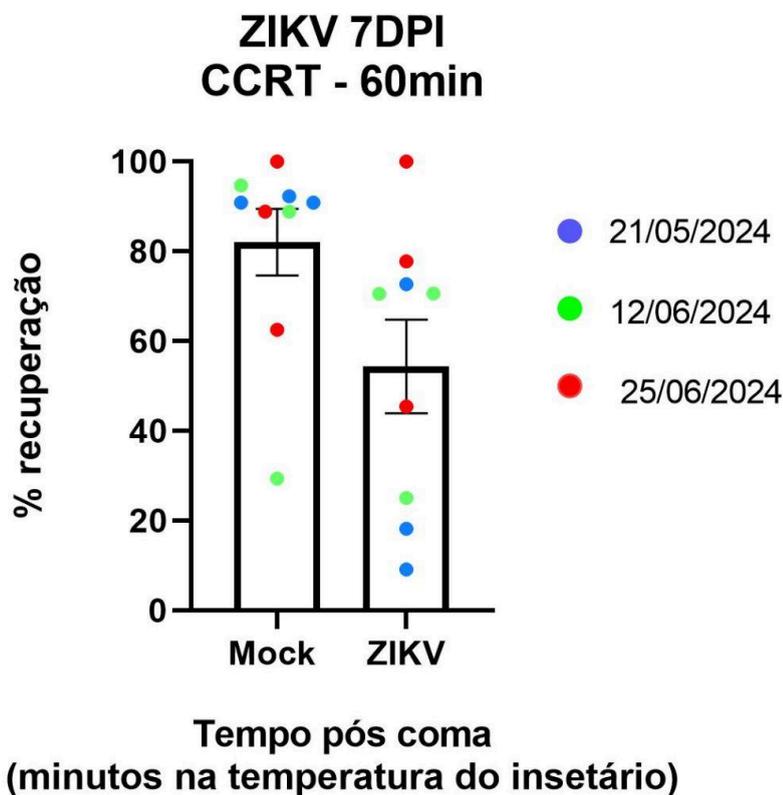
Na avaliação de cada intervalo de tempo (intervalo de 20 minutos) da variável tempo, não há diferença significativa. Apesar de nos tempos 40 e 60 minutos, o valor de P chegar próximo de uma significância.

Tabela 4 - Análise estatística ZIKV X MOCK comparação entre os tempos da variável tempo

Teste de variação múltipla Bonferroni	Diferença média	Intervalo de confiança 95%	Sumário	Valor de P ajustado
0	0.000	-28.64 a 28.64	ns	>0.9999
20	24.38	-4,261 a 53.01	ns	0.1501
40	27.83	-0.8030 a 56,47	ns	0.0621
60	27.68	-9.607 a 56.31	ns	0.0648
80	18.70	-9.937 a 47.34	ns	0.5337
100	18.95	-9.687 a 47.59	ns	0.5071
120	4.196	-24.44 a 32.83	ns	>0.9999

Ns = não significativo. Fonte: Dos autores (2024)

Figura 17 - CCR 60 min



Representação gráfica da distribuição no tempo de recuperação coma induzido pelo frio (CCRT), em cada intervalo de 20 minutos, nos primeiros 60 minutos de experimento.

Fonte: Dos autores (2024).

Analisando a diferença no tempo de recuperação com 60 minutos do CCRT (Figura 17), podemos dizer que há uma notável diferença intra-experimento. Após esse período, todos os mosquitos submetidos ao ensaio se recuperam. Cada cor corresponde a uma replicata técnica. É possível observar também, que a cada replicata, a diferença do tempo de recuperação entre os grupos Mock e ZIKV diminui, mostrando uma variação acima do desejado, sugerindo que pode ser necessário, em experimentos futuros, continuar refinando o protocolo de CCRT.

A partir da análise conjunta dos dados, podemos relacionar o fato do período epidemiológico das arboviroses no Brasil ser no verão, onde as temperaturas permeiam 30°C - 40°C, com uma maior porcentagem de mosquitos infectados. O menor número de infecções nos períodos de menor temperatura, é um efeito da baixa adaptabilidade do *Aedes aegypti* ao frio (De Majo *et al.*, 2017; Tun-Lin *et al.*, 2000; Tun-Lin *et al.*, 2000; Rueda *et al.*, 1990), acarretando em um menor número

de mosquitos circulantes. Porém, esse fato também pode ter influência da menor tolerância ao frio dos mosquitos infectados.

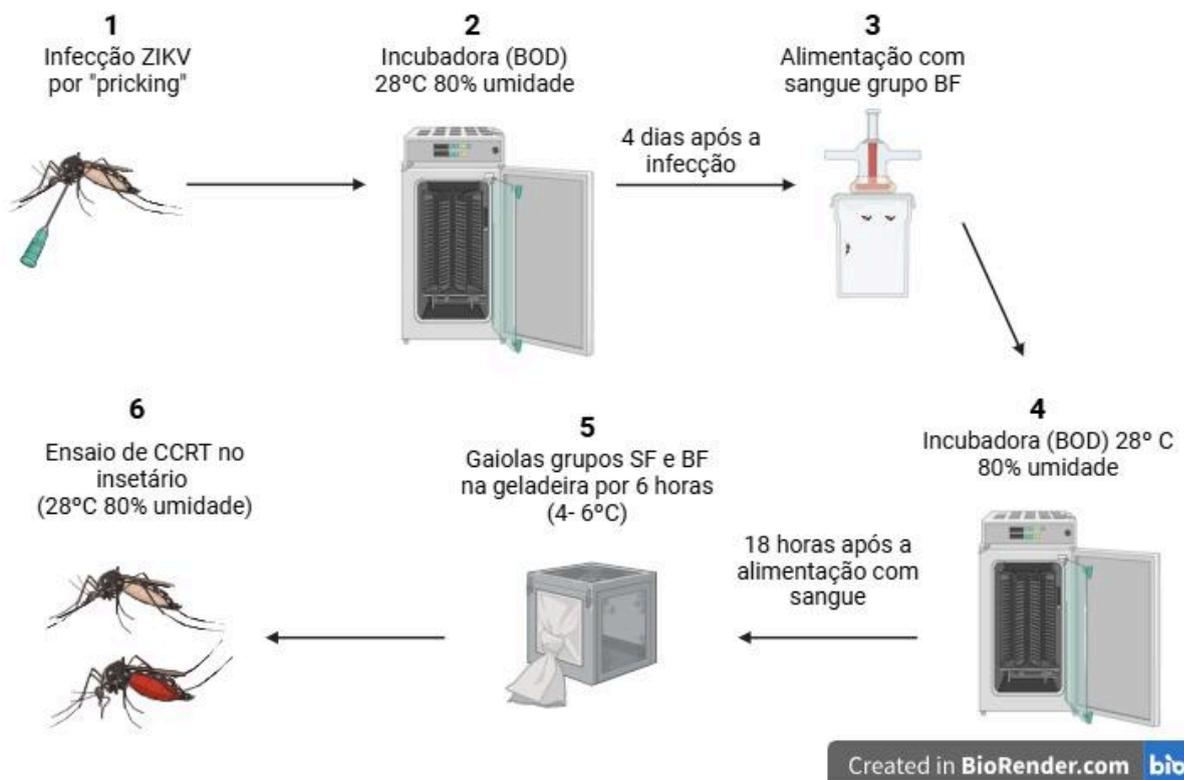
5.4 CHILL COMA RECOVERY TIME (CCRT) EM MOSQUITOS INFECTADOS COM ZIKA VIRUS ALIMENTADOS COM AÇÚCAR X ALIMENTADOS COM SANGUE

Considerando ser necessária a alimentação com sangue para o ciclo biológico dos mosquitos (Bruce, 2004) e a relação da ingestão de sangue com a infecção e transmissão dos arbovírus (Weaver *et al.*, 2021), decidimos incluir este fator no experimento de CCRT.

Para garantir que todos os mosquitos estivessem infectados no experimento de CCRT, foi realizada a infecção por *pricking*. A alimentação com sangue foi feita no quarto dia de infecção, e 18 horas depois, o ensaio de CCRT. O experimento foi realizado em triplicata técnica e biológica. As fêmeas infectadas foram divididas em dois grupos, um alimentado apenas com açúcar, e o outro com sangue. Os mosquitos submetidos ao ensaio de CCRT estavam no sexto dia de infecção. As titulações feitas anteriormente garantem uma infecção estabelecida, com título viral entre 10^4 e 10^6 PFU/mosquito (Figura 18).

A escolha da realização do experimento de CCRT dezoito horas após a alimentação com sangue, foi considerando estudos que relataram que a proteína de choque térmico Hsp70 retorna aos níveis normais de expressão após 24 horas da alimentação (Benoit *et al.*, 2011). Isso poderia impactar também no comportamento do mosquito, portanto no ensaio de CCRT.

Figura 18 - Esquema ilustrativo CCRT ZIKV SF X ZIKV BF

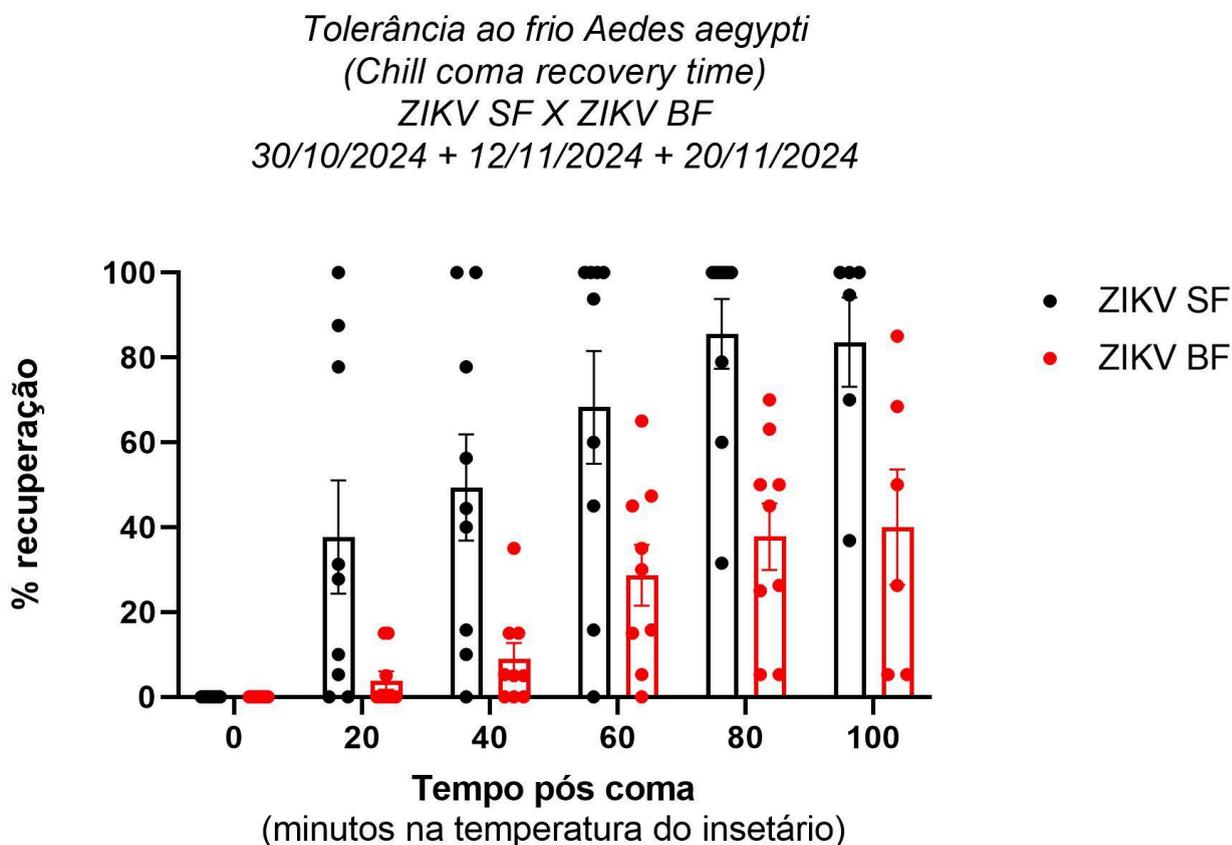


Fonte: Dos autores (2024).

Nesse experimento, que compara dois grupos de fêmeas infectadas, um que ingeriu sangue, e outro que não, revela o impacto do sangue no fitness do mosquito. Somada à infecção, a ingestão de sangue foi mais um estresse aos mosquitos do grupo ZIKV BF, justificando sua recuperação tardia (Figura 19).

A recuperação tardia dos mosquitos infectados alimentados com sangue, contribui para a hipótese de que a menor tolerância ao frio dos mosquitos infectados está relacionada com o fato das infecções diminuírem nos períodos mais frios, considerando que a maioria das fêmeas de *Aedes aegypti* infectadas ingeriram sangue (Lequimes S., Lambrechts L., 2014).

Figura 19 - CCRT ZIKV SF X ZIKV BF



Fêmeas de *Aedes aegypti* foram infectadas por meio do pricking com *Zika virus* na dose $1,34 \times 10^6$ PFU/mL (ZIKV), 5 dias antes do CCRT. Foram divididas em dois grupos, cada um composto por 3 gaiolas de 20 fêmeas. No quarto dia de infecção, um dos grupos (BF) recebeu alimentação com sangue. O outro (SF) permaneceu sendo alimentado apenas com solução de sacarose 10%. 18 horas após a alimentação com sangue, os dois grupos foram submetidos ao protocolo de CCRT (6 horas na geladeira). No experimento de CCRT o número de mosquitos do grupo SF foi de 155 e do grupo BF de 176. O experimento avalia e compara quanto tempo as fêmeas de cada grupo demoram para se recuperar do coma induzido pelo frio após voltarem às condições de temperatura e umidade do insetário.

Fonte: Dos autores (2024).

A análise estatística dos experimentos mostra que a diferença entre os grupos ZIKV SF e ZIKV BF é significativa, sendo observada em todos os parâmetros (Tabela 5).

Tabela 5 - Análise estatística ZIKV SF X ZIKV BF

Variáveis	Valor de P	Valor de P sumário	Significativo?
Tempo	<0.0001	****	Sim
Alimentação	0.0018	**	Sim
Tempo x alimentação	0.0008	***	Sim

Fonte: Dos autores (2024)

Fazendo a análise de múltiplas comparações, foi analisado cada intervalo de tempo, juntamente com os status alimentares. Do intervalo de tempo de 20 minutos até 100 minutos, houve diferença significativa entre os grupos.

Tabela 6 - Análise estatística ZIKV SF X ZIKV BF múltiplas comparações

Teste de variação múltipla Sidak	Intervalo de confiança 95%	Sumário	Valor de P ajustado
0	-29.43 a 29.43	ns	>0.9999
20	4.411 a 63.28	*	0.0162
40	11.01 a 69.88	**	0.0026
60	10.14 a 69.00	**	0.0033
80	18.40 a 77.27	***	0.0003
100	18.88 a 85.74	***	0.0005

Ns = não significativo. Fonte: Dos autores (2024).

5.5 LIMITAÇÕES DOS ENSAIOS COMPORTAMENTAIS

É importante frisar que os ensaios comportamentais em mosquitos *Aedes aegypti* possuem limitações. A maioria dos ensaios que são realizados possuem heterogeneidade e os tamanhos limitados das amostras desafiam conclusões definitivas. Estudos observacionais do comportamento do inseto, além de serem demorados, dependem do julgamento humano subjetivo (Maire, T, *et al.*, 2024).

Também é necessário avaliar quanto a realidade laboratorial corresponde com a realidade biológica. Considerações acerca dos fenótipos observados na natureza precisam ser feitas. Como variações genéticas, ecológicas e fenotípicas entre diferentes variantes (geográficas) da mesma espécie (Maire, T, *et al.*, 2024).

6. CONCLUSÃO

Nos ensaios de CCRT, o mosquito *Aedes aegypti* sofre múltiplos estresses como alimentação com sangue e infecção por ZIKV. Esses estresses afetam negativamente a fisiologia do inseto. Porém, a alimentação com sangue sozinha não alterou o CCRT. A infecção por ZIKV impactou negativamente o CCRT no limiar da significância estatística. Interessantemente, quando somamos os estresses da alimentação e infecção, o mosquito manifesta um impacto negativo no CCRT, de forma significativa.

Assim, os mosquitos infectados parecem ser menos tolerantes ao coma induzido pelo frio, sendo, um parâmetro fisiológico para se investigar mais a fundo a fim de buscar possíveis intervenções. Porém, ainda são necessárias adaptações do protocolo de CCRT para alcançarmos resultados mais consistentes no que diz respeito a variações inter-experimentos .

Em relação aos métodos de infecção que exploramos, a infecção sistêmica por meio do *pricking* e da micro-injeção são efetivas e crônicas. A micro-injeção torna possível atingir títulos virais mais altos, pelo volume maior injetado no inseto. Os dois métodos também garantem uma maior porcentagem de mosquitos infectados, quando comparados com a infecção oral, otimizando os experimentos de infecção.

7. PERSPECTIVAS

Em experimentos futuros, pretendemos avaliar a contribuição de genes específicos de resposta ao estresse térmico de *Aedes aegypti*, tais como AeHSP70 (AAEL017975), AeHSF (AAEL019713) e AesHSP (AAEL013344), durante o CCRT. Nosso laboratório já vem aprofundando as pesquisas da tolerância térmica do *Aedes*

aegypti. A expressão das proteínas de choque térmico está sendo avaliada em diferentes situações de temperaturas baixas e alimentação com sangue.

O parâmetro de tolerância ao frio também pode ser aprofundado, sendo possível chegar a explicações de como isso acontece, e assim encontrar alvos para intervenções biotecnológicas e farmacológicas.

Esperamos assim, que as pesquisas desenvolvidas em nosso laboratório ajudem a elucidar o entendimento sobre o vetor *Aedes aegypti*. Contribuindo com o controle das arboviroses.

REFERÊNCIAS

- AYRES, J. S.; FREITAG, N.; SCHNEIDER, D. S. Identification of *Drosophila* mutants altering defense of and endurance to *Listeria monocytogenes* infection. **Genetics**, 178, 1807–1815 (2008). doi: 10.1534/genetics.107.083782. Epub 2008 Feb 1. Disponível em: <https://academic.oup.com/genetics/article/178/3/1807/6061513>. Acesso em: 21 de março de 2024.
- AYRES, and SCHNEIDER (2012). Tolerance of Infections. **Annual Review of Immunology**, 30, 271-294. DOI: 10.1146/annurev-immunol-020711-075030. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22224770/>. Acesso em: 15 de março de 2024.
- BARRET, A, HIGGS, S. Yellow fever: a disease that has yet to be conquered. **Annu Rev Entomol**. 2007;52:209-29. doi: 10.1146/annurev.ento.52.110405.091454. Disponível em: <https://www.annualreviews.org/content/journals/10.1146/annurev.ento.52.110405.091454>. Acesso: 20 de novembro de 2024.
- BAYLEY, JS et al., (2018). A exposição ao frio causa morte celular por sobrecarga de Ca²⁺ mediada por despolarização em um inseto suscetível ao frio. **Proc. Natl. Acad. Sci. EUA** 115,E9737-E9744. <https://doi.org/10.1073/pnas.1813532115>
- BENOIT, J *et al.* Drinking a hot blood meal elicits a protective heat shock response in mosquitoes Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 Apr 25;108(19):8026–8029. doi: 10.1073/pnas.1105195108. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3093486/>. Acesso em 28 de novembro de 2024.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Arboviroses urbanas causadas por vírus transmitidos por Aedes: Dengue, Chikungunya e Zika. 2021. Disponível em: <http://plataforma.saude.gov.br/anomalias-congenitas/guia-vigilancia-saude-5ed-rev-atual.pdf>. Acesso em 15 de março de 2024.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE E AMBIENTE. Boletim Epidemiológico. Monitoramento das arboviroses urbanas: semanas epidemiológicas 1 a 35 de 2023. Volume 54. 22 de novembro de 2023. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/edicoes/2023/boletim-epidemiologico-volume-54-no-13#:~:text=N%C3%A3o%20foram%20confirmados%20%C3%B3bitos%20por,e%20chikungunya%20no%20mesmo%20per%C3%ADodo>. Acesso em 21 de março de 2024.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE E AMBIENTE. Boletim Epidemiológico. Volume 54. 3 de abril de 2023. Situação epidemiológica da síndrome congênita associada à infecção pelo vírus Zika: Brasil, 2015 a 2022. Disponível em: <http://plataforma.saude.gov.br/anomalias-congenitas/boletim-epidemiologico-SVSA-05-2023.pdf>. Acesso em 19 de março de 2024.
- BRASIL. MINISTÉRIO DO PLANEJAMENTO, DESENVOLVIMENTO E GESTÃO. IPEA. GARCIA, L. Epidemia do vírus Zika e microcefalia no Brasil: emergência, evolução e enfrentamento. 2368 Texto para Discussão. Brasília, fevereiro de 2018. Disponível em: https://repositorio.ipea.gov.br/bitstream/11058/8282/1/td_2368.pdf. Acesso em 21 de março de 2024.
- BRUCE, F. E. Mosquitoes, The Culicidae. In: Marquardt, W, C. **Biology of Disease Vectors**. Academic Press. p. 95-111. 2004.
- CALDO, E. P. et al. Easy and inexpensive molecular detection of dengue, chikungunya and Zika viruses in febrile patients. **Acta Tropica**, Amsterdam, v. 163, p. 32-37, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.07.021>. Acesso em: 25 de março de 2024.
- CALDWELL, R. M.; SCHAFER, J. F.; COMPTON, L. E.; PATTERSON, F. L. Tolerance to Cereal Leaf Rusts. **Science**. 1958 Sep 26;128:714. doi: 10.1126/science.128.3326.714. Disponível em: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.128.3326.714>. Acesso em: 17 de março de 2024.

- CHAN, J et al. Differential cell line susceptibility to the emerging Zika virus: implications for disease pathogenesis, non-vector-borne human transmission and animal reservoirs. **Emerg Microbes Infect.** 24 de agosto de 2016;5(8). doi: 10.1038/emi.2016.99. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1038/emi.2016.99>. Acesso em: 12 de novembro de 2024.
- CHOUIN-CARNEIRO et al. (2020). Zika virus transmission by Brazilian *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* is virus dose and temperature-dependent. **PLoS NTD**. DOI: 10.1371/journal.pntd.0008527. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0008527>. Acesso em: 22 de março de 2024.
- DA SILVEIRA, I.D., et al, 2018. Zika Virus Infection Produces a Reduction on *Aedes aegypti* Lifespan but No Effects on Mosquito Fecundity and Oviposition Success. **Front Microbiol** 9, 3011. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6305470/>. Acesso em 21 de novembro de 2024.
- DE MAJO, EM, et al (2017). Eclosão de ovos e sobrevivência de estágios imaturos de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) em condições naturais de temperatura durante a estação fria em Buenos Aires, Argentina. **J. Med. Entomol.** 54,106-113. <https://doi.org/10.1093/jme/tjw131>
- DUONG V, et al. Asymptomatic humans transmit dengue virus to mosquitoes. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2015 Nov 24;112(47):14688-93. doi: 10.1073/pnas.1508114112. Epub 2015 Nov 9. PMID: 26553981; PMCID: PMC4664300. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4664300/>. Acesso em 27 de novembro de 2024.
- FERRARIS, P; YSSEL, H; MISSÉ, D. Zika virus infection: an update. **Microbes and Infection.** Volume 21, Issues 8–9, October–November 2019, Pages 353-360. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2019.04.005>. Disponível em : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1286457919300528?via%3Dihub>. Acesso em: 27 de junho de 2024.
- FRANZ, A.W.E; et al. Tissue Barriers to Arbovirus Infection in Mosquitoes. **Viruses.** v. 7, p. 3741-3767. 2015.
- GERBERG (1970). Manual for mosquito rearing and experimental techniques. Bull. Am. Mosq. Control Assoc., 5, 1–109.
- GUZMAN, M. G, et al. Dengue infection. **Nat Rev Dis Primers.** 2016 Aug 18;2:16055. doi: 10.1038/nrdp.2016.55. PMID: 27534439. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrdp201655>. Acesso em 27 de novembro de 2024.
- HARDY, J. L.; HOUK, E. J.; KRAMER, L. D.; REEVES, W. C. Intrinsic Factors Affecting Vector Competence of Mosquitoes for Arboviruses. **Annual Review of Entomology.** v. 28, p. 229-262. 1983. doi: 10.1146/annurev.en.28.010183.001305. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6131642/>. Acesso em: 24 de março de 2024.
- HILL, A et al. (2021). Vaccine Delivery and Immune Response Basics. **Methods Mol Biol.** 2021;2183:1-8. doi: 10.1007/978-1-0716-0795-4_1. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32959236/>. Acesso em 06 de novembro de 2024.
- HODOAMEDA, P, et al. Investigation of Biological Factors Contributing to Individual Variation in Viral Titer after Oral Infection of *Aedes aegypti* Mosquitoes by Sindbis Virus. **Viruses.** 2022 Jan 12;14(1):131. doi: 10.3390/v14010131. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8780610/>. Acesso em 21 de novembro de 2024.
- HUGHES, D.P. · LIBERSART, F. Parasite manipulation of host behavior. **Curr. Biol.** 2019; 29:R45-R47. Disponível em: [https://www.cell.com/current-biology/fulltext/S0960-9822\(18\)31602-6](https://www.cell.com/current-biology/fulltext/S0960-9822(18)31602-6). Acesso em 21 de novembro.
- JASS et al. (2019). An impressive capacity for cold tolerance plasticity protects against ionoregulatory collapse in the disease vector *Aedes aegypti*. **J. Exp. Biol.** DOI: 10.1242/jeb.214056. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31732503/>. Acesso em 22 de março de 2024.

KANTOR et al. (2018). Ultrastructural Analysis of Chikungunya Virus Dissemination from the Midgut of the Yellow Fever Mosquito, *Aedes aegypti*. **Viruses**. 2018 Oct 18;10(10):571. doi: 10.3390/v10100571. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1999-4915/10/10/571>. Acesso em 04 de novembro de 2024.

KING, and MacRae (2015). Insect Heat Shock Proteins During Stress and Diapause. **Annu. Rev. Entomol**, 60, 59–75. DOI: 10.1146/annurev-ento-011613-162107. Disponível em: <https://www.annualreviews.org/content/journals/10.1146/annurev-ento-011613-162107>. Acesso em: 25 de março de 2024.

LAMBRECHTS, L , SALEH, MC. Manipulating Mosquito Tolerance for Arbovirus Control. **Micróbio hospedeiro celular**. 11 de setembro de 2019;26(3):309-313. doi: 10.1016/j.chom.2019.08.005. Disponível em: [https://www.cell.com/cell-host-microbe/fulltext/S1931-3128\(19\)30370-1?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1931312819303701%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/cell-host-microbe/fulltext/S1931-3128(19)30370-1?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1931312819303701%3Fshowall%3Dtrue). Acesso em 20 de novembro de 2024.

LAMBRECHTS L, SCOTT, T. Mode of transmission and the evolution of arbovirus virulence in mosquito vectors. **Proc Biol Sci**. 2009 Apr 7;276(1660):1369-78. doi: 10.1098/rspb.2008.1709. Epub 2009 Jan 13. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2660968/>. Acesso em 20 de novembro de 2024.

LEQUIME S., LAMBRECHTS L. (2014). Vertical transmission of arboviruses in mosquitoes: a historical perspective. **Infection Genet. Evol.** 28, 681–690. doi: 10.1016/j.meegid.2014.07.025. Disponível em: <https://hal.science/pasteur-01976254>. Acesso em 21 de novembro de 2024.

LINDERNAN et al. (2012). Infection-Related Declines in Chill Coma Recovery and Negative Geotaxis in *Drosophila melanogaster*. **PLoS One**. DOI: 10.1371/journal.pone.0041907. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0041907>. Acesso em: 25 de março de 2024.

LOUIE, A, et al. How Many Parameters Does It Take to Describe Disease Tolerance? **Plos Biology** 14(6): e1002485. 2016. doi: 10.1371/journal.pbio.1002435. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4835111/#:~:text=More%20typically%2C%20tolerance%20is%20visualized,slope%20%5B5%2C11%5D>. Acesso em: 21 de março de 2024.

LOPES, N. et al. Características gerais e epidemiologia dos arbovírus emergentes no Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, Ananindeua, v. 5, n. 3, p. 55-64, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.5123/S2176-62232014000300007>. Acesso em: 25 de março de 2024.

MACMILLAN, AH , et al .(2011a).Mecanismos subjacentes ao coma frio dos insetos.**J. Fisiol. de Insetos**. 57,12-20.<https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2010.10.004>

MACMILLAN, AH , et al.(2015b).Efeitos simultâneos do frio e da hipercalemia causam lesões por frio em insetos.**Processo. R.Soc. B Biologia Científica**. 282,20151483.<https://doi.org/10.1098/rspb.2015.1483>

MAIRE, T, et al. Arbovirus impact on mosquito behavior: the jury is still out. **Trends Parasitol**. 2024 Apr;40(4):292-301. doi: 10.1016/j.pt.2024.02.004. Epub 2024 Feb 28. Disponível em: <https://pasteur.hal.science/pasteur-04572547v1/file/Maire-TiP-2024-accepted.pdf>. Acesso em 06 de novembro de 2024.

MARASCHIN et al. (2023). Exploring dose–response relationships in *Aedes aegypti* survival upon bacteria and arbovirus infection. **Journal of Insect Physiology**. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2023.104573>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37838284/>. Acesso em: 27 de março de 2024.

MARASCHIN et al. (2024). A Laboratory-Adapted and a Clinical Isolate of Dengue Virus Serotype 4 Differently Impact *Aedes aegypti* Life-History Traits Relevant to Vectorial Capacity. doi: <https://doi.org/10.1101/2024.06.07.597920>. Acesso em 10 de novembro de 2024.

MARIN, E., *et al.*, 2010. Differential responses of the mosquito *Aedes albopictus* from the Indian Ocean region to two chikungunya isolates. **BMC Ecol** 10, 8. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2847964/>. Acesso em 21 de novembro de 2024.

MARQUARDT, W. C. **Biology of Disease Vectors**. 2 ed. Academic Press. 2004.

MARTINS, M. S. et al. *Aedes aegypti*: biology and control. In: Oliveira, C. M.; Souza, A. A.; Almeida, R. M. F. D. (Org.). **Controle biológico de pragas agrícolas: desafios e perspectivas**. 1.ed. Curitiba: Editora da UFPR, 2017. p. 211-223.

MedicalExpo. Automatic micro-injector Nanoject II. Drummond Scientific Company. Disponível em: <https://www.medicaexpo.com/prod/drummond-scientific-company/product-119213-829530.html>. Acesso em: 20 de maio de 2024.

MEDZHITOV, R, et al. Disease tolerance as a defense strategy. **Science**. 2012 Feb 24;335(6071):936-41. doi: 10.1126/science.1214935. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22363001/>. Acesso em: 15 de março de 2024.

MONDOTTE, Juan; SALEH, Maria-Carla. Antiviral Immune Response and the Route of Infection in *Drosophila Melanogaster*. **Advances in Virus Research**, Volume 100, 2018. doi: 10.1016/bs.aivir.2017.10.006. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29551139/>. Acesso em: 02 de abril de 2024.

MOURA et al. (2020). Comparative analysis of the genome-wide RNAi pathway in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*: molecular differences and relevance for arbovirus control. **Parasites & Vectors** 13, 493 (2020). <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04379-4>. Disponível em: <https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-020-04379-4>. Acesso em 21 de março de 2024.

MURDOCH et al. (2002). Understanding and Controlling the Relationship Between Vector and Host. **Parasitology Today**, 18(4), 211-215. 2002. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169475802000739>. Acesso em: 15 de março de 2024.

MURDOCK, C.C. · LUCKHART, S. · CATOR, L.J. Immunity, host physiology, and behaviour in infected vectors. *Curr. Opin. Insect Sci.* 2017; 20:28-33. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5584383/>. Acesso em 21 de novembro de 2024.

MURRIETA, R *et al.* Impact of extrinsic incubation temperature on natural selection during Zika virus infection of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. **PLoS Pathog**. 2021 Nov 9;17(11):e1009433. doi: 10.1371/journal.ppat.1009433. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8629396/>. Acesso em 12 de novembro de 2024.

NASCIMENTO, J. L. F. et al. Comparative molecular analysis of *Aedes* mosquitoes from different geographic regions reveals important implications for arbovirus control. *Parasites & Vectors* 13, 478 (2020). <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04363-y>. Disponível em: <https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-020-04363-y>. Acesso em 15 de março de 2024.

OLIVEIRA et al. (2011). Blood meal-derived heme decreases ROS levels in the midgut of *Aedes aegypti* and allows proliferation of intestinal microbiota. **PLoS Pathogens**, 7. DOI: 10.1371/journal.ppat.1001320. Disponível em: <https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1001320>. Acesso em: 27 de março de 2024.

OLIVEIRA, et al. (2020). How are arbovirus vectors able to tolerate infection? **Developmental & Comparative Immunology**. 2020 Feb;103:103514. Doi: 10.1016/j.dci.2019.103514. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31585195/>. Acesso em: 04 de abril de 2024.

OLUKUNLE, O *et al.* Improved Zika virus plaque assay using Vero/TMPRSS2 cell line. **bioRxiv** 2024.08.16.608323; doi:<https://doi.org/10.1101/2024.08.16.608323>. Disponível em: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2024.08.16.608323v1>. Acesso em 29 de novembro de 2024.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Relatório de Situação do Zika; 2016. <https://www.who.int/emergencies/zika-virus/situation-report/who-zika-situation-report-12-02-2016.pdf>. Acesso em 29 de janeiro de 2022.

OVERGAARD, J, E MACMILLAN, HA (2017). The integrative physiology of insect chill tolerance. **Annu. Rev. Physiol.** 79, 187-208. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-022516-034142>

PAIN, J. et al. Role of Heat Shock Proteins in Insect Vector Physiology. In: King, R., MacRae, T., eds. *Insect Heat Shock Proteins*. Springer. 2015. Disponível em: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-16360-6_11. Acesso em: 18 de março de 2024.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9), 2001. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC130711/>. Acesso em 18 de março de 2024.

PULCINI et al. (2017). Temperature Stress and Immune Response of the *Aedes aegypti* Mosquito in Relation to Dengue Virus. **PLoS Negl Trop Dis**. 2017 Dec; 11(12):e0006150. doi: 10.1371/journal.pntd.0006150. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0006150>. Acesso em: 25 de março de 2024.

QI, G, *et al.* (2024) The long road for vaccine development with difficulties and hopes. **Emerg Microbes Infect.** 2024 Aug 23;13(1):2396886. doi: 10.1080/22221751.2024.2396886. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11378663/>. Acesso em 06 de novembro de 2024.

RABERG, L; SIM, D.; READ, A. F. Disentangling genetic variation for resistance and tolerance to infectious diseases in animals. **Science**, 318, 812–814 (2007). doi: 10.1126/science.1148526. Disponível em: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.1148526>. Acesso em: 21 de março de 2024.

RABERG, L; GRAHAM, A. L.; READ, A. F. Decomposing health: tolerance and resistance to parasites in animals. *Philosophical Transactions of the Royal Society*. **BiolSci**. 2009, Jan 12;364:37. doi: 10.1098/rstb.2008.0184. Disponível em: <https://royalsocietypublishing.org/doi/10.1098/rstb.2008.0184>. Acesso em: 20 de março de 2024.

ROBERTSON, RM, et al (2017).O coma por calafrios no gafanhoto, *Locusta migratória*, é iniciado pela despolarização disseminada no sistema nervoso central. **Rep. científica**. 7,10297.<https://doi.org/10.1038/s41598-017-10586-6>

RUEDA, L., PATEL, K., AXTELL, R. and STINNER, R. (1990). Desenvolvimento dependente da temperatura e taxas de sobrevivência de *Culex quinquefasciatus* e *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **J. Med. Entomol.** 27,892-898. <https://doi.org/10.1093/jmedent/27.5.892>

RYAN, S. J. et al. *Aedes aegypti*: Biology, control, and the role of vector competence. In: Clements, A., ed. *Biology of Disease Vectors*. Elsevier. 2014.

SABIN, E. A. (2014). Mosquitoes, *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*, and Their Role in Zika Virus Transmission in the Americas. **The Lancet Infectious Diseases**, 14(5), 281-288. DOI: 10.1016/S1473-3099(14)70290-6. Disponível em: [https://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099\(14\)70290-6/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099(14)70290-6/fulltext). Acesso em: 14 de março de 2024.

SEVERSON, D; BEHURA, S. Genome Investigations of Vector Competence in *Aedes aegypti* to Inform Novel Arbovirus Disease Control Approaches. **Insects**. 2016 Dec; 7(4): 58. doi: 10.3390/insects7040058. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27809220/>. Acesso em: 20 de março de 2024.

SCHAFER, J. Pioneer leaders in plant pathology: ralph m. Caldwell. **Annual Review of Phytopathology**. 1971;9:235. 1993:31:33-41. doi: 10.1146/annurev.py.31.090193.000341. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18643755/>. Acesso em: 17 de março de 2024.

SHETTY, V et al. Impact of disabled circadian clock on yellow fever mosquito *Aedes aegypti* fitness and behaviors. **Sci Rep**. 2022 Apr 27;12(1):6899. doi: 10.1038/s41598-022-10825-5. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9046260/>. Acesso em 19 de novembro de 2024.

SILVA et al. (2017). Prevalence of Zika Virus in *Aedes aegypti* in Brazil: Challenges and Opportunities for Control. **Viruses** 9(7), 1-12. doi: 10.3390/v9070186. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1999-4915/9/7/186>. Acesso em: 20 de março de 2024.

SONG, B. H.; YUN, S. I.; WOOLLEY, M.; LEE, Y. M. Zika virus: History, epidemiology, transmission, and clinical presentation. **J Neuroimmunol**. 2017;308:50–64. pmid:28285789. doi: 10.1016/j.jneuroim.2017.03.001. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28285789/>. Acesso em: 21 de março de 2024.

SOARES, M; TEIXEIRA, L. & MOITA, L. Tolerância a doenças e imunidade na proteção do hospedeiro contra infecções. **Nature Reviews Immunology** 17, 83–96 (2017). <https://doi.org/10.1038/nri.2016.136>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nri.2016.136>. Acesso em: 15 de março de 2024.

STERKEL, M; OLIVEIRA, J. H. M.; BOTTINO-ROJAS, V.; PAIVA-SILVA, G. O.; OLIVEIRA, P. L. The Dose Makes the Poison: Nutritional Overload Determines the Life Traits of Blood-Feeding Arthropods. **Trends Parasitol**. 2017 Aug;33(8):633-644. doi: 10.1016/j.pt.2017.04.008. Epub 2017 May 23. PMID: 28549573. Disponível em: [https://www.cell.com/trends/parasitology/abstract/S1471-4922\(17\)30109-5?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1471492217301095%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/trends/parasitology/abstract/S1471-4922(17)30109-5?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1471492217301095%3Fshowall%3Dtrue). Acesso em 30 de junho de 2024.

TUN-LIN,C., BURKOT,TReCaio,BH(2000).Efeitos da temperatura e da dieta larval nas taxas de desenvolvimento e sobrevivência do vetor da dengue *Aedes aegypti* no norte de Queensland, Austrália.**Médico Veterinário Entomol**. 14,31-37.<https://doi.org/10.1046/j.1365-2915.2000.00207.x>

WADHWA et al. (2022). Thermal Tolerance and the Spread of the Zika Virus. **PLOS Neglected Tropical Diseases**. DOI: 10.1371/journal.pntd.0008780. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0008780>. Acesso em: 22 de março de 2024.

WEAVER, S et al. Population bottlenecks and founder effects: implications for mosquito-borne arboviral emergence. **Nat Rev Microbiol**. 2021 Mar;19(3):184-195. doi: 10.1038/s41579-020-00482-8. Epub 2021 Jan 11. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7798019/>. Acesso em 20 de novembro de 2024.

WEAVER, S.C.; et al. (2016). Zika Virus: History, Epidemiology, and Pathogenesis. **Current Opinion in Virology**, 19, 107-113. DOI: 10.1016/j.coviro.2016.01.002. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4835223/>. Acesso em: 18 de março de 2024.

WERNECK, G.L.; et al. (2019). The Zika Virus Epidemic in Brazil and the Effectiveness of Preventive Measures. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, 22(Suppl 2), e190012. DOI: 10.1590/1980-549720190012.supl.2. Disponível em:

<https://www.scielo.br/j/rbepid/article/view/1980-5497.2019.supl.2/4589898>. Acesso em: 20 de março de 2024.

WINOKUR, O *et al.* Impact of temperature on the extrinsic incubation period of Zika virus in *Aedes aegypti*. **PLoS Negl Trop Dis**. 2020 Mar 18;14(3):e0008047. doi: 10.1371/journal.pntd.0008047. eCollection 2020 Mar. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7105136/>. Acesso em 18 de novembro de 2024.

WONG, P.S. et al. (2015). *Aedes* Mosquitoes and the Transmission of Zika Virus: A Systematic Review. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, 9(10), e0004172. DOI: 10.1371/journal.pntd.0004172. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0004172>. Acesso em: 22 de março de 2024.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. Geneva: WHO, 2009. 147 p. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/44188>. Acesso em: 25 de março de 2024.

WRIGHT, J. W.; et al. (2014). The Role of Mosquito Vectors in the Transmission of Zika Virus. **Viral Therapy**, 29(1), 51-58. DOI: 10.1016/j.virther.2014.01.004. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359613414000181>. Acesso em: 14 de março de 2024.

WYK et al. (2022). Long-term projections of the impacts of warming temperatures on Zika and dengue risk in four Brazilian cities using a temperature-dependent basic reproduction number. **PLoS NTD**, 2022. DOI: pntd.0010839. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0010839>. Acesso em: 23 de março de 2024.

ZHU, Z.; et al. (2018). Zika Virus and Its Impact on the Immune System. *Clinical Immunology*, 187, 1-9. DOI: 10.1016/j.clim.2017.09.010. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1521661617301371>. Acesso em: 13 de março de 2024.