

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE DO VETOR *Aedes aegypti* À
INFECÇÃO POR MAYARO VÍRUS**

por

PEDRO HENRIQUE FERREIRA SUCUPIRA

Belo Horizonte

Fevereiro/ 2019

DISSERTAÇÃO M/CS – IRR

P. H. F. SUCUPIRA

2019

PEDRO HENRIQUE FERREIRA SUCUPIRA

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE DO VETOR *Aedes aegypti* À
INFECÇÃO POR MAYARO VÍRUS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde - área de concentração Biologia Celular e Molecular, Genética e Bioinformática.

Orientação: Dr. Luciano Andrade Moreira
Coorientação: Dr. João Trindade Marques

Belo Horizonte
Fevereiro/ 2019

Catálogo-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do IRR
CRB/6 1975

S942a Sucupira, Pedro Henrique Ferreira.
2019

Avaliação da resposta imune do vetor *Aedes aegypti* à
infecção por Mayaro vírus / Pedro Henrique Ferreira
Sucupira – Belo Horizonte, 2019

XV, 92 f.: il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f. 82 - 92

Dissertação (mestrado) – Dissertação para obtenção do
título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de
Pós - Graduação em Ciências da Saúde do Instituto René
Rachou. Área de concentração: Biologia Celular e
Molecular, Genética e Bioinformática.

1. *Aedes aegypti*/virologia 2. Interações Hospedeiro-
Parasita 3. sistema imune 4. Mayaro vírus I. Título. II.
Moreira, Luciano Andrade (Orientação). III. Marques, João
Trindade (Coorientação)

CDD – 22. ed. – 616.91

PEDRO HENRIQUE FERREIRA SUCUPIRA

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE DO VETOR *Aedes aegypti* À
INFECÇÃO POR MAYARO VÍRUS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde - área de concentração Biologia Celular e Molecular, Genética e Bioinformática.

Avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Dr. Luciano Andrade Moreira (Instituto René Rachou) Presidente

Dra. Alessandra Aparecida Guarneri (Instituto René Rachou) Titular

Dr. Jayme Augusto de Souza-Neto (Universidade Estadual Paulista Júlio Mesquita Filho) Titular

Dr. Pedro Augusto Alves (Instituto René Rachou) Suplente

Dissertação defendida e aprovada em Belo Horizonte, 25/02/2019

DEDICATÓRIA

Dedicado a minha mãe Dulcineia, as minhas irmãs Caroline, Heloisa e Rebeca e aos meus amigos, em especial a Lídia e David, pelo apoio incondicional em todos os momentos da minha vida. Dedico também a todos professores que passaram pela minha vida, pois graças a seus ensinamentos fui capaz de enxergar mais longe.

AGRADECIMENTOS

A minha mãe Dulcineia Ferreira Lopes. Um exemplo de perseverança e carinho. A minhas irmãs Rebeca, Heloisa e Caroline. Meus maiores exemplos e motivos para continuar sempre. Todas as minhas conquistas na vida só foram possíveis porque antes de mais nada, pude contar com o apoio de vocês.

Ao meu orientador Dr. Luciano Andrade Moreira. Obrigado por ter me dado esse voto de confiança e ter me aceito como seu aluno mesmo sem me conhecer. Obrigado por nunca duvidar do meu potencial e por ter me ajudado em todos os momentos principalmente àqueles em que a ansiedade estava fora do controle. Hoje sei que sou uma pessoa melhor e nossas conversas foram extremamente importantes nesse processo. Obrigado por ser este pesquisador incrível e exemplo de caráter profissional e pessoal!

A todos os membros (atuais e passados) do Grupo de Pesquisas Mosquitos Vetores: Endossimbiontes e Interação Patógeno-Vetor pela convivência diária e pelo excelente trabalho em equipe. Em especial gostaria de agradecer aqueles os quais estive mais envolvido durante esta jornada:

A Dra. Marcele Rocha pelos ensinamentos passados e por sempre me ajudar não importa a hora ou data. Por ser uma das pessoas que mais me ajudou durante todo o processo e nunca mediu esforços para isso. Aprendi e continuo aprendendo muito contigo. Sempre serei grato.

A Bianca Daoud, Simone Mansur e Fernanda Rezende por se provarem uma amizade sincera dentro e fora do ambiente de trabalho. Exemplos de profissionalismo e dedicação que eu levarei para toda a vida. E por sempre tornarem a rotina laboratorial mais leve e menos estressante.

Aos Drs. Luis Villegas e Eric Caragata por me ajudarem grandemente com todas as análises estatística e por sempre estarem dispostos a discutir e esclarecer minhas dúvidas.

Ao Laboratório de RNA de Interferência da UFMG, em especial ao Dr. João Marques e ao Dr. Alvaro por toda ajuda nos experimentos de silenciamento do RNA.

A todos os amigos já presentes e os que tive a oportunidade de conhecer neste período. Vocês sempre foram e sempre serão o melhor porto seguro.

AGRADECIMENTOS ÀS INSTITUIÇÕES FINANCIADORAS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Ao Ministério da Saúde (DEVIT e DECIT) e a Fundação Bill & Melinda Gates pelos recursos financeiros e suporte técnico que também permitiram o desenvolvimento deste e de projetos paralelos.

À Fundação Oswaldo Cruz, ao Instituto René Rachou e ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde pela oportunidade ofertada, além de excelente infraestrutura no que diz respeito a reagentes e equipamentos necessários para trabalho.

"A mente que se abre a uma nova ideia jamais
voltará ao seu tamanho original."

Albert Einstein

"Tudo parece impossível até que seja feito."

Nelson Mandela

RESUMO

O Mayaro vírus (MAYV) é um arbovírus do gênero *Alphavirus*, família *Togaviridae*, e o agente etiológico da febre do Mayaro, uma doença febril aguda, clinicamente semelhante à Dengue e Chikungunya. Apesar de ser uma arbovirose silvestre, muitos casos e surtos em áreas periurbanas já foram relatados para esta doença, aumentando a preocupação e vigilância epidemiológica, uma vez que o *Aedes aegypti*, o principal vetor urbano de DENV, ZIKV e CHIKV, possui capacidade para transmissão deste vírus. A urbanização do MAYV poderia trazer um sério problema de saúde pública. Uma das possíveis estratégias para o controle da transmissão do MAYV seria o uso de mosquitos *Ae. aegypti* transfectados com a bactéria *Wolbachia* (linhagem *wMel*), como vem sendo utilizado para dengue, Zika e chikungunya (www.worldmosquito.org). O objetivo principal deste estudo foi avaliar a participação de diferentes vias de resposta imune do *Ae. aegypti* em resposta à infecção pelo MAYV, e pela *Wolbachia*. Foram utilizadas 2 linhagens de *Ae. aegypti* - Br (mosquitos de campo coletados no Rio de Janeiro) e *wMel*_Br (linhagem de mosquitos transfectados com a cepa *wMel* da bactéria *Wolbachia*). Ambas as linhagens receberam três tratamentos diferentes: sacarose 10%, sangue sem MAYV e sangue com MAYV. Amostras dos mosquitos foram coletadas a 2, 4 e 7 dias após a infecção, seguindo-se pela extração do RNA total e síntese do cDNA. Primeiramente a carga viral de MAYV e a densidade de *wMel* foram quantificadas. Nossos resultados demonstram a capacidade de *wMel* em interferir na replicação do MAYV assim como demonstramos que mosquitos *wMel*_Br infectados com MAYV apresentaram um aumento na densidade de *Wolbachia*. Posteriormente, foram analisados, via quantificação relativa, o perfil de expressão de genes da via Toll (*CACTUS* e *REL1*), Imd (*CASPAR* e *REL2*), JAK/STAT (*DOME* e *SOCS*) e da via do siRNA (*AGO2*). Nossos resultados sugerem que a alimentação sanguínea foi um dos principais fatores responsáveis pelo aumento na expressão dos genes da via Toll e Imd e que o gene *DOME* tem sua expressão aumentada na presença de MAYV sugerindo a participação da via JAK/STAT. Apesar de ter-se um aumento na expressão de genes do sistema imune na linhagem *wMel*_Br, essa ativação do sistema imune não representa o principal mecanismo pelo qual o fenótipo de interferência a patógenos acontece. O gene *AGO2* não teve sua expressão alterada em mosquitos Br, porém teve uma expressão menor em mosquitos *wMel*_Br. Sabendo-se que a via do siRNA é uma das principais vias de controle de infecções virais em *Ae. aegypti*, nós investigamos funcionalmente a participação do gene *AGO2* em ambas as linhagens. Para isto silenciámos o gene *AGO2* de forma transiente utilizando a técnica do RNAi. Não houve alteração da carga viral ou densidade de *wMel* frente ao silenciamento transiente de *AGO2*. Apesar dos mecanismos envolvendo a resposta imune na infecção pelo MAYV em linhagens com e sem *Wolbachia* não estarem claros, nosso trabalho estabelece novas perspectivas e alvos potenciais para novas estratégias de intervenção no mosquito vetor. Entender as interações vírus-hospedeiro-*Wolbachia* são essenciais para o combate à transmissão do MAYV e outras arboviroses. Nosso trabalho também sugere novos marcadores moleculares que podem ser utilizados para determinação de resistência e suscetibilidades à infecção em populações naturais de mosquitos.

Palavras-chaves: *Aedes aegypti*, interações patógeno-vetor, sistema imune, Mayaro vírus.

ABSTRACT

The Mayaro virus (MAYV) is an arbovirus of the genus *Alphavirus*, family *Togaviridae*, and the etiologic agent of Mayaro fever, an acute febrile illness, clinically similar to Dengue and Chikungunya. MAYV is an emerging virus and has a mainly enzootic cycle involving non-human primates and mosquitoes of the species *Haemagogus janthinomys*. Despite being a silvatic arbovirus, many cases and outbreaks in periurban areas have been reported for this disease, increasing concern and epidemiological surveillance, since *Aedes aegypti*, the main urban vector of DENV, ZIKV and CHIKV has the capacity for transmission of this virus. The urbanization of the MAYV could pose a serious public health problem. One of the possible strategies for the control of MAYV transmission would be the use of *Ae. aegypti* mosquitoes transfected with the bacterium *Wolbachia* (*wMel* strain), as it has been used for dengue, Zika and chikungunya (www.worldmosquito.org). The main objective of this study was to evaluate the participation of different pathways of the *Ae. aegypti*'s immune system in response MAYV infection, and also to *Wolbachia* infection. Two strains of *Ae. aegypti* - Br (wild mosquitoes collected in Rio de Janeiro) and *wMel_Br* (lineage of mosquitoes transfected with the *wMel* strain of the *Wolbachia* bacterium). Both strains received three different treatments: 10% sucrose, blood without MAYV and blood with MAYV. Mosquito samples were collected at 2, 4 and 7 days post-infection, followed by extraction of total RNA and cDNA synthesis. First, the viral load of MAYV and the density of *wMel* were quantified. Our results demonstrated the ability of *wMel* to interfere in MAYV replication as well as we demonstrated that *wMel_Br* mosquitoes infected with MAYV showed an increase in *Wolbachia* density. Afterwards, the expression profile of genes from the Toll pathway genes (*CACTUS* and *RELI*), Imd pathway (*CASPAR* and *REL2*), JAK/STAT pathway (*DOME* and *SOCS*) and the siRNA pathway (*AGO2*) were analyzed by relative quantification. Our results suggested that the blood supply was one of the main factors responsible for the increase in the expression of the genes from the Toll and Imd pathways and that the *DOME* gene has its expression increased in the presence of MAYV suggesting the participation of the JAK/STAT pathway in MAYV infection. Although there is an increase in the expression of immune system genes in the *wMel_Br* line, this activation does not represent the main mechanism by which the pathogen interference phenotype occurs. The *AGO2* gene did not have its expression altered in Br mosquitoes, but had a smaller expression in *wMel_Br* mosquitoes. It is known that the siRNA pathway is one of the main routes of control of viral infections in *Ae. aegypti*. Thus, we functionally investigated the involvement of the *AGO2* gene in both strains. For this, we mutate the *AGO2* gene transiently using the RNAi technique. There was no change in viral load or *wMel* density in mosquitoes with transient silencing of *AGO2*. Although the mechanisms involving the immune response against MAYV infection in strains with and without *Wolbachia* are not clear, our work establishes new perspectives and potential targets for new intervention strategies in this vector mosquito. Understanding virus-host-*Wolbachia* interactions are essential for combating the transmission of MAYV and other arboviruses. Our work also suggests new molecular markers that can be used to determine resistance and susceptibility to infection in natural mosquito populations.

Keywords: *Aedes aegypti*, pathogen-vector interactions, immune system, Mayaro virus.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição epidemiológica de casos de MAYV ao redor do mundo..	17
Figura 2: Ocorrência de casos de Mayaro vírus no Brasil.....	18
Figura 3: Possível distribuição de <i>Aedes aegypti</i> no mundo	22
Figura 4: Principais vias de sinalização da resposta imune do <i>Aedes aegypti</i>	25
Figura 5: Repasto sanguíneo artificial de <i>Aedes aegypti</i> em alimentador de vidro....	39
Figura 6: Regressão linear simples da quantificação viral por pfu e RT-qPCR durante a infecção pelo MAYV.	45
Figura 7: Carga viral de MAYV em mosquitos <i>Ae. aegypti</i> no período analisado de 2, 4 e 7 dpi.....	47
Figura 8: Quantificação absoluta de <i>Wolbachia</i> em mosquitos <i>Ae. aegypti</i> sob diferentes condições de tratamento e períodos.	49
Figura 9: Níveis de expressão do gene <i>rel1</i> em mosquitos Br.....	51
Figura 10: Níveis expressão do gene <i>cactus</i> em mosquitos Br.....	54
Figura 11: Níveis de expressão do gene <i>cactus</i> em mosquitos Br e <i>wMel_Br</i>	55
Figura 12: Níveis de expressão do gene <i>rel2</i> em mosquitos Br.....	57
Figura 13: Níveis de expressão do gene <i>rel2</i> em mosquitos Br e <i>wMel_Br</i>	58
Figura 14: Níveis de expressão do gene <i>caspar</i> em mosquitos Br.....	60
Figura 15: Níveis de expressão do gene <i>caspar</i> em mosquitos Br e <i>wMel_Br</i>	61
Figura 16: Níveis de expressão do gene <i>dome</i> em mosquitos Br.	62
Figura 17: Níveis de expressão do gene <i>dome</i> em mosquitos Br e <i>wMel_Br</i>	64
Figura 18: Níveis de expressão do gene <i>socs</i> em mosquitos Br.	65
Figura 19: Níveis de expressão do gene <i>socs</i> em mosquitos Br e <i>wMel_Br</i>	66
Figura 20: Níveis de expressão do gene <i>ago2</i> em mosquitos Br.	67
Figura 21: Níveis de expressão do gene <i>ago2</i> em mosquitos Br e <i>wMel_Br</i>	69
Figura 22: Silenciamento transiente do gene <i>AGO2</i> em mosquitos <i>Ae. aegypti</i>	72
Figura 23: Cinética de crescimento do MAYV em mosquitos deficientes para a via de siRNA.....	74
Figura 24: Quantificação absoluta de <i>Wolbachia</i> em mosquitos <i>Ae. aegypti</i> deficientes para a via de siRNA.....	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Estados com registro de casos suspeitos de doença pelo vírus Mayaro, Brasil, janeiro de 2016.	19
Tabela 2: Identificação dos genes utilizados na análise de MAYV, <i>RPS17</i> e <i>Wolbachia</i>	40
Tabela 3: Identificação dos genes utilizados no ensaio de expressão gênica, e suas respectivas funções conhecidas.	41
Tabela 4: Iniciadores para a amplificação dos moldes para síntese dos dsRNA.	42
Tabela 5: Títulos dos isolados virais de MAYV utilizados nas alimentações infectivas	45
Tabela 06: títulos dos isolados virais de MAYV utilizados nas alimentações infectivas.	76

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Descrição das linhagens de <i>Aedes aegypti</i> e dos tratamentos recebidos por estas.....	37
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

μL - microlitros

Cas9 – CRISPR associated gene 9

CDC – *Center for Disease Control and Prevention*

cDNA – DNA complementar

CHIKV – *Chikungunya virus*

CRISPR - *clustered regularly interspaced short palindromic repeats*

DENV – *Dengue virus*

DNA – ácido desoxirribonucléico

dpi – dias pós-infecção

ECDC – *European Center for Disease Control and Prevention*

MAYV - *Mayaro vírus*

mM – milimolar

ng - nanogramas

OMS – Organização Mundial de Saúde

PAHO – Organização Pan-Americana de Saúde

PFU – unidades formadoras de placa

RIDL – *release of insects carrying a dominant lethal gene*

RNA – ácido ribonucleico

Rps17 – Proteína ribossomal S17

RT-PCR – transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase

RT-qPCR - transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase quantitativa

SFB – soro fetal bovino

SIT – *sterile insect technique*

SINV - *Sindibis virus*

WNV – *West Nile virus*

YFV – *Yellow Fever virus*

ZIKV – *Zika virus*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1 FEBRE DO MAYARO	17
1.1.1 Histórico e epidemiologia	17
1.1.2 Agente etiológico	19
1.1.3 Sintomas e patogenia	20
1.1.4 Diagnóstico	20
1.1.5 Tratamento	21
1.1.6 Ecologia do MAYV - hospedeiros e reservatórios naturais.....	21
1.2 Mosquito <i>Aedes aegypti</i>	22
1.2.1 Infecção e competência vetorial.....	24
1.2.2 Sistema Imune do <i>Aedes aegypti</i>	24
1.2.2.1 Via de sinalização Toll.....	26
1.2.2.2 Via de sinalização Imd.....	27
1.2.2.3 Via de sinalização JAK-STAT.....	27
1.2.2.4 Via do RNAi	28
1.2.2.5 Via da Autofagia	30
1.2.3 Medidas de controle vetorial.....	30
1.2.3.1 O uso de <i>Wolbachia</i> no controle de arboviroses.....	31
2. JUSTIFICATIVA	34
3. OBJETIVOS	35
3.1 Objetivo geral.....	35
3.2 Objetivos específicos	35
4. MATERIAIS E MÉTODOS	36
4.1 Criação dos mosquitos.....	36
4.2 Cultivo e titulação viral em ensaio de placa	37
4.3 Infecção dos mosquitos com MAYV	38
4.4 Extração do RNA total	39
4.5 Análise de MAYV, <i>rps17</i> e <i>Wolbachia</i> via RT-qPCR	39
4.6 Análise da Expressão Gênica	40
4.7 Silenciamento gênico.....	41
4.8 Ensaio de correlação RT-qPCR e PFU	43
4.9 Análises estatísticas	43
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
5.1 Caracterização da infecção de mosquitos <i>Aedes aegypti</i> pelo MAYV	45
5.2 Densidade de <i>Wolbachia</i>	50
5.3 Análise dos níveis de expressão gênica.....	52
5.3.1 Níveis de expressão do gene <i>RELI</i>	53
5.3.2 Níveis de expressão do gene <i>CACTUS</i>	56
5.3.3 Níveis de expressão do gene <i>REL2</i>	58
5.3.4 Níveis de expressão do gene <i>CASPAR</i>	61
5.3.5 Níveis de expressão do gene <i>DOME</i>	64
5.3.6 Níveis de expressão do gene <i>SOCS</i>	67
5.3.7 Níveis de expressão do gene <i>AGO2</i>	70
5.4 Relação entre carga viral e expressão gênica	73
5.5 Silenciamento gênico.....	74

CONCLUSÃO	81
REFERÊNCIAS	82

1. INTRODUÇÃO

As arboviroses têm sido o grande problema de saúde pública do mundo atual ganhando cada dia mais atenção devido aos inúmeros casos relatados. Arbovírus, nome derivado do inglês *Arthropod-borne virus*, são vírus mantidos na natureza através de um ciclo biológico de transmissão entre hospedeiros vertebrados e artrópodes vetores hematófagos como mosquitos, carrapatos, flebotomíneos, entre outros. Em termos de impacto na saúde pública, acredita-se que entre os anos de 1990-2013, as doenças causadas por arbovírus representaram um aumento global de 58% na taxa DALY (do inglês *Disability Adjusted Life Years*), indicador criado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e que representa os anos de vida perdidos, seja por morte prematura ou incapacidade, em relação à esperança de vida (STANAWAY *et al.*, 2016).

De modo geral, os arbovírus se encontram na natureza circulando entre animais silvestres, o que é conhecido como ciclo silvestre, sendo que a transmissão dos vírus para humanos e animais domésticos ocorre de forma acidental (KREUDER *et al.*, 2015). Este processo de urbanização de um arbovírus tem sido algo bastante discutido na comunidade científica, principalmente após os surtos de Zika (ZIKV) e Chikungunya (CHIKV) ocorridos no Brasil nos últimos anos. A adaptação de um arbovírus ao ambiente urbano depende de vários fatores, entre eles mudanças climáticas, desmatamento e o aumento na frequência do tráfego de pessoas, principalmente relacionado ao ecoturismo, que leva humanos a frequentarem áreas silvestres onde há arbovírus circulando (WEAVER, 2005; GOULD; HIGGS, 2009; KILPATRICK; RANDOLPH, 2012)

Além dos vírus mais comumente circulantes que afetam humanos como o Dengue vírus (DENV), a cada dia surgem epidemias e surtos repentinos de outras arboviroses emergentes. Dentre estas arboviroses emergentes tem-se a febre do Mayaro, uma infecção causada pelo Mayaro vírus (MAYV), que é clinicamente muito semelhante à Dengue e outras arboviroses. O MAYV é transmitido principalmente pela picada de mosquitos *Haemagogus janthinomys* que juntamente com roedores e primatas não humanos são responsáveis pela manutenção do vírus em um ciclo enzoótico.

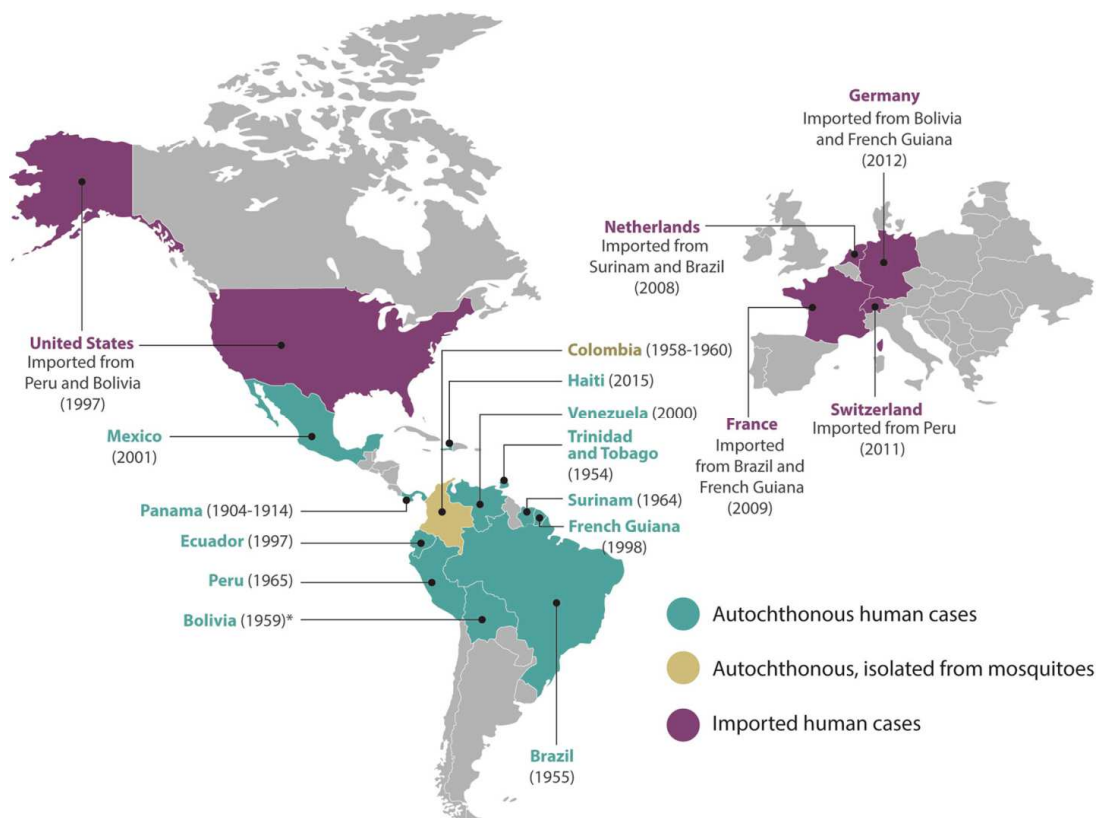
Apesar de ser uma arbovirose silvestre, muitos casos em áreas periurbanas e casos alóctones já foram relatados para a febre do Mayaro (ACOSTA-AMPUDIA *et al.*, 2018), e uma vez que o *Aedes aegypti*, um vetor extremamente antropofílico e com o habitat principalmente urbano, possui capacidade para transmissão deste vírus (LONG *et al.*, 2011; PEREIRA *et al.*, 2018; MACKAY & ARDEN, 2016; MOTA *et al.*, 2015), aumenta a preocupação sobre a urbanização do MAYV. Este poderia se tornar um sério problema de saúde pública devido à intensa poliartralgia debilitante e, muitas vezes crônica, que pode resultar em grande impacto socioeconômico de áreas afetadas.

1.1 FEBRE DO MAYARO

1.1.1 Histórico e epidemiologia

O Mayaro vírus (MAYV) foi pela primeira vez descrito em 1957 depois de seu isolamento de cinco trabalhadores rurais em Trinidad em 1954 (ANDERSON *et al.*, 1957) e desde então surtos da doença já foram relatados em diferentes áreas da região Amazônica, em vários países nas Américas Central e Sul. Casos da febre do Mayaro e/ou isolamento viral em humanos, primatas não humanos, aves, roedores e mosquitos já foram relatados no Peru (FORSHEY *et al.*, 2010; HALSEY *et al.*, 2013), Suriname (METSELAAR, 1966; HASSING *et al.*, 2010), Guiana Francesa (TALARMIN *et al.*, 1988), Guiana e Venezuela (TORRES *et al.*, 2004), Colômbia (GROOT, 1964), Equador (IZURIETA *et al.*, 2009), Panamá (SEYMOUR *et al.*, 1983), Bolívia (FORSHEY *et al.*, 2010) e no Brasil (Figura 1)

Figura 1: Distribuição epidemiológica de casos de MAYV ao redor do mundo.



Fonte: Adaptado de ACOSTA-AMPUDIA *et al.*, 2018.

Dos 3 grandes surtos causados pelo MAYV registrados na América Latina, 2 foram na região Norte do Brasil, nos estados do Pará e do Amazonas (PINHEIRO *et al.*, 1981; ABAD-FRANCH *et al.*, 2012; MOURÃO *et al.*, 2012; HOCH *et al.*, 1981; LEDUC *et al.*, 1981; AZEVEDO *et al.*, 2009). Vários casos da febre do Mayaro também já foram relatados em viajantes que visitaram a região da Bacia Amazônica suscitando uma preocupação em relação a disseminação do MAYV para outros continentes (SLEGERS *et al.*, 2014).

No Brasil, a febre do Mayaro é uma doença de notificação compulsória imediata de acordo com a portaria nº 104, de 25 de janeiro de 2011 do Ministério da Saúde e até 2016 foram notificados 343 casos da doença (Tabela 1; Figura 2). Apesar disso, vale ressaltar que na prática clínica no Brasil é comum os casos serem notificados baseando-se apenas nos sintomas em vez de se usar métodos moleculares como RT-qPCR, devido ao alto custo, ausência de estrutura para tais análises em clínicas da saúde, bem como no tempo para liberação dos resultados, dificultando assim uma análise epidemiológica mais precisa da doença levando-se a acreditar que o número de casos possa estar subestimado.

Tabela 1: Estados com registro de casos suspeitos de doença pelo vírus Mayaro, Brasil, janeiro de 2016.

Estados	Casos notificados								
	Confirmados		Em investigação		Descartados		Total		
	n	%	n	%	n	%	n	%	
Goiás	60	85,7	133	54,5	10	34,4	183	53,3	
Pará	1	1,4	56	22,9	11	37,9	68	19,8	
Tocantins	9	12,8	16	6,5	0	0,0	25	7,2	
Roraima	0	0,0	23	9,4	5	17,2	28	8,1	
Mato Grosso	0	0,0	20	8,1	0	0,0	20	5,8	
Amazonas	0	0,0	6	2,4	2	6,8	8	2,3	
Amapá	0	0,0	6	0,4	1	3,4	7	2,0	
Bahia	0	0,0	1	0,4	0	0,0	1	0,3	
Minas Gerais	0	0,0	1	0,4	0	0,0	1	0,3	
Mato Grosso do Sul	0	0,0	1	0,4	0	0,0	1	0,3	
Distrito Federal	0	0,0	1	0,4	0	0,0	1	0,3	
Total	70	100,0	244	100,0	29	100,0	343	100,0	

Fonte: portalsaude.gov.br. (acessado: 29 de outubro, 2017).

Figura 2: Ocorrência de casos de Mayaro vírus no Brasil.



O mapa representa os casos antes de 2014 (cinza claro) e entre 2014-2016 (cinza escuro), no Brasil. Mapa feito por Fernanda de Menezes Carvalho. Feito através de publicações científicas e MS.

1.1.2 Agente etiológico

MAYV, agente etiológico da febre do Mayaro, é um arbovírus, pertencente a família *Togaviridae* e gênero *Alphavirus*, e assim como os demais vírus do gênero *Alphavirus*, é um vírus envelopado com proteínas estruturais acopladas ao envelope, possui um capsídeo icosaédrico que envolve o seguimento genômico que consiste de uma fita simples linear de RNA senso positivo. O RNA deste possui uma região

genômica que será traduzida em uma poliproteína que quando clivada gerará quatro proteínas não estruturais (nsP1, nsP2, nsP3 e nsP4), e também uma região subgenômica responsável pela codificação das proteínas estruturais Capsídeo (C) e Envelope (E1, E2, E3 e 6k) (MACKAY & ARDEN, 2016; MOTA *et al.*, 2015).

1.1.3 Sintomas e patogenia

A febre do Mayaro é uma doença febril aguda acompanhada de manchas vermelhas na pele (*rash*) e artralgia. Estes sintomas são muito comuns a outras arboviroses como Dengue e Chikungunya o que dificulta o diagnóstico baseado apenas na análise clínica, fazendo-se necessário o uso de métodos sorológicos e moleculares. Em um estudo realizado por Vieira e colaboradores (2015), no qual descreveram um surto de dengue no Mato Grosso, dos 200 casos notificados, 20% foram confirmados para dengue e 3% confirmados para febre do Mayaro, exemplificando a semelhança clínica e a dificuldade de diagnóstico diferencial destas arboviroses baseando-se apenas na clínica.

A febre do Mayaro não é uma doença letal, porém apresenta uma alta taxa de morbidade uma vez que em casos mais graves o paciente pode desenvolver, como no caso de febre chikungunya, uma poliartralgia dolorosa que pode perdurar por vários meses (THEILACKER *et al.*, 2013). Até o presente momento, apenas um caso de mortalidade foi descrito na literatura, em que um paciente no México, com diagnóstico confirmado para MAYV, apresentou hemorragia com trombocitopenia, icterícia, encefalopatia e faleceu 30 dias após a internação hospitalar (NAVARRETE-ESPINOSA & GOMEZ-DANTÉS, 2006).

1.1.4 Diagnóstico

O primeiro passo para o diagnóstico da febre do Mayaro é através de exames clínicos, porém somente a anamnese não é suficiente para um diagnóstico final. Portanto, análises laboratoriais, juntamente com a situação epidemiológica da região, devem ser analisados. Os exames específicos para diagnóstico são a partir do isolamento direto do vírus de pacientes infectados, utilizando técnicas de cultivo viral, assim como métodos moleculares (NAVECA *et al.*, 2017; ROSA *et al.*, 2017).

1.1.5 Tratamento

Para o paciente com febre do Mayaro não existe um tratamento específico. A forma de tratamento é apenas sintomática, com administração de analgésicos e anti-inflamatórios não-esteroides para alívio das dores, podendo ser prescrito por meses em casos mais graves. Alguns autores sugerem o uso de Cloroquina para tratamento da febre do Mayaro, uma vez que este medicamento se mostrou eficaz no tratamento de artralgia incapacitante causada por CHIKV, também um *Alphavirus* (MACKAY & ARDEN, 2016).

1.1.6 Ecologia do MAYV - hospedeiros e reservatórios naturais

O MAYV circula na natureza entre animais silvestres como preguiças, primatas não-humanos, aves e roedores, no que é conhecido como ciclo de transmissão silvestre (ou silvático/enzoótico), causando doenças em humanos e animais domésticos de forma acidental e esporádica (eventos de *spillover*). Neste último caso, os humanos constituem a ponte entre o ciclo silvestre e o rural quando estes adentram áreas florestais onde se tem o vírus circulando e se infectam retornando para áreas periurbanas durante o período de viremia.

No ciclo silvestre o mosquito da espécie *Haemagogus janthinomys* tem sido considerado como o principal vetor do MAYV, após estudos realizados durante os surtos que ocorreram no Estado do Pará, Brasil, em que mosquitos da espécie em questão foram encontrados naturalmente infectados com MAYV (HOCH *et al.*, 1981; AZEVEDO *et al.*, 2009).

Apesar do *Hg. janthinomys* ser considerado o principal vetor, MAYV já foi encontrado infectando naturalmente outras espécies de mosquitos, alguns dos quais também habitam áreas periurbanas, como *Mansonia venezuelensis* (AITKEN *et al.*, 1960), *Psorophora ferox* e *Culex vomerifer* (GALINDO *et al.*, 1966). Além disso, estudos laboratoriais já demonstraram a competência de mosquitos *Aedes scapularis* em transmitir MAYV (FORATTINI & GOMES, 1988).

A distribuição geográfica dos vetores e reservatórios de MAYV restringe-se a áreas rurais próximas as florestas tropicais onde foram relatados a maioria dos surtos. No entanto, vários fatores sugerem a possibilidade de urbanização do MAYV: (1) sua homologia com o CHIKV com uma história da urbanização bem descrita (TESH *et al.*, 1999); (2) a ocorrência regular de casos de MAYV perto das principais cidades

tropicais onde *A. aegypti* é endêmico (TESH *et al.*, 1999); (3) o fato de que MAYV é propagado por viajantes doentes ou aves migratórias (THEILACKER *et al.*, 2013) além de possuir diferentes hospedeiros vertebrados como reservatório (DE THOISY *et al.*, 2003); ademais, (4) estudos experimentais já demonstraram que os vetores *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*, com um comportamento basicamente urbano, são competentes vetores para transmissão de MAYV.

Smith e Francy (1991) testaram a competência vetorial de mosquitos *Ae. albopictus* para MAYV. Quando alimentados em hamsters infectados por MAYV, com viremia em torno de $5.3 \log_{10}$ PFU/mL, ou em alimentadores artificiais, com uma concentração viral máxima de $7.7 \log_{10}$ PFU/mL, uma porcentagem relevante de mosquitos foi capaz de se infectar e transmitir o vírus principalmente no segundo tipo de alimentação.

No que concerne ao *Ae. aegypti*, Long e colaboradores (2011) demonstraram experimentalmente a capacidade de mosquitos coletados no Peru em se infectarem e transmitirem MAYV tanto quando receberam alimentação infectiva via alimentadores artificiais ou através da alimentação em camundongos adultos virêmicos (LONG *et al.*, 2011). Semelhantemente, Pereira e colaboradores (2017) demonstraram a competência de mosquitos *Ae. aegypti* selvagens coletados na região da Urca no Estado do Rio de Janeiro, Brasil, em transmitir MAYV, tanto quando receberam cultivos virais congelados ou frescos, obtendo taxas maiores de infecção no último caso.

Os estudos citados demonstram a capacidade de espécies de vetores altamente antropofílicas e adaptadas ao ambiente urbano em transmitir MAYV, sendo assim de suma importância compreender a relação deste vírus com estas espécies.

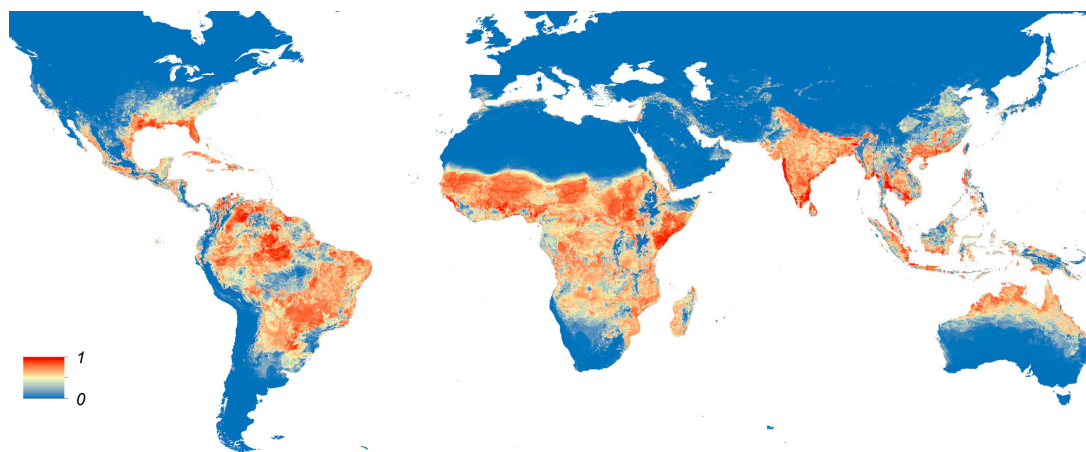
1.2 Mosquito *Aedes aegypti*

O mosquito *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) (ordem Diptera, subordem Nematocera, família Culicidae, subfamília Culicinae) é o principal vetor de várias arboviroses no mundo sendo considerado um vetor altamente competente. Este é um mosquito que quando adulto apresenta o corpo levemente enegrecido, com escamas ornamentais formando um padrão de manchas/faixas prateadas ao longo do corpo, com presença de duas listras no formato de lira em seu tórax (TAKKEN; VERHULST, 2011).

O *Ae. aegypti* possui distribuição principalmente doméstica e é altamente antropofílico, com hábitos diurnos, durante o qual a fêmea realiza o repasto sanguíneo, especialmente durante as primeiras horas da manhã e, ao entardecer, mas não de forma exclusiva, tendo humanos como sua fonte preferencial de alimento (TAKKEN; VERHULST, 2011).

O *Ae. aegypti* está amplamente distribuído pelo mundo principalmente nas regiões tropicais e subtropicais (Figura 3). Esta ubiquidade dificulta o seu controle populacional e viabiliza a disseminação e ocorrência de surtos/epidemias de várias arboviroses em diferentes partes do mundo (KRAEMER *et al.*, 2015).

Figura 3: Distribuição de *Aedes aegypti* no mundo.



O mapa mostra a probabilidade de ocorrência (de 0 azul para 1 vermelho) em uma resolução espacial de 5 km × 5 km. Fonte: KRAEMER *et al.*, 2015.

Os ovos de *Ae. aegypti* podem ser encontrados tanto em criadouros naturais como em vãos de rochas, cascas de frutas e internódios de bambus, quanto em criadouros artificiais, que incluem caixas d'água, pneus, latas, recipientes plásticos, piscinas, entre outros (Fundação Oswaldo Cruz – criadouros naturais e artificiais de *Ae. aegypti*: <http://tinyurl.com/hcgcsd3> [acessado: 08 de janeiro, 2019]).

O ciclo de desenvolvimento de *Ae. aegypti* possui quatro diferentes estágios, sendo: ovo, larva (4 estágios: L1-L4), pupa e inseto adulto, dividido em duas fases: aquática e alada (Fundação Oswaldo Cruz – ciclo de vida de *Ae. aegypti*: <http://tinyurl.com/hcgcsd3> [acessado: 08 de janeiro, 2019]).

O ciclo tem início quando as fêmeas depositam os ovos na parede interna de depósitos com água parada, levando à eclosão dos ovos assim que estes entram em contato com a água (após o período necessário para completar o desenvolvimento do

embrião no ambiente seco). Essas larvas alimentam-se de microrganismos e matéria orgânica particulada, trocando sua cutícula corpórea por três vezes, indo do estágio L1 ao L4 até realizarem metamorfose e se transformarem em pupas. Em seguida ocorrem diversas mudanças fisiológicas e anatômicas, levando ao surgimento dos mosquitos adultos, os quais atingem o meio terrestre (MOORE; WHITACRE, 1972).

1.2.1 Infecção e competência vetorial

A capacidade intrínseca de um vetor em ser infectado e transmitir a doença é denominada Competência Vetorial (HARDY *et al.*, 1983; BLACK & SEVERSON, 2005), e diversos fatores podem influenciar neste processo, como temperatura média do ambiente (WATTS *et al.*, 1987), genótipo do mosquito e do vírus (LAMBRECHTS *et al.*, 2009), concentração do vírus no sangue (NGUYEN *et al.*, 2013), microbiota intestinal (RAMIREZ *et al.*, 2012), dentre outros (KRAMER & EBEL, 2003). O período de tempo entre o mosquito ingerir o vírus e tornar-se apto a transmiti-lo é chamado de Período de Incubação Extrínseco (PIE) e é também um fator crítico para a competência vetorial (CHRISTOFFERSON & MORES 2011; SMITH *et al.*, 2012; NGUYEN *et al.*, 2013). A duração do PIE é geralmente descrita sendo de 8 a 12 dias (WHO 2009), porém este valor pode variar dependendo do arbovírus em questão.

1.2.2 Sistema Imune do *Aedes aegypti*

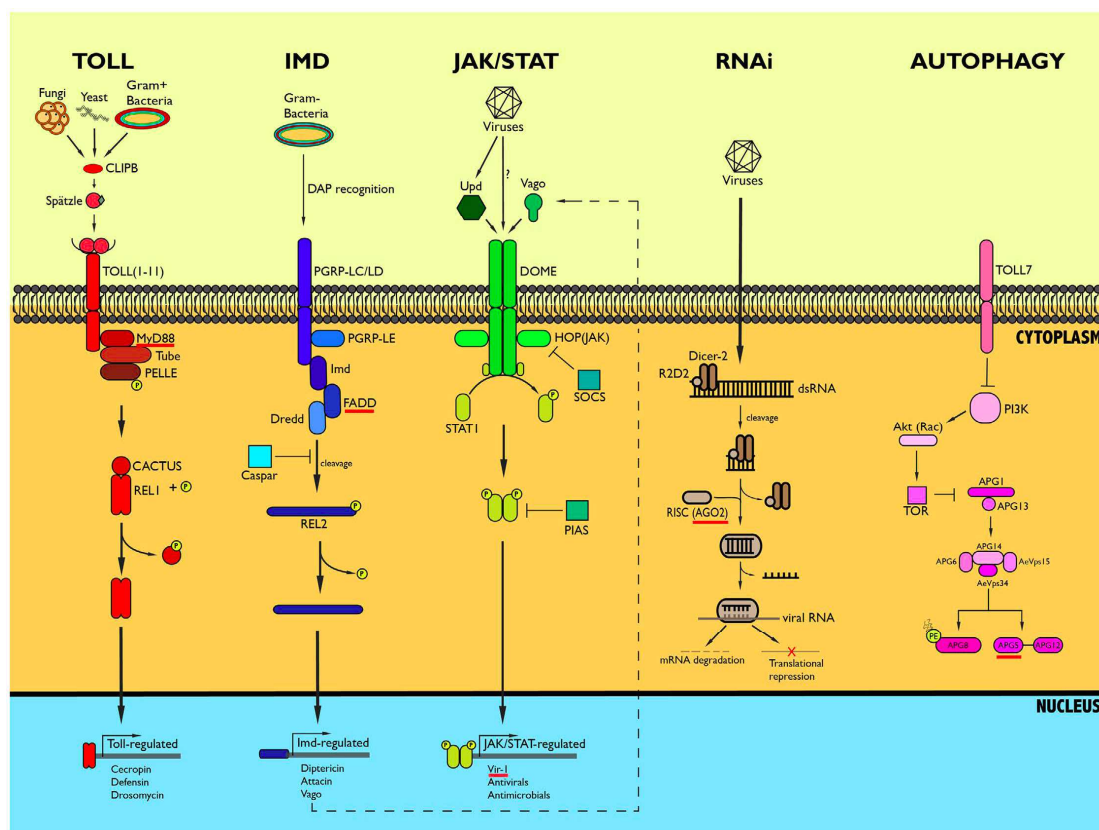
O sistema imune do mosquito consiste de uma resposta imune inata composta por barreiras físicas (anatômicas) e vias de sinalização celular, esta última caracteriza-se pela ativação de um receptor transmembrana que irá desencadear uma cascata de eventos moleculares que culminarão no aumento da expressão de moléculas efetoras. Ambas influenciam diretamente na competência vetorial do mosquito uma vez que são determinantes para a capacidade do vírus em infectar, multiplicar e ser transmitido na saliva pelo mosquito *Ae. aegypti* (BEERNTSEN *et al.*, 2000; BLACK IV *et al.*, 2002). Alguns estudos sugerem também a existência de uma resposta imune adaptativa (SERRATO-SALAS *et al.*, 2018).

Com relação as barreiras anatômicas pode-se citar a barreira de infecção do intestino, a barreira de escape do intestino, a barreira de infecção da glândula salivar e a barreira de escape da glândula salivar. Quando o mosquito se alimenta de sangue num indivíduo que apresenta viremia, os vírus ingeridos precisam primeiramente

infectar produtivamente as células do epitélio do intestino médio. Os mecanismos que afetam a capacidade dos vírus de infectar estas células compõem a chamada barreira de infecção do intestino. Após a infecção do intestino, os vírus devem então ser capazes de se disseminar sistemicamente, via hemocele, passando a chamada barreira de escape/disseminação do intestino para os tecidos secundários como tecido nervoso, muscular, corpo gorduroso, etc. E por último, para que o vírus possa ser transmitido com sucesso este deve ser capaz de vencer as duas últimas barreiras de transmissão, barreira de infecção de escape da glândula salivar, atingindo os dutos salivares de forma a ser transmitido horizontalmente para um hospedeiro vertebrado (BLACK IV *et al.*, 2002; SALAZAR *et al.*, 2007).

Já as vias de sinalização celular caracterizam-se por sua rápida ativação mediante o reconhecimento de moléculas provenientes do patógeno denominados PAMPs (*Pathogen associated molecular patterns*) através de receptores de reconhecimento de padrões denominados PRRs (*Pathogen Recognition Receptors*). As PAMPs são moléculas conservadas entre as classes de microorganismos, e que não estão presentes no hospedeiro, como componentes da parede celular ou RNAs de dupla fita (*dsRNA – double stranded RNAs*) (JUPATANAKUL *et al.*, 2014). As respostas desenvolvidas durante uma infecção são altamente efetivas e incluem a produção de peptídeos antimicrobianos, fagocitose, encapsulação, melanização do patógeno invasor ou, no caso de infecções por arbovírus, clivagem do RNA viral (LEHANE *et al.* 2004). Em *Ae. aegypti* estas respostas são controladas por quatro grandes vias de sinalização: Toll, Imd (*Immune deficiency*), Jak-STAT (*Janus kinase – signal transducers and activators of transcription*) e RNAi (*RNA Interference*) (Figura 4) (DE GREGORIO *et al.*, 2002).

Figura 4: Principais vias de sinalização da resposta imune do *Aedes aegyti*.



Fonte: TERRADAS *et al.*, 2017.

1.2.2.1 Via de sinalização Toll

A via Toll foi primeiramente caracterizada em *Drosophila melanogaster* desempenhando papel no desenvolvimento embrionário dessas moscas e posteriormente como importante mecanismo de defesa contra fungos, bactérias Gram-positivas e vírus (LEMAITRE *et al.*, 1996; ZAMBON *et al.*, 2005).

A transdução do sinal da via de Toll é muito semelhante à sinalização de NF- κ B em mamíferos: O reconhecimento de PAMPs por PRRs ativa uma cascata proteolítica que leva à clivagem da citocina Späetzle, que liga-se e ativa o receptor transmembrana Toll ativando a sinalização através das proteínas adaptadoras MyD88, TUBE e PELLE associadas ao receptor. Essa ativação resulta na fosforilação e subsequente degradação proteossomal do regulador negativo CACTUS, que se liga e sequestra o fator de transcrição NF- κ B (REL1 em mosquitos) no citoplasma. A degradação de CACTUS permite a translocação do REL1 para o núcleo e a subsequente transcrição de genes efetores, como os peptídeos antimicrobianos (AMPs) (LEMAITRE *et al.*, 1996; HOFFMANN, 2003).

Em mosquitos *Ae. aegypti*, a via Toll já foi demonstrada como tendo um papel importante na imunidade antiviral. Xi e colaboradores demonstraram que há um aumento da expressão de componentes da via Toll como SPÄETZLE, TOLL, REL1A e diferentes AMPs no intestino médio e glândulas salivares de mosquitos *Ae. aegypti* infectados com DENV. Utilizando a técnica do RNAi, os mesmos também forneceram maiores evidências do papel da via Toll no controle de DENV. O silenciamento transiente do gene MyD88 leva ao aumento da carga viral do DENV, enquanto o silenciamento do inibidor da via de Toll, CACTUS, leva à diminuição da carga viral nestes mosquitos (XI et al., 2008).

1.2.2.2 Via de sinalização Imd

A via Imd, por sua vez, é bastante conhecida por desempenhar papel contra bactérias Gram-negativas (GEORGE *et al.*, 2001; LU *et al.*, 2001). A ativação desta via acontece de forma semelhante à via Toll, através do reconhecimento de PAMPs por receptores PRRs. Essa interação desencadeia a sinalização intracelular que recruta proteínas adaptadora IMD e FADD resultando na ativação do fator de transcrição NF- κ B (REL2 em mosquitos). Uma vez ativado, REL2 se transloca para o núcleo e induz a transcrição de genes como os AMPs. Nesta via, a proteína CASPAR é responsável por regular negativamente a ativação de REL2 possivelmente através da interferência nas enzimas responsáveis por sua clivagem (SIM *et al.*, 2014).

O papel da via IMD em respostas antivirais já foi demonstrado em *D. melanogaster* infectada por CrPV (*Cricket Paralysis Virus*) e DMelSV (*Drosophila melanogaster sigma virus*) (TSAI *et al.*, 2008; COSTA *et al.*, 2009; AVADHANULA *et al.*, 2009). Em *Anopheles gambiae*, a infecção pelo vírus O'nyong'nyong (ONNV) é potencializada através bloqueio de componentes da via Imd no intestino médio (CARISSIMO *et al.*, 2015). Já em *Ae. aegypti*, estudos já demonstraram que a infecção por DENV (LUPLERTLOP *et al.*, 2011) e SINV (SANDERS *et al.*, 2005) induz a expressão de vários componentes da via IMD.

1.2.2.3 Via de sinalização JAK-STAT

A via JAK-STAT foi identificada pela primeira vez em vertebrados como uma via de sinalização induzida por Interferon (IFN) e desempenha um papel fundamental na imunidade antiviral em mamíferos. Esta é bastante conservada em invertebrados e

foi caracterizada em *D. melanogaster* no contexto de seu papel em vários aspectos do desenvolvimento. (ARBOUZOVA *et al.*, 2006).

A ativação da via JAK-STAT é iniciada através do reconhecimento do ligante Upd (*Unpaired*) pelo receptor transmembrana DOME (*Domeless*). Esta interação, ligante-receptor, sofre uma mudança conformacional que leva à autofosforilação de Hop, um homólogo da quinase de mamífero JAK. Seguidamente, Hop ativado fosforila Dome, induzindo assim a fosforilação e dimerização do fator de transcrição STAT. Uma vez ativado, o dímero STAT se transloca para o núcleo e ativa a transcrição de genes específicos. Esta via possui dois reguladores negativos indenticados até o momento, PIAS (*Protein Inhibitor of Activated STAT*) e SOCS (*Suppressor of Cytokine Signaling*), (SOUSA-NETO *et al.*, 2009; SIM *et al.*, 2014; CHENG *et al.*, 2015).

A primeira evidência da participação de JAK-STAT na imunidade de insetos veio com estudos realizados em *An. gambiae*, que quando desafiado com bactérias resultou na translocação do fator de transcrição STAT (BARILLAS-MURY *et al.*, 1999). Em mosquitos *Ae. aegypti*, Souza-Neto e colaboradores (2009) demonstraram que a JAK-STAT possui atividade antiviral contra DENV uma vez que a replicação de DENV no intestino do mosquito aumentou significativamente quando a expressão do receptor DOME foi suprimida de forma transitória pelo método RNAi, e o contrário foi observado, diminuição da replicação viral quando o regulador negativo da via, PIAS, foi silenciado (SOUSA-NETO *et al.*, 2009).

1.2.2.4 Via do RNAi

No organismo modelo *Drosophila melanogaster* e em outros insetos de forma geral, existem pelo menos 3 vias de RNAi: a via de siRNA (*small interfering RNAs*), via de miRNA (*microRNAs*), e a via de piRNA (*piwiRNAs*), sendo seu funcionamento dependente de componentes e mecanismos moleculares distintos (GHILDIYAL e ZAMORE, 2009).

A via do siRNA é a via mais estudada das vias de RNAi em insetos. Esta é ativada pela formação de longas fitas duplas de RNA (dsRNA – *double stranded RNA*). A via do siRNA pode ser dividida em duas dependendo da origem dos dsRNAs. Estes podem se originar tanto a partir de RNAs virais formados durante a replicação (exógeno - exo-siRNA) quanto do próprio hospedeiro a partir mRNAs (endógeno - endo-siRNA). Os dsRNAs são reconhecidos e clivados pela nuclease

RNAse III denominada DICER-2 (DCR2) gerando pequenos fragmentos de RNA denominados siRNAs que medem aproximadamente 21 pares de base de tamanho. Com a ajuda de DCR2 e da proteína R2D2, os siRNAs são incorporados no Complexo de Silenciamento Induzido por RNA (RISC - do inglês *RNA-induced silencing complex*) dentro do qual terão uma das fitas degradadas. Após este processo, a fita mantida serve de guia para que o complexo RISC encontre fitas complementares de RNA, as quais serão clivadas. Quando o pareamento entre a fita guia e o RNA alvo envolve diversas bases, gerando um pareamento efetivo, o RNA alvo é degradado pela ação catalítica da enzima ARGONAUTA-2 (AGO2). No caso de infecções virais, a degradação do RNA viral leva a inibição da replicação viral (KEENE *et al.*, 2004; CAMPBELL *et al.*, 2008; SÁNCHEZ-VARGAS *et al.* 2009).

No mosquito *Ae. aegypti* os genes centrais da via de siRNA identificados são DCR2, R2D2 e AGO2 (SÁNCHEZ-VARGAS *et al.* 2009). Estes mesmos autores detectaram pequenos RNAs com sequência e tamanho semelhantes aos siRNAs em mosquitos infectados com DENV-2, e também mostraram que o silenciamento transiente de componentes da via de RNAi aumentaram a carga viral do DENV no mosquito e diminuíram o período de incubação extrínseco. Também já foi demonstrada que a expressão de AGO2 é essencial em mosquitos para a modulação de infecções por *Alphavirus (Togaviridae)* em *An. gambiae* e *Ae. aegypti* (KEENE *et al.*, 2004; CAMPBELL *et al.*, 2008). Utilizando uma linhagem de mosquito transgênica expressando um dsRNA complementar ao DENV-2 no intestino, Franz e colaboradores (2006) e (2014) mostraram que quando a via de exo-siRNA é pré-ativada há diminuição da carga viral nos intestinos dos mosquitos infectados e também há diminuição da prevalência da infecção com 7 e 14 dias após a alimentação (FRANZ *et al.*, 2006; FRANZ *et al.*, 2014). Em contrapartida, Khoo e colaboradores (2013), utilizando mosquitos transgênicos que expressam a proteína B2 do Flock House vírus no intestino de mosquitos *Ae. aegypti*, que é um potente inibidor da via de siRNAs, mostraram que há aumento da carga de SINV e do DENV nos mosquitos infectados, porém não há alteração da prevalência da infecção (KHOO *et al.* 2013). Este mesmo grupo mostrou utilizando outra linhagem transgênica (KHOO *et al.* 2010) que eficientemente silencia DCR2 no intestino, o aumento significativo da carga viral e prevalência do SINV no intestino com 7 dpi, porém com 14 dpi este fenótipo é revertido, ficando a carga viral e a prevalência neste tempo semelhantes ao controle. Estes resultados sugerem que a via de siRNA está presente e ativa no

mosquito *Ae. aegypti*, e que a ativação desta via após o início da replicação viral pode não ser suficiente para eliminar a infecção, porém auxilia no controle da carga viral.

1.2.2.5 Via da Autofagia

A autofagia é um processo biológico homeostático celular altamente conservado responsável pela degradação lisossomal de proteínas, organelas danificadas e partes do citosol, e é coordenado por um conjunto de proteínas relacionadas à autofagia (ATG). Durante a autofagia, as células envolvem os componentes citoplasmáticos a serem degradados estruturas de membrana dupla chamadas autofagossomos; essas estruturas então se fundem com os lisossomos para provocar a degradação de seus conteúdos. A autofagia é um processo celular básico que mantém a homeostase celular durante o estresse ou a privação de nutrientes, permitindo a reciclagem de recursos celulares. Durante infecções virais ou bacterianas, a autofagia pode ativar e regular respostas imunológicas, bem como eliminar diretamente os microorganismos intracelulares (DERETIC & LEVINE, 2009).

Um papel protetor para a autofagia tem sido relatado na defesa de *Drosophila* contra o VSV (*Vesicular Stomatitis Virus*), família Rhabdoviridae (SHELLY *et al.*, 2009), e, mais recentemente, o vírus RVFV (*Rift Valley Fever Virus*) família Bunyaviridae (MOY *et al.*, 2014). Em ambos os casos, pensa-se que o ortólogo Toll-7 do receptor do tipo Toll na superfície da célula seja responsável pelo reconhecimento do vírus e pelo desencadeamento da autofagia através da sinalização do fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) -AKt (MOY *et al.*, 2014; NAKAMOTO *et al.*, 2012). Voronin e colaboradores (2012) demonstraram o papel da via na autofagia no controle das populações de *Wolbachia* em diferentes artrópodes e nematódeos filariais (VORONIN *et al.*, 2012)

1.2.3 Medidas de controle vetorial

O MAYV, por ser um patógeno que necessita de um vetor para se disseminar, o controle vetorial se torna algo de suma importância sua discussão. Entretanto, com relação a este arbovírus, ainda não se tem nada definido sobre qual seria o principal vetor em áreas urbanas, uma vez que o vírus já foi isolado de diferentes espécies de mosquitos tanto silvestres quanto periurbanos, o que inviabiliza a adoção de estratégias específicas de controle vetorial. Além disso, até o momento, todos os casos

e surtos foram registrados em áreas silvestres ou periurbanas, locais onde abordagens de controle vetorial seriam inviáveis devido ao grande impacto imposto no ecossistema e a outras populações de insetos.

Contudo, é necessário compreender melhor a eficácia de atuais abordagens utilizadas para o controle da transmissão de arboviroses contra MAYV visando a preparação do sistema de saúde para uma possível urbanização deste vírus. Uma das possíveis estratégias para o controle da transmissão do MAYV seria o uso de mosquitos *Ae. aegypti* transfectados com a bactéria *Wolbachia* (linhagem *wMel*), como vem sendo utilizado para dengue, Zika e Chikungunya no programa World Mosquito Programa (www.worldmosquito.org).

1.2.3.1 O uso de *Wolbachia* no controle de arboviroses

Wolbachia pipientis são organismos procariotos, gram negativos, intracelulares obrigatórios, pertencentes à ordem Rickettsiales (HERTIG & WOLBACH, 1924) presente em cerca de 40% de todas as espécies conhecidas de artrópodes terrestres (ZUG & HAMMERSTEIN, 2012). Entretanto, destaca-se a sua completa ausência em *Ae. aegypti*, o principal vetor de arboviroses no mundo.

A ausência de *Wolbachia* em *Ae. aegypti* foi contornada inicialmente em 2005 (XI *et al.*, 2005), via introdução estável da cepa *wAlbB*, originária de *Aedes albopictus*. Posteriormente, McMeniman e colaboradores transinfectaram a cepa *wMelPop*, originária de *Drosophila melanogaster* no mosquito (MCMENIMAN *et al.*, 2009). Posteriormente foi demonstrado que esta cepa possuía grande capacidade em interferir no desenvolvimento de DENV, CHIKV, YFV (do inglês *Yellow Fever Virus*) e inclusive *Plasmodium* (MOREIRA *et al.*, 2009; VAN DEN HURK *et al.*, 2012). Entretanto, *wMelPop* compromete severamente o fitness do mosquito vetor, reduzindo assim a sua vantagem competitiva na natureza (YEAP *et al.*, 2011). Logo, outra linhagem de *Ae. aegypti* foi então gerada, desta vez contendo a cepa *wMel*, também originária de *D. melanogaster*. Esta por sua vez ainda exerce o efeito de interferência a patógeno no hospedeiro sem alterar severamente o seu fitness (WALKER *et al.*, 2011), característica comprovada pela sua eficiente disseminação no campo (HOFFMANN *et al.*, 2011).

A utilização de mosquitos transfectados com a cepa *wMel* da bactéria *Wolbachia* tem sido vista como uma abordagem bastante promissora, devido as duas

possibilidades de controle que esta contém, sendo uma auto-limitante e outra autossustentável.

A abordagem auto-limitante consiste na liberação no campo de mosquitos machos contendo *Wolbachia* visando a supressão populacional, uma vez que devido a incompatibilidade citoplasmática causada pela presença da bactéria, machos contendo *Wolbachia* quando cruzam com fêmeas sem *Wolbachia* produzem uma prole infértil, diminuindo assim a população de campo (WERREN *et al.*, 2008). Assim como qualquer outra estratégia, possui pontos positivos e negativos.

Como benefício, a abordagem auto-limitante tem o potencial de ser mais eficaz do que a técnica de insetos estéreis (*SIT* em inglês), devido ao fato de que esta abordagem não se baseia na utilização de radiação para esterilizar os machos, um processo que resulta em elevado custo ao *fitness* do hospedeiro (MCGRAW & O'NEILL, 2013). Já em se tratando dos pontos negativos, pode-se citar a necessidade constante de liberação de mosquitos no campo como um processo oneroso e limitante desta estratégia. Ademais, imigração é algo que deve ser sempre levado em consideração nesta abordagem (CURTIS *et al.*, 1982), devido à possibilidade de cruzamentos compatíveis entre machos contendo a bactéria e fêmeas selvagens de outras áreas as quais possuem a mesma cepa de *Wolbachia*.

A outra abordagem é a estratégia chamada de autossustentável, que consiste na substituição da população de mosquitos de campo por mosquitos contendo *Wolbachia*. Esta estratégia é possível pela liberação de ambos machos e fêmeas na natureza, conferindo a transmissão vertical da *Wolbachia*, através dos ovos das fêmeas e conseqüente estabelecimento na natureza. Além disso, há ainda a vantagem de que certas cepas de *Wolbachia* diminuem a capacidade das fêmeas de transmitirem certos patógenos, trazendo um benefício extra.

Nos últimos anos, diversos estudos buscaram analisar o efeito de interferência a patógenos causado por diferentes cepas de *Wolbachia* introduzidas artificialmente no vetor *Ae. aegypti*, via transinfecções estáveis. Moreira e colaboradores (2009) mostraram a redução na infecção, carga viral e transmissão de DENV e CHIKV em *Ae. aegypti* transfectados com a cepa *wMelPop*, estudos semelhantes obtiveram os mesmos resultados para a mesma cepa, em infecções com o Vírus do Oeste do Nilo (do inglês *West Nile Virus - WNV*) (HUSSAIN *et al.*, 2013) e Vírus da Febre Amarela (do inglês *Yellow Fever Virus - YFV*) (VAN DEN HURK *et al.*, 2012).

A cepa *wMelPop* se mostrou uma cepa muito virulenta para o mosquito, afetando grandemente o fitness desse e diminuindo a capacidade competitiva do mosquito com mosquitos de campo (YEAP *et al.*, 2011). Devido a esse fato, tem-se utilizado uma cepa alternativa, a *wMel*, que apresenta um reduzido custo para o fitness do *Ae. aegypti*. Hoje, vários estudos realizados com a cepa *wMel* demonstram a capacidade desta em reduzir a taxa de infecção, disseminação da carga viral e transmissão para DENV (WALKER *et al.*, 2011), CHIKV (ALIOTA *et al.*, 2016), WNV (HUSSAIN *et al.*, 2013), YFV (VAN DEN HURK *et al.*, 2012) e ZIKV (ALIOTA *et al.*, 2016; DUTRA *et al.*, 2016).

Um estudo recente realizado por nosso grupo mostrou a capacidade da cepa *wMel* em diminuir a taxa de infecção e transmissão do MAYV (PEREIRA *et al.*, 2017) demonstrando a eficácia desta abordagem também para este arbovírus.

Desde sua descoberta, várias hipóteses surgiram para explicar a base mecanicista do bloqueio de patógenos devido a presença da *Wolbachia* em *Ae. aegypti*. A primeira hipótese postula que a presença do simbionte aumenta a expressão basal de genes do sistema imune inato de mosquitos *Ae. aegypti* pré-ativando este e assim contribuindo para criar um ambiente refratário a replicação viral (RANCÈS *et al.*, 2012). Uma segunda hipótese sugere que a *Wolbachia* impede o desenvolvimento de patógenos devido a competição por recursos nutricionais críticos, especialmente porque esta possui um genoma muito reduzido e é altamente dependente do hospedeiro para o suporte metabólico (CARAGATA *et al.*, 2014; WU *et al.*, 2004). Dada a ampla gama de patógenos afetados pela *Wolbachia*, é bem possível que uma mistura desses mecanismos esteja atuando, ambos contribuindo para criar um ambiente refratário à infecções virais.

Por não haver nada concluído sobre os possíveis mecanismos de bloqueio de patógenos pela *Wolbachia*, se faz necessário compreender melhor a resposta a infecção por MAYV em mosquitos *Ae. aegypti* e como a *Wolbachia* estaria atuando nesse sistema.

2. JUSTIFICATIVA

Com o aumento do número de casos autóctones e alóctones da Febre do Mayaro, principalmente em áreas periurbanas, ao longo das últimas décadas, tem-se aumentado a preocupação para uma possível urbanização desta doença, uma vez que já foi demonstrada a competência do principal vetor urbano para diversas arboviroses, o *Ae. aegypti*, em transmitir este vírus. Portanto, há uma real necessidade de se caracterizar de forma mais detalhada a interação entre MAYV e linhagens selvagens do inseto vetor *Ae. aegypti* visando desvendar e compreender quais os processos biológicos desencadeados pela presença deste vírus no vetor.

Além disso, outro ponto importante é a grande possibilidade de adaptação do MAYV ao ambiente urbano vindo este a se tornar um problema de saúde pública, e uma vez que não há no mercado vacinas ou tratamentos que sejam eficazes contra MAYV, torna-se essencial compreender a eficácia de atuais abordagens utilizadas para o controle da transmissão de arboviroses contra MAYV. Um método que tem sido utilizado em campo e que já foi demonstrado eficaz no controle da transmissão do MAYV seria o uso de mosquitos *Ae. aegypti* transfectados com a cepa *wMel* da bactéria *Wolbachia*. A grande maioria dos estudos visando descrever de que forma a *Wolbachia* interferiria na replicação viral focaram na interação entre *wMelPop* com DENV e com ZIKV. Aqui, identificamos um déficit na literatura sobre os mecanismos de interferência pela cepa *wMel*, que tem sido utilizada em campo no programa World Mosquito Program, e a relação desta com outras arboviroses, como por exemplo o MAYV. Portanto, se faz necessário desenvolver estudos visando compreender os mecanismos pelos quais esta bactéria interfere na replicação viral do MAYV tanto em modelos *in vitro* quanto *in vivo*.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Avaliar o sistema imune de diferentes linhagens de *Aedes aegypti* em resposta à infecção pelo Mayaro vírus, bem como na presença da bactéria *Wolbachia*.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar o perfil de expressão de genes da via Toll, Imd, JAK/STAT e RNAi em linhagens de *Aedes aegypti* com e sem *Wolbachia* infectados pelo MAYV;
- Avaliar funcionalmente genes da via JAK/STAT e RNAi em linhagens de *Aedes aegypti* com ou sem *Wolbachia* infectados pelo MAYV.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Criação dos mosquitos

Todos os experimentos foram realizados utilizando-se duas linhagens de *Ae. aegypti*. A primeira linhagem denominada Br, designação criada para indicar mosquitos brasileiros selvagens, ou seja, com o *background* genético brasileiro, não transfectados por *Wolbachia*. Essa linhagem selvagem foi derivada de material coletado de ovitrampas no bairro da Urca, RJ, Brasil.

A segunda linhagem denominada wMel_Br foi gerada através da introdução da cepa wMel de *Wolbachia* no *background* genético dos mosquitos brasileiros através de retrocruzamento (DUTRA *et al.*, 2015). Os experimentos foram realizados 35 gerações após o retrocruzamento inicial.

A cada 5 gerações, 200 machos brasileiros F₁-F₂ para cada 600 fêmeas wMel_Br foram introduzidas nas gaiolas da colônia de wMel_Br para prevenir efeitos de endogamia e manter o *background* genético similar entre as duas linhagens.

Todos os mosquitos foram mantidos em insetário com condições climáticas controladas, previamente descritas (DUTRA *et al.*, 2015).

Com o objetivo de analisar os níveis de expressão gênica frente à infecção com MAYV, na presença ou não da bactéria *Wolbachia*, cada linhagem de *Ae. aegypti*, Br e wMel_Br, recebeu três diferentes tratamentos como descrito no Quadro 1. Foram realizadas duas réplicas experimentais distintas em que na primeira réplica foram coletadas 20 fêmeas e na segunda réplica 10 fêmeas de cada grupo. Os tópicos a seguir representam os resultados e discussão dos resultados das duas réplicas juntas.

Quadro 1: Descrição das linhagens de *Aedes aegypti* e dos respectivos tratamentos para estudo da expressão gênica frente ao MAYV.

Linhagem	Tratamento		
Br: mosquitos selvagens não transfectados com a cepa <i>wMel</i> de <i>Wolbachia</i> .	SACAROSE 10%: Mosquitos tiveram somente acesso, <i>ad libitum</i> , a solução de sacarose 10% durante todo o experimento.	MOCK: Mosquitos receberam uma alimentação contendo sobrenadante de células C6/36 sem vírus e sangue total, em uma proporção de 2/1 respectivamente, e posteriormente foram mantidos com solução de sacarose 10% <i>ad libitum</i> .	MAYV: Mosquitos receberam uma alimentação infectiva contendo sobrenadante de células C6/36 infectadas com MAYV e sangue total, em uma proporção de 2/1 respectivamente, e posteriormente foram mantidos com solução de sacarose 10% <i>ad libitum</i> .
wMel_Br: Mosquitos transfectados com a cepa <i>wMel</i> de <i>Wolbachia</i> .			

4.2 Cultivo e titulação viral em ensaio de placa

O Mayaro vírus utilizado neste trabalho foi isolado a partir de amostras de soro humano coletado de pacientes da cidade do Rio de Janeiro, RJ, Sudeste do Brasil. Este isolado foi cedido gentilmente pela Dr. Ana Bispo do Instituto Oswaldo Cruz/ Fiocruz RJ.

Estoques virais foram cultivados em linhagens celulares de *Ae. albopictus* (C6/36) crescidas em meio Leibowitz L-15 suplementado com soro fetal bovino 10% (SFB), 1% penicilina/estreptomicina (Gibco), e mantidos a 28°C, como anteriormente descrito (HAMEL *et al.*, 2015). Os vírus foram multiplicados em monocamadas de C6/36 que foram infectadas com uma multiplicidade de infecção (M.O.I.) de 0,01. Cinco dias após a infecção, o sobrenadante das culturas foi coletado e os títulos infecciosos foram calculados por titulação por placa de lise sob camada de carboximetilcelulose 1% em células VERO (XU *et al.*, 2016 - modificado).

Células VERO foram utilizadas para a titulação viral como anteriormente descrito (DULBECCO & VOGT, 1953) e os valores foram expressos em Unidades Formadoras de Placa por mililitro (PFU/mL). Células VERO foram cultivadas em

meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) com alta concentração de glicose contendo 5% de SFB e 1% penicilina/estreptomicina (GIBCO).

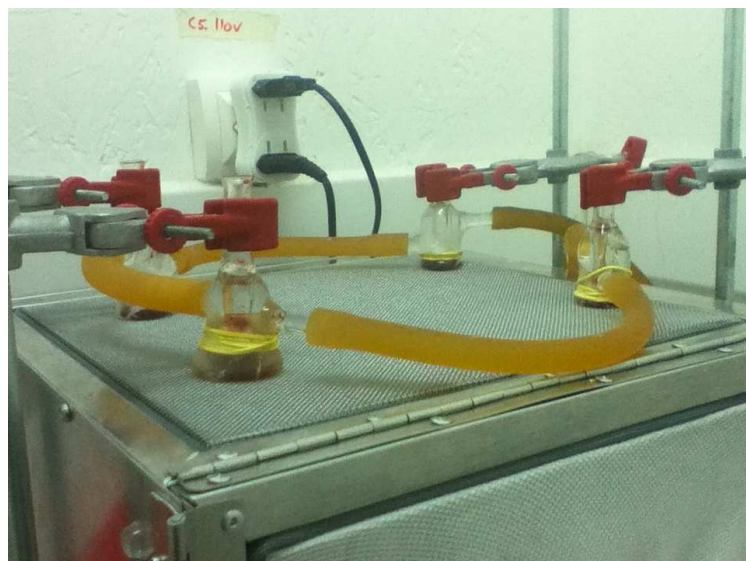
Toda a parte de cultivo viral foi realizada pelo nosso laboratório, sob a responsabilidade da Dra. Marcele Neves Rocha e Bianca Daoud.

4.3 Infecção dos mosquitos com MAYV

MAYV foi coletado do sobrenadante de cultura de células de mosquito C6/36, e resuspendidos em sangue humano fresco de forma a se obter 2 partes de meio de cultura com vírus e 1 parte de sangue humano total (Termo de cooperação técnica com a Fundação Hemominas para obtenção do sangue fresco: OF.GPO/CCO - N°224/16). Uma cultura de células contendo apenas meio de cultura, sem nenhuma partícula viral, foi utilizada como controle (intitulados Mock). Além disso, dois grupos foram mantidos *ad libitum* em solução de sacarose a 10%, sem nenhuma alimentação com sangue e/ou vírus.

Fêmeas adultas com aproximadamente quatro/cinco dias de vida foram deixadas sem qualquer fonte alimentar por 24 horas antes do repasto infectante, e em seguida, foram desafiadas com uma mistura de sangue-vírus por 1h usando alimentadores de vidro envoltos em intestino de porco, como membrana, e mantidos aquecidos a 37°C usando um banho-maria (Figura 5). Após o repasto infectante, os mosquitos que não se alimentaram foram removidos. Os mosquitos infectados foram mantidos em contenção dupla (gaiolas dentro de gaiolas maiores) no infectório NB-2 (DOU – processo n°: 01200.6193/2001-16) do insetário do grupo de Mosquitos Vetores do Instituto René Rachou e tiveram acesso, *ad libitum*, a solução de sacarose a 10%. Fêmeas foram coletadas a 2, 4 e 7 dias após infecção (dpi) de acordo com os grupos descritos abaixo e armazenadas a -70°C até serem processadas.

Figura 5: Repasto sanguíneo artificial de *Aedes aegypti* em alimentador de vidro.



Fonte: Do autor.

4.4 Extração do RNA total

Mosquitos adultos inteiros foram homogeneizados e processados individualmente, como anteriormente descrito (MOREIRA *et al.*, 2009). O RNA total foi extraído dos tecidos dos mosquitos utilizando o método do TRIzol realizado de acordo com protocolo previamente descrito (CARAGATA *et al.*, 2016). Resumidamente, mosquitos foram homogeneizados em 200 μ L de TRIzol (ThermoFisher Scientific) usando um mini beadbeater (Biospect products) e ao final da extração as amostras foram quantificadas para os seus níveis de ácidos nucleicos, via NanoDrop 2000 UV – Vis spectrophotometer (ThermoFisher Scientific).

4.5 Análise de MAYV, *rps17* e *Wolbachia* via RT-qPCR

Para análise da intensidade da carga viral (quantificação total do RNA viral) as amostras de RNA foram diluídas para 50 ng/ μ L em água livre de nuclease, e armazenadas a -80°C . Os níveis de MAYV nessas amostras foram quantificados via RT-qPCR utilizando o LightCycler[®] 96 (Roche) e *primers*/sondas de acordo com a Tabela 1. Para MAYV foram utilizados *primers* e sonda para amplificar e detectar uma região do gene *E2* entre os nucleotídeos 8690 e 8817 (LONG *et al.*, 2011). A densidade de *Wolbachia* foi quantificada para todas as amostras Br e wMel_Br usando *primers* e sonda específicos para o gene *WSP-TM2* responsável por codificar uma proteína de superfície específica de *Wolbachia* (FRENTIU *et al.*, 2014). Para

controle da reação (*housekeeping gene*) foram utilizadas primers e sonda específicos para o gene ribossomal S17 (*RPS17*) de *Ae. aegypti* (MOREIRA *et al.*, 2009).

As condições de ciclagem foram as seguintes: etapa inicial de transcrição reversa a 50°C por 5 min.; inativação da transcriptase reversa/desnaturação inicial a 95°C por 20 seg, 35 ciclos a 95°C por 3 seg e 60°C por 30 seg. O volume total de reação foi de 10 µL (4x *TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix* (Roche), contendo 1 µM de cada par dos iniciadores e sondas, além de 125 ng de RNA molde).

Tabela 2: Identificação dos genes utilizados na análise de MAYV, *RPS17* e *Wolbachia*.

Gene	Sequência dos iniciadores (5'- 3')	Sondas (5'- 3')
<i>MAYV-E2</i>	F - GTGGTCGCACAGTGAATCTTTC R - CAAATGTCCACCAGGCGAAG (LONG <i>et al.</i> , 2011).	/FAM/ATG GTG GTA GGC TAT CCG ACA GGT C/3IAbkFQ/ (LONG <i>et al.</i> , 2011)
<i>WSP-TM2</i>	F - CATTGGTGTGGTGTGGTG R - ACACCAGCTTTTACTTGACCAG (FRENTIU <i>et al.</i> , 2014)	/5-CY5/TCC TTT GGA /TAO/ ACC CGC TGT GAA TGA /3IAbRQSp/ (FRENTIU <i>et al.</i> , 2014)
<i>RPS17</i>	F - TCCGTGGTATCTCCATCAAGCT R - CACTTCCGGCACGTTAGTTGTC (MOREIRA <i>et al.</i> , 2009)	/HEX/CAG GAG GAG GAA CGT GAG CGC AG/3BHQ2/ (MOREIRA <i>et al.</i> , 2009)

Obs: Todos os fluoróforos foram modificados daqueles apresentados nas publicações originais para uso no ensaio multiplex.

Cada amostra foi testada em duplicata para MAYV, *Wolbachia* (gene *WSP-TM2*), e o *RPS17*. As amostras foram analisadas por quantificação absoluta, através da comparação dos valores de MAYV com diluições seriadas deste mesmo produto gênico, clonado e amplificado no plasmídeo pGEMT-Easy (Promega), de acordo com instruções do fabricante. Os níveis de MAYV foram calculados como número total de cópias por mosquito.

4.6 Análise da Expressão Gênica

Para os ensaios de expressão gênica, após extração total do RNA e quantificação via NanoDrop, 1 µg de RNA total foi tratado com enzima DNase (Promega) seguindo recomendações do fabricante e em seguida, o produto final de 11ul, foi utilizado para a síntese de cDNA seguindo recomendações do fabricante, via uso da enzima M-MLV transcriptase reversa (Promega). Ao término do processo, os cDNAs foram então diluídos (1:10) em água livre de nucleases e armazenados a -20°C.

Para o estudo da expressão gênica nos diferentes grupos de mosquitos, foram escolhidos sete genes. Suas identificações, respectivas funções conhecidas e sequência dos iniciadores utilizados (alguns desenhados através do site Primer3Plus (disponível em <https://primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi> - outros obtidos a partir da literatura) estão descritas na Tabela 3.

Tabela 3: Identificação dos genes utilizados no ensaio de expressão gênica, e suas respectivas funções conhecidas.

Gene	Função conhecida	Sequência dos iniciadores (5' - 3')
<i>Argonauta (AGO2)</i>	Enzima endonuclease	F - TTGTTTGCTTCGTTGCTCTTT R - ATCTCCTACACCGAACCCACT (XI <i>et al.</i> , 2008)
<i>CACTUS</i>	Regulador negativo da via de Toll	F - AGACAGCCGCACCTTCGATTCC R - CGCTTCGGTAGCCTCGTGGATC
<i>CASPAR</i>	Regulador negativo da via IMD	F - GAATCCGAGCGAGCCGATGC R - CGTAGTCCAGCGTTGTGAGGTC
<i>Domeless (DOME)</i>	Receptor transmembrana da via JAK-STAT	F - AAGATGTTTCGTAACGACTCGGTCATT R - GGTGAGATTGTACGTAACATGATCGGTAT
<i>Relish 1 (REL1)</i>	Fator de transcrição da via de Toll	F - TGGTGGTGGTGTCTGCGTAAC R - CTGCCTGGCGTGACCGTATCC
<i>Relish 2 (REL2)</i>	Fator de transcrição da Via IMD	F - TGAATGTGCTGTTGGGTCAT R - TTTTACACATCACCGCCAA
<i>SOCS</i>	Regulador negativo da via JAK-STAT	F - CCGAAATCACTCAAATCCTACC R - ATCGTCCAGTGGCCTGTATC

Todos os genes foram analisados em duplicata, e a sua expressão relativa média normalizada obtida através da planilha Q-Gene (SIMON, 2003), utilizando o gene *RPS17* do mosquito como referência. As condições de ciclagem foram as seguintes: uma etapa inicial de desnaturação a 95°C por 5 min, seguida por amplificação de 35 ciclos a 95°C por 15 seg e 60°C por 30 seg. O volume total de reação foi de 10 µL, composta por 5 µL de SYBR Green PCR Master Mix (ThermoFisher Scientific), 0,5 µL de cada par dos iniciadores (10 µM), 2 µL de água livre de nuclease e 125 ng de RNA molde).

4.7 Silenciamento gênico

A síntese do dsRNA foi feita tendo como base o protocolo descrito no DRSC (*Drosophila RNAi Screening Center*), disponível em <http://www.flyrnai.org> (acessado em 01/08/2018). Resumidamente, foram desenhados oligos específicos, descritos na

Tabela 4, utilizando o site Primer3Plus (disponível em <https://primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi> - acessado em 01/08/2018) para uma região que amplifica aproximadamente 450 pb da sequência dos genes alvos do mosquito *Ae. aegypti*, ou de uma região da sequência de *Firefly Luciferase (FLUC)* de tamanho semelhante. *FLUC* foi utilizado como controle. Em cada par dos iniciadores foi adicionada a sequência nas extremidades do promotor de T7 nos primers *forward* e o promotor SP6 nos primers *reverse*, respectivamente. A obtenção das sequências com os promotores para síntese do RNA foi feita pela amplificação por RT-PCR no caso dos genes alvos (*SOCS*, *DOME* e *AGO2*), ou feito o PCR a partir do plasmídeo pAC5.1-Luc (Invitrogen®) para a *FLUC*. A síntese do RNA nas duas polaridades do produto de PCR foi feita separadamente utilizando o kit MEGAscript® T7 Transcription Kit ou MEGAscript® SP6 Transcription Kit, segundo o protocolo do fabricante, com a modificação no tempo de síntese para 16 horas. Após a síntese, o RNA foi precipitado com fenol-clorofórmio, ressuspendido em água e quantificado. O anelamento das fitas do RNA foi feito a partir de quantidades equimolares do RNA que foi desnaturado a 94°C e deixado esfriar naturalmente à temperatura ambiente na bancada. Após a quantificação, o dsRNA foi diluído para a concentração final de 7.25 µg/µL, e o sucesso do anelamento foi verificado por eletroforese em gel de agarose.

Tabela 4: Iniciadores para a amplificação dos moldes para síntese dos dsRNA.

Iniciadores	Sequências (5'- 3')
dsAGO2_Forward_T7	taatacgactcactataggagaCAGTTCAAGCAGACGAACCA
dsAGO2_Reverse_SP6	atttagtgacactatagaagTGATGTAGACGCGTCCTCTG
dsDOME_Forward_T7	taatacgactcactataggagaAAATCCGACTCGTGGTCATG
dsDOME_Reverse_SP6	atttagtgacactatagaagTGTCGGTCTTCGAGGTAATGT
dsSOCS_Forward_T7	taatacgactcactataggagaTTATCGCAAAGTGGAGGACC
dsSOCS_Reverse_SP6	atttagtgacactatagaagTGTGAGACCACAATGAGGGAGT
dsFLUC_Forward_T7	taatacgactcactataggagaACAATCCGGAAGCGACCAA
dsFLUC_Reverse_SP6	atttagtgacactatagaagTGTGACTGGCGACGTAATCCAC

Para o procedimento de microinjeção, fêmeas do mosquito *Ae. aegypti* de ambas as linhagens Br e wMel_Br com 3 a 4 dias de vida foram nocauteadas utilizando ar frio e acondicionadas em gelo e microinjetadas intratoracicamente com 500 ng de dsRNA utilizando o microinjetor Nanoject III™ (Drummond©). Dois dias após a microinjeção as fêmeas foram alimentadas com sangue contendo MAYV, como descrito anteriormente. Para controle, no momento da alimentação fêmeas foram coletadas e testadas para o silenciamento dos genes alvos.

4.8 Ensaio de correlação RT-qPCR e PFU

Visando reforçar a eficácia da alimentação infectiva e verificar se há correlação entre os valores totais de RNA viral encontrado na análise por RT-qPCR com a detecção de partículas virais infectivas através da titulação por placa, mosquitos da linhagem Br foram desafiados com MAYV (descrito no item 4.3) e coletados 7dpi. Posteriormente, estes foram macerados individualmente em 200uL de solução PBS 1x. Desse valor, 100uL foram utilizados para análises em RT-qPCR, no qual o RNA foi extraído dos tecidos dos mosquitos usando o kit *High Pure Viral Nucleic Acid* (Roche) seguindo recomendações do fabricante. As amostras de RNA foram diluídas para 50 ng/μL em água livre de nuclease, e armazenadas a -80°C. Os níveis de MAYV nessas amostras foram quantificados via RT-qPCR como descrito no item 4.5. Em contrapartida, os 100uL restantes foram utilizados para realização da titulação em ensaio de placa como descrito no item 4.2.

4.9 Análises estatísticas

Para verificar se os dados possuem uma distribuição normal os mesmos foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk ($\alpha = 0,05$).

Os dados de quantificação absoluta para MAYV (item 5.1) e wMel (item 5.2) foram analisados utilizando teste não paramétrico de Kruskal Wallis seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn, ambos com 5% de significância.

Os dados de quantificação relativa, expressão dos genes estudados (item 5.3), foram analisados usando um modelo linear generalizado (do inglês *Generalized Linear Model - GLM*) de regressão para cada gene e, em seguida, foram comparados aos pares usando testes Kruskal Wallis seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn, ambos com 5% de significância.

Para a análise dos experimentos de teste do silenciamento gênico (Figura 30) foram utilizados os testes de t de Student e análise de variância (One-way ANOVA) seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey.

Para a análise dos dados de carga viral e densidade de *Wolbachia* das linhagens de Br e *wMel_Br* com o gene *AGO2* silenciadas (Figura 31 e 32) foi utilizado o teste de Mann Whitney two-tailed com 5% de significância.

As análises de Regressão Linear Simples com Coeficiente de Correlação de Pearson foram realizadas no programa Microsoft Excel (Microsoft Excel for Mac 2011, versão 14.7.7 - 170905).

O programa GraphPad Prism versão 7.04 (GraphPad Software, San Diego California, EUA) foi utilizado para realizar as análises do teste de Kruskal Wallis e para a produção de gráficos e também para as análises de prevalência.

As análises em GLM foram feitas utilizando o programa SPSS V17 (IBM).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização da infecção de mosquitos *Aedes aegypti* pelo MAYV

Em um primeiro momento, realizamos a caracterização da infecção dos mosquitos de ambas as linhagens que receberam alimentação para checar o êxito da infecção.

Para alimentação infectiva foram utilizados isolados virais de MAYV fresco cultivados em células C6/36, nas duas réplicas experimentais. Ambos os isolados utilizados foram titulados em ensaio de placa com células Vero e os valores expressos em PFU/mL, descritos na Tabela 5.

Tabela 5: Títulos dos isolados virais de MAYV utilizados nas alimentações infectivas

Réplica	Títulos virais (PFU/mL)
1º	9 log ₁₀
2º	7 log ₁₀

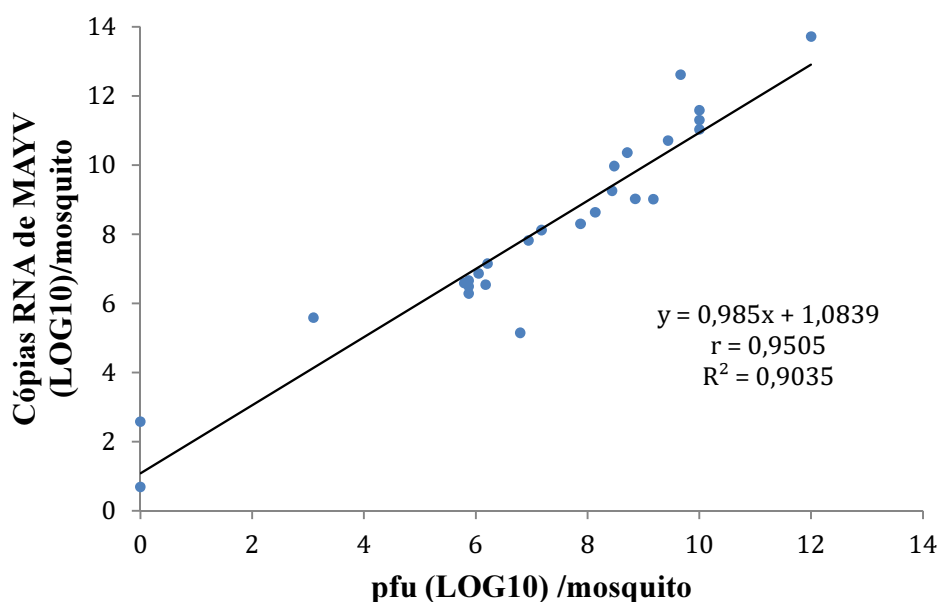
Ensaio de placa são de suma importância, pois fornecem informações sobre partículas virais infectivas, ou seja, mostram, aproximadamente, quantas partículas virais potencialmente capazes de infectar o hospedeiro vetor foram ingeridas por este. Long e colaboradores (2011) foram os primeiros a analisarem experimentalmente a capacidade de infecção e transmissão de MAYV por mosquitos *Ae. aegypti*. Neste estudo foram utilizados títulos virais variando de 3,4 a 7,3 log₁₀ PFU/mL demonstrando que a infecção via alimentação sanguínea artificial é dose-dependente, ou seja, quanto maior o título viral, maiores as taxas de infecção (prevalência) do vetor (LONG *et al.*, 2011).

A escolha por utilizar cultivos virais frescos foi baseada nos trabalhos de Pereira *et al.* (2018) e Ciota *et al.* (2017) em que foi demonstrado que as taxas de infecção de mosquitos para isolados frescos tanto para MAYV (PEREIRA *et al.*, 2018) quanto para ZIKV (CIOTA *et al.*, 2017), são maiores do que aqueles que se alimentaram de vírus congelados. Os pontos negativos de se utilizar cultivos virais frescos são o fato de o cultivo viral ser uma metodologia onerosa e também desconhecer a carga viral que está sendo utilizada, sabendo esta somente após a

análise em ensaio de placa. Apesar disso a garantia de uma maior taxa de infecção é maior.

Para quantificação da carga viral dos mosquitos que receberam alimentação infectiva foram utilizados o RT-qPCR com iniciadores padronizados (LONG *et al.*, 2011). O MAYV é um vírus de RNA polaridade positiva, e seu genoma é utilizado tanto para transcrição quanto para replicação viral. Diversos autores mostraram que a técnica de transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase quantitativa (RT-qPCR) é um método rápido e sensível para quantificar o RNA viral, que é um ótimo indicador da replicação de diferentes arbovírus correlacionando com a detecção de partículas infectivas (HOUNG, *et al.* 2000; HOUNG *et al.* 2001; BENNETT *et al.* 2002). Esta correlação pode ser observada em nossos próprios experimentos. Para comparação, amostras de mosquitos individuais foram testadas por RT-qPCR para quantificação do RNA viral, e também tiveram o título viral calculado em número de unidades formadoras de placa (PFU) como descrito no item 4.8. Utilizando uma análise por Regressão Linear Simples que demonstra a relação entre duas variáveis e o quanto uma variável influencia outra, nossas análises mostraram que nossos ensaios de RT-qPCR correlacionam linearmente com a carga viral observada nos mosquitos como demonstrado na Figura 6.

Figura 6: Regressão linear simples da quantificação viral por pfu e RT-qPCR durante a infecção pelo MAYV.



O gráfico mostra a relação entre a carga viral medida por RT-qPCR e o título viral por mosquito. Cada ponto azul representa um mosquito fêmea individual. A linha representa a tendência entre os pontos.

Para esta análise, o R^2 é 0,9035, o que significa que 90,35% da variável resposta (cópias de RNA de MAYV/mosquito) consegue ser explicada pela variável explicativa (pfu/mosquito).

Outro ponto a ser observado é o valor do coeficiente de correlação (r). Neste caso, o valor de r é igual à 0,9505, indicando que há uma dependência positiva de y em relação à x , ou seja, quanto maior o número de PFU, maior será o número de cópias de RNA viral detectado pelo método RT-qPCR.

Também foi analisado a prevalência de mosquitos infectados de ambas as linhagens, Br e w Mel_Br. Em todos os grupos que receberam alimentação infectiva (MAYV), em todos os tempos analisados, 2, 4 e 7 dias após infecção (dpi), foram obtidos 100% de mosquitos infectados.

Este resultado vai de encontro aos valores encontrados por Long *et al.* (2011), reforçando a premissa de que a prevalência dos mosquitos está mais relacionada ao fato de o isolado viral ser fresco ou não do que a carga viral do mesmo.

Nossos dados também vão de encontro aos obtidos por Pereira e colaboradores, onde viu-se taxas de infecção menores tanto para Br, a 4dpi, quanto para w Mel_Br, em todos os tempos analisados (PEREIRA *et al.*, 2018). Esta divergência de resultados pode ser devido ao fato de Pereira *et al.* terem analisado apenas cabeça e tórax enquanto neste estudo foram analisados mosquitos inteiros.

Após o repasto sanguíneo do mosquito, o arbovírus deve primeiramente infectar as células do epitélio intestinal do vetor. Em seguida inicia-se o processo de maturação dos vírions fazendo com que estes necessitem se disseminar das células intestinais para a hemocele, via lâmina basal, e assim possam infectar órgãos secundários, como as glândulas salivares, estando então aptos a serem transmitidos a novos hospedeiros.

O período de tempo entre o mosquito ingerir o vírus e tornar-se apto a transmiti-lo é denominado período de incubação extrínseco (PIE) e este varia para cada arbovírus, pois são várias as barreiras imunes tanto físicas quanto humorais que o vírus precisa vencer para chegar até a saliva (BLACK IV *et al.*, 2002; SALAZAR *et al.*, 2007).

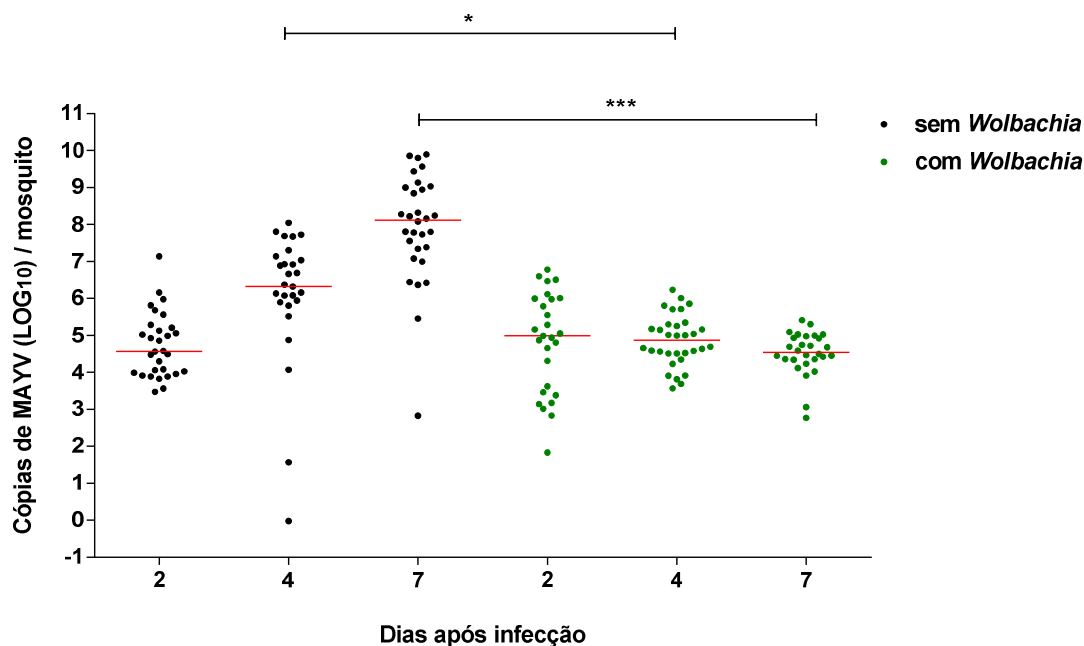
Pereira e colaboradores mostraram que para MAYV, a 4 dias após a infecção é possível detectar o vírus na saliva do *Ae. aegypti* linhagem Br (mosquitos selvagens). Sabendo que o vírus precisa atravessar diferentes barreiras imunológicas tanto físicas

quanto humorais para se disseminar até o tórax e cabeça (BLACK IV *et al.*, 2002; SALAZAR *et al.*, 2007), muitos mosquitos que foram detectados como positivos neste estudo, podem ter tido uma infecção limitada apenas ao intestino médio, ou seja, o vírus não foi capaz de atravessar a barreira do intestino e se disseminar via hemocele, o que explicaria a alta prevalência encontrada neste estudo, principalmente em mosquitos *wMel_Br*, uma vez que foi analisado mosquitos inteiros.

Em um estudo realizado por Dutra *et al.* (2016), em que analisaram os efeitos da cepa *wMel* de *Wolbachia* sobre isolados virais de ZIKV no abdômen separadamente da cabeça+tórax, os autores observaram que as taxas de infecção no abdomen sempre foram maiores tanto para linhagens Br quanto para linhagens *wMel_Br*. Mais uma vez, este resultado corrobora a alta prevalência encontrada na linhagem contendo *wMel*.

Além da análise da prevalência, o número de cópias para MAYV foi quantificado, via RT-qPCR, para cada mosquito que recebeu alimentação infectiva (Figura 7).

Figura 7: Carga viral de MAYV em mosquitos *Ae. aegypti* no período analisado de 2, 4 e 7 dpi.



Mosquitos contendo (*wMel_Br* - círculos verdes) ou não (*Br* - círculos pretos) *Wolbachia* foram infectados via oral com MAYV. A quantificação absoluta do número de cópias virais (expresso como logaritmo do número de cópias virais por mosquito) foi realizada via qRT-PCR. Cada grupo representado é composto de ≤ 30 fêmeas individuais inteiras coletadas em duas réplicas. Linhas vermelhas horizontais representam a mediana de cópias virais. Somente mosquitos com carga viral detectável foram considerados na análise. Valor de P obtido via Teste Kruskal-Wallis, * $< 0,05$; *** $< 0,001$

Aos 2 dpi, ambas as linhagens tiveram a mesma carga viral. Uma vez que aos 2 dpi ainda observa-se a presença de sangue no intestino do vetor, ou seja, a digestão não foi completa, o valor da carga viral neste tempo representa o conteúdo ingerido pelos mosquitos, que é o mesmo para todos os grupos, mostrando que ambas as linhagens receberam o sangue com o vírus e não houve favorecimento de uma linhagem.

Ao longo dos demais dias, até o dia 7 dpi, mosquitos *Ae. aegypti Br* apresentaram um aumento na mediana de cópias virais de MAYV de forma que este valor permaneceu o mesmo para os mosquitos *wMel_Br*. Este efeito demonstra a capacidade da cepa *wMel* em restringir a infecção de MAYV em mosquitos *Ae. aegypti* corroborando os resultados encontrados por Pereira *et al.*, 2018.

Estes resultados também corroboram com outros estudos que observaram o efeito de interferência à patógenos desta bactéria a vírus cujo material genético é baseado em RNA em *Ae. aegypti* tanto em transinfecções estáveis, processo pelo qual

uma associação artificial entre *Wolbachia* e hospedeiro é criada via injeção da bactéria no embrião em desenvolvimento, (MOREIRA *et al.*, 2009; VAN DEN HURK *et al.*, 2012; CARAGATA *et al.*, 2016), quanto em transinfecções transientes, onde a bactéria é inserida artificialmente em mosquitos já adultos, sem que ocorra a passagem desta para a prole (JOUBERT O'NEILL, 2017). Nossos resultados corroboram a ideia de uso desta metodologia no controle da transmissão de arboviroses.

5.2 Densidade de *Wolbachia*

Alguns estudos já demonstraram que o efeito de interferência na replicação de patógenos causado pela *Wolbachia* está diretamente relacionado a densidade desta no hospedeiro. Estudos realizados por Hussain *et al.* (2013) e Van Den Hurk *et al.* (2012), em que ambos compararam efeitos de bloqueio entre a cepa *wMelPop* (virulenta) e a cepa *wMel* (benigna), mostraram que quanto maior a virulência da cepa de *Wolbachia* transfectada no vetor *Ae. aegypti*, maior será o efeito de bloqueio na replicação e transmissão de determinado patógeno.

Sabendo que a densidade de *Wolbachia* influencia diretamente no efeito de bloqueio, neste estudo, a densidade de *Wolbachia*, ou seja, o número de cópias para *wMel*, foi quantificado, via RT-qPCR, para cada mosquito da linhagem *wMel_Br* que receberam qualquer um dos três tratamentos (Figura 8).

Figura 8: Quantificação absoluta de *Wolbachia* em mosquitos *Ae. aegypti* sob diferentes condições de tratamento e períodos.

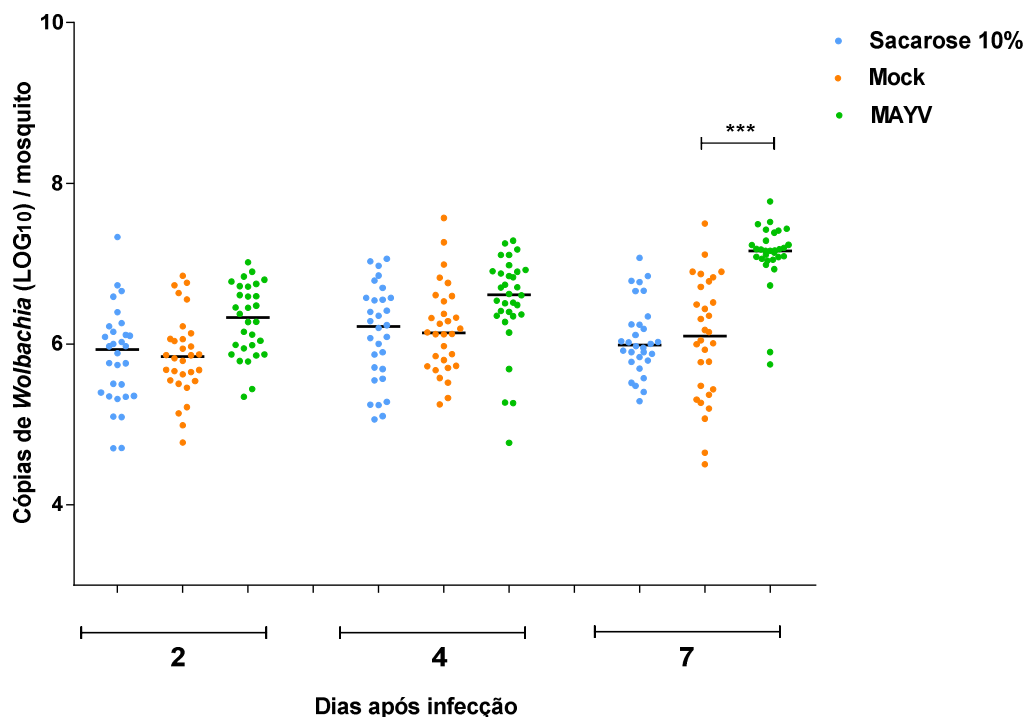


Gráfico dot plot mostra a densidade de *Wolbachia* em mosquitos *Ae. aegypti* linhagem *wMel_Br* que receberam diferentes tratamentos sacarose 10% (azul), sangue sem MAYV/Mock (laranja) e sangue com MAYV (verde) em diferentes tempos 2, 4 e 7 dpi. A quantificação absoluta do número mediano de cópias de *Wolbachia*, expresso em logaritmo, baseado em curva padrão, foi realizada via qRT-PCR. Cada grupo representado é composto de ≤ 30 fêmeas individuais inteiras coletadas em duas réplicas. Linhas pretas horizontais representam a mediana de cópias de *Wolbachia*. Valor de P obtido via Teste Kruskal-Wallis, *** $<0,001$.

Observando a Figura 8, percebe-se um aumento na densidade de *Wolbachia* nos mosquitos infectados com MAYV principalmente no 7dpi. Esta é a primeira vez em que um estudo analisou a densidade de *wMel* em mosquitos *Ae. aegypti* em diferentes condições envolvendo a infecção com MAYV.

Alguns autores acreditam que há uma forte competição entre *Wolbachia* e o hospedeiro por nutrientes críticos como colesterol e aminoácidos, especialmente porque esta possui um genoma muito reduzido e é altamente dependente do hospedeiro para o suporte metabólico (WU *et al.*, 2004; CARAGATA *et al.*, 2013; CARAGATA *et al.*, 2014; GEOGHEGAN *et al.*, 2017). Isto contribuiria para criar um ambiente não propício para a replicação viral já que o vírus não teria disponível os recursos necessários para completar o seu ciclo. Aqui, hipotetizamos que na presença do MAYV, a competição se torne mais acirrada contribuindo para um aumento da

densidade de *Wolbachia* o que influenciaria diretamente de forma proporcional na interferência da replicação do patógeno.

Quando se fala sobre densidade de *Wolbachia*, precisa-se também falar sobre a via da autofagia. Voronin *et al.* (2012) demonstrou que a via da autofagia desempenha um papel fundamental no controle das populações de *Wolbachia* em diferentes artrópodes e nematódeos filariais. Hoje sabe-se também que os arbovírus possuem mecanismos de escape da resposta imunológica seja escapando ao reconhecimento ou inibindo a produção de um estado antiviral pelo hospedeiro vetor (FRAGKOUDIS *et al.*, 2009). Uma outra hipótese que explicaria tal aumento na densidade de *Wolbachia* poderia ser o fato de MAYV, semelhante a outros arbovírus, inibir ou diminuir a ativação da via da autofagia o que contribuiria para aumentar a densidade de *wMel*. Aqui tem-se um efeito inverso. Na tentativa de escape, o vírus estaria favorecendo o desenvolvimento e multiplicação da bactéria aumentando mais ainda o efeito de interferência na replicação do MAYV. Aqui incentivamos maiores estudos visando esclarecer melhor a relação entre a densidade de *Wolbachia* com a via da autofagia durante infecções por diferentes arbovírus em *Ae. aegypti*.

5.3 Análise dos níveis de expressão gênica

Após a caracterização da infecção, o próximo passo foi avaliar a expressão de sete genes do sistema imune inato do vetor *Ae. aegypti* de ambas as linhagens, Br e *wMel_Br*. Neste estudo, foram avaliados como a expressão desses genes seria em diferentes condições: 1) na presença e ausência de sangue na alimentação; 2) na presença e ausência da bactéria *Wolbachia*; 3) na presença e ausência do MAYV, e também em condições onde se teria 4) a presença concomitante da bactéria e do MAYV. Foram coletados 20 mosquitos fêmeas na primeira réplica e 10 na segunda réplica em três tempos diferentes 2, 4 e 7 dias pós infecção (dpi).

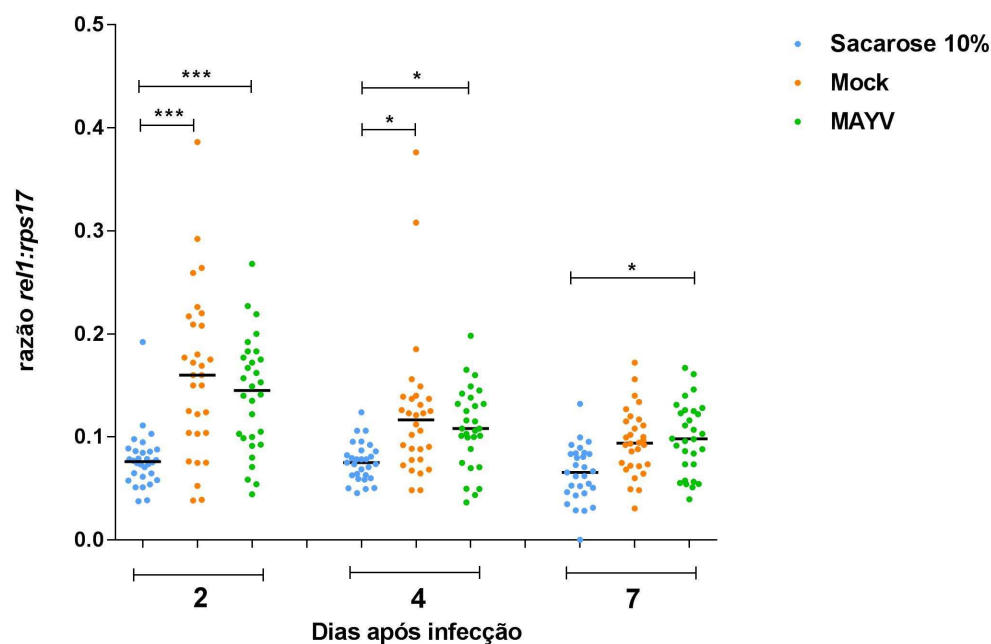
O critério de escolha dos sete genes estudados aqui, descritos na Tabela 3, baseou-se no papel que cada um desempenha na via a qual participam. Para as vias Toll, Imd e JAK/STAT, foram escolhidos um antagonista e um agonista como marcador da atividade destas vias. Por sua vez, com relação a via do siRNA, o gene *AGO2* foi escolhido baseando-se no estudo de Terradas *et al.* (2017) o qual foi o primeiro estudo envolvendo este gene com o bloqueio da replicação de patógenos causado pela *Wolbachia*. Naquele estudo avaliou-se a participação de *AGO2 in vitro* em uma linhagem de células proveniente de *Ae. aegypti* denominada Aag2 tanto com

e sem *Wolbachia*. Aqui, verifica-se um *gap* em estudos *in vivo*, o que nos motivou na escolha deste gene.

5.3.1 Níveis de expressão do gene *RELI*

Em mosquitos Br, os níveis de expressão do fator de transcrição *Relish 1* (*RELI*) foram significativamente elevados nos grupos Mock e MAYV, a 2 e 4 dpi. Não houve diferença entre estes grupos. Porém, estes se diferiram significativamente do grupo Sacarose 10% (Teste Kruskal-Wallis: Mock x Sacarose 10% $P < 0,0001$; MAYV x Sacarose 10% $P = 0,04$). A 7 dpi, houve diferença apenas entre o grupo que recebeu sacarose 10% e o que recebeu infecção-MAYV (Teste Kruskal Wallis: $P = 0,0264$). Não houve diferença significativa entre os grupos que receberam o mesmo tratamento ao longo do tempo (Figura 9).

Figura 9: Níveis de expressão do gene *RELI* em mosquitos Br.



Os níveis de expressão de *rel1* foram quantificados via RT-qPCR para mosquitos Br que receberam diferentes tratamentos sacarose 10% (azul), sangue sem MAYV/Mock (laranja) e sangue com MAYV (verde) em diferentes tempos 2, 4 e 7 dias após infecção. Os dados representam a razão (normalização) entre o nível de expressão de *RELI* e o gene constitutivo do hospedeiro, *rps17*. O gráfico dot plot representa os valores medianos (linhas horizontais pretas) observados para cada grupo que é composto de ≤ 30 fêmeas individuais inteiras coletadas em duas réplicas. Valor de P obtido via Teste Kruskal-Wallis, * $< 0,05$; ** $< 0,001$.

A não diferença entre os grupos Mock e MAYV demonstra que a alteração na expressão de *RELI* pode ser devido a presença de sangue na dieta. Vários autores já demonstraram que a microbiota intestinal pode ser afetada por diversos fatores dentre eles a dieta. Muturi *et al.* (2018) demonstrou que após a alimentação com sangue humano há um aumento na abundância de bactérias que colonizam o intestino de mosquitos fêmeas de *Ae. aegypti*. Semelhantemente, Villegas *et al.* (2018) relataram que a microbiota de corpo inteiro de *Ae. aegypti* foi significativamente mais diversificado entre os mosquitos alimentados com sangue (sangue de camundongo) em comparação com os mosquitos alimentados com açúcar.

Dada a natureza de sobreposição e amplo espectro das cascatas de sinalização imunológica, a microbiota pode ativar as respostas imunes de insetos vetores e indiretamente afetar a competência destes em transmitir arboviroses (XI *et al.*, 2008; DONG *et al.*, 2012; RAMIREZ *et al.*, 2012; BARLETTA *et al.*, 2017).

Aqui hipotetizamos que o aumento da expressão de *RELI* pode ser devido ao aumento da microbiota do vetor *Ae. aegypti* após a alimentação sanguínea. Entretanto, nossos dados da expressão de *RELI* vão de encontro aos obtidos por Barletta e colaboradores, onde não se viu aumento algum da expressão de *RELI* 24 horas após a alimentação sanguínea (BARLETTA *et al.*, 2017). O que explicaria esta diferença poderia ser o tempo em que foram analisados e o tempo de digestão do sangue no intestino. Observa-se na Figura 10, que a maior diferença entre os grupos que receberam alimentação sanguínea e os grupos mantidos a sacarose 10% foi no 2 dpi. Com isso, pode-se inferir que o tempo de contato entre microbiota e sangue seria diretamente proporcional a expressão de *RELI*.

Comparando-se mosquitos sem (Br) e com (wMel_Br) *Wolbachia*, na análise via modelos lineares generalizados (GLM), os níveis de expressão de *RELI* foram significativamente alterados pela presença de *Wolbachia* (GLM; $W = 11,684$, $df = 1$, $P < 0,0001$).

Em cenários de transinfecção de *Wolbachia*, já foi observado um aumento sistêmico na expressão de genes relacionados à imunidade do hospedeiro, de forma que este então estaria “preparado” para uma futura infecção, sendo esta teoria conhecida como “*immune priming*” (KAMBRIS *et al.*, 2009; MOREIRA *et al.*, 2009; PAN *et al.*, 2012; RANCÈS *et al.*, 2012).

Baseado em tal afirmação, diversos estudos buscaram analisar o papel do sistema imune em cenários de infecção viral e presença de *Wolbachia*. Dentre eles,

destaca-se dados onde *Drosophila* (infecção natural) e mosquitos (transinfecção) contendo cepas distintas de *Wolbachia* (benigna – *wMel*; virulenta – *wMelPop*) demonstraram que o efeito de interferência à patógeno foi presente em ambos os organismos, de forma que no cenário de infecção natural não foi detectado a ativação do sistema imune do hospedeiro, apenas na transinfecção de *Ae. aegypti* (RANCÈS *et al.*, 2012, 2013; WONG *et al.*, 2011). Além do mais, foi em *Ae. aegypti* onde se correlacionou a presença de *Wolbachia* com o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), a qual está ligada à ativação da via Toll de imunidade, responsável por combater agentes infecciosos (PAN *et al.*, 2012).

Acredita-se que na transfecção de *Wolbachia*, a ativação do sistema imune possa não representar o principal mecanismo pelo qual o fenótipo de interferência a patógenos aconteça, mas que a ativação deste sistema sirva para exarcebar o efeito de bloqueio por parte da bactéria (RANCÈS *et al.*, 2012).

Nossos dados corroboram o observado por Bian e colaboradores, onde viu-se um aumento na expressão de *RELI* em mosquitos *Ae. aegypti* transfectados com a cepa *wAlbB*, proveniente de *Ae. albopictus* (BIAN *et al.*, 2010).

Em um estudo publicado em 2012, Rancés *et al.* analisaram o transcriptoma de de duas linhagens de mosquitos *Ae. aegypti*, uma transfectada com *wMelPop-CLA* e outra com *wMel*. Em ambas as linhagens, foram encontrados um aumento na expressão de genes da via Toll, sendo que *Defensina*, um peptídeo antimicrobiano (AMP) sintetizado a partir da ativação da via Toll, foi o gene mais altamente regulado na linhagem transfectada com a cepa *wMel*. Estes resultados indicam que a *Wolbachia* pode ativar a via Toll e aumentar a imunidade basal em *Ae. aegypti*.

Por sua vez, em outro estudo publicado em 2013, Rancés e colaboradores, analisaram a participação da via Toll no bloqueio de DENV em duas linhagens de *D. melanogaster*, uma contendo *wMelPop* e a outra *wMel*, ambas as linhagens mutantes para o gene *SPÄETZLE* da via Toll. Em ambas as linhagens, a não ativação da via Toll não interferiu no efeito de bloqueio causado pela presença de *Wolbachia* (RANCÈS *et al.*, 2013).

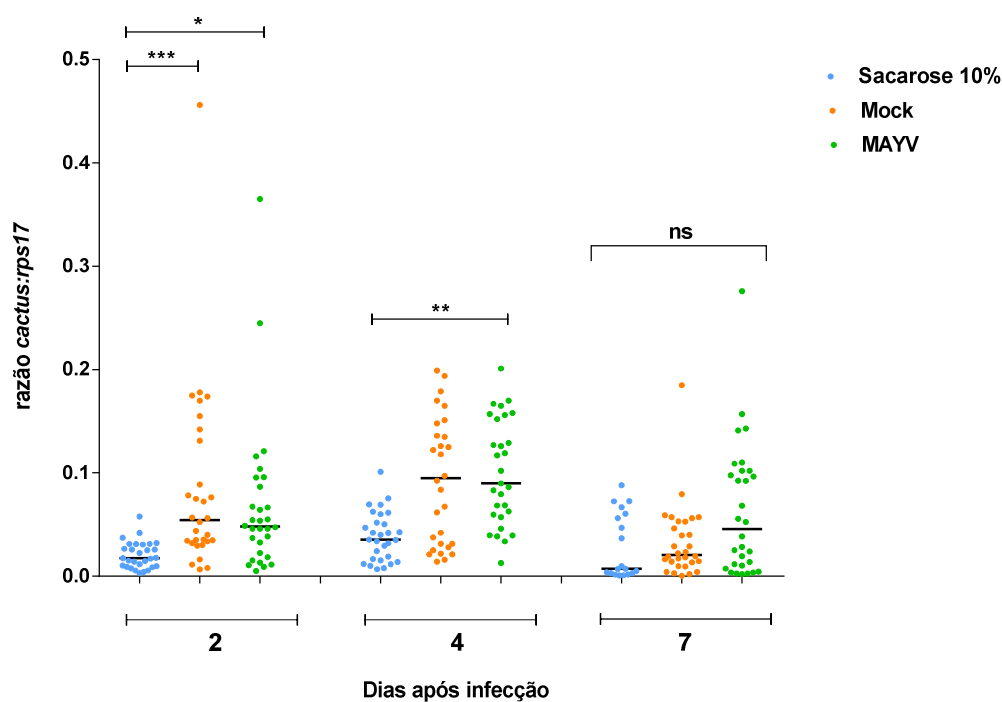
Por fim, aqui inferimos que o aumento na expressão de *RELI* pode ser em resposta ao aumento da diversidade e quantidade de bactérias da microbiota intestinal do *Ae. aegypti* tanto em linhagens com e sem *wMel*. Este aumento, por mais que seja indicativo de um aumento na atividade da via Toll, em linhagens transfectadas com a

cepa *wMel*, a ativação de Toll não seria necessária no bloqueio da transmissão de MAYV.

5.3.2 Níveis de expressão do gene *CACTUS*

Em mosquitos Br, os níveis de expressão do regulador negativo da via Toll, *CACTUS*, a 2 dpi, foi maior nos grupos Mock e MAYV. Não houve diferença entre estes grupos (Mock e MAYV). Porém, estes se diferiram significativamente do grupo Sacarose 10% (Teste Kruskal-Wallis: Mock x Sacarose 10% $P=0,0005$; MAYV x Sacarose 10% $P=0,0123$). A 4 dpi, somente houve diferença significativa entre os grupos MAYV e Sacarose 10% (Teste Kruskal-Wallis: $P=0,0031$). A 7 dpi, não houve diferença significativa entre os grupos (Figura 10).

Figura 10: Níveis expressão do gene *CACTUS* em mosquitos Br.

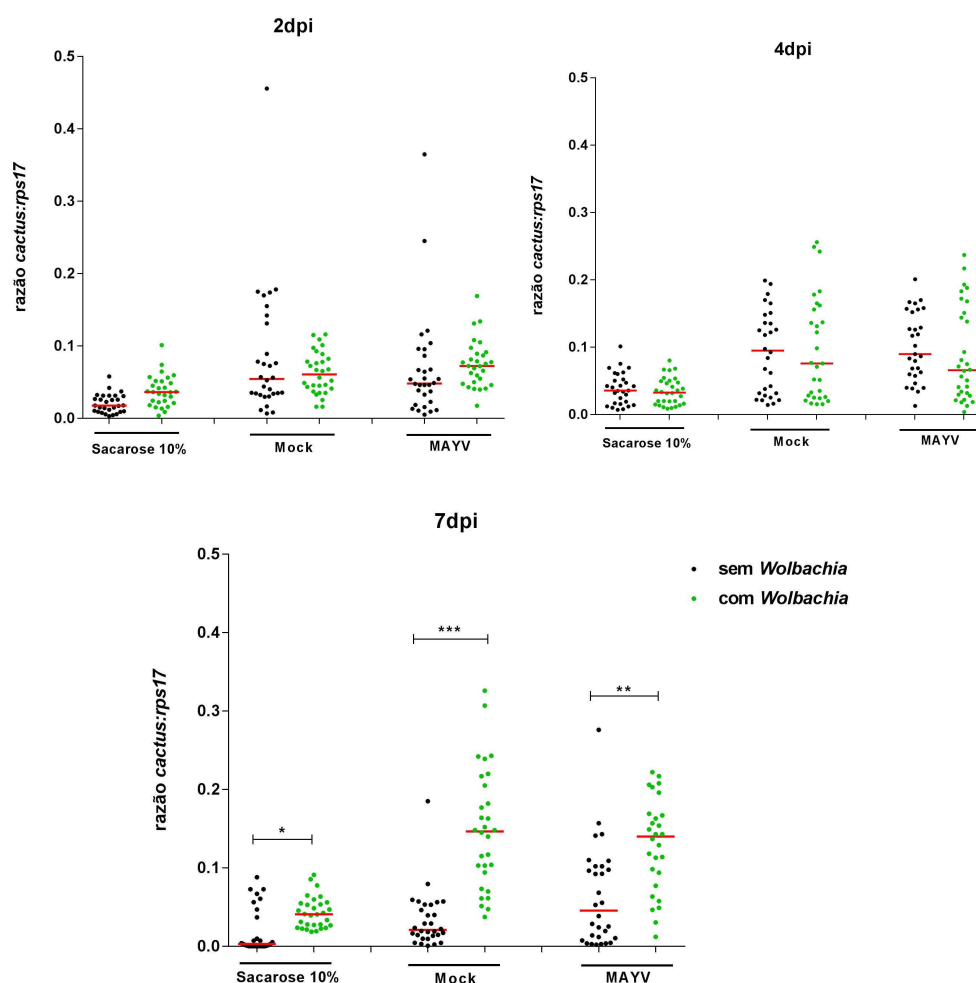


Os níveis de expressão de *CACTUS* foram quantificados via RT-qPCR para mosquitos Br que receberam diferentes tratamentos sacarose 10% (azul), sangue sem MAYV/Mock (laranja) e sangue com MAYV (verde) em diferentes tempos 2, 4 e 7 dias após infecção. Os dados representam a razão (normalização) entre o nível de expressão de *CACTUS* e o gene constitutivo do hospedeiro, *RPS17*. O gráfico dot plot representa os valores medianos (linhas horizontais pretas) observados para cada grupo que é composto de ≤ 30 fêmeas individuais inteiras coletadas em duas réplicas. Valor de P obtido via Teste Kruskal-Wallis, * $< 0,05$; ** $< 0,01$, *** $< 0,001$.

Observando a Figura 10, a 2 e 4 dpi, observa-se um perfil de expressão do gene *CACTUS* semelhante ao do gene *RELI*. O que poderia estar causando este efeito, assim como discutido no item 5.3.1, poderia ser a presença de sangue na alimentação e o aumento na diversidade e quantidade da microbiota intestinal.

Analisando as linhagens Br e *wMel*_Br, a expressão do gene *CACTUS* apresentou diferença significativa entre as linhagens Br e *wMel*_Br a 7 dpi (Teste Kruskal-Wallis Sacarose 10% $P=0,427$; Mock $P<0,0001$; MAYV $P=0,0026$) como demonstrado na Figura 11.

Figura 11: Níveis de expressão do gene *CACTUS* em mosquitos Br e *wMel*_Br.



níveis de expressão de *CACTUS* foram quantificados via RT-qPCR para mosquitos das linhagens Br (preto) e *wMel*_Br (verde) que receberam diferentes tratamentos sacarose 10%, sangue sem MAYV (Mock) e sangue com MAYV (MAYV) em diferentes tempos 2, 4 e 7 dias após infecção. Os dados representam a razão (normalização) entre o nível de expressão de *CACTUS* e o gene constitutivo do hospedeiro, *RPS17*. O gráfico dot plot representa os valores medianos (linhas horizontais vermelhas) observados para cada grupo que é composto de ≤ 30 fêmeas individuais inteiras coletadas em duas réplicas. Valor de P obtido via Teste Kruskal-Wallis, * $<0,05$; ** $<0,01$, *** $<0,001$.

Na análise via GLM, os níveis de expressão de *CACTUS* foram significativamente alterados pela presença de *Wolbachia* (GLM; $W = 5,51$, $df = 1$, $P < 0.0001$) e também ao longo do tempo comparando Br e *wMel_Br* (GLM; $W = 27,46$, $df = 2$, $P < 0.0001$).

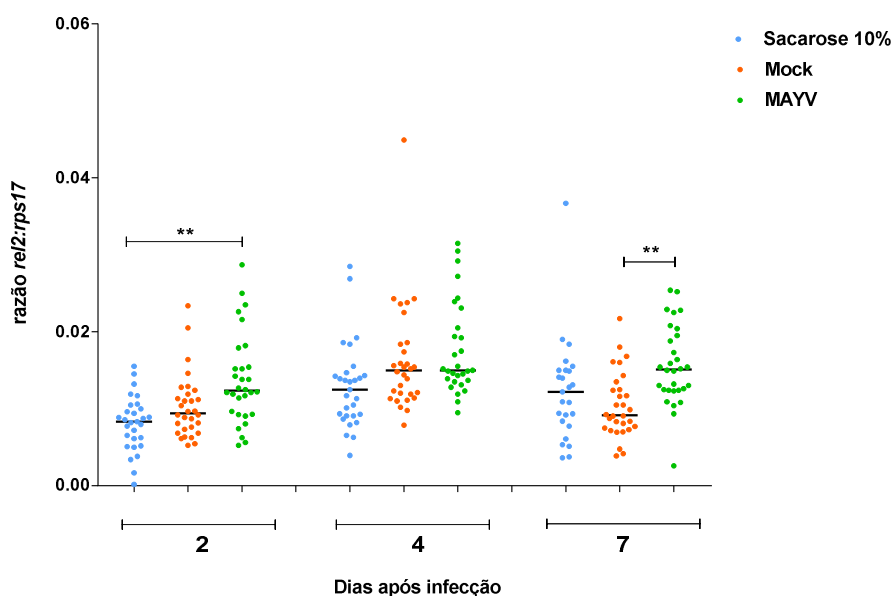
Bian e colaboradores também observaram que há um aumento na expressão de *CACTUS* em mosquitos *Ae. aegypti* transfectados com a cepa *wAlbB* (BIAN *et al.*, 2010).

O resultados obtidos com *CACTUS* reforçam a ideia de que a presença de *wMel* em *Ae. aegypti* pode aumentar a expressão basal de genes da via Toll, porém esta via não teria um papel fundamental no controle da replicação e transmissão do MAYV em linhagens *wMel_Br*.

5.3.3 Níveis de expressão do gene *REL2*

O gene *REL2* responsável por codificar o fator de transcrição *Relish 2* da via Imd teve os níveis de expressão quantificados em mosquitos da linhagem Br e *wMel_Br*.

Em mosquitos Br, para a expressão do gene *REL2*, só houve diferença significativa entre os grupos Sacarose 10% e MAYV a 2 dpi (Teste Kruskal-Wallis: $P=0,0035$) e os grupos Mock e MAYV a 7dpi (Teste Kruskal-Wallis: $P=0,0021$) (Figura 12).

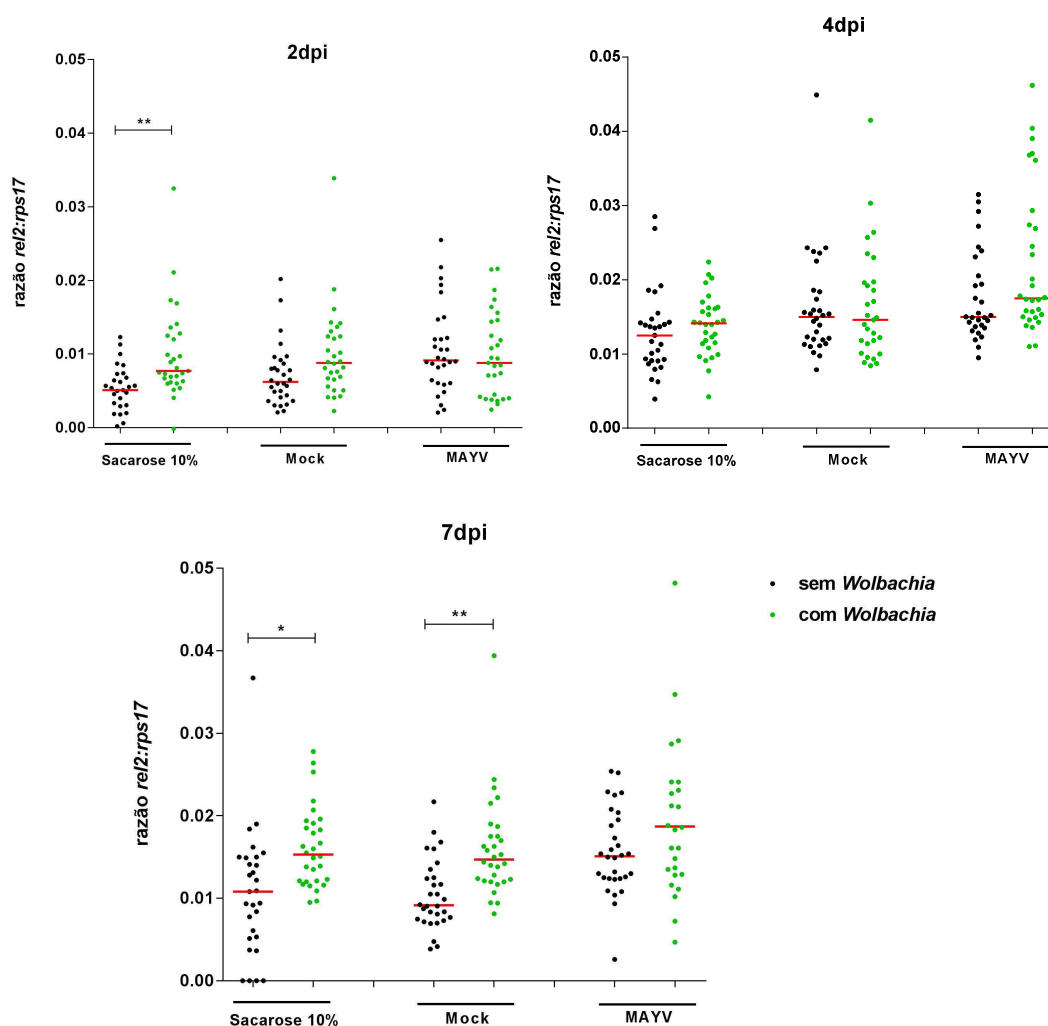
Figura 12: Níveis de expressão do gene *REL2* em mosquitos Br.

Os níveis de expressão de *REL2* foram quantificados via RT-qPCR para mosquitos Br que receberam diferentes tratamentos sacarose 10% (azul), sangue sem MAYV/Mock (laranja) e sangue com MAYV (verde) em diferentes tempos 2, 4 e 7 dias após infecção. Os dados representam a razão (normalização) entre o nível de expressão de *REL2* e o gene constitutivo do hospedeiro, *RPS17*. O gráfico dot plot representa os valores medianos (linhas horizontais pretas) observados para cada grupo que é composto de ≤ 30 fêmeas individuais inteiras coletadas em duas réplicas. Valor de P obtido via Teste Kruskal-Wallis, ** $<0,01$.

Barletta *et al.* (2017) mostraram que há um aumento na expressão de *REL2* após alimentação sanguínea devido ao crescimento na microbiota levando a ativação da via Imd e impactando as cargas de SINV no mosquito *Ae. aegypti*. De forma semelhante, podemos inferir o que o aumento na expressão de *REL2* em mosquitos da linhagem Br foi devido a presença de sangue na alimentação o mesmo observado para o gene *REL2* e *CACTUS*.

Comparando mosquitos Br e *wMel_Br*, *REL2* teve sua expressão alterada pela presença de *wMel* (GLM; $W = 7,41$, $df = 1$, $P < 0,0001$), com os níveis de expressão mais altos observados a 2 dpi no grupo Sacarose 10% (Teste Kruskal-Wallis: $P=0,0035$) e a 7 dpi nos grupos Sacarose 10% (Teste Kruskal-Wallis: $P=0,0109$) e Mock (Teste Kruskal-Wallis: $P=0,0035$) (Figura 13).

Figura 13: Níveis de expressão do gene *REL2* em mosquitos Br e *wMel_Br*.



Os níveis de expressão de *REL2* foram quantificados via RT-qPCR para mosquitos das linhagens Br (preto) e *wMel_Br* (verde) que receberam diferentes tratamentos sacarose 10%, sangue sem MAYV (Mock) e sangue com MAYV (MAYV) em diferentes tempos 2, 4 e 7 dias após infecção. Os dados representam a razão (normalização) entre o nível de expressão de *REL2* e o gene constitutivo do hospedeiro, *RPS17*. O gráfico dot plot representa os valores medianos (linhas horizontais vermelhas) observados para cada grupo que é composto de ≤ 30 fêmeas individuais inteiras coletadas em duas réplicas. Valor de P obtido via Teste Kruskal-Wallis, * < 0,05; ** < 0,01.

Observa-se que a infecção pelo MAYV não afetou a expressão de *REL2* em nenhuma das linhagens de *Ae. aegypti*. Em mosquitos *wMel_Br* não infectados com MAYV, a expressão foi pouco maior, resultado este que também foi observado por Bian *et al.* (2010) em mosquitos *Ae. aegypti* transfectados com a cepa *wAlbB*. Aqui demonstramos que há um aumento da expressão de *REL2* na presença de *wMel* independente da alimentação sanguínea. Isso demonstra a capacidade de *wMel* em

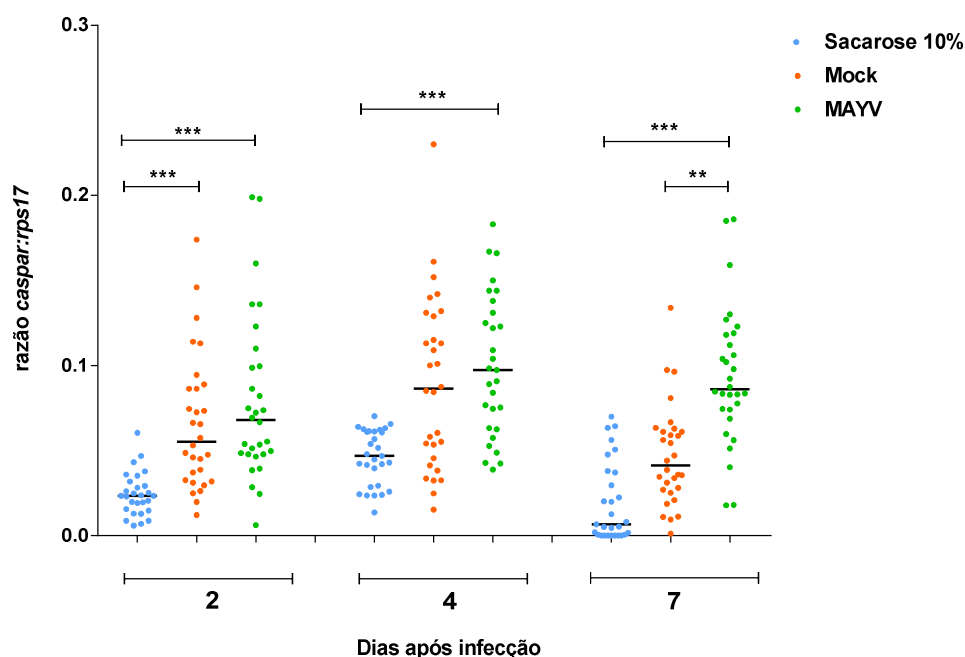
aumentar a expressão basal do gene *REL2* indicando que pode haver uma pré-ativação da via Imd contribuindo assim no controle da replicação e transmissão do vírus MAYV posteriormente.

5.3.4 Níveis de expressão do gene *CASPAR*

De uma forma geral, a análise da expressão de *CASPAR* via GLM mostrou que este sofre influencia dependendo da dieta que o mosquito recebe (GLM; $W = 126,033$, $df = 2$, $P < 0,0001$), e também ao longo do tempo (GLM; $W = 37,819$, $df = 2$, $P < 0,0001$).

Comparando par a par via teste Kruskal-Wallis, em mosquitos Br, a expressão deste gene, a 2 dpi, foi maior nos grupos Mock e MAYV. Não houve diferença entre estes grupos. Porém, estes se diferiram significativamente dos grupos que receberam Sacarose 10% (Teste Kruskal-Wallis: Mock x Sacarose 10% $P=0,0006$; MAYV x Sacarose 10% $P<0,0001$). A 4 dpi, houve diferença significativa somente entre os grupos Sacarose 10% e MAYV (Teste Kruskal-Wallis: $P=0,0008$). A 7 dpi, houve diferença significativa do grupo MAYV dos demais (Teste Kruskal-Wallis: MAYV x Sacarose 10% $P<0,0001$; MAYV x Mock $P=0,0017$) (Figura 14).

Figura 14: Níveis de expressão do gene *CASPAR* em mosquitos Br.

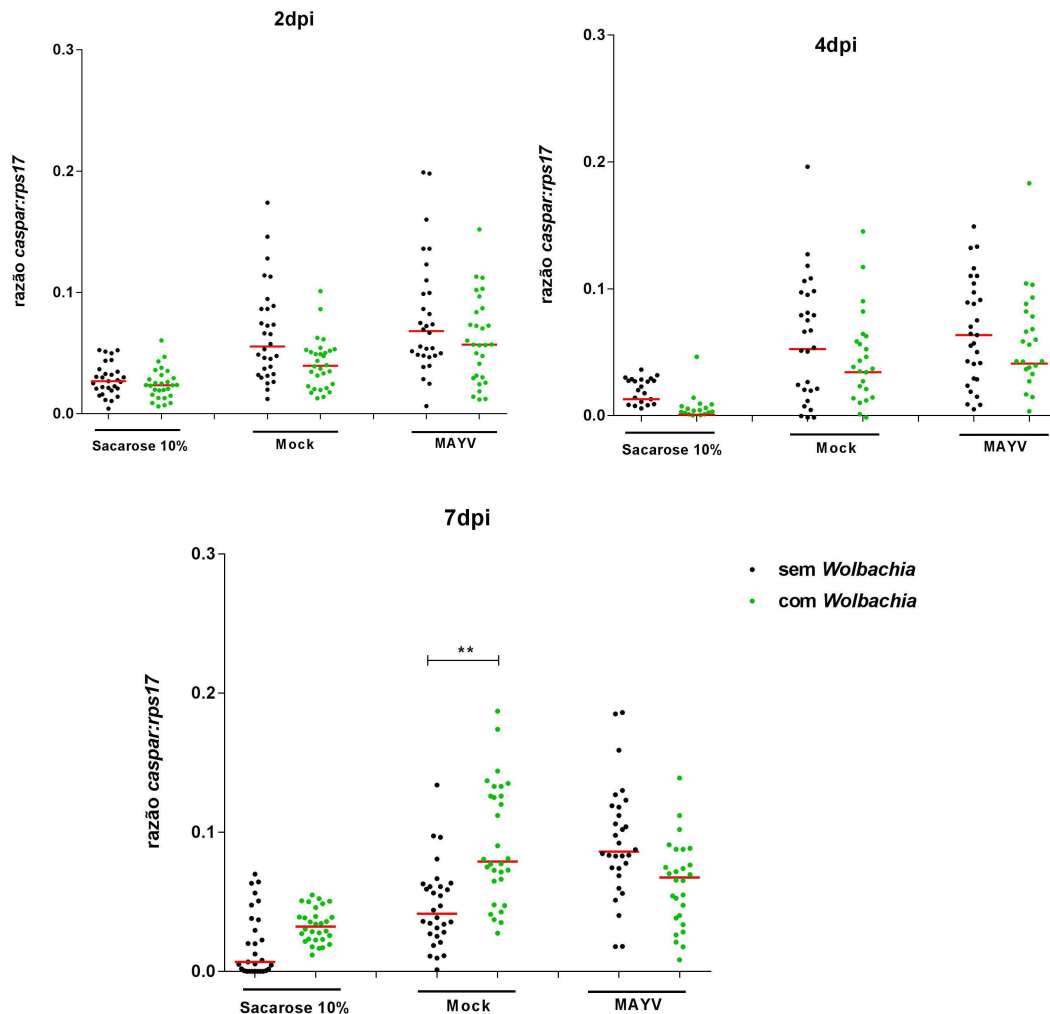


Os níveis de expressão de caspar foram quantificados via RT-qPCR para mosquitos Br que receberam diferentes tratamentos sacarose 10% (azul), sangue sem MAYV/Mock (laranja) e sangue com MAYV (verde) em diferentes tempos 2, 4 e 7 dias após infecção. Os dados representam a razão (normalização) entre o nível de expressão de *CASPAR* e o gene constitutivo do hospedeiro, *RPS17*. O gráfico dot plot representa os valores medianos (linhas horizontais pretas) observados para cada grupo que é composto de ≤ 30 fêmeas individuais inteiras coletadas em duas réplicas. Valor de P obtido via Teste Kruskal-Wallis, ** $<0,01$, *** $<0,001$.

A 2 e 4 dpi, a expressão do gene *CASPAR* seguiu um mesmo padrão dos genes principalmente influenciados pela dieta contendo sangue humano sugerindo que o fator sangue na alimentação sanguínea pode ter sido o responsável por esse aumento assim como discutidos em tópicos anteriores. Porém, a 7 dpi, observa-se uma maior expressão deste gene no grupo infectado com MAYV sugerindo que este gene poderia estar participando do controle da infecção por MAYV em mosquitos *Ae. aegypti* selvagens e conseqüentemente na ativação da via Imd. A 7 dpi é o tempo em que se observou maior carga viral de MAYV em mosquitos Br (Figura 7). Uma vez que a 7 dpi, já houve completa digestão do sangue, a microbiota do mosquito já teria voltado ao seu estado normal, o que nos leva a inferir que a infecção pelo MAYV pode ter sido o motivo pelo aumento na expressão de *CASPAR* neste tempo.

Análise via GLM mostrou que *CASPAR* não sofre influência na presença de *Wolbachia* (GLM; $W = 2,779$, $df = 1$, $P < 0,096$). Comparando par a par mosquitos da linhagens Br e *wMel_Br*, a expressão do gene *CASPAR* apresentou diferença significativa entre as linhagens a 7 dpi apenas nos grupos Mock (Teste Kruskal-Wallis: $P=0,0016$) (Figura 15).

Figura 15: Níveis de expressão do gene *CASPAR* em mosquitos Br e *wMel_Br*.



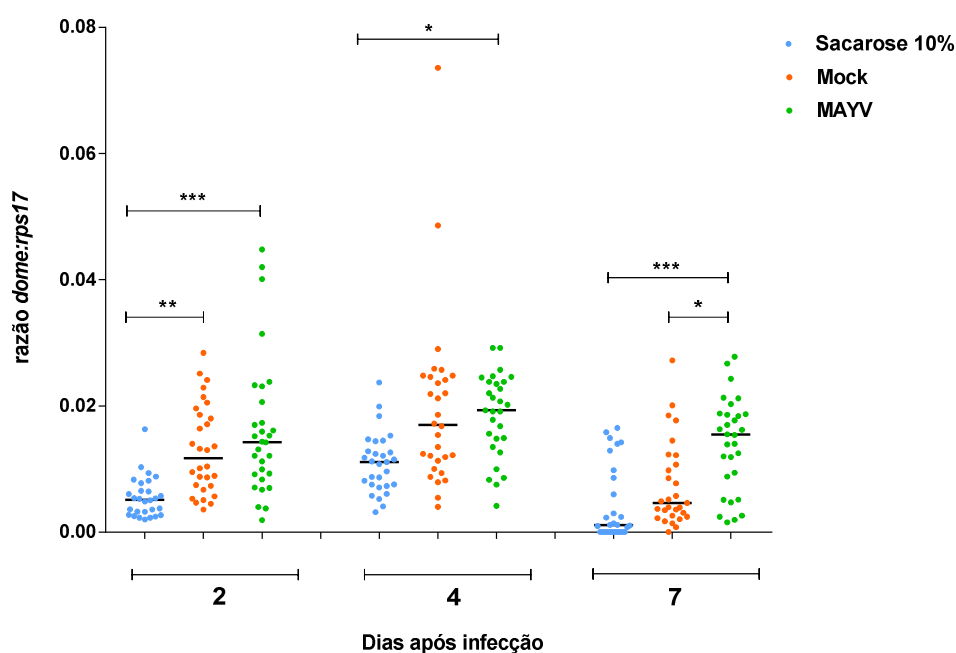
Os níveis de expressão de *caspar* foram quantificados via RT-qPCR para mosquitos das linhagens Br (preto) e *wMel_Br* (verde) que receberam diferentes tratamentos sacarose 10%, sangue sem MAYV (Mock) e sangue com MAYV (MAYV) em diferentes tempos 2, 4 e 7 dias após infecção. Os dados representam a razão (normalização) entre o nível de expressão de *CASPAR* e o gene constitutivo do hospedeiro, *RPS17*. O gráfico dot plot representa os valores medianos (linhas horizontais vermelhas) observados para cada grupo que é composto de ≤ 30 fêmeas individuais inteiras coletadas em duas réplicas. Valor de P obtido via Teste Kruskal-Wallis, ** $< 0,01$.

5.3.5 Níveis de expressão do gene *DOME*

Em mosquitos Br, a expressão de *DOME*, a 2 dpi, foi maior nos grupos Mock e MAYV. Não houve diferença entre estes grupos. Porém, estes se diferiram significativamente dos grupos que receberam Sacarose 10% (Teste Kruskal-Wallis: Mock x Sacarose 10% $P=0,0048$; MAYV x Sacarose 10% $P<0,0002$). A 4 dpi, houve diferença significativa somente entre os grupos Sacarose 10% e MAYV (Teste Kruskal-Wallis: $P=0,0350$). A 7 dpi, houve diferença significativa do grupo MAYV dos demais (Teste Kruskal-Wallis: MAYV x Sacarose 10% $P<0,0001$; MAYV x Mock $P=0,0223$) (Figura 16).

Análise via GLM, mostrou que a expressão de *DOME* é afetada pela dieta que o mosquito recebe (GLM; $W = 87,847$, $df = 2$, $P < 0,0001$).

Figura 16: Níveis de expressão do gene *DOME* em mosquitos Br.

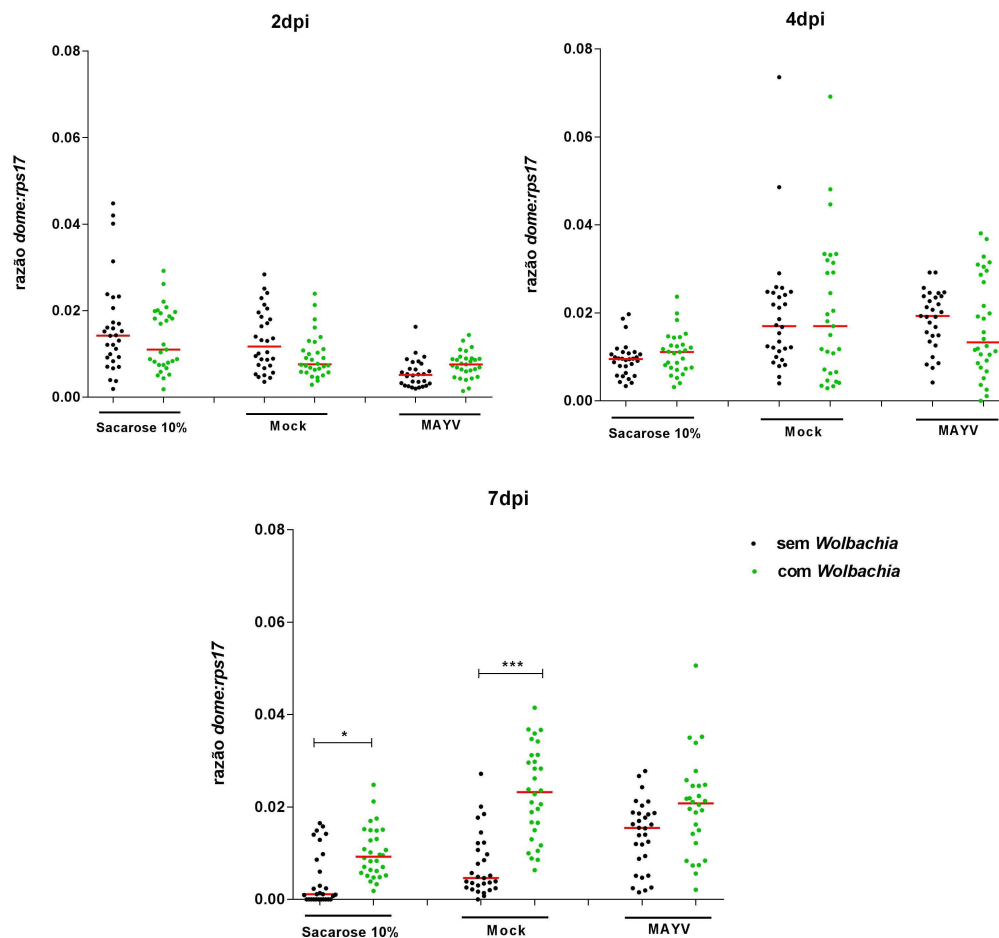


Os níveis de expressão de *DOME* foram quantificados via RT-qPCR para mosquitos Br que receberam diferentes tratamentos sacarose 10% (azul), sangue sem MAYV/Mock (laranja) e sangue com MAYV (verde) em diferentes tempos 2, 4 e 7 dias após infecção. Os dados representam a razão (normalização) entre o nível de expressão de *DOME* e o gene constitutivo do hospedeiro, *RPS17*. O gráfico dot plot representa os valores medianos (linhas horizontais pretas) observados para cada grupo que é composto de ≤ 30 fêmeas individuais inteiras coletadas em duas réplicas. Valor de P obtido via Teste Kruskal-Wallis, * $< 0,05$; ** $< 0,01$, *** $< 0,001$.

A via de sinalização JAK/STAT é uma via imune de sinalização conservada que regula vários processos de desenvolvimento assim como imunidade antiviral tanto em mamíferos quanto em insetos. Trabalhos anteriores já demonstraram a atividade antiviral de JAK/STAT em mosquitos *Ae. aegypti*. Jupatanakul e colaboradores demonstraram a correlação entre o receptor de membrana DOME e a infecção por DENV2, onde a superexpressão de *DOME* levou a diminuição da carga viral. Souza-Neto e colaboradores demonstraram através da ativação transiente da via JAK/STAT via silenciamento gênico de PIAS o que conferiu resistência maior a infecção por DENV no intestino médio (SOUZA-NETO *et al.*, 2009). Aqui observamos, em mosquitos da linhagem Br, a 7dpi, um aumento na expressão de *DOME* nos grupos que receberam alimentação infectiva (Figura 16). Possivelmente, o aumento observado na expressão deste gene se deveu ao aumento da carga viral no vetor indicando que a via JAK/STAT poderia estar participando no controle da infecção por MAYV.

Comparando mosquitos Br e wMel_Br, a expressão do gene *dome* apresentou diferença significativa entre as linhagens a 7 dpi nos grupos Sacarose 10% (Teste Kruskal-Wallis: $P=0,0349$) e Mock (Teste Kruskal-Wallis: $P<0,0001$) (Figura 17).

Figura 17: Níveis de expressão do gene *DOME* em mosquitos Br e *wMel_Br*.



Os níveis de expressão de *DOME* foram quantificados via RT-qPCR para mosquitos das linhagens Br (preto) e *wMel_Br* (verde) que receberam diferentes tratamentos sacarose 10%, sangue sem MAYV (Mock) e sangue com MAYV (MAYV) em diferentes tempos 2, 4 e 7 dias após infecção. Os dados representam a razão (normalização) entre o nível de expressão de *DOME* e o gene constitutivo do hospedeiro, *RPS17*. O gráfico dot plot representa os valores medianos (linhas horizontais vermelhas) observados para cada grupo que é composto de ≤ 30 fêmeas individuais inteiras coletadas em duas réplicas. Valor de P obtido via Teste Kruskal-Wallis, * $< 0,05$; *** $< 0,001$.

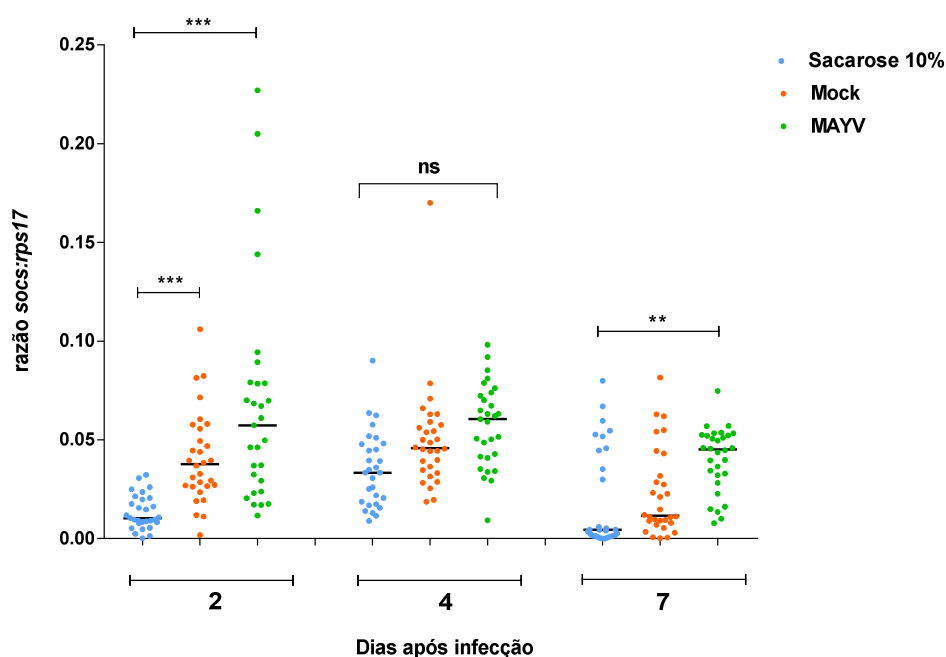
Comparando as linhagens Br e *wMel_Br*, mosquitos contendo a cepa *wMel* de *Wolbachia* apresentaram um aumento significativo na expressão do gene *DOME* a 7 dpi em comparação aos mosquitos sem a bactéria nos grupos que receberam sacarose 10% e nos grupos que receberam infecção Mock. Aqui demonstramos de forma inédita que a presença da cepa *wMel* de *Wolbachia* em *Ae. aegypti* pode levar a um aumento tardio da expressão de *DOME*, principalmente após a alimentação

sanguínea, conferindo assim uma pré-ativação do sistema imune do vetor o que poderia contribuir para criar um ambiente refratário à infecção por MAYV.

5.3.6 Níveis de expressão do gene *SOCS*

Em mosquitos Br, a expressão de *SOCS*, a 2 dpi, foi maior nos grupos Mock e MAYV. Não houve diferença entre estes grupos. Porém, estes se diferiram significativamente dos grupos que receberam Sacarose 10% (Teste Kruskal-Wallis: Mock x Sacarose 10% $P=0,0004$; MAYV x Sacarose 10% $P<0,0001$). A 4 dpi, não houve diferença significativa entre os grupos. A 7 dpi, houve diferença significativa entre os grupos MAYV e Sacarose 10% (Teste Kruskal-Wallis: $P=0,0053$) (Figura 18).

Figura 18: Níveis de expressão do gene *SOCS* em mosquitos Br.

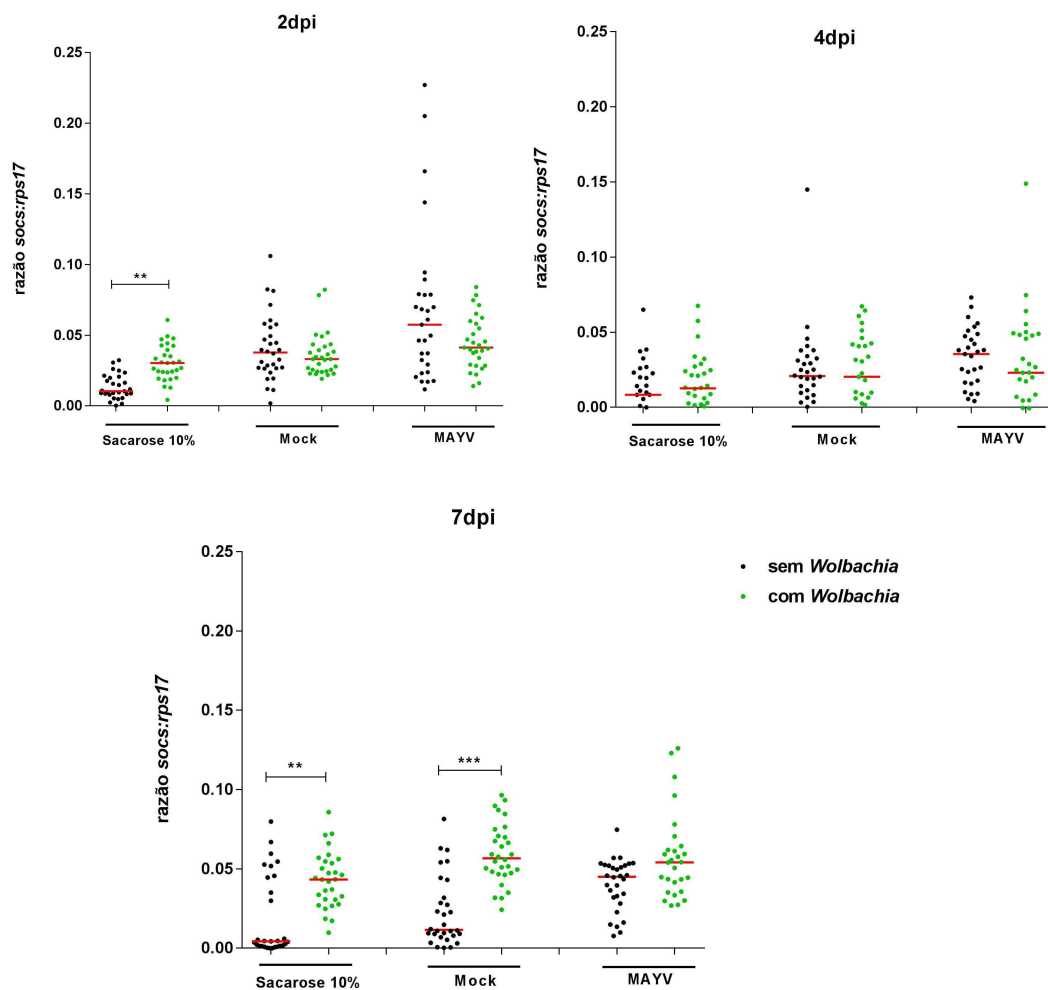


Os níveis de expressão de *SOCS* foram quantificados via RT-qPCR para mosquitos Br que receberam diferentes tratamentos sacarose 10% (azul), sangue sem MAYV/Mock (laranja) e sangue com MAYV (verde) em diferentes tempos 2, 4 e 7 dias após infecção. Os dados representam a razão (normalização) entre o nível de expressão de *SOCS* e o gene constitutivo do hospedeiro, *RPS17*. O gráfico dot plot representa os valores medianos (linhas horizontais pretas) observados para cada grupo que é composto de ≤ 30 fêmeas individuais inteiras coletadas em duas réplicas. Valor de P obtido via Teste Kruskal-Wallis, ** $<0,01$, *** $<0,001$.

A expressão de *SOCS* a 2 dpi em mosquitos Br foi semelhante ao gene *DOME* e também àqueles com expressão afetada pela presença de sangue na dieta, mostrando que tanto para *SOCS* quanto para *DOME* a 2 dpi, a dieta sanguínea possa ser um fator que contribua para o aumento na expressão desses genes logo após a alimentação.

Comparando as linhagens Br e *wMel_Br*, a expressão do gene *SOCS* apresentou diferença significativa a 2 dpi nos grupos Sacarose 10% (Teste Kruskal-Wallis: $P=0,0014$), esta diferença se manteve a 7 dpi (Teste Kruskal-Wallis: $P=0,0092$). E também a 7 dpi, houve diferença significativa nos grupos Mock (Teste Kruskal-Wallis: $P=<0,0001$) (Figura 19).

Figura 19: Níveis de expressão do gene *SOCS* em mosquitos Br e *wMel_Br*.



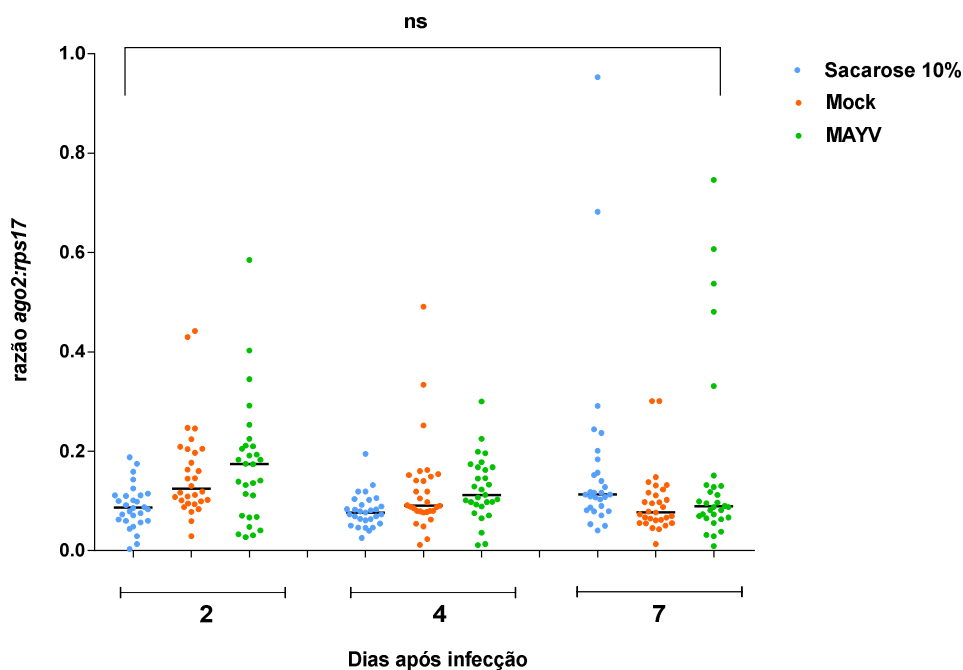
Os níveis de expressão de *SOCS* foram quantificados via RT-qPCR para mosquitos das linhagens Br (preto) e *wMel_Br* (verde) que receberam diferentes tratamentos sacarose 10%, sangue sem MAYV (Mock) e sangue com MAYV (MAYV) em diferentes tempos 2, 4 e 7 dias após infecção. Os dados representam a razão (normalização) entre o nível de expressão de *SOCS* e o gene constitutivo do hospedeiro, *RPS17*. O gráfico dot plot representa os valores medianos (linhas horizontais vermelhas) observados para cada grupo que é composto de ≤ 30 fêmeas individuais inteiras coletadas em duas réplicas. Valor de P obtido via Teste Kruskal-Wallis, ** < 0,01, *** < 0,001.

Para *SOCS*, observa-se um perfil de expressão semelhante a *DOME* aos 7 dpi em mosquitos da linhagem *wMel_Br*. *SOCS*, por ser um regulador negativo da via JAK/STAT, uma expressão alta deste seria indicativo que a via JAK/STAT está ativa. O raciocínio aqui seria o mesmo aplicado a *DOME*, também um gene da via JAK/STAT, onde a presença da cepa *wMel* de *Wolbachia* em *Ae. aegypti* pode levar a um aumento tardio da expressão de *SOCS*, principalmente após a alimentação sanguínea, de forma que o *Ae. aegypti* estaria preparado para uma futura infecção.

5.3.7 Níveis de expressão do gene *AGO2*

Em mosquitos Br, não houve expressão significativa de *AGO2* em nenhum dos grupos (Figura 20).

Figura 20: Níveis de expressão do gene *AGO2* em mosquitos Br.



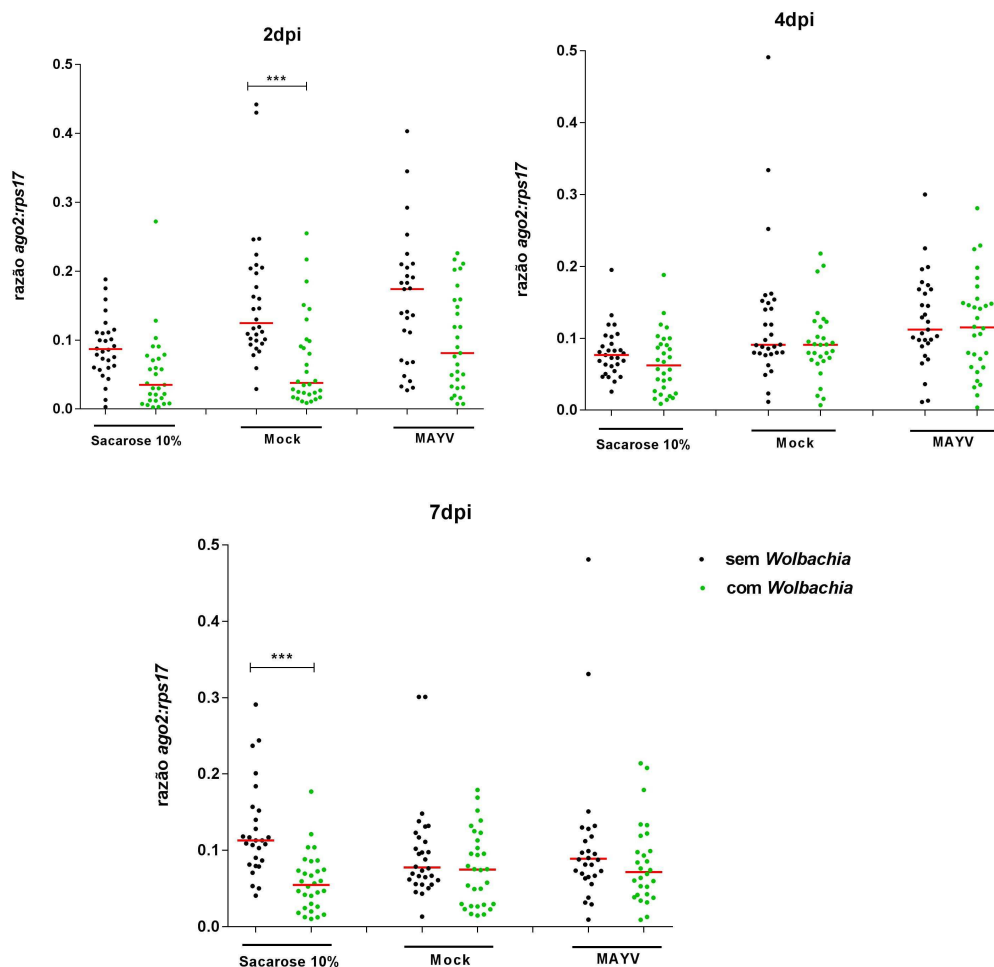
Os níveis de expressão de *AGO2* foram quantificados via RT-qPCR para mosquitos Br que receberam diferentes tratamentos sacarose 10% (azul), sangue sem MAYV/Mock (laranja) e sangue com MAYV (verde) em diferentes tempos 2, 4 e 7 dias após infecção. Os dados representam a razão (normalização) entre o nível de expressão de *AGO2* e o gene constitutivo do hospedeiro, *RPS17*. O gráfico dot plot representa os valores medianos (linhas horizontais pretas) observados para cada grupo que é composto de ≤ 30 fêmeas individuais inteiras coletadas em duas réplicas.

Diferentes estudos já demonstraram a participação da via do siRNA no controle de infecções virais em mosquitos (KEENE *et al.*, 2004; CAMPBELL *et al.*, 2008; FRANZ *et al.*, 2006; FRANZ *et al.*, 2014; KHOO *et al.* 2010; KHOO *et al.* 2013). Dentre estes estudos, tem-se um realizado por McFarlane e colaboradores (2014) onde demonstraram a participação da via do siRNA contra infecções pelo CHIKV, também um *Alphavirus*, em mosquitos *Ae. aegypti* via silenciamento transiente do gene *AGO2* (McFARLANE *et al.*, 2014).

A partir dos nossos resultados podemos inferir que em mosquitos *Ae. aegypti* selvagens (sem *Wolbachia*) a via do siRNA não estaria ativa na infecção pelo MAYV indo de encontro ao encontrado por outros autores. A não participação da via do siRNA poderia ser um dos fatores que explicaria o fato de observarmos uma rápida replicação de MAYV em mosquitos Br como demonstrado na Figura 8, uma vez que uma das principais via de controle de infecções virais em *Ae. aegypti* não estaria ativa.

A análise via GLM mostrou que a expressão de *AGO2* é diferente dependendo da linhagem de *Ae. aegypti* (GLM; $W = 49,051$, $df = 1$, $P < 0,0001$). Comparando as linhagens Br e wMel_Br par a par via teste Kruskal-Wallis, percebe-se que essa diferença é mais acentuada aos 2 dpi no grupo Mock (Teste Kruskal-Wallis: $P < 0,001$) e aos 7 dpi no grupo Sacarose 10% (Teste Kruskal-Wallis: $P < 0,001$) onde observa-se um *dowregularion* da expressão de *AGO2* (Figura 21).

Figura 21: Níveis de expressão do gene *AGO2* em mosquitos Br e *wMel_Br*.



Os níveis de expressão de *AGO2* foram quantificados via RT-qPCR para mosquitos das linhagens Br (preto) e *wMel_Br* (verde) que receberam diferentes tratamentos sacarose 10%, sangue sem MAYV (Mock) e sangue com MAYV (MAYV) em diferentes tempos 2, 4 e 7 dias após infecção. Os dados representam a razão (normalização) entre o nível de expressão de *AGO2* e o gene constitutivo do hospedeiro, *RPS17*. O gráfico dot plot representa os valores medianos (linhas horizontais vermelhas) observados para cada grupo que é composto de ≤ 30 fêmeas individuais inteiras coletadas em duas réplicas. Valor de P obtido via Teste Kruskal-Wallis, *** $<0,001$.

Comparando a expressão de *AGO2* entre as linhagens Br e *wMel_Br*, observa-se que há uma supressão da via do siRNA. Esse fenômeno de supressão da via do siRNA poderia ser um mecanismo para contornar a intensa competição que há entre *Wolbachia* e o hospedeiro por nutrientes críticos como aminoácidos e colesterol. Uma vez que na presença de *Wolbachia* a replicação do MAYV não é efetiva, o organismo do *Ae. aegypti* como forma de compensar a falta de nutrientes e poupar energia

desativaria a via do siRNA e por isso observamos uma menor expressão do gene *AGO2* em mosquitos da linhagem *wMel_Br*.

Outro ponto a ser questionado e investigado com relação a via do siRNA é se o próprio MAYV não estaria, de alguma maneira, inibindo a atividade desta como forma de escape em ambas as linhagens.

5.4 Relação entre carga viral e expressão gênica

A fim de analisar se há alguma relação, dependência, entre carga viral e a expressão dos genes analisados, utilizamos a análise por Regressão Linear Simples para correlacionar linearmente as variáveis carga viral, determinada de acordo com o item 4.5, e expressão gênica, realizada de acordo com o item 4.6. Ou seja, era de nosso interesse saber se a expressão gênica de algum dos genes estudados foi de alguma forma influenciada pela carga viral (quantidade de partículas virais de MAYV).

Tendo por base os parâmetros coeficiente de determinação (R^2) e coeficiente de correlação (r) (Figuras 23 à 29), percebe-se que não houve correlação de nenhum dos genes estudados com a carga viral. Aqui, demonstramos pela primeira vez que a expressão dos genes *RELI*, *CACTUS*, *REL2*, *CASPAR*, *DOME*, *SOCS* e *AGO2* não possui dependência linear com a carga viral.

Isso demonstra que a expressão desses genes não é influenciada pela intensidade da carga viral em si. A presença do vírus em si no *Ae. aegypti*, independente da carga viral ingerida, é o suficiente para aumentar a expressão de genes do sistema imune. Estes resultados corroboram o que observamos neste estudo. Os resultados das duas réplicas tanto para carga viral, quanto prevalência ou expressão gênica foram apresentados juntos pois não houve diferença estatística entre os mesmo grupos que receberam o mesmo tratamento em ambas as réplicas mesmo sabendo que o isolado viral utilizado possuía cargas virais diferentes (Tabela 5) com uma diferença de dois logs entre a primeira e a segunda réplica.

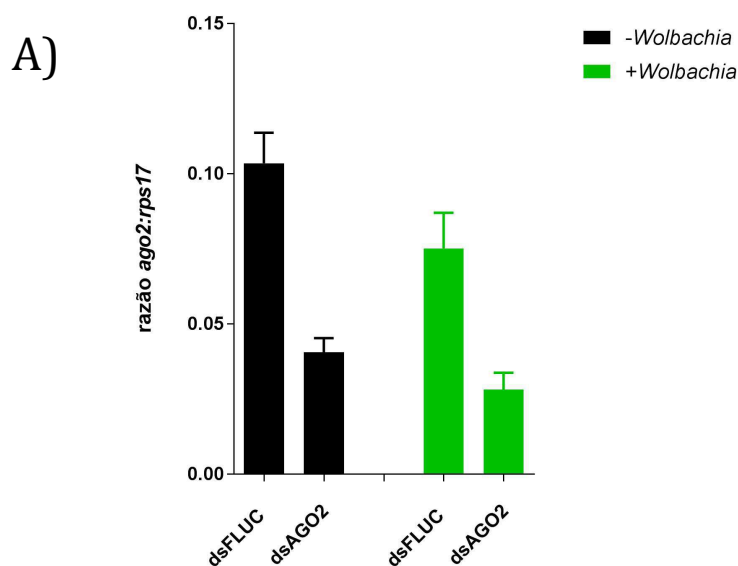
Análises de competência vetorial realizados em laboratórios muitas vezes são criticados devido as altas cargas virais utilizadas nas alimentações infectivas, uma vez que são utilizados isolados virais frescos, e muitos defendem que por este não ser o cenário observado na natureza, não poderia-se tomar análises de competência vetorial em laboratório como fato. Aqui, demonstramos que em se tratando do MAYV e no âmbito da resposta imune inata, a intensidade da carga viral em si não seria um fator

preocupante na análise da expressão gênica. Ou seja, a quantidade de partículas virais não seria o fator determinante na ativação de um gene, mas sim a presença do vírus já seria o suficiente para ativar determinada via.

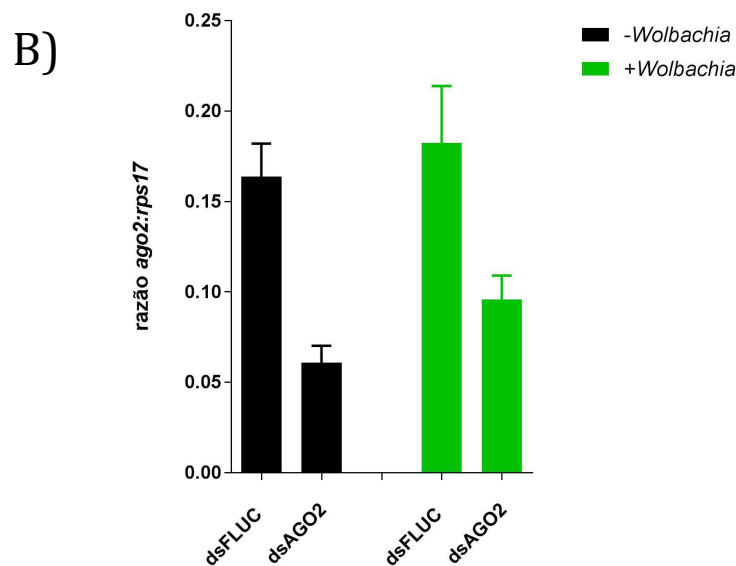
5.5 Silenciamento gênico

No mosquito *Ae. aegypti*, as infecções por arbovírus são confrontadas por diversas vias de resposta imune inata, dentre as quais destaca-se a via de imunidade antiviral baseada em RNA de interferência – RNAi. A fim de avaliar a contribuição desta via contra o MAYV, fizemos o silenciamento transiente do gene que codifica a proteína *AGO2* (Figura 22), componente principal do complexo de silenciamento RISC, fundamental para o funcionamento da maquinaria de siRNA (OKAMURA *et al.* 2004).

Neste estudo, também tentou-se silenciar os genes que codificam as proteínas *DOME* e *SOCS* a fim de avaliar a participação da via JAK/STAT contra infecções por MAYV, porém o mesmo não foi alcançado com sucesso.

Figura 22: Silenciamento transiente do gene *AGO2* em mosquitos *Ae. aegypti*.

Linagem	Br (- <i>Wolbachia</i>)		wMel Br (+ <i>Wolbachia</i>)	
Gene	dsFLUC	dsAGO2	dsFLUC	dsAGO2
n	35	28	20	11
Eficiência do knock-down	61%		62%	



Linagem	Br (- <i>Wolbachia</i>)		wMel Br (+ <i>Wolbachia</i>)	
Gene	dsFLUC	dsAGO2	dsFLUC	dsAGO2
n	12	23	24	15
Eficiência do knock-down	63%		47%	

Os gráficos mostram a relação entre a expressão do gene *AGO2* em relação ao gene constitutivo *RPS17* medidas por RT-qPCR em duas réplicas distintas. **A)** Primeira réplica. **B)** Segunda réplica. Os mosquitos foram injetados com 500 ng de RNA (dsAGO2 ou dsFLUC), e testados individualmente dois dias após a nanoinjeção. Os valores de p foram calculados comparando os grupos dsFLUC e dsAGO2 utilizando ANOVA one-way com pós-teste de Tukey.

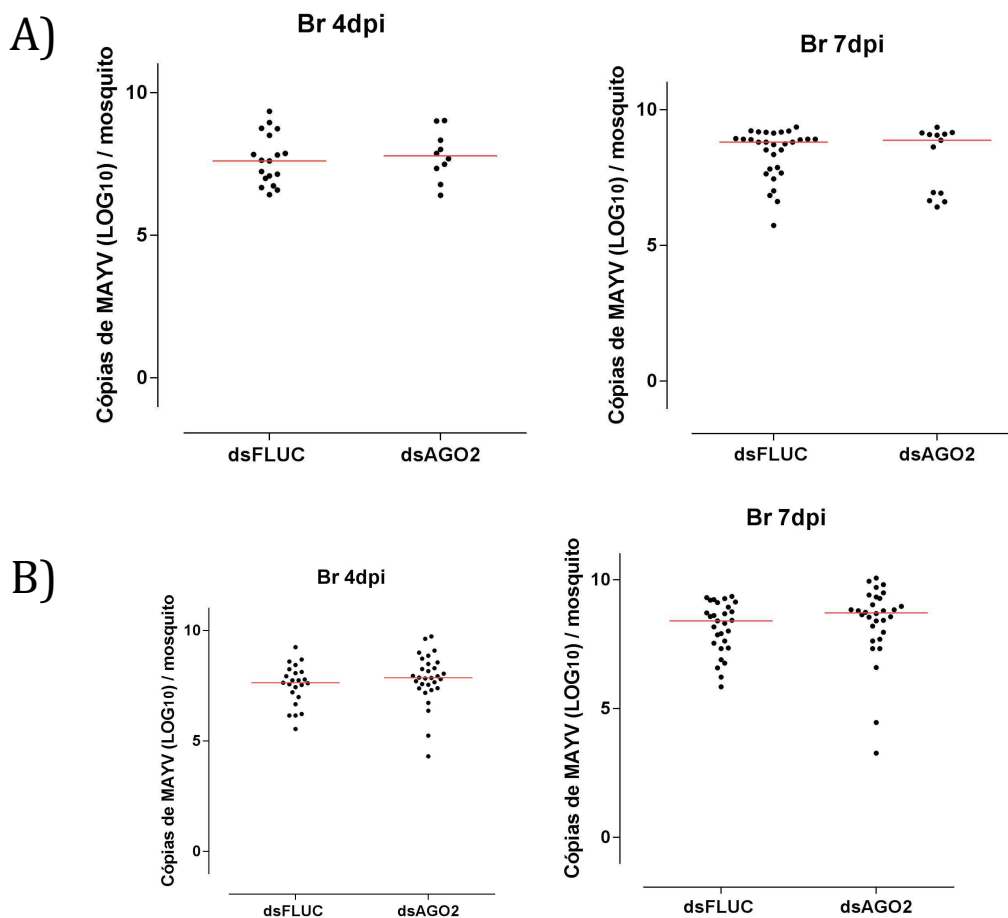
Após a confirmação do silenciamento, os mosquitos com o gene *AGO2* silenciados receberam alimentação infectiva. A tabela 6 descreve os valores da carga viral expressos em PFU/mL dos isolados virais utilizados em cada réplica.

Tabela 06: títulos dos isolados virais de MAYV utilizados nas alimentações infectivas.

Réplica	Títulos virais (PFU/mL)
1°	11 log ₁₀
2°	10 log ₁₀

Mosquitos da linhagem Br, sem *Wolbachia*, foram processados e então tiveram a carga viral de MAYV quantificados via quantificação absoluta. Analisando os resultados demonstrados na Figura 23 não houve diferença na carga viral entre os grupos analisados em ambos os tempos 4 e 7 dias após a infecção, o que nos leva a inferir que a via do siRNA não seria uma das vias de controle do MAYV em *Ae. aegypti*.

Figura 23: Cinética de crescimento do MAYV em mosquitos deficientes para a via de siRNA.



Mosquitos sem *Wolbachia* (linhagem Br) foram infectados via oral com MAYV. A quantificação absoluta do número de cópias virais (expresso como logaritmo do número de cópias virais por mosquito) foi realizada via qRT-PCR nos tempos 4 e 7 depois da infecção. Cada ponto preto representa um mosquito fêmea individual. **A)** Valores para a réplica 1. **B)** Valores para a réplica 2. Linhas vermelhas horizontais representam a mediana de cópias virais. Somente mosquitos com carga viral detectável foram considerados na análise. Os valores de p foram calculados comparando os subgrupos dsFLUC e dsAGO2 utilizando teste de Mann Whitney two-tailed com 5% de significância

Vários autores já demonstraram a participação da via do siRNA no controle de infecções virais em mosquitos (KEENE *et al.*, 2004; CAMPBELL *et al.*, 2008; FRANZ *et al.*, 2006; FRANZ *et al.*, 2014; KHOO *et al.* 2010; KHOO *et al.* 2013). Um destes estudos, realizado por Sánchez-Vargas e colaboradores (2009), mostrou um aumento de aproximadamente 4 vezes na carga viral do DENV-2 quando feito o silenciamento de *AGO2* em mosquitos. Os nossos resultados de expressão e silenciamento transiente de *AGO2* vão de encontro a estes resultados, mostrando que, apesar de a via do siRNA ser uma das principais vias de controle de infecções virais

em *Ae. aegypti*, em se tratando de MAYV, esta não tem uma grande participação. Poderíamos também inferir que a não ativação da via do siRNA poderia ser uma das razões por se observar um curto período de incubação extrínseco para o MAYV em mosquitos *Ae. aegypti* como demonstrado por Pereira *et al.* (2018) assim como nossas análises de expressão do gene *AGO2*.

O que nos motivou a estudar a via do siRNA em mosquitos *wMel_Br* foi um estudo *in vitro* com células Aag2 contendo *wMel* realizado por Terradas e colaboradores (2017) onde mostrou-se a participação da via do RNAi no controle de DENV em células contendo *Wolbachia*. Entretanto, neste estudo, em ambas as réplicas, mosquitos transfectados com a cepa *wMel* de *Wolbachia* não se infectaram com MAYV. Portanto, os níveis de *wMel*, densidade de *Wolbachia*, foram quantificados objetivando analisar se há algum efeito do silenciamento do gene *AGO2* no controle da densidade de *wMel* (Figura 24).

Figura 24: Quantificação absoluta de *Wolbachia* em mosquitos *Ae. aegypti* deficientes para a via de siRNA.

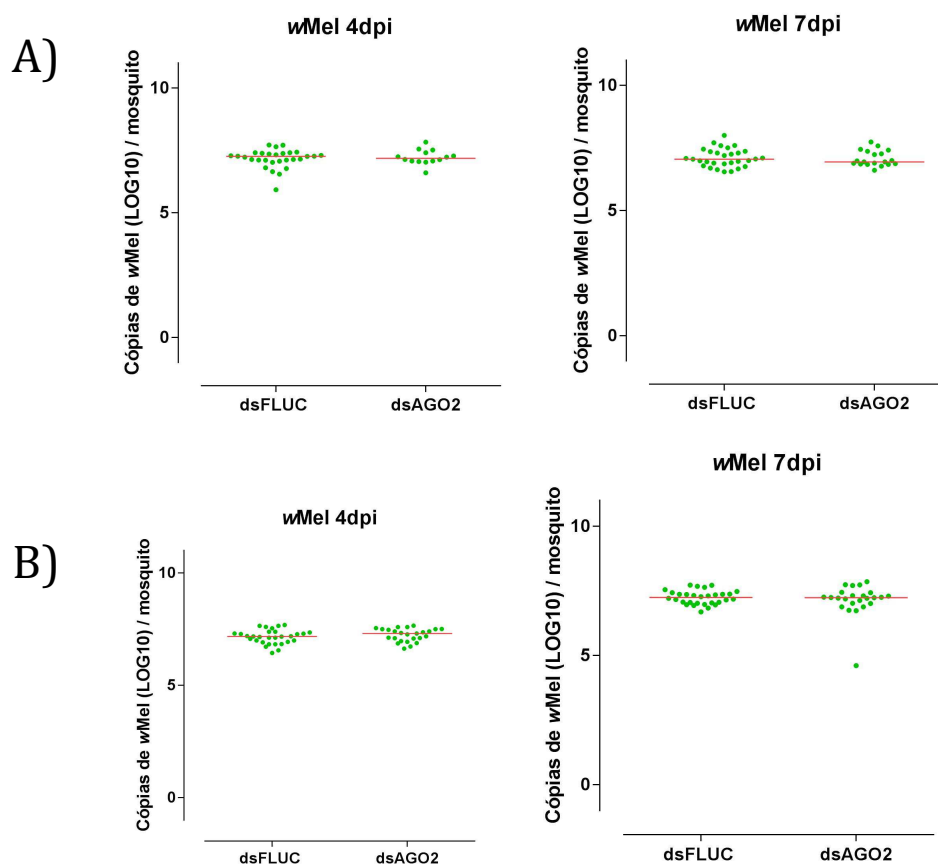


Gráfico dot plot mostra a densidade de *Wolbachia* em mosquitos *Ae. aegypti* linhagem *wMel_Br* que tiveram o gene *AGO2* silenciado. A quantificação absoluta do número mediano de cópias de *Wolbachia*, expresso em logaritmo, baseado em curva padrão, foi realizada via qRT-PCR nos tempos 4 e 7 após a alimentação infectiva com MAYV. Cada ponto verde representa um mosquito fêmea individual. **A)** Valores para a réplica 1. **B)** Valores para a réplica 2. Linhas vermelhas horizontais representam a mediana de *Wolbachia*. Os valores de *p* foram calculados comparando os subgrupos dsFLUC e dsAGO2 utilizando teste de Mann Whitney two-tailed com 5% de significância.

Este é o primeiro estudo em que se correlacionou a densidade de *Wolbachia* com a via do siRNA do sistema imune do vetor *Ae. aegypti*. Aqui percebe-se que a via do siRNA não possui nenhuma participação no controle da densidade de *wMel* em *Ae. aegypti*, resultado este já esperado uma vez que, de acordo com a literatura, as vias do RNAi possuem como principal alvo vírus e não bactérias. Ademais, um estudo realizado por Voroni *et al.* (2012) mostrou que a principal via que controla a infecção por *Wolbachia* em diferentes artrópodes seria a via da autofagia.

Todavia, faz-se necessário o estudos de outras vias do sistema imune, não somente àquelas responsáveis pelo controle de infecções bacterianas, em linhagens de *Ae. aegypti* transfectados com diferentes cepas de *Wolbachia* objetivando analisar o impacto dessas vias na densidade de *Wolbachia* assim como no controle da replicação de diferentes arbovírus.

CONCLUSÃO

- Houve aumento da densidade de *w*Mel em mosquitos infectados com MAYV;
- A alimentação sanguínea desempenha um papel importante no aumento da expressão de genes da resposta imune;
- Apesar de ter-se um aumento na expressão de genes do sistema imune na linhagem *w*Mel_Br, essa ativação do sistema imune não representa o principal mecanismo pelo qual o fenótipo de interferência a patógenos aconteça, outros mecanismos devem ser estudados;
- A intensidade da carga viral não interfere na expressão de genes do sistema imune;
- Se faz necessário validar funcionalmente a participação das vias Toll, Imd e JAK/STAT e novamente a via do RNAi frente a infecção pelo MAYV utilizando a técnica de silenciamento gênico.

REFERÊNCIAS

- ABAD-FRANCH, F.; GRIMMER, G.H.; DE PAULA, V.S.; FIGUEIREDO, L.T.; BRAGA, W.S.; LUZ, S.L. Mayaro virus infection in Amazonia: a multimodel inference approach to risk factor assessment. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6(10), e1846, 2012.
- ACOSTA-AMPUDIA Y, MONSALVE DM, RODRÍGUEZ Y, PACHECO Y, ANAYA JM, RAMÍREZ-SANTANA C. Mayaro: an emerging viral threat? *Emerg Microbes Infect.* 2018 Sep 26;7(1):163.
- AITKEN, T.H.; DOWNS, W.G.; ANDERSON, C.R.; SPENCE, L.; CASALS, J. Mayaro virus isolated from a Trinidadian mosquito, *Mansonia venezuelensis*. *Science* 1960;131:986.
- ALIOTA, M. T.; WALKER, E. C.; *et al.* The wMel Strain of *Wolbachia* Reduces Transmission of Chikungunya Virus in *Aedes aegypti*. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 10, n. 4, p. e0004677, 2016.
- ANDERSON, C.R.; DOWNS, W.G.; WATTLEY, G.H.; AHIN, N.W.; REESE, A.A. Mayaro virus: a new human disease agent. II. Isolation from blood of patients in Trinidad. *B.W.I Am J Trop Med Hyg*, v. 6, p. 1012e6, 1957.
- ARBOUZOVA, N.I.; ZEIDLER, M.P. JAK/STAT signalling in *Drosophila*: Insights into conserved regulatory and cellular functions. *Development*, v. 133, p. 2605–2616, 2006.
- AVADHANULA, V.; WEASNER, B.P.; HARDY, G.G.; KUMAR, J.P.; HARDY, R.W. A novel system for the launch of alphavirus RNA synthesis reveals a role for the IMD pathway in arthropod antiviral response. *PLoS Pathog.*, v. 5, p. 1000582, 2009.
- AZEVEDO, R.S.; SILVA, E.V.; CARVALHO, V.L.; RODRIGUES, S.G.; NUNES-NETO, J.P.; MONTEIRO, H. *et al.* Mayaro fever virus, Brazilian Amazon. *Emerg Infect Dis*;15:1830e2, 2009.
- BARILLAS-MURY, C.; HAN, Y.S.; SEELEY, D.; KAFATOS, F.C. *Anopheles gambiae* Ag-STAT, a new insect member of the STAT family, is activated in response to bacterial infection. *EMBO J.*, v. 18, p. 959–967, 1999.
- BARLETTA AB, NASCIMENTO-SILVA MC, TALYULI OA, OLIVEIRA JH, PEREIRA LO, OLIVEIRA PL, SORGINE MH. Microbiota activates IMD pathway and limits Sindbis infection in *Aedes aegypti*. *Parasit Vectors*. 2017 Feb 23;10(1):103.
- BEERNTSEN, B. T., A. A. JAMES AND B. M. CHRISTENSEN. Genetics of mosquito vector competence. *Microbiol Mol Biol Rev*, v. 64, n. 1, p. 115-137, 2000.
- BENNETT, K. E., K. E. OLSON, L. MUNOZ MDE, I. FERNANDEZ-SALAS, J. A. FARFAN-ALE, S. HIGGS, W. C. T. BLACK AND B. J. BEATY (2002). "Variation in vector competence for dengue 2 virus among 24 collections of *Aedes aegypti* from

- Mexico and the United States." *Am J Trop Med Hyg* 67(1): 85-92.
- BIAN G, XU Y, LU P, XIE Y, XI Z. The endosymbiotic bacterium *Wolbachia* induces resistance to dengue virus in *Aedes aegypti*. *PLoS Pathog*. 2010 Apr 1;6(4):e1000833.
- BLACK IV, W. C. *et al.* Flavivirus susceptibility in *Aedes aegypti*. *Archives of Medical Research*, v. 33, n. 4, p. 379–388, 2002.
- BLACK, W. C. AND D. W. SEVERSON. Genetics of Vector Competence. *Biology of Disease Vectors*. W. H. Marquardt. London, Elsevier Academic Press.
- CAMPBELL, C. L., K. M. KEENE, D. E. BRACKNEY, K. E. OLSON, C. D. BLAIR, J. WILUSZ AND B. D. FOY (2008). "*Aedes aegypti* uses RNA interference in defense against Sindbis virus infection." *BMC Microbiol* 8: 47.
- CARAGATA EP, RANCÈS E, O'NEILL SL, MCGRAW EA. Competition for amino acids between *Wolbachia* and the mosquito host, *Aedes aegypti*. *Microb Ecol*. 2014 Jan;67(1):205-18.
- CARAGATA, E. P.; DUTRA, H. L. C.; MOREIRA, L. A. Exploiting Intimate Relationships: Controlling Mosquito-Transmitted Disease with *Wolbachia*. *Trends in Parasitology*, v. 32, n. 3, p. 207–218, 2016.
- CARISSIMO, G., E. PONDEVILLE, M. MCFARLANE, I. DIETRICH, C. MITRI, E. BISCHOFF, C. ANTONIEWSKI, C. BOURGOUIN, A. B. FAILLOUX, A. KOHL AND K. D. VERNICK (2015). "Antiviral immunity of *Anopheles gambiae* is highly compartmentalized, with distinct roles for RNA interference and gut microbiota." *Proc Natl Acad Sci U S A* 112(2): E176-185.
- CHAN, M. AND M. A. JOHANSSON. The incubation periods of Dengue viruses. *PloS one*, v. 7, n.11, e50972, 2012.
- CHRISTOFFERSON, R. C. AND C. N. MORES. Estimating the magnitude and direction of altered arbovirus transmission due to viral phenotype. *PloS one*, v. 6, n. 1, e16298, 2011.
- CIOTA AT, BIALOSUKNIA SM, ZINK SD, BRECHER M, EHRBAR DJ, MORRISSETTE MN, KRAMER LD. Effects of Zika Virus Strain and Aedes Mosquito Species on Vector Competence. *Emerg Infect Dis*. 2017 Jul;23(7):1110-1117.
- COSTA, A.; JAN, E.; SARNOW, P.; SCHNEIDER, D. The Imd pathway is involved in antiviral immune responses in *Drosophila*. *PLoS One* 2009, 4, e7436.
- CURTIS, C. F. *et al.* A field trial on control of *Culex quinquefasciatus* by release of a strain integrating cytoplasmic incompatibility and a translocation. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, v. 31, n. 2–3, p. 181–190, 5 mar. 1982.
- DE THOISY, B., GARDON, J., SALAS, R. A., MORVAN, J. & KAZANJI, M.

Mayaro virus in wild mammals, French Guiana. *Emerg. Infect. Dis.* 9, 1326–1329 (2003).

DE FARIA, I. J. D. S., R. P. OLMO, E. G. SILVA AND J. T. MARQUES. dsRNA Sensing During Viral Infection: Lessons from Plants, Worms, Insects, and Mammals. *Journal of interferon & cytokine research*, v. 33, p. 239-253, 2013.

DE GREGORIO, E.; SPELLMAN, P. T.; TZOU, P.; RUBIN, G. M.; LEMAITRE, B. The Toll and Imd pathways are the major regulators of the immune response in *Drosophila*. *The EMBO journal*, v. 21, p. 2568-2579, 2002.

DERETIC, V.; LEVINE, B. Autophagy, Immunity, and Microbial Adaptations. *Cell Host Microbe* 2009, 5, 527–549.

DONG Y, MORTON JC JR, RAMIREZ JL, SOUZA-NETO JA, DIMOPOULOS G. The entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* activate toll and JAK-STAT pathway-controlled effector genes and anti-dengue activity in *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol.* 2012 Feb;42(2):126-32.

DULBECCO, R.; & VOGT, M. Some problems of animal virology as studied by the plaque technique. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 18, 273-279, 1953.

DUTRA, H. L. C. *et al.* From Lab to Field: The Influence of Urban Landscapes on the Invasive Potential of *Wolbachia* in Brazilian *Aedes aegypti* Mosquitoes. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 9, n. 4, 2015.

DUTRA, H. L. C. *et al.* *Wolbachia* Blocks Currently Circulating Zika Virus Isolates in Brazilian *Aedes aegypti* Mosquitoes. *Cell Host & Microbe*, p. 1–4, 2016.

FORATTINI, O. P.; GOMES, A. D. E. C.; Biting activity of *Aedes scapularis* (Rondani) and *Haemagogus mosquitoes* in southern Brazil (Diptera: Culicidae). *Rev Saude Publica*, v. 22, p. 84-93, 1988.

FORSHEY, B.M.; GUEVARA, C.; LAGUNA-TORRES, V.A. *et al.* Arboviral etiologies of acute febrile illnesses in western South America, 2000–2007. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 4(8), e787, 2010.

FRAGKLOUDIS R, ATTARZADEH-YAZDI G, NASH AA, FAZAKERLEY JK, KOHL A. Advances in dissecting mosquito innate immune responses to arbovirus infection. *J Gen Virol.* 2009 Sep;90(Pt 9):2061-72.

FRANZ, A. W. E., I. SANCHEZ-VARGAS, Z. N. ADELMAN, C. D. BLAIR, B. J. BEATY, A. A. JAMES AND K. E. OLSON (2006). "Engineering RNA interference-based resistance to dengue virus type 2 in genetically modified *Aedes aegypti*." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 4198-4203.

FRANZ, A. W., I. SANCHEZ-VARGAS, R. R. RABAN, W. C. T. BLACK, A. A. JAMES AND K. E. OLSON (2014). "Fitness impact and stability of a transgene conferring resistance to dengue-2 virus following introgression into a genetically

diverse *Aedes aegypti* strain." PLoS Negl Trop Dis 8(5): e2833.

FRANZ, A. *et al.* Tissue Barriers to Arbovirus Infection in Mosquitoes. *Viruses*, v. 7, n. 7, p. 3741–3767, 2015.

FRENTIU, F. D., ROBINSON, J., YOUNG, P. R., MCGRAW, E. A. & O'NEILL, S. L. *Wolbachia*-Mediated resistance to dengue virus infection and death at the cellular level. PLoS One 5, 1–8 (2010).

FRENTIU, F. D. *et al.* Limited Dengue Virus Replication in Field-Collected *Aedes aegypti* Mosquitoes Infected with *Wolbachia*. PLoS Negl. Trop. Dis. 8, 1–11 (2014).

GALINDO, P.; SRIHONGSE, S.; DE RODANICHE, E.; GRAYSON, M. A. An ecological survey for arboviruses in Almirante, Panama, 1959e1962. *Am J Trop Med Hyg*, v. 15, p. 385-400, 1966.

GEOGHEGAN V, STANTON K, RAINEY SM, ANT TH, DOWLE AA, LARSON T, HESTER S, CHARLES PD, THOMAS B, SINKINS SP. Perturbed cholesterol and vesicular trafficking associated with dengue blocking in *Wolbachia*-infected *Aedes aegypti* cells. Nat Commun. 2017 Sep 13;8(1):526.

GEORGEL, P.; NAITZA, S.; KAPPLER, C.; FERRANDON, D.; ZACHARY, D.; SWIMMER, C.; KOPCZYNSKI, C.; DUYK, G.; REICHHART, J.-M.; HOFFMANN, J.A.; *et al.* *Drosophila* Immune Deficiency (IMD) Is a Death Domain Protein that Activates Antibacterial Defense and Can Promote Apoptosis. *Dev. Cell*, v. 1, p. 503–514, 2001.

GHILDIYAL, M. AND P. D. ZAMORE (2009). "Small silencing RNAs: an expanding universe." Nat Rev Genet 10(2): 94-108.

GOULD, E. A.; HIGGS, S. Impact of climate change and other factors on emerging arbovirus diseases. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 103, n. 2, p. 109–121, fev. 2009.

GROOT, H. Estudios sobre virus transmitidos por artropodos en colombia. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales* 12(46), 197–217, 1964.

HALSEY, E.S.; SILES, C.; GUEVARA, C. *et al.* Mayaro virus infection, Amazon Basin region, Peru, 2010– 2013. *Emerg. Infect. Dis.* 19(11), 1839–1842, 2013.

HAMEL, R. *et al.* Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. *J. Virol.* 89, 8880–8896 (2015).

HARDY, J. L. *et al.* Intrinsic Factors Affecting Vector Competence of Mosquitoes for Arboviruses. *Annual Review of Entomology*, v. 28, n. 1, p. 229–262, jan. 1983.

HASSING, R.J.; LEPARC-GOFFART, I.; BLANK, S.N. *et al.* Imported Mayaro virus infection in The Netherlands. *J. Infect.* 61(4), 343–345, 2010.

HERTIG, M.; WOLBACH, S. B. Studies on Rickettsia-Like Micro-Organisms in Insects. *The Journal of medical research*, v. 44, n. 3, p. 329–374.7, mar. 1924.

HOCH, A.L.; PETERSON, N.E.; LEDUC, J.W.; PINHEIRO, F.P. An outbreak of Mayaro virus disease in Belterra, Brazil. Iii. Entomological and ecological studies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 30(3), 689–698, 1981.

HOFFMANN JA. The immune response of *Drosophila*. *Nature*. 2003 Nov 6;426(6962):33-8. Review.

HOFFMANN, A A *et al.* Successful establishment of *Wolbachia* in *Aedes* populations to suppress dengue transmission. *Nature*, v. 476, n. 7361, p. 454–7, 25 ago. 2011.

HOUNG, H. H., D. HRITZ AND N. KANESA-THASAN (2000). "Quantitative detection of dengue 2 virus using fluorogenic RT-PCR based on 3'-noncoding sequence." *J Virol Methods* 86(1): 1-11.

HOUNG, H. S., R. CHUNG-MING CHEN, D. W. VAUGHN AND N. KANESA-THASAN (2001). "Development of a fluorogenic RT-PCR system for quantitative identification of dengue virus serotypes 1-4 using conserved and serotype-specific 3' noncoding sequences." *J Virol Methods* 95(1-2): 19-32.

HUSSAIN, M. *et al.* Effect of *Wolbachia* on replication of West Nile virus in a mosquito cell line and adult mosquitoes. *Journal of virology*, v. 87, n. 2, p. 851–8, jan. 2013.

IZURIETA, R.O.; MACALUSO, M.; WATTS, D.M. *et al.* Assessing yellow fever risk in the Ecuadorian Amazon. *J. Glob. Infect. Dis.* 1(1), 7–13, 2009.

KAMBRIS, Z. *et al.* Immune activation by life-shortening *Wolbachia* and reduced filarial competence in mosquitoes. *Science (New York, N.Y.)*, v. 326, n. 5949, p. 134–6, 2009.

KEENE KM, FOY BD, SANCHEZ-VARGAS I, BEATY BJ, BLAIR CD, OLSON KE. RNA interference acts as a natural antiviral response to O'nyong-nyong virus (Alphavirus; Togaviridae) infection of *Anopheles gambiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Dec 7;101(49):17240-5.

KILPATRICK, A. M.; RANDOLPH, S. E. Drivers, dynamics, and control of emerging vector-borne zoonotic diseases. *The Lancet*, v. 380, n. 9857, p. 1946–1955, 2012.

KHOO, C. C., J. PIPER, I. SANCHEZ-VARGAS, K. E. OLSON AND A. W. FRANZ (2010). "The RNA interference pathway affects midgut infection- and escape barriers for Sindbis virus in *Aedes aegypti*." *BMC Microbiol* 10: 130.

KHOO, C. C., J. B. DOTY, M. S. HEERSINK, K. E. OLSON AND A. W. FRANZ (2013). "Transgenemediated suppression of the RNA interference pathway in *Aedes aegypti* interferes with gene silencing and enhances Sindbis virus and dengue virus type 2 replication." *Insect Mol Biol* 22(1): 104-114.

- KRAEMER, M. U. G. *et al.* The global compendium of *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* occurrence. *Scientific data*, v. 2, p. 150035, 2015.
- KRAMER, L. D. AND G. D. EBEL. Dynamics of flavivirus infection in mosquitoes. *Adv Virus Res*, v. 60, p. 187-232, 2003.
- KREUDER JOHNSON, C. *et al.* Spillover and pandemic properties of zoonotic viruses with high host plasticity. *Scientific reports*, v. 5, p. 14830, 2015.
- JOUBERT DA, O'NEILL SL. Comparison of Stable and Transient Wolbachia Infection Models in *Aedes aegypti* to Block Dengue and West Nile Viruses. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017 Jan 4;11(1):e0005275.
- JUPATANAKUL N, SIM S, DIMOPOULOS G. The insect microbiome modulates vector competence for arboviruses. *Viruses*. 2014 Nov 11;6(11):4294-313.
- JUPATANAKUL, N. *et al.*, Engineered *Aedes aegypti* JAK/STAT Pathway-Mediated Immunity to Dengue Virus. *PLoS Negl Trop Dis*. vol.11, n. 1, p. e0005187, 2017.
- LAMBRECHTS, L., C. CHEVILLON, R. G. ALBRIGHT, B. THAISOMBOONSUK, J. H. RICHARDSON, R. G. JARMAN AND T. W. SCOTT. Genetic specificity and potential for local adaptation between dengue viruses and mosquito vectors. *BMC Evol Biol*, v. 9, p. 160, 2009.
- LEDUC, J.W.; PINHEIRO, F.P.; TRAVASSOS DA ROSA, A.P. An outbreak of Mayaro virus disease in Belterra, Brazil. Ii. Epidemiology. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 30(3), 682–688, 1981.
- LEMAITRE, B.; NICOLAS, E.; MICHAUT, L.; REICHHART, J.; HOFFMANN, J. The dorsoventral regulatory gene cassette controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*, v. 86, p. 973–983, 1996.
- LLAGONNE-BARETS, M.; ICARD, V.; LEPARC-GOFFART, I.; PRAT, C.; PERPOINT, T.; ANDRE, P.; *et al.* A case of Mayaro virus infection imported from French Guiana. *J Clin Virol*, v. 77, p. 66e8, 2016.
- LONG, K. C.; ZIEGLER, S.A.; THANGAMANI, S.; HAUSSER, N.L.; KOCHER, T. J.; HIGGS, S.; TESH, R.B. Experimental transmission of Mayaro virus by *Aedes aegypti*. *Am J Trop Med Hyg*, v. 85, n. 4, p. 750-7, oct 2011
- LU, Y.; WU, L.P.; ANDERSON, K.V. The antibacterial arm of the *Drosophila* innate immune response requires an IκB kinase. *Genes Dev.*, v. 15, p. 104–110, 2001.
- LUPLERTLOP, N.; SURASOMBATPATTANA, P.; PATRAMOOL, S.; DUMAS, E.; WASINPIYAMONGKOL, L.; SAUNE, L.; HAMEL, R.; BERNARD, E.; SERENO, D.; THOMAS, F.; *et al.* Induction of a peptide with activity against a broad spectrum of pathogens in the *Aedes aegypti* salivary gland, following infection with dengue virus. *PLoS Pathog.*, v. 7, e1001252, 2011.

MACKAY, I. M.; ARDEN, K. E. Mayaro virus: a forest virus primed for a trip to the city?. *Microbes and Infection*, v. 18, p. 724 - 734, 2016.

MCFARLANE, M., C. ARIAS-GOETA, E. MARTIN, Z. O'HARA, A. LULLA, L. MOUSSON, S. M. RAINEY, S. MISBAH, E. SCHNETTLER, C. L. DONALD, A. MERITS, A. KOHL AND A. B. FAILLOUX (2014). "Characterization of *Aedes aegypti* innate-immune pathways that limit Chikungunya virus replication." *PLoS Negl Trop Dis* 8(7): e2994.

MCMENIMAN, C.; LANE, R.; CASS, B. Stable introduction of a life-shortening *Wolbachia* infection into the mosquito *Aedes aegypti*. *Science*, v. 323, n. January, p. 141–144, 2009.

MCGRAW, E. A; O'NEILL, S. L. Beyond insecticides: new thinking on an ancient problem. *Nature reviews. Microbiology*, v. 11, n. 3, p. 181–93, mar. 2013.

MERKLING, S. H. AND R. P. VAN RIJ. Beyond RNAi: antiviral defense strategies in *Drosophila* and mosquito. *J Insect Physiol* v. 59, n. 2, p. 159-170, 2013.

METSELAAR, D. Isolation of arboviruses of group A and group C in Surinam. *Trop. Geogr. Med.* 18(2), 137–142, 1966.

MOLINA-CRUZ, A., L. GUPTA, J. RICHARDSON, K. BENNETT, W. T. BLACK AND C. BARILLAS-MURY. "Effect of mosquito midgut trypsin activity on dengue-2 virus infection and dissemination in *Aedes aegypti*." *Am J Trop Med Hyg.* v. 72, n. 5, p. 631-637, 2005

MOORE, C. G.; WHITACRE, D. M. Competition in Mosquitoes. Production of *Aedes aegypti* Larval Growth Retardant at Various Densities and Nutrition Levels. *Annals of the Entomological Society of America*, v. 65, n. 4, p. 915–918, 17 jul. 1972.

MOREIRA, L. A *et al.* A *Wolbachia* symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with dengue, Chikungunya, and Plasmodium. *Cell*, v. 139, n. 7, p. 1268–78, 24 dez. 2009.

MOTA. T. O. M.; RIBEIRO, M. R.; VEDOVELLO, D.; NOGUEIRA, M. L. Mayaro virus: a neglected arbovirus of the Americas. *Future Virology*, vol. 10, n. 9, 2015.

MOURAO, M.P.; BASTOS, M. S.; DE FIGUEIREDO, R.P. *et al.* Mayaro fever in the city of Manaus, Brazil, 2007– 2008. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 12(1), 42–46, 2012.

MOY, R.H.; GOLD, B.; MOLLESTON, J.M.; SCHAD, V.; YANGER, K.; SALZANO, M.-V.; YAGI, Y.; FITZGERALD, K.A.; STANGER, B.Z.; SOLDAN, S.S.; *et al.* Antiviral Autophagy Restricts Rift Valley Fever Virus Infection and Is Conserved from Flies to Mammals. *Immunity* 2014.

MUTURI EJ, DUNLAP C, RAMIREZ JL, ROONEY AP, KIM CH. Host blood-meal source has a strong impact on gut microbiota of *Aedes aegypti*. *FEMS Microbiol Ecol.* 2019 Jan 1;95(1).

- NAKAMOTO, M.; MOY, R.H.; XU, J.; BAMBINA, S.; YASUNAGA, A.; SHELLY, S.S.; GOLD, B.; CHERRY, S. Virus recognition by Toll-7 activates antiviral autophagy in *Drosophila*. *Immunity* 2012.
- NAVARRETE-ESPINOSA, J.; GÓMEZ-DANTÉS, H. Arbovirus causing hemorrhagic fever at IMSS. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*, v. 44, n. 4, p. 347-53, jul 2006.
- NAVECA FG, NASCIMENTO VAD, SOUZA VC, NUNES BTD, RODRIGUES DSG, VASCONCELOS PFDC. Multiplexed reverse transcription real-time polymerase chain reaction for simultaneous detection of Mayaro, Oropouche, and Oropouche-like viruses. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2017
- NGUYEN, N. M., D. THI HUE KIEN, T. V. TUAN, N. T. H. QUYEN, C. N. B. TRAN, L. VO THI, D. L. THI, H. L. NGUYEN; *et al.* Host and viral features of human dengue cases shape the population of infected and infectious *Aedes aegypti* mosquitoes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*: 1-6. 2013.
- OKAMURA, K., A. ISHIZUKA, H. SIOMI AND M. C. SIOMI (2004). "Distinct roles for Argonaute proteins in small RNA-directed RNA cleavage pathways." *Genes Dev* 18(14): 1655-1666.
- PAN, X. *et al.* *Wolbachia* induces reactive oxygen species (ROS)-dependent activation of the Toll pathway to control dengue virus in the mosquito *Aedes aegypti*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 109, n. 1, p. E23-31, 3 jan. 2012.
- PEREIRA TN, ROCHA MN, SUCUPIRA PHF, CARVALHO FD, MOREIRA LA. *Wolbachia* significantly impacts the vector competence of *Aedes aegypti* for Mayaro virus. *Sci Rep*. 2018 May 2;8(1):6889.
- PINHEIRO, F.P.; FREITAS, R.B.; TRAVASSOS DA ROSA, J.F.; GABBAY, Y.B.; MELLO, W.A.; LEDUC, J.W. An outbreak of Mayaro virus disease in Belterra, Brazil. I. Clinical and virological findings. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 30(3), 674-681, 1981.
- RAMIREZ, J.L.; DIMOPOULOS, G. The Toll immune signaling pathway control conserved anti-dengue defenses across diverse *Ae. aegypti* strains and against multiple dengue virus serotypes. *Dev. Comp. Immunol.*, v. 34, p. 625-629, 2010.
- RAMIREZ, J. L., J. SOUZA-NETO, R. TORRES COSME, J. ROVIRA, A. ORTIZ, J. M. PASCALE AND G. DIMOPOULOS. Reciprocal tripartite interactions between the *Aedes aegypti* midgut microbiota, innate immune system and dengue virus influences vector competence. *PLoS Negl Trop Dis*, v. 6, n. 3, e1561, 2012.
- RANCÈS E, YE YH, WOOLFIT M, MCGRAW EA, O'NEILL SL. The relative importance of innate immune priming in *Wolbachia*-mediated dengue interference. *PLoS Pathog*. 2012 Feb;8(2)

RANCÈS E, JOHNSON TK, POPOVICI J, ITURBE-ORMAETXE I, ZAKIR T, WARR CG, O'NEILL SL. The toll and Imd pathways are not required for *Wolbachia*-mediated dengue virus interference. *J Virol*. 2013 Nov;87(21):11945-9.

SALAZAR MI, RICHARDSON JH, SÁNCHEZ-VARGAS I, OLSON KE, BEATY BJ. Dengue virus type 2: replication and tropisms in orally infected *Aedes aegypti* mosquitoes. *BMC Microbiol*. 2007 Jan 30;7:9.

SANCHEZ-VARGAS, I., J. C. SCOTT, B. K. POOLE-SMITH, A. W. FRANZ, V. BARBOSA SOLOMIEU, J. WILUSZ, K. E. OLSON AND C. D. BLAIR (2009). "Dengue virus type 2 infections of *Aedes aegypti* are modulated by the mosquito's RNA interference pathway." *PLoS Pathog* 5(2): e1000299.

SANDERS, H.R.; FOY, B.D.; EVANS, A.M.; ROSS, L.S.; BEATY, B.J.; OLSON, K.E.; GILL, S.S. Sindbis virus induces transport processes and alters expression of innate immunity pathway genes in the midgut of the disease vector, *Aedes aegypti*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, v. 35, p. 1293–1307, 2005.

SERRATO-SALAS J, IZQUIERDO-SÁNCHEZ J, ARGÜELLO M, CONDE R, ALVARADO-DELGADO A, LANZ-MENDOZA H. *Aedes aegypti* antiviral adaptive response against DENV-2. *Dev Comp Immunol*. 2018 Jul;84:28-36.

SEYMOUR, C.; PERALTA, P.H.; MONTGOMERY, G.G. Serologic evidence of natural togavirus infections in Panamanian sloths and other vertebrates. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 32(4), 854–861, 1983.

SIM S, JUPATANAKUL N, DIMOPOULOS G. Mosquito immunity against arboviruses. *Viruses*. 2014 Nov 19;6(11):4479-504.

SIMON, P. Q-Gene: Processing quantitative real-time RT-PCR data. *Bioinformatics*, v. 19, n. 11, p. 1439–1440, 2003.

SHELLY, S.; LUKINOVA, N.; BAMBINA, S.; BERMAN, A.; CHERRY, S. Autophagy Is an Essential Component of *Drosophila* Immunity against Vesicular Stomatitis Virus. *Immunity* 2009, 30, 588–598.

SLEGGERS, C.A.; KEUTER, M.; GUNTHER, S.; SCHMIDT-CHANASIT, J.; VAN DER VEN, A.J.; DE MAST, Q. Persisting arthralgia due to Mayaro virus infection in a traveler from Brazil: is there a risk for attendants to the 2014 FIFA world cup? *J. Clin. Virol.* 60(3), 317–319 (2014).

SMITH, G. C.; FRANCY, D. B. Laboratory studies of a Brazilian strain of *Aedes albopictus* as a potential vector of Mayaro and Oropouche viruses. *J Am Mosq Control Assoc*, v. 7, n. 1, p. 89-93, Mar 1991.

SMITH, D. L., K. E. BATTLE, S. I. HAY, C. M. BARKER, T. W. SCOTT AND F. E. MCKENZIE. Ross, macdonald, and a theory for the dynamics and control of mosquito-transmitted pathogens. *PLoS Pathog*, v. 8, n. 4, e1002588, 2012.

- SOUZA-NETO, J.A.; SIM, S.; DIMOPOULOS, G. An evolutionary conserved function of the JAK-STAT pathway in anti-dengue defense. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 106, p. 17841–17846, 2009.
- STANAWAY, J. D. *et al.* The global burden of dengue: an analysis from the Global Burden of Disease Study 2013. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 3099, n. 16, p. 1–12, 2016.
- TAKKEN, W.; VERHULST, N. O. Host Preferences of Blood-Feeding Mosquitoes. *Annual Review of Entomology*, v. 58, n. 1, 2011.
- TALARMIN, A.; CHANDLER, L.J.; KAZANJI, M. *et al.* Mayaro virus fever in French Guiana: isolation, identification, and seroprevalence. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 59(3), 452–456, 1998.
- TERRADAS G, JOUBERT DA, MCGRAW EA. The RNAi pathway plays a small part in *Wolbachia*-mediated blocking of dengue virus in mosquito cells. *Sci Rep.* 2017 Mar 6;7:43847.
- TESH, R. B. *et al.* Mayaro virus disease: an emerging mosquito-borne zoonosis in tropical South America. *Clin. Infect. Dis.* 28, 67–73 (1999).
- THEILACKER, C.; HELD, J.; ALLERING, L.; EMMERICH, P.; SCHMIDT-CHANASIT, J.; KERNWV; *et al.* Prolonged polyarthralgia in a German traveller with Mayaro virus infection without inflammatory correlates. *BMC Infect Dis*, v. 13, p. 369, 2013.
- TORRES, J.R.; RUSSELL, K.L.; VASQUEZ, C. *et al.* Family cluster of Mayaro fever, Venezuela. *Emerg. Infect. Dis.* 10(7), 1304–1306, 2004.
- TSAI CW, MCGRAW EA, AMMAR ED, DIETZGEN RG, HOGENHOUT SA. *Drosophila melanogaster* mounts a unique immune response to the Rhabdovirus sigma virus. *Appl Environ Microbiol* 74: 3251–3256; 2008.
- VAN DEN HURK, A. F. *et al.* Impact of *Wolbachia* on infection with chikungunya and yellow fever viruses in the mosquito vector *Aedes aegypti*. *PLoS neglected tropical diseases*, v. 6, n. 11, p. e1892, jan. 2012.
- VIEIRA, C. J.; SILVA, D.J.; BARRETO, E. S.; SIQUEIRA, C. E.; COLOMBO, T. E.; OZANIC, K.; SCHMIDT, D. J.; DRUMOND, B. P.; MONDINI, A.; NOGUEIRA, M. L.; BRONZONI, R.V. Detection of Mayaro virus infections during a dengue outbreak in Mato Grosso, Brazil. *Acta Trop.* 2015
- VILLEGAS LEM, CAMPOLINA TB, BARNABE NR, ORFANO AS, CHAVES BA, NORRIS DE, PIMENTA PFP, SECUNDINO NFC. Zika virus infection modulates the bacterial diversity associated with *Aedes aegypti* as revealed by metagenomic analysis. *PLoS One.* 2018 Jan 2;13(1):e0190352.
- VORONIN D, COOK DA, STEVEN A, TAYLOR MJ. Autophagy regulates *Wolbachia* populations across diverse symbiotic associations. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012 Jun 19;109(25):E1638-46.

- WALKER, T. *et al.* The *wMel* *Wolbachia* strain blocks dengue and invades caged *Aedes aegypti* populations. *Nature*, v. 476, n. 7361, p. 450–453, 2011.
- WATTS, D. M., D. S. BURKE, B. A. HARRISON, R. E. WHITMIRE AND A. NISALAK. Effect of temperature on the vector efficiency of *Aedes aegypti* for dengue 2 virus. *Am J Trop Med Hyg*, v. 36, n. 1, p. 143-152, 1987.
- WEAVER, S. C. Host range, amplification and arboviral disease emergence. *Archives of virology. Supplementum*, n. 19, p. 33–44, 2005.
- WERREN, J. H.; BALDO, L.; CLARK, M. E. *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology. *Nature reviews. Microbiology*, v.6, n. 10, p. 741–51, out. 2008.
- WONG, Z. S. *et al.* *Wolbachia*-Mediated Antibacterial Protection and Immune Gene Regulation in *Drosophila*. *PLoS ONE*, v. 6, n. 9, p. e25430, 29 set. 2011.
- WHO, W. H. O. Dengue Guidelines for Diagnosis, treatment, prevention and control. WHO, 2009
- WU M, SUN LV, VAMATHEVAN J, *et al.*, Phylogenomics of the reproductive parasite *Wolbachia pipientis wMel*: a streamlined genome overrun by mobile genetic elements. *PLoS Biol.* 2004 Mar;2(3):E69.
- XI, Z.; RAMIREZ, J.L.; DIMOPOULOS, G. The *Aedes aegypti* Toll pathway controls dengue virus infection. *PLoS Pathog.*, v. 4, p. 1000098, 2008.
- YEAP, H. L. *et al.* Dynamics of the “popcorn” *Wolbachia* infection in outbred *Aedes aegypti* informs prospects for mosquito vector control. *Genetics*, v. 187, n. 2, p. 583–95, mar. 2011.
- ZAMBON, R.A.; NANDAKUMAR, M.; VAKHARIA, V.N.; WU, L.P. The Toll pathway is important for an antiviral response in *Drosophila*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, v. 102, p. 7257–7262, 2005.
- ZUG, R.; HAMMERSTEIN, P. Still a host of hosts for *Wolbachia*: analysis of recent data suggests that 40% of terrestrial arthropod species are infected. *PloS one*, v. 7, n. 6, p. e38544, jan. 2012.