

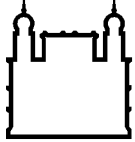
MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Programa de Pós-Graduação Biologia Parasitária

**ESTUDO DA TRANSMISSÃO VERTICAL E TRANSMISSÃO VENÉREA DO VÍRUS  
ZIKA EM MOSQUITOS *Aedes Aegypti***

**STÉPHANIE SILVA CAMPOS**

Rio de Janeiro  
Abril de 2017



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária**

*Stéphanie Silva Campos*

ESTUDO DA TRANSMISSÃO VERTICAL E VENÉREA DO VÍRUS ZIKA EM  
MOSQUITOS *AEDES AEGYPTI*.

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo  
Cruz como parte dos requisitos para obtenção do  
título de Mestre em Biologia Parasitária.

**Orientador :** Prof. Dr. Ricardo Lourenço de Oliveira

**RIO DE JANEIRO**

Abril de 2017

Campos, Stéphanie Silva.

Estudo da transmissão vertical e venérea do vírus Zika em mosquitos *Aedes aegypti* / Stéphanie Silva Campos. - Rio de Janeiro, 2017.  
87 f.; il.

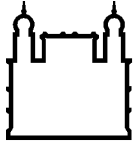
Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2017.

Orientador: Ricardo Lourenço de Oliveira.

Bibliografia: Inclui Bibliografias.

1. Zika vírus. 2. transmissão venérea em *Aedes aegypti*. 3. transmissão vertical em *Aedes aegypti*. I. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Manguinhos/ICICT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária**

***AUTOR: STÉPHANIE SILVA CAMPOS***

**Estudo da transmissão vertical e transmissão venérea do vírus Zika em  
mosquitos *Aedes aegypti*.**

**ORIENTADOR: Prof. Dr. Ricardo Lourenço de Oliveira**

**Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_**

**EXAMINADORES:**

**Profa Dra – Denise Valle- IOC/FIOCRUZ – Presidente e revisora**

**Profa. Dra. Flavia Barreto- IOC/FIOCRUZ**

**Prof. Dr. Pedro Lagerblad Oliveira- UFRJ**

**Prof. Dr. Ieda Pereira Ribeiro- IOC /FIOCRUZ**

Rio de Janeiro, 28 de abril de 2017.

## **AGRADECIMENTOS**

Seria impossível realizar um projeto de mestrado sozinha. Conteí com a ajuda de muitas pessoas e por isso, não conseguiria nomear todos nesse trabalho. Contudo, alguns merecem destaque seja por terem me auxiliado de forma ativa em experimentos ou por simplesmente terem entrado e feito diferença na minha vida.

E por isso, agradeço meus colegas de mestrado (ou como nos chamamos “molusqueiros templários”) pelos momentos prazerosos durante as disciplinas e seminário discente.

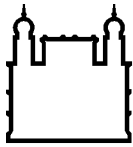
A todos do LATHEMA pelo apoio e carinho ao longo desses anos, em especial às minhas amigas Iule, Rafaela, Maria Clara, Tacilaine e Anielly. Um agradecimento especial também para Dra Marcia Castro.

Aos meus irmãos de orientação Felipe, Dinair, Keli e em especial, Rosilayne, pelo companheirismo, ajuda em experimentos e ensinamentos importantes para meu crescimento profissional e pessoal.

Ao meu melhor amigo, confidente e namorado, Victor pelos momentos felizes e por sempre me incentivar.

E por último, um agradecimento com muito carinho, aos que eu considero os principais responsáveis por essa conquista: meu orientador Ricardo Lourenço e minha mãe, Regina. Os dois acreditaram em mim quando nem eu mesma acreditava. E por isso, fui capaz de vencer a maior batalha da minha vida e realizar um sonho.

**“A felicidade é como a borboleta:  
quando a perseguimos nos escapa;  
quando desistimos de segui-la,  
pousa em nós.”**



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### ESTUDO DA TRANSMISSÃO VERTICAL E TRANSMISSÃO VENÉREA DO VÍRUS ZIKA EM MOSQUITOS *Aedes Aegypti*.

#### RESUMO

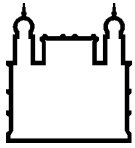
#### DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

**Stéphanie Silva Campos**

O vírus Zika (ZIKV) é um flavivírus cujo principal vetor é o mosquito *Aedes aegypti*. É transmitido principalmente pela picada de fêmeas do mosquito quando apresentam partículas virais infectantes na saliva, uma via conhecida como transmissão horizontal. No entanto, a transmissão vertical (progenitora infectada gera prole infectada) e a transmissão sexual ou venérea (o vírus é passado através da cópula), também são possíveis entre mosquitos. Estas últimas são apontadas como um mecanismo de manutenção viral na natureza no período entre epidemias. A variação da frequência dessas rotas parece ser grande e estar ligada a inúmeros fatores, desde o vírus, espécie e população do vetor até condições ambientais. Analisando a importância do conhecimento dos diferentes aspectos da dinâmica da transmissão do ZIKV, e considerando a falta de estudos sobre as vias de transmissão vertical e venérea deste vírus, este trabalho tem como objetivo avaliar a ocorrência dessas vias em mosquitos *Ae aegypti* infectados com ZIKV. Para isso, inicialmente, fêmeas do mosquito *Ae aegypti* de diferentes localidades (Urca, Manginhos e Goiânia) foram infectadas oralmente usando diferentes cepas de ZIKV. Além da cepa viral e da população de mosquito, nos ensaios de transmissão vertical houve variação no tempo entre a alimentação sanguínea infectante e a alimentação sanguínea não infectante, destinada a estimular a desova (10 e 14 dias após infecção). Também variaram as condições em que as desovas foram recolhidas - individualmente ou em conjunto de ovos - e a forma como foi examinado o tempo de vida da prole (*pool* ou individual). Nos ensaios de transmissão venérea, as principais variações testadas

foram as populações de mosquito, as cepas virais utilizadas para infecção das fêmeas, as condições de manutenção dos adultos - alimentação em conjunto em uma mesma solução açucarada ou não, e o tempo de cruzamento entre machos e fêmeas infectadas oralmente ou fêmeas não infectadas. A infecção não provocou diferenças significativas entre as taxas de postura de eclosão. Um *pool* de cinco machos filhos, dentre 574 fêmeas e 526 machos (organizados em *pool* de 2 ou 5 indivíduos) de fêmeas infectadas se mostrou positivo por análise de RT-qPCR. Alinhamento das sequências nucleotídicas da amostra viral usada para infecção das mães e da amostra recuperada da prole infectada revelou mutações nos genes que codificam as proteínas NS2B e NS2A, com substituição de aminoácido nesse último. Em relação à transmissão venérea, foram detectadas partículas virais em três machos de diferentes experimentos de acasalamento com fêmeas infectadas. Através do alinhamento das sequências genômicas do ZIKV obtido de um desses machos, juntamente com amostra original usada para infecção das fêmeas e RNA viral isolado de fêmeas infectadas, apontou alterações no gene que codifica a proteína E apenas no macho. Concluimos que, experimentalmente, as transmissões vertical e venérea ocorrem no par *Ae aegypti* – vírus ZIKA, ainda que com frequência relativamente baixa.





Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### STUDY OF VERTICAL TRANSMISSION AND SEXUAL TRANSMISSION OF ZIKA VIRUS IN MOSQUITOES AEDES AEGYPTI

#### ABSTRACT

#### MASTER DISSERTATION IN BIOLOGIA PARASITARIA

Stéphanie Silva Campos

The Zika virus (ZIKV) is a flavivirus whose main vector is the mosquito *Aedes aegypti*. It is mainly transmitted by the bite of mosquito females presenting infectious viral particles in the saliva, a route known as horizontal transmission. However, vertical transmission (infected parent generates infected offspring) and sexual or venereal transmission (the virus is passed through copulation) are also possible among mosquitoes. The latter are noted as a viral maintenance mechanism in nature in the period between epidemics. The frequency variation of these routes seems to be high and to be linked to numerous factors ranging from virus, species and vector's population to environmental conditions. Analyzing the importance of the knowledge about different aspects of ZIKV transmission dynamics, and the lack of studies regarding vertical and venereal transmission of this virus, this study aims to evaluate the occurrence of these pathways in *Ae aegypti* mosquitoes infected with ZIKV. To achieve this goal, initially *Ae aegypti* mosquito females from diverse locations (Urca, Manguinhos and Goiânia) were orally infected using different strains of ZIKV. In addition to the viral strain and mosquitoes population, in the vertical transmission assays variations were also included regarding the time lag between the infectious and the subsequent noninfectious blood meals, the last aiming to stimulate oviposition (10 and 14 days per infection). Variations were also included in the collection conditions of the oviposited eggs - individually or in pools, and in the way the offspring lifetime was examined (in pool or individual eggs). Regarding venereal transmission assays, the main tested variations were the mosquitoes population, the viral strains used for females' infection, the rearing adult conditions - sugar feeding solution offered to a pool of mosquitoes or not, the time of crossing between males and orally infected and / or uninfected females. There were no significant differences in oviposition and hatching rates of infected and uninfected groups. A pool of five males in 574 females and 526 males (organized in pools of 2 or 5 individuals), offspring of infected females, was positive by RT-qPCR analysis. Alignment of the

nucleotide sequences of the virus used for mothers' infection and the recovered infected offspring revealed mutations in the NS2B and NS2A coding genes, leading to amino acid substitution in the latter. In relation to the venereal transmission, Zika virus particles were detected in three males arising from different experiments of mating with infected females. Through the genomic sequences alignment of the virus obtained from one of these males with the original samples, employed to infect the females used in the insemination assays and genomic virus from females infected was identified changes in proteins E. We conclude that, experimentally, both vertical and venereal transmissions occur in the *Ae aegypti* - ZIKA virus, albeit with relatively low frequency.

## ÍNDICE

<b>RESUMO</b>	<b>4</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>6</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>14</b>
<b>1.1 Arboviroses</b> .....	<b>14</b>
1.1.1 Interação Vírus Vetor.....	15
<b>1.2. Transmissão Transovariana e Venérea</b> .....	<b>21</b>
<b>1.3 Vetor Aedes aegypti</b> .....	<b>23</b>
<b>1.4 Zika vírus</b> .....	<b>26</b>
<b>2. OBJETIVO</b>	<b>30</b>
<b>2.1 Objetivo Geral</b> .....	<b>30</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>31</b>
<b>3.1 Mosquitos</b> .....	<b>31</b>
<b>3.2 CEPAS VIRAIS</b> .....	<b>33</b>
<b>3.3 Transmissão vertical</b> .....	<b>35</b>
<b>3.4 Transmissão venérea</b> .....	<b>42</b>
<b>3.6 Maceração</b> .....	<b>48</b>
<b>3.7 Plaqueamento</b> .....	<b>48</b>
<b>3.8 Extração de RNA</b> .....	<b>49</b>
<b>3.9 RT- qPCR</b> .....	<b>49</b>
<b>3.10 Sequenciamento</b> .....	<b>50</b>
<b>3.11 Análise Estatística</b> .....	<b>51</b>
<b>4 RESULTADOS</b>	<b>52</b>
<b>4.1 Taxa da transmissão vertical</b> .....	<b>52</b>
<b>4.2 Taxa de postura e eclosão de ovos</b> .....	<b>53</b>
<b>4.3 Taxa de infecção venérea</b> .....	<b>55</b>
<b>4.4 Sequenciamento</b> .....	<b>57</b>
<b>5. DISCUSSÃO</b>	<b>58</b>

<b>6. CONCLUSÕES</b>	<b>64</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>65</b>
<b>8. APÊNDICE</b>	<b>80</b>
<b>8.1 Tabela qRT-PCR das cabeças fêmeas dos ensaio 2 e 3.....</b>	<b>80</b>
<b>8.2 Resultado da RT-PCR do pool de macho positivo do ensaio 1 .....</b>	<b>81</b>
<b>8.3 Tabela dos ovos de <i>Aedes aegypti</i> da Urca (F2) de fêmeas infectadas e não infectadas pelo ZIKV RioS1. ....</b>	<b>81</b>
<b>8.4 Tabela do resultado da qRT-PCR das fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> Urca (F2) e Goiânia(F2) .....</b>	<b>82</b>
<b>8.5 Tabela do resultado da RT-PCR dos machos e solução açucarada do ensaio 4.....</b>	<b>83</b>
<b>8.6 Tabelas do resultado da qRT-PCR das fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> do ensaio 5 (ZIKV Rio U1 e ZIKV PE243). ....</b>	<b>84</b>
<b>8.7 Tabela do resultado da qRT-PCR macho postívio de <i>Aedes aegypti</i> do ensaio 5. ....</b>	<b>86</b>
<b>8.8 Alinhamento ZIKV Rio-S1 x prole <i>Aedes aegypti</i> (ensaio 1) .....</b>	<b>86</b>
<u>    <b>8.9 Alinhamento Zikv Rio-U1 X Macho <i>Aedes Aegypti</i> Infectado Sexualmente X Fêmeas Infectadas Oralmente (Ensaio 4).....</b></u>	<b>87</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1: Demonstração esquemática dos ciclos do vírus dengue, que exemplifica essencialmente os possíveis ciclos de um arbovírus transmitido por mosquito. Fonte: Vasilakis et al. (2011)..... 15
- Figura 2: Interação entre elementos bióticos e abióticos na dinâmica do ciclo de um arbovírus. Cortesia de A-B Failloux. .... 16
- Figura 3: Criação de larvas de *Ae aegypti* em insetário (LATHEMA). A=larvas em bacia plástica contendo água desclorada e levedura de cerveja. B= larvas e pupas de *Ae aegypti*..... 33
- Figura 4: Placa de 24 poços utilizada para inoculação para titulação viral. Os focos presentes em alguns poços sinalizam a presença viral, uma vez que o vírus destrói as células. Fonte: cortesia de Myrna Bonaldo (LABMOF-IOC).... 34
- Figura 5: Mosquitos contidos em gaiolas plásticas de fundo móvel com acesso à alimentação sanguínea virêmica (disponível na câmara interna).....36
- Figura 6: Esquema do ensaio 1: *Aedes aegypti*-Manguinhos (F>10) - ZIKV S1. Dpe = dias após emergência do adulto..... 38
- Figura 7: Esquema do ensaio 2: *Aedes aegypti* – Urca (F2) - ZIKV U1. Dpe= dias após a emergência de adulto. ....39
- Figura 8: Esquema do ensaio 3: *Aedes aegypti*-Urca (F2) - ZIKV S1. Dpe = dias após emergência do adulto..... 40
- Figura 9: Esquema do ensaio 4 - *Aedes aegypti* da Urca (F2) e *Aedes aegypti* Goiânia (F2) – ZIKV Rio-U1..... 44
- Figura 10: Esquema ensaio 5 - *Aedes aegypti* –Urca (F2) - ZIKV Rio-U1 e ZIKV PE243..... 45
- Figura 11: Total de ovos postos de acordo com a natureza das fêmeas de *Ae aegypti* (Urca) desafiadas oralmente com ZIKV Rio-S1 (Ensaio3). Em cada amostra, a barra horizontal indica a mediana..... 54
- Figura 12: Taxa de eclosão de ovos postos por fêmeas de *Ae aegypti* da Urca, desafiadas oralmente com ZIKV Rio-S1 (ensaio 3). Em cada grupo, a barra horizontal indica a mediana..... 55

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1: denominação do lote de acordo com o dpc de cada grupo de fêmea<sup>46</sup>**

**Tabela 2: Taxa de disseminação e infecção, respectivamente, das fêmeas de *Aedes aegypti* progenitoras desafiadas oralmente com ZIKV e de suas proles, estas examinadas com 5, 7 e 11 dias após emergência dos adultos. As progenitoras são oriundas de duas populações, Manguinhos e Urca, desafiadas com as cepas Rio-S1 e Rio-U1. As desovas foram coletadas em diferentes intervalos após o desafio oral com ZIKV (dpi). Os corpos (abdome + tórax) da prole foram analisados em *pool* e/ou individualmente por RT-qPCR, após passagem por cultura de células Vero, para determinar a taxa de infecção. O mesmo foi feito com as cabeças das progenitoras (taxa de disseminação). .....53**

**Tabela 3: Número total e mediana de ovos postos e de eclosões de acordo com a natureza das fêmeas de *Ae aegypti* (Urca) desafiadas oralmente com ZIKV Rio-S1 (ensaio 3). .....54**

**Tabela 4: Taxa de infecção de machos e fêmeas de *Ae aegypti* da Urca (UR) e Goiânia (GO). Machos virgens ficaram em contato por 5 dias com fêmeas das respectivas populações, que haviam sido infectadas, 10 dias antes, por via oral com ZIKV cepa Rio-U1 (ensaio 4). .....56**

**Tabela 5: Taxas de infecção e disseminação de ZIKV em fêmeas de *Ae aegypti* da Urca (UR) desafiadas com diferentes isolados, de acordo com o lote. O 1º lote foi desafiado oralmente com ZIKV Rio-U1 e PE243 e examinado com 14 dpi, quando as fêmeas cruzaram com machos virgens (mostrados nas colunas 'macho'). Os lotes 2 a 5 correspondem a fêmeas virgens e não infectadas que tiveram contato com esses machos em diferentes períodos. As taxas de infecção e de inseminação dessas fêmeas foram determinadas no 14º dpc. A taxa de infecção de machos foi determinada em 14 dpc (Urca – F2) (ensaio 5). .....57**

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Ae	Aedes
ATP	adenosina trifosfato
CDC	Centro de Controle e Prevenção de Doenças
CEP	Condições ambientais padrão
CHIKV	chikungunya vírus
CMC	carboximetilcelulose
CT	<i>cycle threshold</i>
DENV	dengue vírus
dpc	dia após o início da cópula
dpe	dia após emergência do adulto
dpi	dia após infecção
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
F>10	acima de 10 gerações da colônia criada em insetário
F2	segunda geração da colônia criada em insetário
IMD	<i>Immune Deficiency</i>
iRNA	<i>interference RNA</i>
JAK-STAT	<i>Janus kinase signal transducer and activation of transcription</i>
MAN	Manguinhos
MEB	<i>Midgut Escape Barrier</i>
MEX	México
MIB	<i>Midgut Infection Barrier</i>
miRNA	microRNA
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Tampão fosfato-salino
PCR	Polymerase chain reaction
PFU	unidade formadora de placa
qPCR	<i>quantitative Polymerase chain reaction</i>

Rpm	rotação por minuto
RT- PCR	<i>reverse transcriptase Polymerase chain reaction</i>
TB	<i>Transmission Barrier</i>
UR	Urca
ZIKV	Zika vírus



# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Arboviroses

Arboviroses são infecções virais ocasionadas por arbovírus. A palavra arbovírus é resultante da expressão na língua inglesa *arthropod-borne virus*, que se refere aos vírus mantidos na natureza por propagação biológica entre um hospedeiro vertebrado e um artrópode de hábito hematofágico (Higgs e Beaty, 2004). Assim, esta categoria de vírus tem o desafio de infectar hospedeiros muito díspares, capazes de se replicar em distintos tipos celulares, em diferentes temperaturas corporais e de interagir com variados sistemas bioquímicos e moleculares. Dessa forma, ambos os hospedeiros (vertebrado e invertebrado) são reservatórios destes arbovírus. No caso de hospedeiros susceptíveis ou permissivos, os arbovírus podem se manter temporariamente ou mesmo durante todo o resto da existência pós-infecção. O primeiro caso corresponde aos vertebrados, que, geralmente, após a produção de anticorpos neutralizantes, limitam a existência do arbovírus em seu organismo. No segundo caso, os artrópodes, já que a partir do momento em que o indivíduo estiver infectante para o arbovírus, assim permanecerá por toda a vida (Kramer, 2016). Durante a infecção, permanente ou transitória, no invertebrado ou vertebrado, ocorre interação complexa arbovírus-hospedeiro, que depende de fatores bióticos e abióticos. Dentre os primeiros, destacam-se a genética do vírus e do hospedeiro e, no segundo, a temperatura. A perpetuação de dado arbovírus no ecossistema depende de dinâmica na qual o comportamento alimentar do artrópode vetor, a sazonalidade de sua densidade populacional, as condições climáticas e outros fatores que influenciam a sua longevidade e metabolismo são cofatores (Marquardt, 2004; Diaz *et al*, 2012; Kramer, 2016).

De acordo com o Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos (CDC, 2010), há pelo menos 530 arbovírus identificados, dos quais cerca de 100 são responsáveis por infecção e/ou doenças em humanos. Dentre os principais gêneros de arbovírus responsáveis por enfermidades humanas estão: *Flavivirus*, *Alphavirus*, *Orthobunyavirus* e *Phlebovirus*.

As arboviroses mais importantes, do ponto de vista da saúde pública, são aquelas transmitidas por mosquitos, cujos agentes provocam viremia e/ou sintomas em seres humanos (Gubler e Roehring, 1998). Em função das necessidades

ambientais de seus vetores, as arboviroses se concentram em grande parte nas áreas tropicais do planeta (Karabatsos, 1985; Gubler, 1996).

### 1.1.1 Interação Vírus Vetor

As arboviroses são essencialmente zoonoses, em que animais não humanos, como aves e outros primatas, por exemplo, participam da transmissão juntamente com mosquitos, em ciclos silvestres, rurais e/ou urbanos (Karabatsos, 1985; Vasilakis e Weaver, 2011) (Figura 1). Em alguns casos, arbovírus podem se adaptar a vetores sinantrópicos e passarem a ser mantidos em ambiente modificado, onde, na ausência de outros reservatórios humanos é a fonte de infecção para mosquitos. Este é o caso das epidemias urbanas do vírus da dengue e chikungunya, por exemplo, nas Américas (Gubler, 2002).

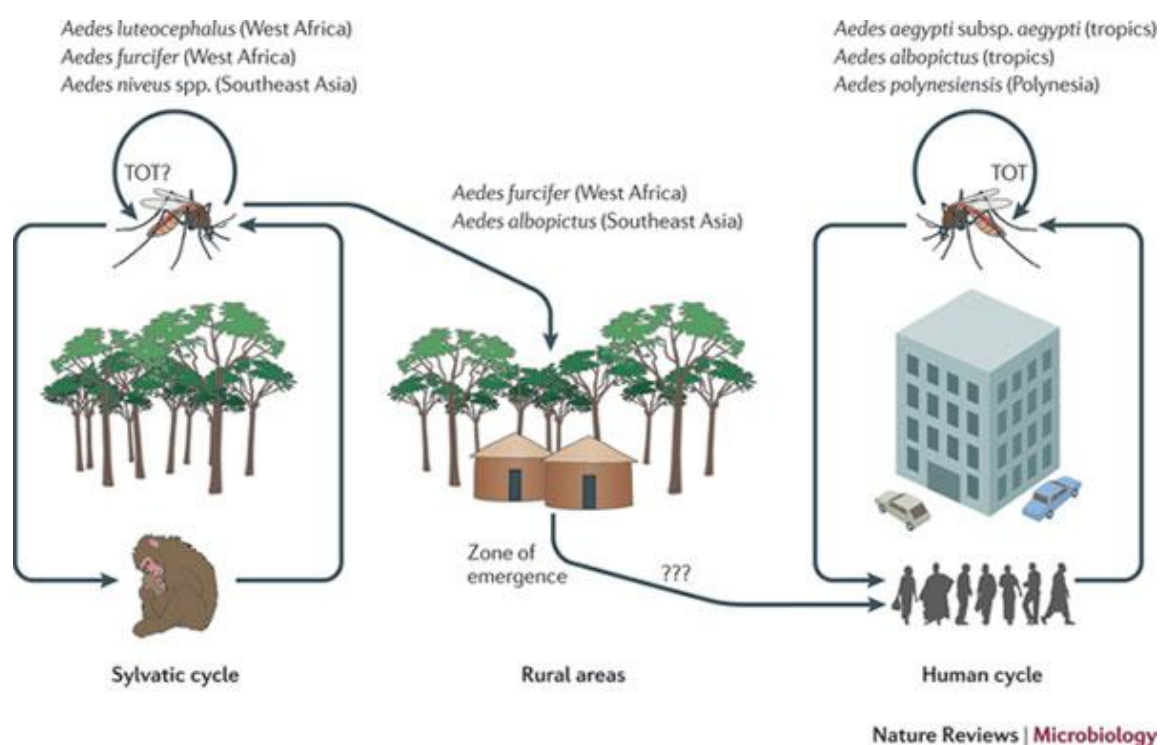
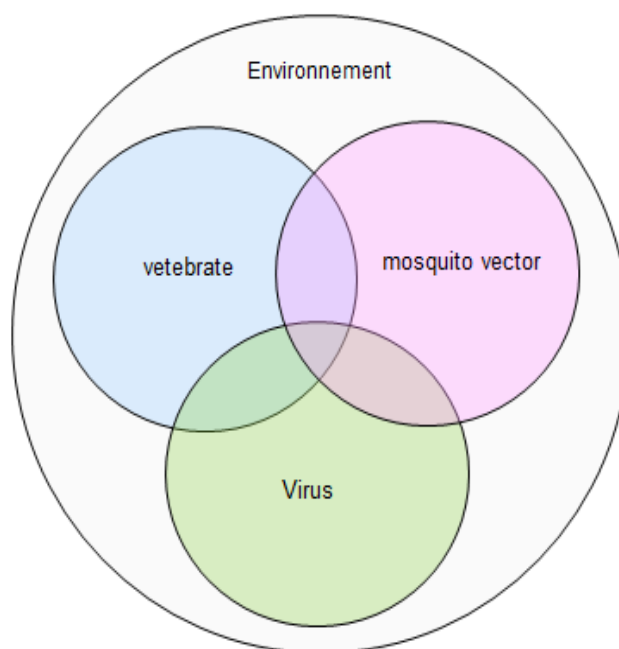


Figura 1: Demonstração esquemática dos ciclos do vírus dengue, que exemplifica essencialmente os possíveis ciclos de um arbovírus transmitido por mosquito. Fonte: Vasilakis *et al.* (2011).

A dinâmica do ciclo de um arbovírus na natureza envolve a interação entre o vírus, o hospedeiro vertebrado, o vetor e o ambiente (Diaz *et al.*, 2012) (Figura 2). Neste último, a temperatura, a umidade relativa do ar e o tipo de ocupação e uso humanos do espaço exercem forte influência sobre tal dinâmica. Uma vez que os

mosquitos são seres exotérmicos, a temperatura ambiente influenciará diretamente o seu metabolismo e a velocidade de replicação do vírus em seu organismo. Normalmente, quanto mais baixa a temperatura, mais lentas são a replicação e a disseminação do vírus. Nem sempre, porém, a temperatura exerce influência idêntica na transmissão de vírus distintos, uma vez que, juntamente com esse fator abiótico, as genéticas, tanto do vírus quanto do hospedeiro invertebrado, regem, em conjunto, o fenômeno. Ao mesmo tempo, já se observou que a disseminação e a capacidade de transmissão de certos arbovírus são menores quando os insetos são mantidos de forma constante em temperaturas relativamente altas (28° C), em comparação com aqueles que sofrem variações circadianas de temperatura (Carrington *et al.*, 2013).



**Figura 2:** Interação entre elementos bióticos e abióticos na dinâmica do ciclo de um arbovírus. Cortesia de A-B Failloux.

Depois do repasto em um vertebrado virêmico, a transmissão pela picada de um mosquito somente é possível após um período de replicação (no estômago) e disseminação das partículas virais no seu organismo (tecidos como glândula salivar). Neste sentido, como será descrito à frente, a longevidade e a probabilidade de sobrevivência diária de um mosquito exercem influência decisiva na dinâmica de transmissão. Por sua vez, longevidade e taxa de sobrevivência diária dependem obviamente de fatores bióticos, mas também das condições ambientais. Neste aspecto, o custo biológico da resistência a inseticidas, a variabilidade genética e as

condições de nutrição da população do mosquito estão entre exemplos dos primeiros, enquanto a umidade relativa e o uso do ambiente por humanos destacam-se entre os últimos (Lourenço-de-Oliveira, 2015 a). A transmissão de agentes infecciosos por artrópodes vetores se dá por duas formas: mecânica e biológica (Higgs e Beaty, 2004). A transmissão mecânica consiste na transferência do agente infeccioso pelo artrópode de forma física. Na transmissão biológica, o microrganismo infecta o hospedeiro invertebrado, se reproduz e/ou se desenvolve em diferentes estádios de vida, podendo então ser transmitido a um hospedeiro vertebrado (Higgs e Beaty, 2004). No caso de culicídeos vetores, o processo de transmissão biológica de parasitos ao hospedeiro vertebrado ocorre via alimentação sanguínea realizada exclusivamente pelas fêmeas (Consoli e Lourenço-de-Oliveira, 1994; Clements, 1999). Os arbovírus são transmitidos biologicamente para vertebrados.

Assim, ao ingerir sangue virêmico, as partículas virais se aderem à membrana plasmática das células epiteliais do estômago do vetor, onde irão invadir e se replicar nestes tipos celulares. Os mecanismos que afetam a capacidade dos vírus de infectar estas células compõem a chamada barreira de infecção do intestino (MIB – *Midgut Infection Barrier*). Essa replicação é normalmente restrita a um determinado período, específico para cada arbovírus. Em populações suscetíveis do vetor, após escapar da barreira do intestino médio, o vírus ganha a hemolinfa ou a rede de traqueíolas e traqueias que oxigenam diversos órgãos, infectando tecidos secundários: corpo gorduroso, tecido nervoso, sistema reprodutor e glândula salivar. Em outras palavras, o vírus vence a barreira de escape do intestino (*MEB – Midgut Escape Barrier*) e se dissemina. Uma vez instalada a infecção fora do estômago, o mosquito permanece infectado pelo resto de sua vida. Nos mosquitos não susceptíveis, as partículas virais não ultrapassam a barreira intestinal e a infecção fica restrita ao estômago, situação em que o mosquito está infectado, porém não é infectante. Por fim, para chegar a ser expelido junto à saliva do mosquito durante a hematofagia, o vírus deve vencer a barreira de transmissão (*TB – Transmission Barrier*) presente na glândula salivar do animal (Hardly *et al.*, 1983; Girard *et al.*, 2004; Higgs e Beaty, 2004; Halstead, 2008). Neste caso, diz-se que haverá transmissão horizontal. Esse ciclo viral no vetor é fortemente influenciado pela temperatura, como demonstrado em trabalhos com mosquitos infectados pelo vírus dengue: verificou-se que exposição a temperaturas elevadas, acelera a chegada do vírus às glândulas salivares do inseto (Lambrechts *et al.*, 2011). As barreiras de infecção e barreiras de

escape do intestino citadas anteriormente estão diretamente ligadas à competência vetorial de mosquitos vetores (Gubler *et al*,1998; Bosio *et al*,1998).

Denomina-se competência vetorial a susceptibilidade de uma população de inseto vetor ao parasito (Hardy, Houk *et al.*, 1983; Black e Severson, 2005). Como a infecção do vírus no mosquito evolui no tempo e espaço (tecidos primário e secundário de replicação), a competência vetorial é quantificada igualmente segundo as etapas. Assim, a taxa de infecção, determinada a partir de tecidos do abdome ou abdome + tórax (corpo), por exemplo, corresponde ao percentual de indivíduos infectados dentre o número de indivíduos desafiados oralmente pelo vírus a partir de um repasto sanguíneo, decorridos alguns dias do repasto. A taxa de disseminação, geralmente determinada a partir de triturados das patas, asas ou cabeça dos insetos testados, corresponde ao percentual de mosquitos positivos nestes tecidos dentre aqueles que tinham o corpo positivo. Por último, a taxa de transmissão corresponde à proporção de indivíduos com a saliva positiva dentre aqueles em que o vírus foi capaz de se disseminar (Vega-Rúa *et al.*, 2014).

O período compreendido entre a ingestão de sangue infectado e o aparecimento do vírus na saliva e a sua transmissão para outro hospedeiro vertebrado se denomina período de incubação extrínseco. O tempo decorrido desde a exposição ao vírus até o aparecimento dos primeiros sintomas no hospedeiro vertebrado é chamado de período de incubação intrínseco (Higgs e Beaty, 2004).

Naturalmente, os insetos estão expostos a diversos agentes infecciosos como fungos, protozoários, bactérias e vírus. Objetivando combater a invasão desses microrganismos, os insetos desenvolveram diferentes mecanismos de defesa, que vão desde barreiras morfológicas (cutícula e matriz peritrófica) a respostas mediadas por componentes celulares (encapsulação e fagocitose) e humorais (melanização e peptídeos antimicrobianos) (Marquardt, 2004; Lemaitre e Hoffmann, 2007). As respostas imunológicas dos insetos advêm do sistema imune inato, já que os invertebrados não possuem memória imunológica, impossibilitando o desenvolvimento da imunidade adquirida (Lemaitre e Hoffmann, 2007).

Mosquitos estão sujeitos a desafios de grande variedade de microrganismos devido aos seus habitat e hábitos alimentares. No estágio larvar, mosquitos ingerem uma série de microrganismos em suspensão ou depositados no fundo de seus criadouros, ao passo que as fêmeas adultas, durante a ingestão de sangue, podem adquirir infecções por bactéria, helmintos, vírus e protozoários. O sistema imune

inato desses animais possui mecanismos capazes de distinguir diferentes classes de agentes infecciosos e combatê-los (Dimopoulos, 2003; Lemaitre e Hoffmann, 2007). Em mosquitos, estudos mostram que as vias Toll, Imd (*Immune Deficiency*) e JAK-STAT (*Janus kinase signal transducer and activation of transcription*) estão envolvidas na produção de peptídeos antimicrobianos conferindo proteção contra fungos, bactérias, protozoários e vírus (Shin *et al.*, 2005; Antonova *et al.*, 2009; Garver *et al.*, 2009; Souza-Neto *et al.*, 2009; Magalhaes *et al.*, 2010; Sim e Dimopoulos, 2010; Carvalho-Leandro *et al.*, 2012).

Sabe-se que, durante a digestão sanguínea, o tubo digestivo do inseto, em especial o estômago (ou intestino médio), tecido primário de replicação viral, abriga grande amplificação da flora bacteriana. Decorre uma resposta imune que de alguma forma interfere com a replicação viral. Insetos tratados com antibióticos tendem a apresentar maior carga viral no organismo e maior proporção de disseminação viral, o que é atribuído à importante atuação da microbiota intestinal na inibição do desenvolvimento de patógenos - como o vírus da dengue - por meio da modulação do sistema imune do mosquito ou da produção de moléculas antimicrobianas. A microbiota está ligada à competência vetorial, em função de seu importante papel na permissividade da infecção de um determinado microrganismo, e também de sua influência na reprodução, nutrição e desenvolvimento do vetor (Xi *et al.*, 2008, Dong *et al.*, 2009, Ramírez *et al.*, 2012, 2014). Tais achados sugerem que a introdução de bactérias capazes de combater patógenos no intestino do mosquito poderia ser útil na estratégia de controle, como é o caso da *Wolbachia* (Gusmão *et al.*, 2010; Ramírez *et al.*, 2012, 2014; Villegas e Pimenta, 2014). A bactéria endossimbiótica *Wolbachia*, embora presente em cerca de 40% de todas as espécies de insetos terrestres é ausente de vetores de importância médica como *Anopheles stephensi*, *Anopheles gambiae* e *Aedes aegypti* (Hilgenboecker *et al.*, 2008; Zug e Hammerstein, 2012). É capaz de bloquear a transmissão de muitos agentes infecciosos em mosquitos, como os vírus da dengue, chikungunya, Zika (Moreira *et al.*, 2009; Bourtzis *et al.*, 2014; Tan *et al.*, 2017).

Ainda que a via RNA de interferência (iRNA) não seja considerada clássica da imunidade inata, possui um importante papel na atividade antiviral (Sim *et al.*, 2014). Segundo Campbell *et al.* (2014), os arbovírus são capazes de modular a expressão de iRNA dos insetos, de modo a facilitar sua replicação e disseminação no vetor.

Tal fato pôde, por exemplo, ser observado em *Aedes aegypti* infectados por DENV e *Aedes albopictus* infectados por CHIKV (Hussain *et al.*, 2012).

A variabilidade genética de um arbovírus em uma dada área é de grande importância, uma vez que esta pode conferir evasão do sistema imune do hospedeiro, aumento da virulência, resistência a antivirais e, em consequência, aumentar a gama de hospedeiro. Ficou evidente ao longo dos anos que a epidemiologia das arboviroses é determinada por muitos fatores que incluem o hospedeiro, o vetor e o ambiente e que esses, em conjunto, influenciam a diversidade genética do vírus. A caracterização molecular e a análise filogenética de isolados de arbovírus, feitas a partir de vertebrados e vetores, têm ajudado na compreensão da dinâmica de transmissão. No mosquito, a evolução da infecção dos arbovírus é determinada por complexas interações, identificadas desde os níveis molecular e celular até o populacional (Sánchez-Vargas *et al.*, 2009). Já se verificou que amostras (genótipos) diferentes do mesmo sorotipo de vírus dengue (como DENV3), em uma mesma população do vetor, podem se replicar com intensidades diferentes e se disseminar com distinta eficiência até a glândula salivar (Hanley *et al.*, 2008). Ou seja, de alguma forma parece haver seleção de populações virais, com sucessos variados na infecção do mosquito. Com efeito, no hospedeiro vertebrado, como o homem, no qual a resposta imune é de grande complexidade, ocorrem distintas interações das partículas virais em muitos tecidos (Geisbert e Jahrling, 2004; Gandini *et al.*, 2011).

O estudo das interações entre o vírus e o vetor e de como estas interações formatam as pressões evolutivas específicas do vetor e do próprio vírus é necessário para melhor avaliar os fatores que governam o potencial que o vírus tem de se adaptar a vetores ou/e de se expandir geograficamente (Ciota e Kramer, 2010).

O vetor desempenha um importante papel no mecanismo de seleção e manutenção de elevados níveis de virulência (Monath, 1994; Arias-Goeta *et al.*, 2013, 2014). Variações pontuais em um genótipo específico de arbovírus podem ser responsáveis pelo aparecimento de cepas de vírus que se replicam com mais eficiência em humanos e em mosquitos, e que produzem altas taxas de viremia, facilitando a transmissão pelos vetores. Vale ressaltar que a mesma mutação ocorrida em determinado vírus pode favorecer sua replicação, disseminação e transmissão em uma espécie de vetor, mas não necessariamente em outra. Um

exemplo é a mutação ocorrida na posição 226 da glicoproteína E do envelope do vírus chikungunya, que aumentou sua competência vetorial pelo *Aedes albopictus* em algumas regiões africanas, embora o mesmo não tenha sido observado para *Aedes aegypti* (Vazeille *et al*, 2007). A variação genética, as mutações adaptativas que ocorrem nos vírus durante a replicação em mosquitos, bem como a influência de tais variações na transmissão entre mosquitos e humanos e entre mosquitos permanecem pouco conhecidas. Algumas mutações adaptativas em cepas de vírus emergentes podem afetar a intensidade de transmissão por uma espécie de mosquito, mas não por outra. Isso se deve ao alto custo na biologia do vetor, incluindo diminuição da longevidade e taxa de postura, em consequência à resposta do principal mecanismo antiviral, iRNA. É possível que ocorram mutações adaptativas ou diferenças na variabilidade genética em um isolado viral durante os processos de transmissão vertical ou venérea. Ou melhor, é possível que, na prole que nasce infectada, o vírus não tenha a mesma variabilidade genética que em sua progenitora ou vice-versa (Kramer, 2016).

## **1.2. Transmissão Transovariana e Venérea**

Higgs e Beaty (2004) descrevem dois principais tipos de transmissão para os ciclos de infecção em culicídeos vetores: a vertical e horizontal. Na transmissão horizontal, o vetor é infectado por meio de um repasto sanguíneo contendo sangue virêmico e transmite o vírus pela picada após um período de incubação extrínseco, como descrito acima. Outra forma de transmissão horizontal, dessa vez entre mosquitos, é a venérea, ou sexual, detectada primeiramente por Thompson e Beaty (1977) em *Aedes triseriatus* infectados pelo vírus da encefalite La Crosse. A transmissão vertical consiste na transferência do vírus de uma progenitora para sua prole. Esse tipo de transmissão pode ocorrer através do mecanismo de transmissão transovo (infecção dos ovos no momento da oviposição, ficando a partícula viral depositada na superfície do ovo) ou transmissão transovariana (infecção do folículo embrionário) (Rosen, 1988). A via transovariana apresenta maior eficiência se comparada à via transovo, pois a infecção das células germinativas é permanente (Tesh, 1984).

A via hospedeiro vertebrado – vetor – hospedeiro vertebrado é considerada a determinante para a epidemiologia de arboviroses e é a ela que epidemias dão



visibilidade (Fine, 1975). Porém, após as epidemias ou epizootias e nos períodos de grande atividade viral em locais endêmicos ou enzoóticos, uma considerável proporção dos hospedeiros vertebrados de uma área apresentará anticorpos neutralizantes específicos contra o vírus que circulou intensamente. Com isso, ao longo dos dias, a chance de um mosquito contendo partículas virais infectantes na saliva picar um indivíduo susceptível é reduzida. No entanto, no período entre epidemias, quando as condições ambientais e epidemiológicas são desfavoráveis para a procriação do vetor artrópode e a transmissão do vírus, algumas hipóteses procuram explicar a manutenção do vírus na natureza. Dentre os mecanismos de conservação estão: participação de hospedeiros desconhecidos e formas alternativas de transmissão (Reeves, 2004; Charron *et al.*, 2013).

Como sugerido por Lequime e Lambrechts (2014) a transmissão vertical nos artrópodes pode funcionar como um mecanismo de conservação de um arbovírus nos momentos em que as taxas de transmissão horizontal são mais baixas, já que além de gerar fêmeas, machos também podem ser infectados verticalmente e transmitir o vírus via sexual (Thompson e Beaty, 1977). A transmissão vertical pôde ser comprovada, tanto na natureza quanto experimentalmente, em numerosos estudos utilizando diferentes arbovírus dos gêneros *Flavivirus*, *Alphavirus* e *Orthobunyavirus* (Watts *et al.*, 1973; Castro *et al.*, 2004; Chomposri *et al.*, 2016). No entanto, as taxas de transmissão vertical podem variar de acordo com o vírus, o mosquito e as condições climáticas (Lequime *et al.*, 2016). Por exemplo, as taxas de transmissão vertical natural em *Aedes* são maiores em condições de clima árido, se comparadas às taxas observadas em condições tropicais (Lequime *et al.*, 2016). Também já foi observado que, em comparação com os gêneros *Flavivirus* e *Alphavirus*, vírus do gênero *Orthobunyavirus* são mais eficientes na transmissão vertical, o que ocorre por transferência pela via transovariana (Leake, 1984; Tesh, 1984; Turell, 1988). Como sugerido por Rosen (1988), diferentemente dos *Orthobunyavirus*, a transmissão vertical de *Flavivirus* por mosquitos *Aedes* se deve ao mecanismo do tipo transovo.

Em relação à transmissão venérea, horizontal, foi observado primeiramente por Rosen (1987), em *Ae albopictus* infectados via intratorácica por DENV, que machos infectados conseguem transmitir o vírus via sexual, mas o contrário (fêmeas infectando machos) não foi demonstrado. Diversos estudos envolvendo a transmissão venérea em vários insetos vetores mostraram que machos infectados

são capazes de infectar fêmeas da mesma espécie por meio de esperma e/ou fluidos seminais contaminados. Este é o caso do trabalho desenvolvido por Mavale *et al.* (2010), que infectaram *Ae aegypti* machos com CHIKV via intratorácica; 4 dias depois da infecção (dpi), fêmeas da mesma espécie foram postas em contato com esses machos por oito dias. Ao final deste período, cerca de 11% das fêmeas analisadas estavam infectadas por CHIKV.

### 1.3 Vetor *Aedes aegypti*

O mosquito *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* Linnaeus, 1762, é um inseto díptero pertencente à família *Culicidae* e subfamília *Culicinae* (Consoli e Lourenço-de-Oliveira, 1994). É, talvez, uma das espécies de insetos mais estudadas em vista de sua importância epidemiológica, uma vez que é transmissor natural do vírus da febre amarela urbana, dos quatro sorotipos do dengue, de chikungunya e Zika.

Trata-se de uma espécie de origem africana que se disseminou passivamente para várias partes do mundo à custa das atividades humanas, em momentos distintos da história. No Brasil, essa espécie foi introduzida a partir provavelmente da costa ocidental da África durante o período colonial, na época do intenso tráfico de escravos (Consoli e Lourenço-de-Oliveira, 1994). Se no continente de origem *Aedes aegypti* pode ocorrer em locais distantes de humanos e as formas imaturas se criam em depósitos naturais, nos demais continentes e mesmo na África, hoje esta espécie acha-se muito associada ao homem, sua principal fonte alimentar sanguínea. *Aedes aegypti* usa residência e locais de trabalhos do homem como abrigo e a água acumulada em depósitos artificiais como criadouros. Sua estreita associação com humanos, seu comportamento alimentar preferencialmente antropofílico e distribuição espacial sinantrópica favorecem a transmissão de arbovírus para os quais esta espécie tem competência (Boorman e Porterfield, 1956; Marchette *et al.*, 1969; Akoua-Koffi *et al.*, 1999; Lozovel, 2001; Forattini, 2002).

Esse mosquito pertence ao subgênero *Stegomyia*. Na África, várias espécies deste subgênero são envolvidas na transmissão silvestre, rural e/ou urbana de arbovírus, tais como febre amarela, Zika e chikungunya. Acredita-se que tais vírus co-evoluíram com os primatas não humanos e espécies africanas de *Stegomyia* (Gubler, 2002).

O *Aedes aegypti* pode ser encontrado nas regiões tropicais e subtropicais do globo e mesmo em algumas regiões de clima temperado nos hemisférios norte e sul (Forattini, 1962; Clements, 1992). Atualmente, sua distribuição abrange todo o território brasileiro, salvo as áreas florestadas ou onde a presença de humanos seja muito baixa ou nula.

Tal como os demais mosquitos, *Aedes aegypti* tem quatro estádios larvais de desenvolvimento e um estágio pupal no qual se dá a metamorfose para o estágio adulto e de onde emergem os machos e fêmeas alados. Dependendo da temperatura ambiente, da densidade larval e da disponibilidade de nutrientes no criadouro, a duração dos estágios larvares pode variar, mas geralmente compreende sete a dez dias em temperaturas médias de 26-28°C. Larvas comem matéria orgânica dissolvida ou depositada no fundo dos criadouros. O estágio pupal dura geralmente dois dias. Após a emergência da pupa, os adultos buscam abrigos em locais com pouca corrente de ar, sombrios e úmidos, onde repousam antes de iniciarem atividades como cópula e busca de alimento e mesmo depois dos repastos (Consoli e Lourenço-de-Oliveira, 1994).

A emergência dos machos se inicia em torno de um dia antes das fêmeas, visto que seu desenvolvimento larvar é mais rápido. No entanto, os machos necessitam de quase um dia pós-emergência para estarem aptos a copularem: sua genitália precisa realizar rotação de 180° e a cutícula das peças genitais externas deve estar endurecida. Essas peças se assemelham a fórceps, que prendem o final do abdome das fêmeas durante a cópula. Assim que a cópula termina, o macho injeta uma substância que funciona como tampão vaginal e que impede que a fêmea inseminada receba espermatozoides de outro macho, pelo menos até a desova seguinte, quando o tampão será eliminado com a passagem dos ovos (Clements, 1992).

Os espermatozoides obtidos numa primeira cópula podem ser usados para a fertilização dos óvulos produzidos por toda a vida de uma fêmea de mosquito, pois serão armazenados vivos dentro de um receptáculo chamado espermateca. Isto significa que uma fêmea poderá gerar filhos de um mesmo macho por toda a vida. No entanto, ela pode ser inseminada por outros machos ao longo de sua existência, embora geralmente tente evitar. *Aedes aegypti* é uma espécie estenogâmica, ou seja, capaz de copular em pequenos espaços. Os machos dessa espécie podem copular com fêmeas junto de abrigos na proximidade dos criadouros, pois já estão

aptos a fazê-lo quando as primeiras fêmeas emergem (Clements, 1992; Lourenço-de-Oliveira, 2015b). Mas podem também ir procurá-las próximo a fontes sanguíneas, aproveitando-se da aproximação das fêmeas vorazes por sangue. Desta forma, geralmente todas as fêmeas de *Aedes aegypti* que se captura estão inseminadas, ou seja, apresentam a espermateca cheia de espermatozoides (Consoli e Lourenço-de-Oliveira, 1994).

Em geral, fêmeas e machos de mosquitos podem se alimentar de açúcares, obtidos de flores e frutos. Mas, aparentemente, na natureza, fêmeas de *Aedes aegypti* ingerem pouco ou nenhum açúcar (Clements, 1992). A hematofagia é restrita às fêmeas, que precisam de sangue para o desenvolvimento dos ovários e amadurecimento dos ovos. A voracidade por sangue aumenta entre o terceiro e quinto dia após a emergência da pupa. A cada alimentação sanguínea completa, geralmente, segue-se uma gestação de três dias, finalizada por uma postura. Se isso acontece, diz-se que houve concordância gonotrófica. Mas, em *Aedes aegypti*, é frequente ocorrer discordância gonotrófica, especialmente na primeira alimentação sanguínea (Clements 1992; Consoli e Lourenço-de-Oliveira, 1994). Este comportamento aumenta o número de contatos com as fontes sanguíneas, no caso deste mosquito representadas principalmente por humanos, potencializando o risco de transmissão de arbovírus (Juliano *et al.*, 2014). Assim, seu comportamento arisco e sua grande sensibilidade aos câmbios de luminosidade fazem com que fêmeas de *Aedes aegypti* interrompam o repasto sanguíneo em resposta a mínimos movimentos feitos pela sua vítima. Como necessitam completar o repasto, retomam a hematofagia no mesmo ou em outro indivíduo, comportamento que também potencializa a transmissão de vírus (Clements, 1992).

Terminada a gestação e a desova e passadas algumas horas de repouso, a fêmea procura novamente tomar sangue e assim sucessivamente. Ou seja, uma fêmea de mosquito ingere sangue a cada três ou quatro dias. A disseminação e a transmissão de arbovírus, como flavivírus, podem demorar em média uma (6-12 dias) ou duas semanas (10-14 dias), respectivamente. Assim, uma fêmea de *Aedes aegypti* susceptível que, por ventura, tenha tomado sangue virêmico no primeiro repasto de sua vida, terá partículas virais disseminadas até o sistema reprodutor ou as glândulas salivares (Lourenço-de-Oliveira, 2015a).

A desova é feita sobre substratos úmidos, próximo à superfície da água dos criadouros, ou seja, nas suas paredes e não diretamente sobre a água. Os ovos de

*Aedes aegypti* são resistentes à dessecação. Depois de completado o período embrionário (cerca de três dias), os ovos podem eclodir quando em contato com a água, por exemplo, quando imersos por águas das chuvas. Mas, se não houver contato com a água, os ovos podem permanecer viáveis por longos períodos, principalmente se mantidos em ambientes úmidos (Consoli e Lourenço-de-Oliveira, 1994).

*Aedes aegypti* apresenta uma particularidade no comportamento de desova, consistindo na dispersão de ovos de uma mesma gestação em vários criadouros (Lourenço-de-Oliveira, 2015 b). Seus principais criadouros são depósitos artificiais de fundo escuro, mantidos em locais sombreados contendo água parada com aspecto limpo, não turvo e que não apresente excesso de matéria orgânica em decomposição. Tais criadouros estão dentro das casas e outros tipos de imóveis ou na sua imediata vizinhança, como terrenos baldios e nos quintais. Assim, uma grande variedade de tipos de depósitos pode ser apontada como criadouro, entre os quais se destacam os reservatórios de água para consumo doméstico, caixas-d'água, cisternas ou tanques mal fechados. Além desses, pratos de vasos de planta, aquários e bebedouros de animais cuja água não é trocada periodicamente. Sua distribuição e densidade populacional são muito relacionadas àquelas de humanos, uma vez que o *Aedes aegypti* é altamente sinantrópico. Assim, sua frequência é maior nos locais com maior concentração humana e com menor cobertura vegetal (Consoli e Lourenço-de-Oliveira, 1994).

Muitos criadouros de *Aedes aegypti* têm caráter transitório, pois estão diretamente ligados ao regime de chuvas. Embora esses tipos de criadouros obriguem o rápido desenvolvimento de formas imaturas para a fase adulta. A característica transitória pode ser relevante em recipientes descartáveis de tamanho pequeno e médio, deixados a céu aberto (pneus, garrafas, plásticos e latas). A importância sanitária desse tipo de criadouro é menor que aquela dos recipientes grandes e médios, que podem garantir a produção regular de adultos, independentemente de chuvas (Lourenço-de-Oliveira, 2015 b).

## 1.4 Zika vírus

O vírus Zika (ZIKV) é um arbovírus da família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*, cujos principais vetores são os mosquitos do gênero *Aedes*, subgênero *Stegomyia*.

Foi isolado pela primeira vez em macaco rhesus na Floresta Zika, na Uganda, em 1947. No ano seguinte, o vírus foi isolado novamente, porém, desta vez, em *Aedes (Stegomyia) africanus* coletados no mesmo local (Dick *et al.*, 1952). O primeiro relato de caso humano ocasionado por infecção pelo ZIKV ocorreu na Nigéria em 1954 (Macnamara, 1954). Desde então, pequenos surtos foram detectados na África e no Sudeste Asiático até 2007, quando uma grande epidemia ocorreu em Yap, uma pequena Ilha na Micronésia (Duffy *et al.*, 2009). Em sequência, várias epidemias de larga escala ocorreram em Ilhas do Oceano Pacífico (Donald *et al.*, 2016). Em maio de 2015, o vírus entrou nas Américas, sendo registrado o primeiro caso no Brasil, na cidade de Salvador, Bahia. No mês de dezembro do mesmo ano, o número de casos suspeitos já passava de 1,3 milhões, atingindo também outras localidades no país (Hennessey *et al.*, 2016). Em julho de 2016, 40 países do continente americano apresentavam casos autóctones de infecção pelo ZIKV (PAHO, 2016).

Trata-se de um vírus de RNA fita simples com polaridade positiva, contendo 10.807 pares de bases em seu genoma, que codificam a poliproteína que será clivada, dando origem às proteínas estruturais: capsídeo (C), membrana precursora (prM), envelope (E) e proteínas não estruturais (NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5). Apresenta três linhagens genéticas: Leste africano, Oeste africano e Asiática (Faye *et al.*, 2014; Kuno e Chang, 2007).

O ZIKV tem sido mantido em dois ciclos de transmissão distintos nos aspectos evolutivos e ecológicos: silvestre e urbano. O ciclo silvestre envolve primatas não humanos e espécies de mosquitos silvestres. Já no ciclo urbano, há a participação de seres humanos como hospedeiros vertebrados amplificadores e os mosquitos *Aedes aegypti* (principal vetor) e *Aedes albopictus* (Musso e Gubler, 2016) como vetores já reconhecidos. Neste sentido, os ciclos silvestre e urbano do ZIKV são semelhantes aos descritos para outros arbovírus como da dengue (DENV), febre amarela e chikungunya (CHIKV), também transmitidos pelo mosquito *Aedes aegypti* em seus ciclos urbanos (Vasilakis e Weaver, 2008; Weaver e Reisen, 2010).

Os vetores de ZIKV nas Américas foram definidos durante 2016. Estudos de laboratório e de campo revelaram que a única espécie comprovadamente vetora natural no continente é *Aedes aegypti* (Ferreira-de Brito *et al.*, 2016). Em laboratório, populações desta espécie mostraram variável competência vetorial, que também variou de acordo com o isolado viral usado nos desafios. Nestes ensaios, populações cariocas do vetor testadas com vírus isolados recentemente do Rio de

Janeiro exibiram valores de taxas de transmissão bastante elevados (71,6 – 96,5%) (Chouin-Carneiro *et al.*, 2016). Contudo, hipóteses de que outros mosquitos poderiam estar atuando como vetores urbanos foram levantados. Sendo assim, o mosquito do gênero *Culex* foi indicado como possível vetor. Por isso foram realizados estudos laboratoriais envolvendo diferentes populações de inúmeras localidades, infectados por ZIKV dos genótipos africano e asiático, através de animais infectados ou alimentação sanguínea, criados em diferentes condições. Os resultados de tais testes comprovaram que o *Culex* não se mostra competente para a transmissão do ZIKV, não sendo designado então como vetor do arbovírus (Fernandes *et al.*, 2016; Guo *et al.*, 2016; Boccolini *et al.*, 2016; Huang *et al.*, 2016; Aliota *et al.*, 2016; Amraoui *et al.*, 2016; Hall-Mendelin *et al.*, 2016; Hart *et al.*, 2017; Heitnman *et al.*, 2017).

O período de incubação extrínseco do ZIKV varia de sete a 10 dias, enquanto o período de incubação intrínseco, de três a 12 dias (Boorman e Porterfield, 1956; CVE). Contudo, experimentos recentes realizados com populações de mosquitos do Novo Mundo, tanto de *Aedes aegypti* quanto de *Aedes albopictus*, só conseguiram detectar partículas virais na saliva no 14º dia pós-alimentação infectante; a disseminação geralmente ainda foi baixa no 7º dpi (Chouin-Carneiro *et al.*, 2016; Fernandes *et al.*, 2016).

Estima-se que 80% dos humanos infectados não apresentam sintomas. As manifestações clínicas são diversas: febre, conjuntivite, cefaleia, mialgia, artralgia náusea e erupção cutânea (Marano *et al.*, 2015). Embora os casos de complicações em decorrência ao ZIKV sejam incomuns, a infecção por tal arbovírus foi relacionada à Síndrome de Guillain-Barré e à microcefalia em neonatos cujas mães tiveram contato com o vírus preferivelmente no primeiro trimestre da gestação (Petersen *et al.*, 2016; Rasmussen *et al.*, 2016).

Ainda que o principal mecanismo de transmissão do ZIKV para humanos seja através do repasto sanguíneo do vetor infectado, foram reportados casos de transmissão intrauterina, sexual via sêmen, e a partir de transfusão sanguínea (Kumar *et al.*, 2016; Sampathkumar e Sanchez, 2016). O vírus também pôde ser isolado do leite materno, urina e saliva, embora a transmissão por meio desses materiais não tenha sido notificada (Tamura *et al.*, 2012; Dupont-Rouzeyrol *et al.*, 2016; Bonaldo *et al.*, 2016).

Quanto à transmissão entre mosquitos, levantaram-se as hipóteses de transmissão vertical e venérea de ZIKV, uma vez que mosquitos-macho já haviam sido detectados naturalmente infectados, na África e nas Américas (Ferreira-de-Brito *et al.*, 2016). Por conta disso, Thangamani *et al.* (2016) investigaram se o ZIKV poderia ser transmitido verticalmente em *Aedes aegypti*. Em seu estudo, utilizando mosquitos dessa espécie e *Aedes albopictus*, inoculados via intratorácica pelo ZIKV (cepa MEX 1- 44), foi obtida taxa de infecção mínima de 1:290 para prole de *Aedes aegypti*. Não foi possível detectar nenhum indivíduo infectado da prole de *Aedes albopictus*. Entretanto, Ciota *et al* (2017) ao desafiar oralmente fêmeas das mesmas espécies obteve taxa de infecção mínima de 1:84 apenas para larvas de *Aedes aegypti*. Até o momento, não há estudos sobre a avaliação da ocorrência de transmissão venérea de ZIKV entre mosquitos.



## 2. OBJETIVO

### 2.1 Objetivo Geral

Este trabalho tem como objetivo avaliar experimentalmente a ocorrência de transmissão vertical e de transmissão venérea do vírus Zika em mosquitos *Aedes aegypti*.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Estimar experimentalmente a frequência da transmissão vertical do ZIKV para prole de fêmeas de *Aedes aegypti* de diferentes populações
- Avaliar a frequência da transmissão da infecção do ZIKV (cepas do Rio de Janeiro e Pernambuco) por via venérea de fêmeas em que o vírus já se disseminou para machos livres de infecção, em condições experimentais.
- Estimar a taxa de infecção, disseminação e transmissão de fêmeas infectadas por transmissão venérea do ZIKV, ou seja, através da cópula de machos infectados em condições experimentais.
- Investigar se a infecção por ZIKV interfere com a fecundidade do *Aedes aegypti*
- Comparar o genoma de ZIKV oriundos de fêmeas de *Aedes aegypti* e de sua prole, para verificar se há alteração ou seleção durante o processo de transmissão vertical.
- Comparar o genoma de amostras de ZIKV usadas para infectar fêmeas por via oral com o genoma de machos por elas infectados via venérea.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Mosquitos

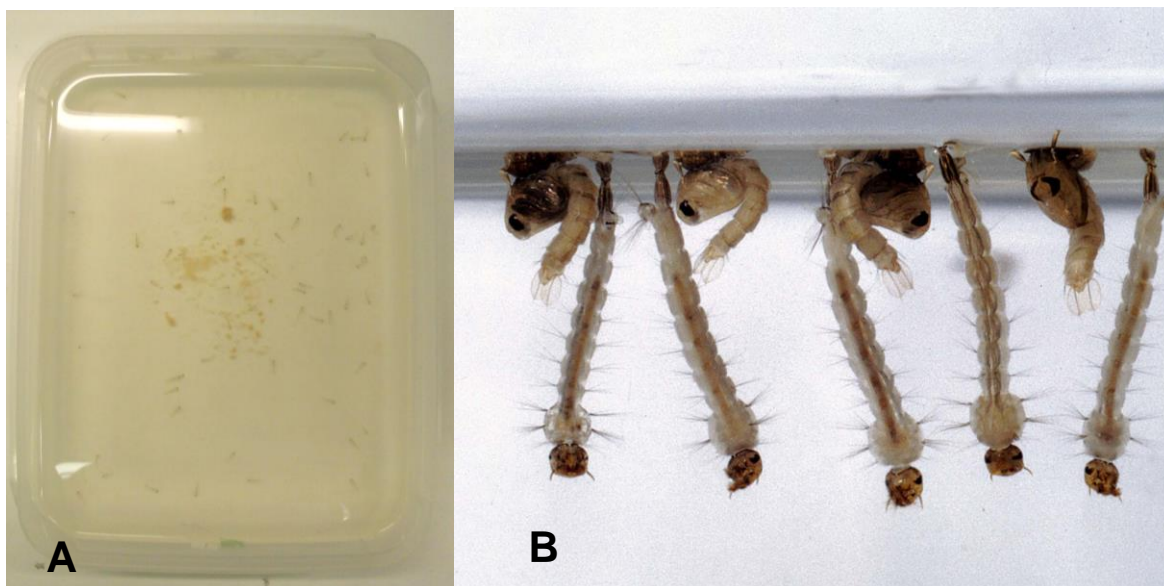
Os mosquitos utilizados eram da espécie *Aedes aegypti* de duas localidades da cidade do Rio de Janeiro: Urca (22°56'45"S 43°09'43") e Manguinhos (22°52'20"S 43°14'46"W). Uma população de Goiânia (GO) (16°40'19,86"S 49°22'56,55"O) foi usada exclusivamente em um dos experimentos de estudo de transmissão venérea. Os mosquitos do bairro da Urca foram coletados em janeiro em 2016, para se montar uma colônia de baixo número de gerações (F2) em laboratório. Já os mosquitos de Manguinhos foram procedentes de uma colônia mantida no Laboratório de Mosquitos Transmissores de Hematozoários (LATHEMA) há mais de 10 gerações. Os experimentos desenhados para a avaliação de ocorrência de transmissão vertical e de transmissão venérea do ZIKV não puderam ser realizados com fêmeas obtidas diretamente da natureza, pois necessitávamos conhecer sua história de vida (idade, estado nutricional e fisiológico o que só é possível experimentando-se indivíduos colonizados).

No caso dos mosquitos da Urca, a colônia foi estabelecida a partir de formas imaturas – ovos, larvas e pupas coletadas, respectivamente, com o emprego de ovitrampas e de pipetas ou redes em criadouros artificiais, na parte externa das casas. As ovitrampas consistem em um vaso plástico escuro contendo água ou uma solução de água e infusão de feno, usadas como atraente para as fêmeas em busca de sítios para oviposição, e paletas de aglomerado (Eucatex). As paletas, parcialmente imersas na água, são os suportes para a oviposição. As ovitrampas permaneceram durante 5-7 dias no campo, quando foram trocadas para um novo ciclo de 5-7 dias de coleta. Os ovos recolhidos nas paletas contidas nas ovitrampas podem permanecer viáveis durante muito tempo se mantidos em ambiente úmido. Assim, acondicionamos as paletas recolhidas em ambiente com 80% de umidade relativa durante cerca de um mês antes de estimularmos a eclosão. Os ovos foram eclodidos imergindo-se as paletas em água desclorada em insetário próprio para a colonização de mosquitos no LATHEMA.

Independentemente da origem dos mosquitos, as formas imaturas e os adultos foram criados e mantidos nas mesmas condições, em insetário (LATHEMA)

com umidade relativa ( $70 \pm 10\%$ ) e temperatura ( $27 \pm 1^\circ\text{C}$ ) controladas e um ciclo de 12h:12h de claro e escuro.

As larvas foram criadas em bacias plásticas medindo 30 x 21 x 6 cm contendo cerca de 1 L de água desclorada (Figura 3). Foram colocadas 100 larvas (L2) por bacia, dois ou três dias após a emergência das paletas, alimentadas com 250mg de levedura de cerveja. As pupas eram coletadas a cada dois dias e transferidas em potes plásticos contendo água desclorada, e sem alimento, para gaiolas teladas.



**Figura 3: Criação de larvas de *Ae aegypti* em insetário (LATHEMA). A=larvas e pupas em bacia plástica contendo água desclorada e levedura de cerveja. B= larvas e pupas de *Ae aegypti*.**

Para a obtenção de desovas para a amplificação das colônias, as fêmeas emergidas e mantidas com machos das respectivas localidades durante 3-5 dias foram alimentadas com sangue de camundongo duas vezes por semana, durante duas semanas. O LATHEMA possui licença específica para o uso de camundongos com esta finalidade (CEUA-IOC, licença LW-34/14). Os ovos eram recolhidos em papéis de filtro úmidos mantidos dentro das gaiolas. As desovas eram mantidas no insetário, sob as mesmas condições estabelecidas para as paletas.

Dependendo do objetivo do experimento, as pupas da geração a ser usada eram separadas por sexo, de modo a garantir adultos virgens para os ensaios. Adultos eram alimentados continuamente com solução açucarada (sacarose 10%) até a realização dos experimentos.

### 3.2 CEPAS VIRAIS

Os mosquitos foram desafiados com três cepas do ZIKV: Rio-S1, Rio-U1 e PE243. As duas primeiras cepas citadas foram isoladas a partir de amostras de saliva e de urina, respectivamente, provenientes de pacientes na cidade do Rio de Janeiro em janeiro de 2016 (Bonaldo *et al.*, 2016). O isolamento do ZIKV PE243 foi obtido do soro de paciente da cidade de Recife, em 2015 (Donald *et al.*, 2016). No caso das cepas Rio-S1 e Rio-U1, o vírus foi isolado e mantido por duas passagens adicionais em monocamadas de células Vero de rim de macaco verde. Já a cepa PE243 foi isolada a partir de inoculação do soro em cultura de células do clone c6/36 de *Aedes albopictus*, seguindo-se mais duas passagens em células Vero (Bonaldo *et al.*, 2016; Donald *et al.*, 2016). O título de todas as cepas virais foi determinado a partir da inoculação de diluições sucessivas do sobrenadante das culturas em monocamadas de células Vero, incubadas por 7 dias a 37°C, e expressos em unidades formadoras de placas por mililitro (PFU/ mL) após fixação e coloração com solução de cristal violeta em formaldeído (Figura 4).

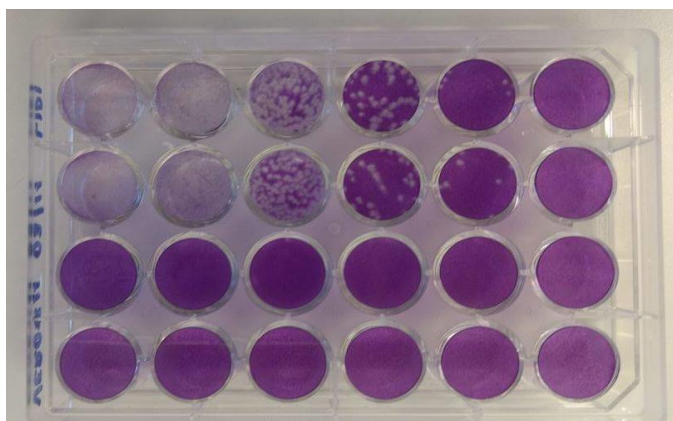


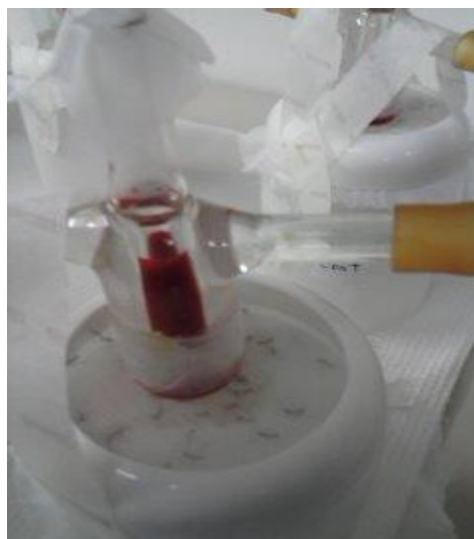
Figura 4: Placa de 24 poços utilizada para inoculação para titulação viral. Os focos presentes em alguns poços sinalizam a presença viral, uma vez que o vírus destrói as células. Fonte: cortesia de Myrna Bonaldo (LABMOF- IOC).

A infecção experimental por via oral de fêmeas de *Aedes aegypti* foi o ponto de partida tanto para os experimentos de investigação da transmissão vertical quanto da transmissão venérea. Assim, os procedimentos para o desafio oral e para o diagnóstico da infecção nas fêmeas de mosquitos desafiadas ou em sua prole ou nos machos com que cruzaram são descritos conjuntamente. De acordo com a natureza ou objetivo do experimento em si, daremos detalhes específicos, como por exemplo, a cepa viral usada e o período de incubação.

Escolhemos o desafio oral das fêmeas de *Aedes aegypti* e não a inoculação intratorácica do vírus para tentar simular ao máximo o que pode acontecer na natureza.

O desafio oral com ZIKV foi feito com fêmeas adultas de *Aedes aegypti* da Urca (F2) e Manguinhos (F>10), com 5-7 dias após a emergência da pupa, mantidas em jejum por 24 horas. Assim, na véspera do repasto infectante, os mosquitos foram aspirados da gaiola onde emergiram anestesiados com frio e separados por sexo sobre banho de gelo. Grupos de 60-65 fêmeas foram colocadas em gaiolas plásticas cilíndricas (~12 x 8 cm) teladas na abertura superior e com o fundo obliterado por uma rodela deslocável de borracha. Essas gaiolas eram mantidas no mesmo local onde a alimentação infectante seria feita no dia seguinte, cobertas com tecido úmido.

O repasto artificial infeccioso continha duas partes de hemácias, uma parte de sobrenadante de cultura de ZIKV e 0,5 mM ATP usado como fagoestimulante. O título viral final utilizado era de  $10^6$  PFU/ mL. As hemácias usadas eram provenientes de sangue desfibrinado de coelho ou sangue humano heparinizado, obtido de voluntário do próprio laboratório, lavadas cinco vezes com PBS. A alimentação infectante foi feita empregando-se alimentadores artificiais de vidro, conectados por tubos de borracha entre si e a um banho-maria circulante mantido a 37°C (Figura 5). A base de cada alimentador de vidro foi coberta por membrana biológica, consistindo de intestino suíno lavado e distendido. A mistura de sangue e vírus foi colocada na câmara interna dos alimentadores, de modo que fosse aquecida pela água circulante na câmara externa ao seu redor e os mosquitos tivessem acesso ao sangue através da membrana na base desses recipientes. O tempo máximo de duração da exposição dos mosquitos ao repasto infectante foi de 50 minutos. Após a alimentação, os mosquitos foram anestesiados em banho de gelo e separados; as fêmeas não alimentadas foram mortas imediatamente e descartadas, enquanto somente as fêmeas totalmente ingurgitadas foram selecionadas, transferidas para gaiolas cilíndricas de papelão, teladas nas duas extremidades e mantidas a temperatura constante de 26°C e 70 % de umidade relativa, em ciclo de 12h: 12h claro: escuro (doravante denominadas condições ambientais padrão, ou CEP). As fêmeas tiveram acesso contínuo à solução açucarada (sacarose 10%), até que outro tipo de manipulação fosse necessário.



**Figura 5: Mosquitos contidos em gaiolas plásticas de fundo móvel com acesso à alimentação sanguínea virêmica (disponível na câmara interna).**

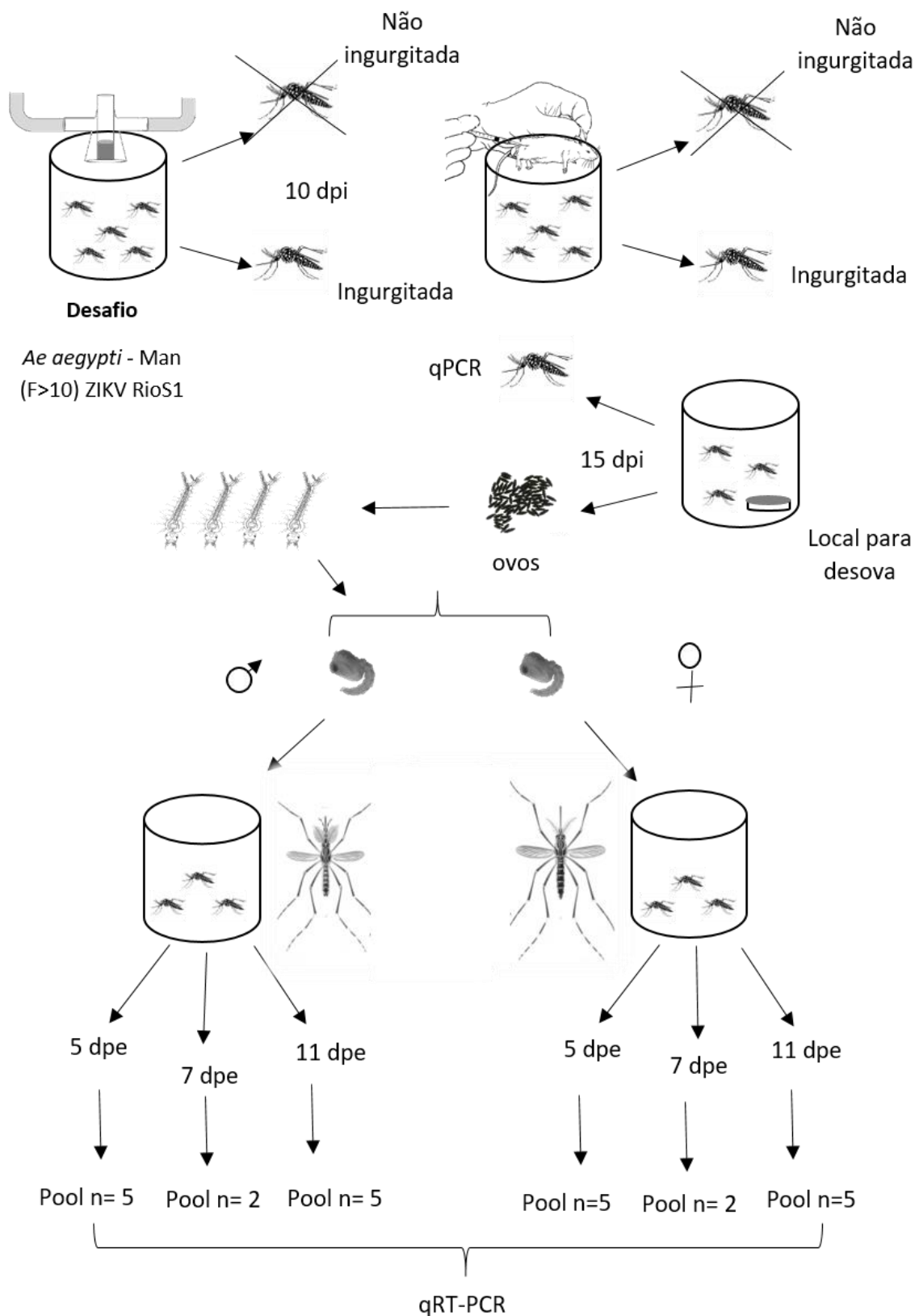
### **3.3 Transmissão vertical**

A avaliação ocorrência de transmissão vertical contou com a realização de três ensaios diferenciados (ensaios 1, 2 e 3). As diferenças básicas entre eles são (Figuras 6,7 e 8):

- 1) A cepa viral usada;
- 2) A população de mosquito testada;
- 3) O tempo entre a alimentação sanguínea infectante e a alimentação sanguínea não infectante, destinada a estimular a desova. A alimentação sanguínea não infectante consistiu do oferecimento de um camundongo anestesiado durante 30 minutos;
- 4) As condições em que as desovas foram recolhidas e as proles examinadas, individualmente ou em *pools*.

### **Ensaio 1**

Os mosquitos utilizados para este ensaio eram *Aedes aegypti* da população de Manguinhos, desafiados oralmente com o ZIKV Rio-S1. Dez dias após a alimentação infectante (dpi), foi oferecido um segundo repasto sanguíneo não infectado, objetivando-se aumentar as chances de desova após a disseminação viral. Após serem anestesiadas em gelo, fêmeas completamente ingurgitadas foram selecionadas e reunidas numa mesma gaiola cilíndrica, onde um recipiente contendo papel filtro úmido foi introduzido dois dias depois para oviposição. As fêmeas tiveram acesso à solução açucarada. Os mosquitos não alimentados foram mortos e descartados. Os ovos foram recolhidos cinco dias após o repasto não infectante e mantidos em câmara úmida por sete dias em CEP. Neste mesmo dia, portanto, 15 dias depois do repasto infectante, todas as fêmeas foram anestesiadas em banho de gelo e mortas por congelamento a  $-80^{\circ}\text{C}$ , temperatura em que seus corpos foram preservados até o exame para determinação da taxa de disseminação. Sete dias depois do recolhimento dos ovos, uma amostra foi posta para eclodir por imersão em água desclorada a  $26^{\circ}\text{C}$ . As larvas foram criadas em CEP, como descrito no item 3.1. Ao chegarem à fase de pupa, os indivíduos foram separados de acordo com sexo, para impedir o cruzamento após a emergência para a fase adulta, o que poderia criar um fator de confusão sobre a natureza da infecção (vertical ou venérea). Frações da prole foram mortas com cinco, sete e onze dias após a emergência da pupa, seus corpos foram agrupados em *pools* de dois ou cinco indivíduos e mantidos a  $-80^{\circ}\text{C}$  até serem testados.

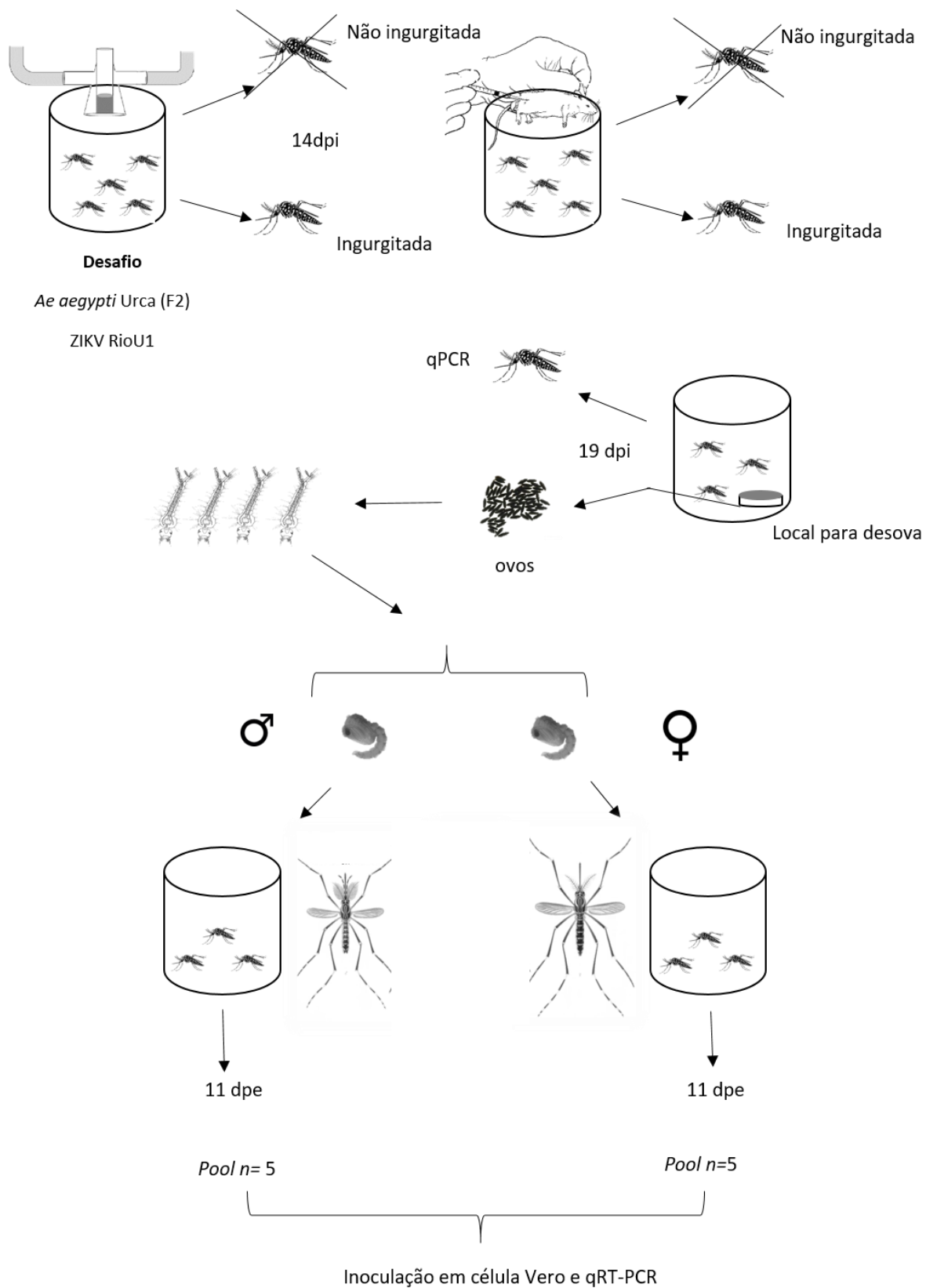


**Figura 6: Esquema do ensaio 1: *Aedes aegypti*-Manguinhos (F>10)- ZIKV S1. Dpe = dias após emergência do adulto.**



## **Ensaio 2**

Os mosquitos *Aedes aegypti* utilizados neste ensaio eram de população da Urca (F2), desafiados oralmente com o ZIKV-U1. No 14º dpi, os mosquitos foram submetidos ao repasto sanguíneo não infectante. Cerca de trinta minutos após a alimentação, os mosquitos foram anestesiados em gelo, e apenas as fêmeas ingurgitadas foram selecionadas e reunidas numa mesma gaiola cilíndrica, onde um recipiente contendo papel filtro úmido foi introduzido dois dias depois para oviposição. As fêmeas tiveram acesso à solução açucarada. Os mosquitos não alimentados foram mortos e descartados. Os ovos foram recolhidos cinco dias após o repasto não infectante e mantidos em câmara úmida por sete dias em CEP. Neste mesmo dia, portanto 19 dias depois do repasto infectante, todas as fêmeas foram anestesiadas em banho de gelo e mortas por congelamento a -80°C, temperatura em que seus corpos foram preservados até o exame para determinação da taxa de disseminação. Sete dias depois que os ovos foram recolhidos, uma amostra foi posta para eclodir por imersão em água desclorada a 26°C. As larvas foram criadas em CEP, como descrito no item 3.1. Ao chegarem à fase de pupa, os indivíduos foram separados de acordo com sexo, para prevenir o cruzamento ao emergirem para a fase adulta, o que poderia criar um fator de confusão entre a natureza da infecção (vertical ou venérea). Parte da prole foi morta com onze dias após a emergência da pupa, sendo seus corpos agrupados em *pools* de cinco indivíduos e mantidos a -80°C até serem testados.



**Figura 7: Esquema do ensaio 2: *Aedes aegypti* – Urca (F2) - ZIKV U1. Dpe= dias após a emergência de adulto.**

### **Ensaio 3**

Os mosquitos utilizados neste ensaio eram *Aedes aegypti*, população da Urca (F2), desafiados oralmente com o ZIKV RIO-S1. Ao completar 5 dpi, 10 fêmeas foram anestesiadas em gelo e sacrificadas para a verificação de infecção. No 14º dpi, os mosquitos foram submetidos ao repasto sanguíneo não infectante. Cerca de trinta minutos após a alimentação, os mosquitos foram anestesiados em gelo. Os mosquitos não alimentados foram mortos e descartados. Apenas as fêmeas ingurgitadas foram selecionadas e, desta vez, mantidas individualizadas, em frascos Borel telados contendo substrato para oviposição (chumaço de algodão coberto com papel-filtro úmido). Foi oferecido acesso contínuo à solução açucarada e o conjunto de fêmeas foi mantido em CEP, como descrito acima. Sete dias após a hematofagia não infecciosa, o papel-filtro contendo a desova de cada fêmea foi numerado de acordo com a genitora e o número de ovos foi aferido. As fêmeas foram avaliadas individualmente por RT- qPCR, como descrito adiante. O papel contendo ovos foi mantido individualizado em câmara úmida por sete dias. Após esse período, todos os ovos foram postos em água desclorada para eclosão a 26°C. Ao atingirem o estadio L2, as larvas oriundas de fêmeas não infectadas foram mortas, enquanto as de fêmeas infectadas, criadas até a fase adulta em CEP. Ao chegarem à fase de pupa, foram igualmente separadas de acordo com sexo, impedindo o cruzamento ao emergirem para fase adulta. Os adultos foram mortos ao completaram dez dias de vida em insetário (em CEP), com acesso diário à solução açucarada, e agrupados em *pools* ou mantidos de forma individual em temperatura -80°C.

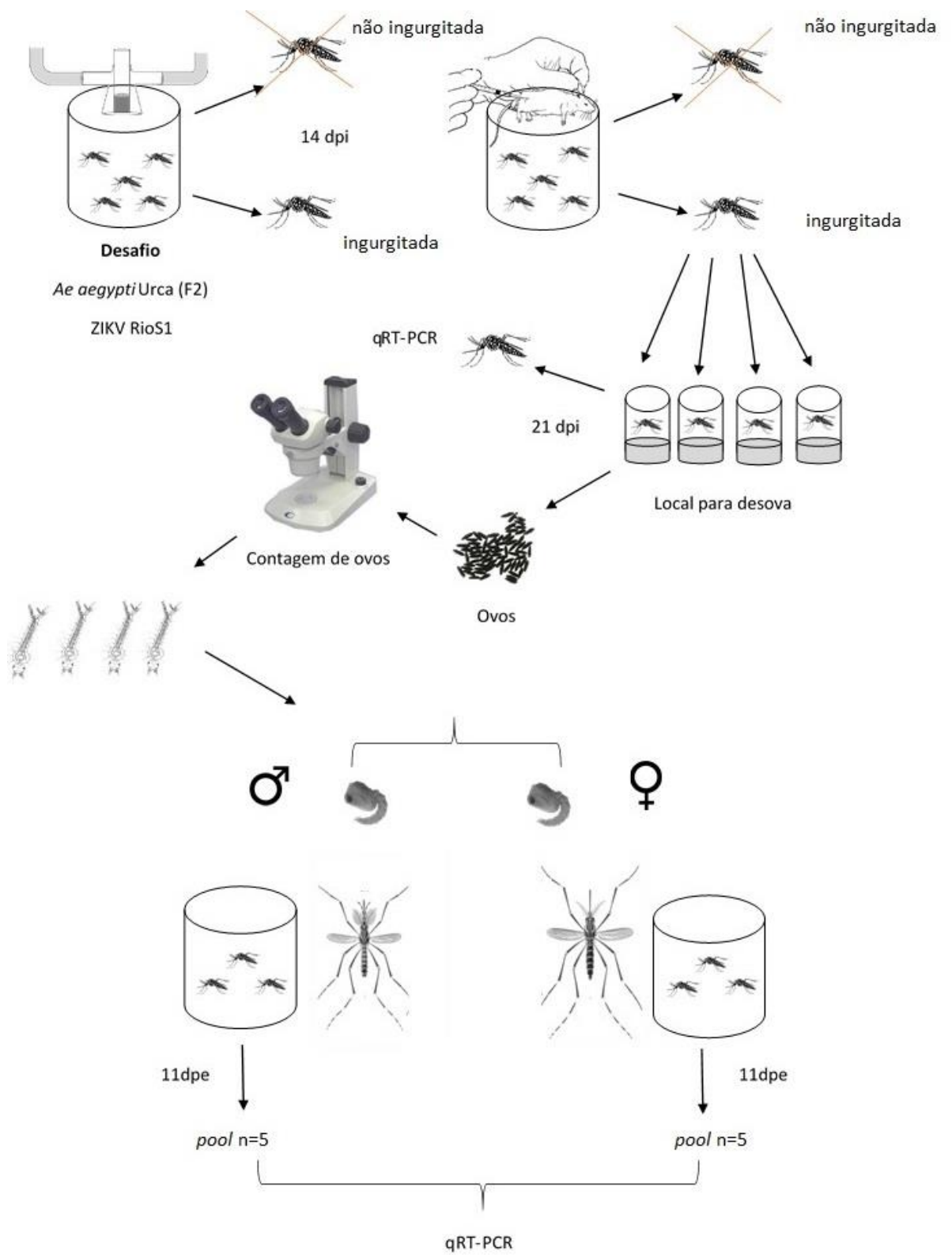


Figura 8: Esquema do ensaio 3: *Aedes aegypti*-Urca (F2)- ZIKV S1. Dpe = dias após emergência do adulto

### 3.4 Transmissão venérea

O mesmo protocolo de infecção oral artificial descrito acima (item 3.3) foi realizado para o estudo da transmissão venérea, diferenciando-se essencialmente apenas em um ponto: as fêmeas desafiadas com alimentação sanguínea contendo ZIKV eram virgens. Ou seja, machos e fêmeas foram separados na fase de pupa e emergiram em gaiolas distintas. As fêmeas receberam oferta de sangue infectado sem terem sido previamente acasaladas. Com efeito, uma cópula prévia diminuiria a receptividade das fêmeas a uma segunda cópula, pois nos *Stegomyia* é comum que os machos injetem um tampão vaginal após a cópula que bloqueia a passagem de sêmen.

Após alimentadas com o repasto sanguíneo infectante, as fêmeas virgens foram anestesiadas em banho de gelo e separadas, sendo aproveitadas apenas aquelas completamente ingurgitadas. Em seguida, foram contadas e transferidas para gaiolas cilíndricas de papelão (20 x 16 cm), teladas na parte superior, onde receberam solução açucarada (sacarose 10%) continuamente e foram mantidas em CEP.

Foram feitos dois ensaios para estudo da transmissão venérea, denominados ensaios 4 e 5, respectivamente. As diferenças principais entre eles foram a população de mosquito testada e as condições de manutenção dos adultos, alimentando-se em conjunto numa mesma solução açucarada ou não, como será detalhado abaixo (Figuras 9 e 10).

No ensaio 4, usamos duas populações de *Ae aegypti*, de Goiânia (F1) e da Urca (F2), ao passo que no ensaio 5 somente a população da Urca (F2) foi usada. O vírus usado no ensaio 4 foi ZIKV Rio-U1 e, no ensaio 5, ZIKV PE243 e Rio-U1.

#### **Ensaio 4**

Passados 10 dias do desafio oral das fêmeas com ZIKV, 10 fêmeas de cada população (Goiânia e Urca) foram mortas para a determinação da taxa de disseminação. Machos virgens das respectivas populações foram introduzidos na gaiola onde estava o restante das fêmeas de cada população, na proporção 1 macho: 2 fêmeas: 19 machos da população de Urca e 45 de Goiânia para 37 fêmeas de Urca e 90 de Goiânia. Os machos e fêmeas permaneceram juntos durante 5 dias,

sendo alimentados continuamente com solução de sacarose a 10%. Depois de separados das fêmeas, os machos foram mantidos vivos por mais 15 dias, quando foram mortos ao frio para determinação da taxa de infecção 20 dias após primeiro contato com fêmeas infectadas (Figura 9).

Mosquitos das mesmas populações, porém não infectados, foram mantidos em paralelo e nas mesmas condições e proporções de macho: fêmea para servirem como controle para as taxas de inseminação. Examinamos espermatecas de uma amostra de 30 fêmeas através da dissecação sobre lâmina, em PBS, seguido de exame ao microscópio ótico, de acordo com Consoli e Lourenço-de-Oliveira (1994). Todas as espermatecas de fêmeas de ambas as populações estavam repletas de sêmen.

Amostras da solução açucarada compartilhada, durante 5 dias, pelas fêmeas (previamente desafiadas oralmente com ZIKV) e machos foram coletadas e examinadas por RT-qPCR para a detecção de RNA de ZIKV.

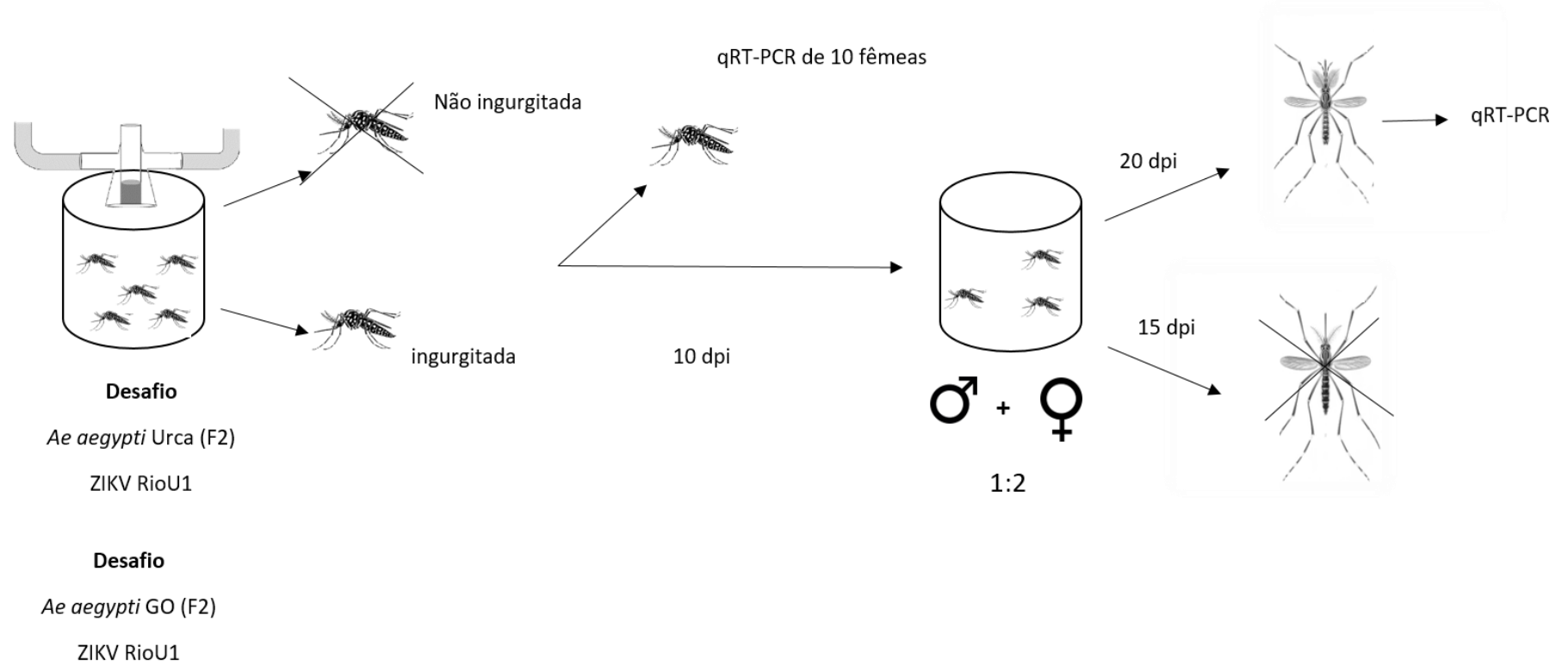


Figura 9: Esquema do ensaio 4 - *Aedes aegypti* da Urca (F2) e *Aedes aegypti* Goiânia (F2) – ZIKV Rio-U1.

### **Ensaio 5**

Machos virgens de *Ae aegypti* da Urca, geração F2, foram inseridos nas gaiolas contendo fêmeas virgens previamente desafiadas com ZIKV Rio-U1 ou ZIKV PE243 por via oral no 10 dpi destas. A proporção macho/fêmea foi de 1:1; 256 fêmeas infectadas pelo ZIKV Rio-U1 e 256 machos da mesma espécie (divididas em 3 gaiolas cilíndricas de 16cm x 18cm, resultando em 85 mosquitos de cada sexo em cada gaiola) e 76 fêmeas infectadas com ZIKV PE243 juntamente com machos *Aedes aegypti* em apenas uma gaiola. Os machos haviam recebido alimentação açucarada (sacarose 10%) *ad libitum* desde a emergência da pupa. Fêmeas e machos permaneceram em contato durante 30 horas sem acesso à solução açucarada. A retirada da alimentação açucarada buscou impedir a infecção dos machos por via oral, ao sugarem a solução açucarada compartilhada por fêmeas com vírus disseminado e cuja saliva poderia conter ZIKV.

Em seguida, as fêmeas foram retiradas por aspiração, mortas a frio e armazenadas em freezer -80°C para posterior avaliação da taxa de disseminação viral. Visava-se avaliar se, estando com elevada taxa de disseminação viral, os machos que com elas tivessem contato adquiririam a infecção por via venérea.

Os machos foram mantidos vivos em gaiolas semelhantes e postos para cruzar com diferentes e subsequentes lotes de fêmeas virgens de *Ae aegypti*, da mesma população e geração, jamais alimentadas previamente com sangue. Cada grupo de fêmeas virgens era introduzido igualmente na proporção 1:1, deixado sem acesso à solução açucarada, por 30 horas. Passado esse período, as fêmeas eram retiradas por aspiração e mantidas vivas em CEP por 14 dias com acesso contínuo à sacarose a 10%. Os machos sobreviventes permaneciam cerca de 24 horas com acesso à solução de sacarose antes da introdução de novo lote de fêmeas virgens, quando a alimentação de açúcar era novamente suspensa por 30h. No total, os mesmos machos foram colocados em contato com quatro novos grupos de fêmeas virgens em diferentes dias após o cruzamento (dpc) com as fêmeas desafiadas oralmente com o ZIKV (Tabela 1).



**Tabela 1: denominação do lote de acordo com o dpc de cada grupo de fêmea**

<b>Lote</b>	<b>DPC</b>
2°	3
3°	7
4°	10
5°	14

Após 14 dpc, 30 fêmeas de cada lote eram selecionadas aleatoriamente e submetidas à salivagem forçada (Chouin-Carneiro *et al.*, 2016). O total de fêmeas de cada lote diminuía ao longo dos dpc por conta da mortalidade dos machos. Por isso, a média de fêmeas total por gaiola para todos os lotes foi de 64 para as infectadas com ZIKK Rio-U1 e 61 para as infectadas pelo ZIKV PE243. Para tal, em condições NB2, cada fêmea foi anestesiada em banho de gelo, suas asas e patas foram arrancadas e sua probóscide introduzida em uma ponteira de pipeta contendo 5µl de soro bovino fetal. Passados 30 min, o soro potencialmente contendo a saliva da fêmea era lançado em tubo com 45 µl de meio Leibovitz L15. Imediatamente após a salivagem, a espermoteca de cada fêmea foi dissecada em PBS 1x sobre uma lâmina de vidro e observada ao microscópio óptico após coberta com lamínula. A análise da espermoteca buscava saber se as fêmeas haviam cruzado com os machos supostamente infectados. Os corpos e as salivas das fêmeas foram armazenados a -80°C.

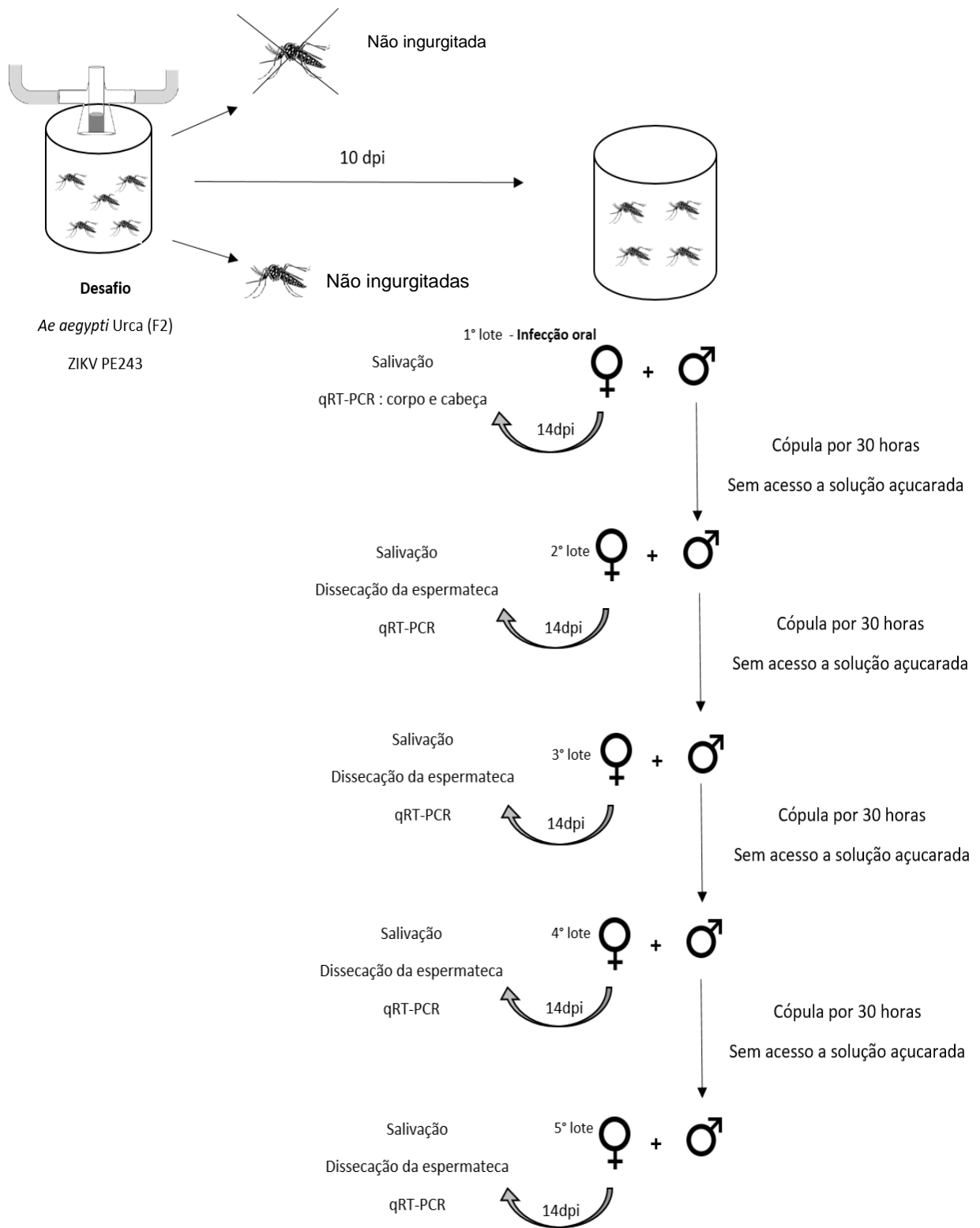


Figura 10: Esquema ensaio 5 - *Aedes aegypti* –Urca (F2)- ZIKV Rio-U1 e ZIKV PE243.

### **3.5 Diagnóstico da infecção por ZIKV**

O diagnóstico da infecção por ZIKV em mosquitos usados nos experimentos foi feito por inoculação de triturado de cabeça ou corpos em monocamada de cultura de células Vero e revelado após fixação e coloração por solução de cristal violeta em formaldeído, como detalhado abaixo. No caso do exame dos indivíduos resultantes de proles de fêmeas desafiadas oralmente ou de machos que copularam com fêmeas desafiadas oralmente, os triturados dos corpos foram também examinados por RT-qPCR, conforme descreveremos abaixo.

### **3.6 Maceração**

Os corpos (tórax + abdômem) e cabeças dos mosquitos analisados foram homogeneizados em tubos contendo microesferas de vidro com meio Leibovitz's L-15 e 4% de soro fetal bovino, acrescido de antibiótico e antifúngicos (gentamicina e fugizona, ambos a 0,1% e penicilina a 1%) por 20 segundos a 6.000 rpm. Para maceração de cabeça foram utilizados 250µL de meio, enquanto para corpos triturados individualmente usamos 500µL. Quando os corpos foram triturados em *pools* de 2 ou 5 indivíduos, usamos 1 mL de meio por tubo. A maceração dos tecidos dos mosquitos foi feita no homogeneizador Procellys 24 (Bertin Technologies, ref. 03119-200-RD000).

### **3.7 Plaqueamento**

Para reduzir as chances de contaminação microbiana, os homogeneizados foram centrifugados a 10.000 rpm, por 5 minutos, a 4°C, e apenas o sobrenadante foi inoculado em cultura de células. Geralmente recolhíamos 60 µL do sobrenadante e inoculávamos individualmente três diluições do mesmo material: 1/1, 1/10 e 1/100. As diluições eram feitas em meio Earle's 199 contendo 5% de soro fetal bovino, acrescido de antibiótico (penicilina 1%) e antifúngicos (gentamicina e fugizona 0,1%). Após a diluição, o material foi inoculado em placas de 96 poços contendo monocamada de células Vero preparada na véspera. Seguiu-se incubação por 1 hora a 37°C em atmosfera com 5% CO<sub>2</sub>, com ligeira agitação para homogeneização

a cada 15 min. Posteriormente a esse período, em cada poço foram adicionados 150µL de CMC (carboxi metil celulose) a 2,4% em meio Earle's 199 contendo 5% de soro fetal bovino. Após sete dias de incubação a 37°C e atmosfera de 5% CO<sub>2</sub>, o material foi fixado por formaldeído a 10% e após sucessivas lavagens, corado por cristal violeta a 0,04%. A infecção viral foi detectada a partir da ocorrência de efeito citopático e aparecimento de PFU.

Para a determinação das taxas de infecção e de disseminação viral, examinamos triturados de corpos e cabeças, respectivamente. Examinamos homogeneizados das cabeças de todas as fêmeas que foram desafiadas oralmente com ZIKV. O encontro de partículas virais na cabeça do mosquito significa que houve disseminação viral, requisito para as transmissões vertical e venérea. Por outro lado, examinamos os corpos das proles de fêmeas desafiadas oralmente (estudo da transmissão vertical), assim como os machos e fêmeas experimentados no estudo da transmissão venérea, determinando-se a taxa de infecção.

### **3.8 Extração de RNA**

O RNA viral foi extraído de uma amostra de 140 µL do sobrenadante do homogeneizado de tecido do mosquito (a partir de 250 µL de macerado de cabeça, 500 µL de corpo e 1ml de *pool*), utilizando-se o kit comercial QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Alemanha), de acordo com protocolo descrito pelo fabricante.

### **3.9 RT- qPCR**

Os homogeneizados foram submetidos à detecção específica do RNA viral do ZIKV através da RT-qPCR. Foi usado o kit SuperScript III Platinum one-step RT-qPCR (Invitrogen) e o QuantStudio 6 Flex Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Para cada reação utilizou-se: *primer forward* 600 nM (5'-CTTGGAGTGCTTGTGATT-3', posição genômica 3451-3468), *primer reverse* 600 nM (5'-CTCCTCCAGTGTTCAATTT-3', posição genômica 3637-3620) e sonda 800 nM (5'-FAM-AGAAGAGAATGACCACAAAGATCA-3'-TAMRA, posição do genoma 3494-3517). As sequências deste conjunto de primers foram fornecidas por Isabelle

Lepark-Goffart (Centro Nacional de Referência de Arboviroses, IRBA, Marseille, França). A transcrição reversa foi realizada a 45°C durante 15 min. As condições de qPCR foram 95°C durante 2 minutos, seguidos por 40 ciclos de amplificação de 95°C durante 15 segundos, 58°C durante 5 segundos e 60°C durante 30 segundos. Para cada ensaio, os números de cópias de RNA viral foram calculados por quantificação absoluta, utilizando curva padrão com RNA sintético de ZIKV (Bonald *et al.*, 2016), gentilmente fornecida pelo Laboratório de Biologia Molecular de Flavivírus.

### 3.10 Sequenciamento

O RNA obtido dos homogeneizados dos corpos dos machos infectados via transmissão venérea e dos *pools* de prole infectada foram utilizados para o sequenciamento com o objetivo de analisar possíveis alterações genéticas durante os processos de transmissão venérea e vertical, respectivamente em todo genoma viral. Para tal, e com a finalidade de comparação, também foram sequenciadas amostras das cepas virais utilizadas nas infecções orais (Rio-U1 e Rio-S1) e homogeneizados de fêmeas infectadas responsáveis pelas transmissões venérea e vertical avaliadas nesse estudo. Esta etapa do experimento foi realizado em colaboração com a equipe do Laboratório de Biologia Molecular de Flavivirus.

Inicialmente, o RNA viral foi submetido à transcrição reversa com o sistema de síntese de primeira cadeia Superscript IV (Invitrogen) e *primers* randômicos aleatórios, de acordo com as recomendações do fabricante. A reação foi realizada a 23°C por 10 min, 55°C por 10 min e 80°C por 10 min. Em seguida, para a realização da PCR foi usado o kit Go Taq Master Mix green (Promega) e *primers* específicos para oito regiões do genoma viral. O produto da PCR é submetido então à purificação pelo utilizado o kit Qiagen.

As reações de sequenciamento foram realizadas utilizando-se o Kit ABI RISMÒ Big DyeÒ Terminator v3.1 (PE Applied Biosystems) de acordo com as informações do fabricante e adaptadas no Laboratório de Biologia Molecular de Flavivirus. Para a reação de sequenciamento, utilizamos as seguintes concentrações: 1 µL de DNA purificado; 1 µL do *primer* utilizado contendo 3,2 pmol; 1,2 µL de BigDye; 1,3 µL de tampão PBS; 5,5 µL de água. A reação de

sequenciamento foi realizada nas seguintes condições: 96°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos, 60°C por 4 minutos, durante 40 ciclos.

A precipitação do produto do sequenciamento em placa de 96 poços foi realizada utilizando-se 2,5 µL de EDTA a 125 mM seguido de uma breve centrifugação. Em seguida, foram adicionados 25 µL de etanol PA em cada poço. Após 15 min de incubação em temperatura ambiente, a placa foi centrifugada a 3.000g por 30 min a 4°C. Depois desta etapa, o líquido contido na placa foi desprezado e esta submetida à centrifugação de forma invertida sobre duas folhas de lenço de papel absorvente, a 1268 rpm por 30 seg. Novamente, cada poço recebeu etanol (30 µL), para lavagem dos precipitados, e a placa foi centrifugada a 1650 g por 15 min a 4°C, sendo o líquido em suspensão desprezado em um único movimento. Após essa etapa, a placa foi centrifugada de forma invertida sobre duas folhas de lenço de papel, a 1268 rpm por 30 seg. Por fim, houve incubação da placa aberta a 65°C por 5 min.

As reações foram analisadas no sequenciador de 48 capilares ABI PRISMÒ 3730 Genetic Analyzer (Applied Biosystems), situado na Plataforma PDTIS, Fiocruz.

### **3.11 Análise Estatística**

Para comparar as taxas de postura e de eclosão de ovos do grupo de fêmeas infectadas e não infectadas, foi adotado o teste Mann Whitney. Foi considerada diferença significativa quando os valores de p foram inferiores a 0,05. As análises dos dados foram realizadas com o software PRISM 5.0 (GraphPad Software, San Diego-CA, EUA, 2007).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Taxa da transmissão vertical

A Tabela 2 mostra os resultados relativos à transmissão vertical obtidos com duas populações de *Ae aegypti* e duas linhagens de ZIKV. Os dados confirmam a disseminação viral nas fêmeas progenitoras, resultando em provável infecção de seu sistema reprodutor, requisito para a transferência para a prole. A taxa de infecção (TI) das fêmeas progenitoras sacrificadas no 5° dpi parâmetro verificado para fêmeas da Urca infectadas com a cepa Rio-S1 do vírus Zika, foi de 80%. A taxa de disseminação nas progenitoras variou de 10% a 73% nas fêmeas de diferentes populações em diferentes dpi. Ou seja, houve baixa taxa de disseminação para a cepa ZIKV Rio-U1, ao mesmo tempo que mesma população (Urca) e geração de mosquitos testada, apresentou elevada taxa de disseminação com a cepa ZIKV Rio-S1. Obviamente, as chances de transmissão vertical no primeiro caso ficaram reduzidas.

A taxa de infecção da prole (machos e fêmeas) foi determinada a partir de análises individuais ou em *pool* por RT- qPCR (Tabela 2). Os *pools* eram compostos por mosquitos do mesmo sexo e ensaio. Apenas um *pool* de prole foi positivo para ZIKV, confirmando ocorrência de transmissão vertical. Tratou-se de um *pool* contendo cinco indivíduos machos oriundos de fêmeas de Manguinhos desafiadas com ZIKV Rio-S1, cujas desovas foram recolhidas 15 dpi, resultando em taxa de infecção que varia de 0,5% a 2,5% (considerando que todos os indivíduos do *pool* estavam infectados ou considerando apenas um indivíduo, respectivamente) (Tabela 2). Esses indivíduos tinham 11 dias de vida adulta quando foram mortos e examinados.

Os resultados resumidos na Tabela 2 podem ser vistos em detalhes, mosquito a mosquito, no apêndice 1.

Tabela 2: Taxa de disseminação e infecção, respectivamente, das fêmeas de *Aedes aegypti* progenitoras desafiadas oralmente com ZIKV e de suas proles, estas examinadas com 5, 7 e 11 dias após emergência dos adultos. As progenitoras são oriundas de duas populações, Manguinhos e Urca, desafiadas com as cepas Rio-S1 e Rio-U1. As desovas foram coletadas em diferentes intervalos após o desafio oral com ZIKV (dpi). Os corpos (abdome + tórax) da prole foram analisados em *pool* e/ou individualmente por qPCR, após passagem por cultura de células Vero, para determinar a taxa de infecção. O mesmo foi feito com as cabeças das progenitoras (taxa de disseminação).

População de <i>Ae aegypti</i>	Cepa ZIKV	Progenitora			Prole						
		N	dpi	TD (%)	5 dpe		7 dpe		11 dpe		
					N <i>pool5</i>	TI (%)	N <i>pool2</i>	TI (%)	N <i>pool5</i>	N	TI (%)
Man (F>10)	Rio-S1	26	15	73	20f 20m	0	10f 10m	0	20f 20m	-	0 f 0,5%a 2,5%m
	Rio-U1	29	19	10	-	-	-	-	59f 43m	-	0
UR (F2)	Rio-S1	27	21	61	-	-	-	-	-	51f 91m	0

dpe = dias após emergência do adulto, dpi = dias após infecção, f = fêmea, m = macho, Man = Manguinhos, N = número de mosquitos testado individualmente, N *pool2* = número de *pools* contendo 2 indivíduos cada, N *pool5* = número de *pools* contendo 5 indivíduos cada, TD = taxa de disseminação, TI = taxa de infecção, UR = Urca.

## 4.2 Taxa de postura e eclosão de ovos

Em um dos experimentos de transmissão vertical (ensaio 3), das 31 fêmeas desafiadas com o vírus Zika, 19 (61%) foram efetivamente infectadas. O número de ovos postos por cada fêmea desafiada foi contado para investigar se a infecção por ZIKV interfere com a fecundidade de *Aedes aegypti*. De um total de 1.671 ovos, 1.146 (69%) foram postos por fêmeas infectadas. Embora o número de ovos postos por cada fêmea infectada e não infectada tenha variado, gerando medianas iguais a 49,5 e 60, respectivamente (Tabela 3) (Figura 11), não houve diferenças significativas na fecundidade ( $p = 0,3613$ ). Em relação ao total de ovos eclodidos (564), 204 (36%) e 360 (63,8%) derivaram de fêmeas infectadas (Figura 12). Não se detectou diferenças na fertilidade ( $p = 0,6103$ ) entre fêmeas infectadas e não infectadas com ZIKV. Detalhes do número de ovos postos e eclodidos por cada fêmea (grupos infectado e não infectado) estão no Anexo 2.



Tabela 3: Número total e mediana de ovos postos e de eclosões de acordo com a natureza das fêmeas de *Ae aegypti* (Urca) desafiadas oralmente com ZIKV Rio-S1 (ensaio 3).

	Ovos postos		Eclosão	
	Total	Mediana	Total	Mediana
<b>Fêmeas infectadas</b>				
(ZIKV disseminado)	1.146	49,5	204	10
<b>Fêmeas não infectadas</b>				
(Sem disseminação do ZIKV)	525	60	360	12

Figura 11: Total de ovos postos de acordo com a natureza das fêmeas de *Ae aegypti* (Urca) desafiadas oralmente com ZIKV Rio-S1 (Ensaio3). Em cada amostra, a barra horizontal indica a mediana.

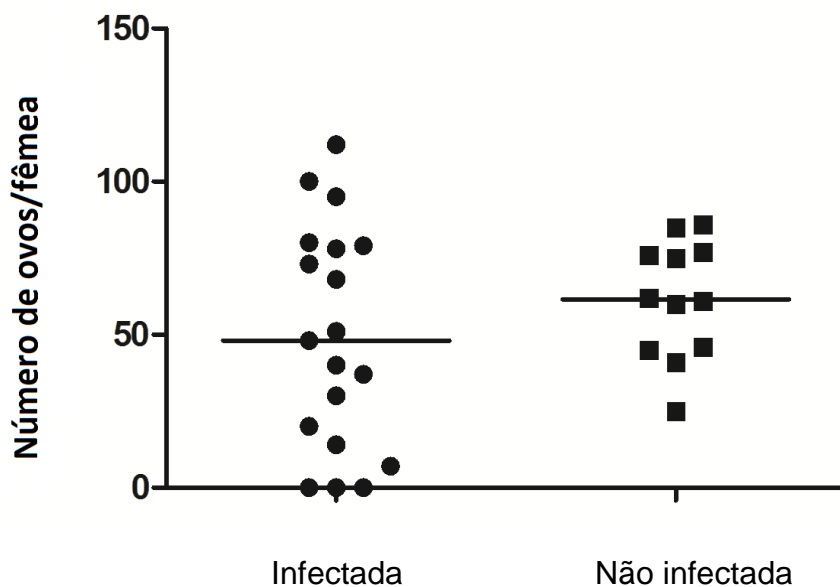
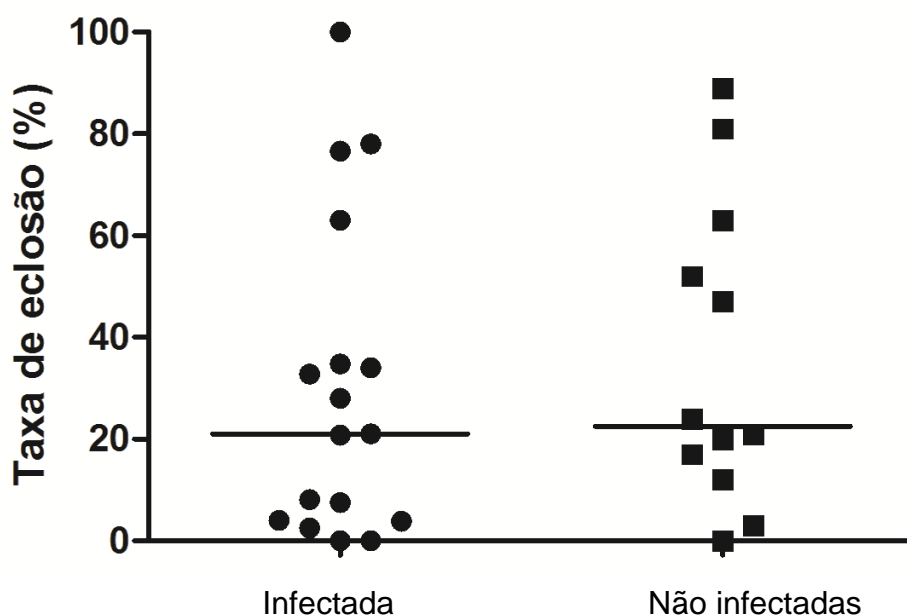


Figura 12: Taxa de eclosão de ovos postos por fêmeas de *Ae aegypti* da Urca, desafiadas oralmente com ZIKV Rio-S1 (ensaio 3). Em cada grupo, a barra horizontal indica a mediana.



### 4.3 Taxa de infecção venérea

Análise por RT- qPCR dos corpos de 10 fêmeas da Urca e 10 fêmeas de Goiânia, 10 dias depois da infecção oral com a cepa ZIKV Rio-U1 (ensaio 4) identificou 7 e 5 fêmeas positivas, respectivamente, ou seja, taxas de disseminação de 70% e 50%. A taxa de infecção dos machos de Urca e Goiânia que ficaram em contato durante 5 dias com as fêmeas das respectivas populações também foi obtida por RT-qPCR. Num total de seis mosquitos machos de Goiânia, dois foram positivos (33%). Nenhum dos dois mosquitos da Urca se mostrou positivo para o vírus Zika. Os reminescentes do alimento açucarado avaliado para a presença viral foi negativo segundo a análise de RT-qPCR.

**Tabela 4: Taxa de infecção de machos e fêmeas de *Ae aegypti* da Urca (UR) e Goiânia (GO). Machos virgens ficaram em contato por 5 dias com fêmeas das respectivas populações, que haviam sido infectadas, 10 dias antes, por via oral com ZIKV cepa Rio-U1 (ensaio 4).**

População	Fêmeas		Machos	
	N	TI (%)	N	TI (%)
UR	10	70	2	0
GO	10	50	6	33

N=número total, TI= taxa de infecção.

Para o ensaio 5, fêmeas da Urca desafiadas oralmente com as cepas Rio-U1 ou PE243 de ZIKV, tiveram suas cabeças e carcaças avaliadas por qRT-PCR (apêndice 8.6) no 14° dpi. Esse grupo corresponde ao chamado '1° lote', no qual as fêmeas infectadas seriam responsáveis pela transmissão sexual do vírus aos machos. De um total de 30 fêmeas desafiadas com ZIKV Rio-U1, 19 foram positivas, correspondendo a uma taxa de infecção de 63%, enquanto que das 30 fêmeas desafiadas pelo ZIKV PE243, apenas cinco foram positivas (16,6%). As taxas de disseminação, calculadas a partir do número de cabeças positivas de fêmeas desafiadas (Tabela 4), alcançaram 26% (5 cabeças positivas) para ZIKV Rio-U1 e 20% (1 cabeça positiva) para PE243.

Os machos tiveram seus corpos analisados por inoculação por plaqueamento e RT-qPCR com 14 dpc. Dos 110 mosquitos machos que cruzaram com fêmeas infectadas pelo ZIKV Rio-U1, apenas 1 se mostraram positivo para ambas as técnicas de detecção, resultando numa taxa de infecção de 0,9% para este grupo. Nenhum dos 38 machos que ficaram em contato com fêmeas infectadas pela cepa PE243 foi positivo por nenhuma das técnicas empregadas (Tabela 5).

Os diferentes grupos de fêmeas que cruzaram subsequentemente com machos supostamente infectados via sexual pelo ZIKV (cepa Rio-U1 e PE243) receberam denominações de acordo com o dpc dos machos, sendo 2°, 3°, 4° e 5° lotes. No 14° dpi, 30 fêmeas de cada lote foram submetidas à salivação forçada e suas espermatecas dissecadas e examinadas para a determinação da inseminação. Nenhuma fêmea do 2°, 3°, 4° e 5° lote se mostrou positiva para ZIKV, segundo a inoculação de homogêneos de corpos em cultura de célula. Por isso, suas cabeças e salivas não foram analisadas. Por outro lado, as taxas de inseminação das

espermatecas foram variadas, sendo 46° a taxa mais baixa e 90° a taxa mais alta, como visto na Tabela 5.

**Tabela 5: Taxas de infecção e disseminação de ZIKV em fêmeas de *Ae aegypti* da Urca (UR) desafiadas com diferentes isolados, de acordo com o lote. O 1° lote foi desafiado oralmente com ZIKV Rio-U1 e PE243 e examinado com 14 dpi, quando as fêmeas cruzaram com machos virgens (mostrados nas colunas 'macho'). Os lotes 2 a 5 correspondem a fêmeas virgens e não infectadas que tiveram contato com esses machos em diferentes períodos. As taxas de infecção e de inseminação dessas fêmeas foram determinadas no 14° dpc. A taxa de infecção de machos foi determinada em 14 dpc (Urca – F2) (ensaio 5).**

Cepa	Macho		Fêmeas														
			1° LOTE			2° LOTE			3° LOTE			4° LOTE			5° LOTE		
	N	TI	N	TI	TD	N	TI	TINS	N	TI	TINS	N	TI	TINS	N	TI	TINS
Rio-U1	110	0,9%	30	63%	26%	30	0	90%	30	0	77%	30	0	60%	30	0	70%
PE243	38	0	30	46%	20%	30	0	90%	30	0	50%	30	0	90%	30	0	46%

N= número total de indivíduos, TI= taxa de infecção, TD= taxa de disseminação, TINS= taxa de inseminação.

#### 4.4 Sequenciamento

O sequenciamento do RNA proveniente do *pool* de 5 machos positivos para ZIKV, resultantes de transmissão vertical (Tabela 2), ou seja, filhos de fêmeas desafiadas oralmente com ZIKV Rio-S1, foi comparado com a sequência da amostra original do vírus, utilizada para o desafio oral das fêmeas progenitoras. Houve substituição de nucleotídeos nas posições 4.102 (gene que codifica a proteína NS2A) e 6.897 (gene que codifica a proteína NS2B); no primeiro caso, substituição de uma alanina por uma guanina, no outro, de uma timina por uma citosina. A mutação ocorrida na posição 4.102 (NS2A) acarretou em permuta do aminoácido lisina pela alanina, enquanto a mutação na posição 6.897 não gerou substituição de aminoácidos expressos.

Em relação à transmissão venérea, comparou-se o sequenciamento do RNA de ZIKV de um macho positivo para o vírus depois de contato com fêmeas desafiadas oralmente com a cepa Rio-U1 com o sequenciamento do vírus utilizado para a infecção das fêmeas do 1° lote, além do vírus extraído a partir de tais fêmeas. Foram detectadas trocas nucleotídicas na posição 1.115 (proteína E) no qual uma

timina foi substituída por uma citosina, sem gerar substituição de aminoácidos expressos.

## 5. DISCUSSÃO

O ZIKV é um flavivírus que tem como principal vetor o mosquito *Aedes aegypti*. Assim como outros arbovírus, possui como rota de transmissão mais importante aquela do tipo horizontal, na qual uma fêmea susceptível se infecta durante o repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado em viremia e, após um determinado período, torna-se apta a transmitir o arbovírus em evento de hematofagia subsequente. No entanto, alguns arbovírus também podem ser transmitidos verticalmente por seus vetores, ou seja, fêmeas infectadas transmitem o vírus à sua prole. A transmissão vertical em mosquitos vetores já foi constatada em vários trabalhos utilizando diversos arbovírus de grande importância médica, como DENV, febre amarela, CHIKV, vírus da encefalite japonesa e vírus do oeste do Nilo, além de flavivírus não patogênicos (Blitvich e Firth, 2015; Bolling *et al.*, 2015; Tesh *et al.*, 2016). A variação da taxa para esse tipo de transmissão é grande e talvez dependa de diversos fatores como espécie e população do mosquito, condições ambientais (temperatura e umidade), origem geográfica do vírus, fase em que a prole é analisada (imaturo ou adulto), ciclo gonotrófico e sua relação com a taxa de disseminação viral das progenitoras (este último parâmetro ligado ao método de infecção e à carga virêmica) e superinfecção (Beaty *et al.*, 1980; Hardly *et al.*, 1980; Tesh, 1984; Smith *et al.*, 2007; Lequime *et al.*, 2016).

No caso do ZIKV, transmissão vertical foi demonstrada pela primeira vez com a detecção de vírus em machos de *Aedes aegypti* cujas progenitoras haviam sido infectadas via intratorácica. No entanto, este procedimento, experimental, supera duas importantes barreiras (*MEB* e *MIB*) e, com isso, facilita a disseminação viral e aumenta de forma artificial as chances de transmissão vertical (Smith *et al.*, 2007; Thangamani *et al.*, 2016). Diferentemente de tal trabalho, em nosso estudo foi possível provar a existência de transmissão vertical do ZIKV (cepa Rio-S1) em mosquitos *Aedes aegypti* (população Manguinhos) machos - filhos de progenitoras infectadas via alimentação virêmica (via que corresponde à rota natural da infecção do vetor). Essa também foi a estratégia usada por Ciota *et al.* (2017), independente e simultaneamente ao nosso estudo, cujos resultados foram recentemente divulgados em sistema *ahead of print*.

Interessante notar que, dos três ensaios de investigação da transmissão vertical do ZIKV (Tabela 2), o fenômeno foi detectado naquele em que as fêmeas apresentaram a maior taxa de disseminação viral (73%), cujos ovos foram recolhidos 15 dias depois do desafio oral com vírus e no lote cujos filhos foram examinados 11 dias após a emergência (os lotes examinados com cinco e sete dias foram negativos).

Coincidentemente, só foi detectada transmissão vertical no ensaio com a população de Manguinhos - e não da Urca. Porém, não tendo sido realizadas réplicas com as mesmas condições, não achamos conveniente estabelecer correlação entre a natureza da população ou da cepa viral usada. No entanto, do ponto de vista das fêmeas progenitoras, é provável que a maior taxa de disseminação, associada ao tempo entre o desafio infeccioso oral e ao tempo pós-emergência da prole tenham sido fatores que contribuíram para ocorrência de transmissão vertical. Ainda assim, a taxa de disseminação nas progenitoras parece se destacar como fator determinante. Assim, a ausência de detecção de transmissão vertical nos ensaios 2 e 3 pode estar ligada às taxas de disseminação das progenitoras (10% e 63%), mais baixas se comparadas às das progenitoras do ensaio 1. Mas, fatores intrínsecos das populações utilizadas e as combinações cepa do vírus & população de mosquito e o mecanismo de transmissão vertical do tipo transovo (principal mecanismo utilizado por flavivírus) podem estar também influenciando estes resultados (Blitvich e Firth, 2015; Bolling *et al.*, 2015). De qualquer forma, no ensaio 2, com o ZIKV disseminado em apenas 10% das fêmeas (Urca), a expectativa de detecção de transmissão vertical era baixa. As populações de *Ae aegypti* do Rio de Janeiro têm demonstrado taxas de disseminação acima de 60% (geralmente entre 80-100%) quando desafiadas por linhagens brasileiras de ZIKV (Fernandes *et al.*, 2016). É possível que algum problema metodológico tenha resultado nesta taxa inesperada; por isso, qualquer comparação dos resultados deste ensaio com os outros dois, com taxas bem mais altas de disseminação (66% e 73%) deve ser feita com cautela.

No experimento em que foi detectada transmissão vertical (Tabela 2), 5% dos *pools* de machos testados com 11 dpe foi positivo: 1 pool +/ 20 *pools* de 5 indivíduos testados, somando-se um total 100 mosquitos. Se considerarmos o total de *pools* testados nesse dpe (20 *pools* de cada sexo, totalizando 200 mosquitos examinados), a taxa de transmissão cai para 2,5%. No entanto, se analisarmos o número de

indivíduos total de cada *pool*, havendo a possibilidade de um, dois, três, quatro ou até os cinco indivíduos estarem positivos, a taxa será de no mínimo 0,5%. E se contabilizarmos o total de mosquitos filhos testados com mesma quantidade de dpe (11) nos experimentos 1 e 3, nos quais a taxa de disseminação se assemelharam (DIR = 66 e 73%) temos um total de 342 mosquitos 200 e 142, respectivamente). Se considerarmos o exame em *pools* de 5 indivíduos cada (como feito no ensaio 1), a expectativa de taxa de transmissão do ZIKV em *Ae aegypti* do Rio de Janeiro cai para 1,8% (1 *pool* + / 68 *pools* examinados). A taxa de transmissão vertical em uma série de populações dessa espécie desafiadas com diferentes cepas de ZIKV, porém com títulos virais bem mais elevados no repasto sanguíneo, variou de 0 a 2,8% (Ciota *et al.*, 2017).

De fato, machos de *Aedes* têm sido encontrados naturalmente infectados com ZIKV, seja *Aedes furcifer*, na África (Diallo *et al.*, 2014), seja *Ae aegypti* e *Ae albopictus* nas Américas (Ferreira-de-Brito *et al.*, 2016). Portanto, essa via de transmissão, ainda que aparentemente pouco frequente em laboratório, pode ser importante na perpetuação do vírus na natureza. De qualquer modo, parte dos machos de mosquitos achados naturalmente infectados podem ter adquirido a infecção via venérea, como discutiremos adiante.

Antes de passar a esse tema, é interessante fazer um comentário em relação à taxa de oviposição dos *Ae aegypti* que desafiámos com ZIKV. Já se havia verificado que populações de *Ae aegypti* do Rio de Janeiro infectados por DENV-2 (cepa 16681) colocaram menos ovos, e com menor frequência, se comparados com mosquitos não infectados (Sylvestre *et al.*, 2013). Em nosso trabalho, não houve diferença significativa nas taxas de oviposição nem nas taxas de eclosão entre os grupos de fêmeas infectadas ou não com ZIKV (Tabela 3, Figuras 10 e 11). No entanto, há necessidade de ensaios adicionais para avaliar de forma robusta a potencial influência da infecção por ZIKV na reprodução dos mosquitos *Ae. aegypti*.

Outra via de transmissão horizontal, menos frequente, é a transmissão venérea, ou sexual. Nela, uma fêmea infectada passa o vírus a um macho não infectado, ou vice-versa, durante a cópula (Higgs e Beaty, 2004). Assim como a transmissão vertical, a transmissão venérea é também apontada como um mecanismo potencial de manutenção de um arbovírus em períodos entre epidemias. Sabe-se que mosquitos machos podem se infectar experimental ou naturalmente com um arbovírus via transmissão vertical. Este fenômeno sugere que, a partir dos

machos, pode-se dar início a um novo ciclo de infecção por transmissão venérea a fêmeas (Mavale *et al.*, 2010). Essa rota de infecção foi constatada em *Ae aegypti* e *Ae albopictus*, infectados por CHIKV e DENV, respectivamente por Rosen (1987) e Mavale *et al.* (2010). Em ambos os trabalhos, mosquitos machos foram infectados via intratorácica e postos para inseminar fêmeas virgens da mesma espécie. Porém, no trabalho desenvolvido por Rosen (1987) fêmeas de *Ae albopictus*, infectadas com DENV via intratorácica, não foram capazes de transmitir o vírus por via sexual a machos não infectados. Outros estudos envolvendo diferentes artrópodes vetores infectados por arbovírus demonstraram a via sexual como rota para transmissão (Thompson e Beaty, 1977; Ovenden e Mahon, 1984; Shroyer, 1990; Geevarghese *et al.*, 2003; Mavale *et al.*, 2005, 2006).

No presente trabalho foi observado, em dois ensaios independentes, que fêmeas de *Ae aegypti* foram capazes de transmitir o ZIKV por via venérea. Num primeiro ensaio para investigar esta rota de transmissão (ensaio 4), fêmeas de *Ae aegypti* de Goiânia infectadas por ZIKV Rio-U1 conseguiram transmitir o vírus a machos da mesma espécie e população, ao se manterem juntos na proporção 2:1 (duas fêmeas por macho) por 5 dias, compartilhando a mesma fonte de carboidratos (algodão embebido por solução de sacarose a 10%). A negatividade da análise dos algodões embebidos usados por ambas as populações testadas (Goiânia e Urca) sugere a transmissão venérea a partir das fêmeas infectadas como a única via de infecção dos machos. Os dois machos analisados da população de mosquitos da Urca foram negativos. Contudo, esse resultado não é representativo, devido ao número amostral muito baixo. Já no segundo ensaio, no qual a proporção macho e fêmea foram 1:1 e cruzamento por 36 horas sem compartilhar algodão com solução açucarada, detectou-se um macho de *Ae aegypti* (Urca) positivo para ZIKV Rio-U1

Tendo em vista que as taxas de infecção das fêmeas infectadas oralmente, as condições ambientais, a população de mosquito e cepa viral usada foram as mesmas em ambos os ensaios, acreditamos que a proporção diferenciada de fêmeas em relação aos machos e o tempo de cruzamento pode ter favorecido a transmissão sexual do ZIKV Rio-U1 a machos de *Ae aegypti* (Urca) no ensaio 5, não observado no ensaio 4.

Apesar da ausência de partículas virais nos algodões fornecidos preferimos descartar qualquer possibilidade de infecção que não fosse pela rota sexual. E, ainda, sabendo através de testes preliminares que o tempo estipulado para o



cruzamento seria suficiente para inseminar a maior parte das fêmeas, adotamos tais parâmetros para o ensaio 5.

Quando tentamos verificar se machos que adquiriram a infecção por ZIKV por via venérea seriam capazes de transmiti-lo para fêmeas virgens e não infectadas, não logramos comprovar o fenômeno (Tabelas 1 e 4). As fêmeas inseminadas por machos em diferentes dpc não foram infectadas com ZIKV via venérea, embora a análise das espermatecas tenha comprovado a transferência de espermatozoides. No entanto, visto que a taxa de infecção dos machos (ZIKV Rio-U1) foi de 0,9%, correspondendo a um único indivíduo positivo, do qual se desconhece se a disseminação viral tinha atingido os órgãos reprodutores, a chance de infecção de fêmeas era quase nula. Outro fator que pode contribuir para essa negatividade é o comportamento reprodutor dos machos de *Ae aegypti*. Sabe-se que após a cópula o macho impede temporariamente a inseminação das fêmeas por ele copuladas por outros machos (Craig, 1967; Lourenço-de-Oliveira, 2015a). Assim, a probabilidade de que o mosquito infectado tenha inseminado e transmitido o vírus sexualmente para uma fêmea dentro de uma gaiola com vários outros machos é reduzida.

Em relação à genética viral, um estudo comparando cepas das duas linhagens, pré e pós-epidemia de ZIKV ocorrida em 2007, a partir de mosquitos, animais e pessoas infectadas, constatou que os genes desse vírus se mostram relativa estabilidade, detectando 24 substituições de aminoácidos na linhagem asiática e 75 na linhagem africana em proteínas estruturais e não estruturais. Tais alterações se concentraram principalmente nas proteínas NS5 e NS3, que constituem os principais componentes enzimáticos do complexo de replicação viral (Zhu *et al*, 2016). Mutações em outros flavivírus podem estar associadas a mudanças na virulência, tropismo e replicação (Whiteman *et al.*, 2011). As consequências e a importância dessas mudanças no ZIKV precisam ainda ser avaliadas em estudos futuros.

No presente trabalho foram observadas mutações no genoma do vírus extraído a partir do *pool* da prole macho (ensaio 1) (apêndice 8.7) nos genes das proteínas NS2A e NS2B. Outra substituição observada, dessa vez no macho infectado sexualmente, ao compararmos os genomas virais (macho x fêmeas do 1º lote x ZIKV Rio U1) foi ao gene da proteína E (apêndice 8.8). O impacto dessas mudanças genéticas é desconhecido, sendo necessários novos estudos. Vale ressaltar que a redundância do código genético permite que muitos aminoácidos

sejam traduzidos por mais de um códon, mantendo a eficiência e precisão da produção de aminoácidos das proteínas. Por isso, nem todas as mutações na sequência genética do vírus irão gerar mudanças em suas proteínas.

## 6. CONCLUSÕES

O ZIKV (cepa Rio-S1) foi transmitido verticalmente pelo mosquito *Aedes aegypti* (população Manguinhos) a sua prole, quando esta foi examinada com 11 dias de emergência, gerando taxa de infecção que varia de 2,5% a 0,5%.

Não houve diferença significativa nas taxas de oviposição e eclosão de ovos provenientes de fêmeas infectadas e não infectadas pelo ZIKV Rio-S1.

Fêmeas de *Aedes aegypti* (Goiânia e Urca) infectadas por via oral foram capazes de transmitir ZIKV Rio-U1 a machos após 10 e 12 dias da infecção. A variação da frequência da transmissão venérea de fêmeas infectadas para machos entre os experimentos pode ser resultado, por exemplo, da variação do número de insetos utilizados, além do tempo de cruzamento entre as fêmeas infectadas e os machos.

O RNA sequenciado a partir do *pool* de machos infectados verticalmente, quando alinhado com a sequência genômica do vírus utilizado para infecção das progenitoras, apresentou mutações nos genes das proteínas NS2A e NS2B. No entanto apenas uma das mutações (NS2A) gerou troca de aminoácido na proteína.

Ao comparar as sequências do RNA do macho (ensaio 5) infectado sexualmente, com a do vírus usado para infectar as fêmeas com que copularam e com o vírus extraído a partir de fêmeas infectadas, foi observada mutação no gene referentes à proteínas E ( sem troca de aminoácido).

Não podemos afirmar que as troca de aminoácidos na proteína NS2A, pode acarretar alterações de alguma função viral, uma vez que não há ainda estudos suficientes para avaliar tais possíveis mudanças.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aliota M.T, Peinado S.A, Osorio J.E, Bartholomay L.C. 2016. *Culex pipiens* and *Aedes triseriatus* mosquito susceptibility to Zika virus. *Emerg Infect Dis.* 22(10):1857-9.

Amraoui F, Atyame-Nten C, Vega-Rúa A, Lourenço-de-Oliveira R, Vazeille M, Failloux *Culex*.2016. mosquitoes are experimentally unable to transmit Zika virus. *Euro Surveill.* 21(35).

Antonova Y, Alvarez KS, Kim YJ, Kokoza V, Raikhel AS.2009.The role of NF-kappaB factor REL2 in the *Aedes aegypti* immune response. *Insect Biochem Mol Biol.* 39(4): 303-314.

Akoua-Koffi C, Diarrassouba S, Benie VB, Ngbichi JM, Bozoua T, Bosson A, et al. Investigation surrounding a fatal case of yellow fever in Cote d'Ivoire in 1999. *Bull Soc Pathol Exot.* 94(3):227–30.

Arias-Goeta C, Mousson L, Rougeon F, Failloux AB.2013. Dissemination and transmission of the E1-226V variant of chikungunya virus in *Aedes albopictus* are controlled at the midgut barrier level. *PLoS One.*8(2):e57548.

Arias-Goeta C, Moutailler S, Mousson L, Zouache K, Thiberge JM, Caro V, Rougeon F, Failloux AB. 2014. Chikungunya virus adaptation to a mosquito vector correlates with only few point mutations in the viral envelope glycoprotein. *Infect Genet Evol.* 24:116-26.

Beaty B.J, Tesh R.B, Aitken THG. 1980. Transovarial transmission of yellow fever virus in *Stegomyia* mosquitoes. *Am J Trop Med Hyg.* 29: 125–132.

Black W C e DW Severson. Genetics of Vector Competence. In: W. H. Marquardt (ed). *Biology of Disease Vectors.* London: *Elsevier Academic Press.*2005.

Blitvich BJ, Firth AE.2015. Insect-Specific Flaviviruses: A Systematic Review of Their Discovery, Host Range, Mode of Transmission, Superinfection Exclusion Potential and Genomic Organization. *Viruses.* 7(4): 1927-1959.

Boccolini D, Toma L, Di Luca M, Severini F, Romi R, Remoli ME, Sabbatucci M, Venturi G, Rezza G, Fortuna C. 2016. Experimental investigation of the susceptibility of Italian *Culex pipiens* mosquitoes to Zika virus infection. *Euro Surveill.* 1: 21(35)

Bolling BG, Weaver SC, Tesh RB, Vasilakis N. 2015. Insect-Specific Virus Discovery: Significance for the Arbovirus Community. *Viruses.* 7(9):4911-28.

Bourtzis K, Dobson SL, Xi Z, Rasgon JL, Calvitti M, Moreira LA, Bossin HC, Moretti R, Baton LA, Hughes GL, Mavingui P, Gilles JR. 2014. Harnessing mosquito-Wolbachia symbiosis for vector and disease control. *Acta Trop.* 132:150-63.

Bonaldo MC, Ribeiro IP, Lima NS, Santos AAC, Menezes LSR, Cruz SOD. 2016. Isolation of infective Zika virus from urine and saliva of patients in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis.* 10(6):e4816.

Boorman JPT, Porterfield JS. 1956. A simple technique for infection of mosquitoes with viruses; transmission of Zika virus. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 50(3):238-42.

Bosio CF, Beaty BJ, Black WC. 1998. Quantitative genetics of vector competence for dengue-2 virus in *Aedes aegypti*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 59:965–970.

Campbell CL, Harrison T, Hess AM, Ebel GD. 2014. MicroRNA levels are modulated in *Aedes aegypti* after exposure to Dengue. *Insect Mol. Biol.* 23: 132–139.

Carrington LB, Armijos MV, Lambrechts L, Barker CM, Scott TW. 2013. Effects of fluctuating daily temperatures at critical thermal extremes on *Aedes aegypti* life-history traits. *PLoS One.* 8(3):e58824.

Carvalho-Leandro D, Ayres CF, Guedes DR, Suesdek L, Melo-Santos MA, F, Cordeiro MT, Regis LN, Marques ET, Gil LH, Magalhaes T. 2012. Immune

transcript variations among *Aedes aegypti* populations with distinct susceptibility to dengue virus serotype 2. *Acta Trop.*124(2):113-9.

Castro MG, Nogueira RM, Schatzmayr HG, Miagostovich MP, Lourenço-de-Oliveira R. 2004. Dengue virus detection by using reverse transcription-polymerase chain reaction in saliva and progeny of experimentally infected *Aedes albopictus* from Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.*99: 809-14.

Centers for Disease Control and Prevention, 2010. Arbovirus Catalog. <https://wwwn.cdc.gov/arbocat/VirusBrowser.aspx>. Acesso em 22 de dezembro de 2016.

Centro de Vigilância Epidemiológica (CVE). Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. Coordenadoria de Controle de Doenças. Nota Informativa Febre pelo Vírus Zika no Estado de São Paulo. Acesso em 28 dezembro de 2016.

Charron MVP, Balenghien T, Seegers H, Langlais M, Ezanno P. 2013.How Much Can Diptera-Borne Viruses Persist Over Unfavourable Seasons. *PLoS ONE.*8: e74213.

Chávez JH, Silva JR, Amarilla AA, Moraes Figueiredo LT. 2010. Domain III peptides from flavivirus envelope protein are useful antigens for serologic diagnosis and targets for immunization. *Biologicals.* 2010. 38(6):613-8.

Chomposri J, Thavara U, Tawatsin A, Boonserm R, Phumee A, Sangkitporn S, Siriyasatien P. 2016. Vertical transmission of Indian Ocean Lineage of chikungunya virus in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* mosquitoes. *Parasit Vectors.* 9: 227.

Chouin-Carneiro T, Vega-Rua A, Vazeille M, Yebakima A, Girod R, Goindin D, Dupont-Rouzeyrol M, Lourenço-de-Oliveira R, Failloux AB. 2016. Differential Susceptibilities of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from the Americas to Zika Virus. *PLoS Negl Trop Dis.*10(3):e0004543

Ciota AT, Bialosuknia SM, Ehrbar DJ, Kramer LD. 2017. Vertical Transmission of Zika Virus by *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* Mosquitoes. *Emerg Infect Dis.*15: 23(5).

Ciota AT, Kramer LD .2010. Insights into arbovirus evolution and adaptation from experimental studies. *Viruses.* 2: 2594-2617

Claire L. Donald C.L , Brennan B, Cumberworth S.L, Rezelj V.V, et al. 2016. Full Genome Sequence and sfRNA Interferon Antagonist Activity of Zika Virus from Recife, Brazil. *Plos Neglected Tropical Diseases.*

Clements A.N, The Biology of mosquitoes: Development, nutrition, and reproduction. Chapman & Hall. 1992.pp 509.

Craig GB Jr. 1967. Mosquitoes: female monogamy induced by male accessory gland substance. *Science.*156:1499–1501.

Diallo D, Sall A.A, Diagne C.T, Faye O, Faye O, Ba Y. 2014. Zika virus emergence in mosquitoes in southeastern Senegal. *PLoS ONE.* 9(10): e109442.

Diaz, L.A., Flores, F.S., Quaglia, A., Contigiani, M.S. 2012. Intertwined arbovirus transmission activity: reassessing the transmission cycle paradigm. *Front.Physiol.* 3: 493.

Dimopoulos, G. 2003. Insect immunity and its implication in mosquito-malaria interactions. *Cell Microbiol.*

Dick G.W.A, Kitchen S.F, Haddow A.J.1952. Zika virus. I. Isolations and serological specificity. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 46:509–520.

Dong Y, Manfredini F, Dimopoulos G. 2009. Implication of the mosquito midgut microbiota in the defense against malaria parasites. *PLoS Pathog.* 5(5):e1000423.

Duffy M.R, Chen T.H, Hancock W.T, Powers A.M, Kool J.L, Lanciotti R.S, Pretrick M, Marfel M, Holzbauer S, Dubray C, Guillaumot L, Griggs A, Bel M, Lambert A.J, Laven J, Kosoy O, Panella A, Biggerstaff B.J, Fischer M, Hayes E.B. 2009. Zika Virus Outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *N Engl J Med.* 360 (24): 2536-43.

Dupont-Rouzeyrol M, Biron A, O'Connor O, Huguon E, Descloux E. 2016. Infectious Zika viral particles in breastmilk. *Lancet.* 387(10023):1051

Faye O, Freire C.C, Iamarino A, Faye O, de Oliveira J.V, Diallo M, Zanotto P.M. 2014. Molecular evolution of Zika virus during its emergence in the 20(th) century. *PLoS Negl Trop Dis.* 8(1).

Fernandes R.S, Campos S.S, Ferreira-de-Brito A, Miranda R.M, Barbosa da Silva KA, Castro M.G, Raphael L.M, Brasil P, Failloux A.B, Bonaldo M.C, Lourenço-de-Oliveira R. 2016. *Culex quinquefasciatus* from Rio de Janeiro Is Not Competent to Transmit the Local Zika Virus. *PLoS Negl Trop Dis.*10(9):e0004993.

Ferreira-de-Brito A, Ribeiro I.P, Miranda R.M, Fernandes R.S, Campos S.S, Silva K.A, Castro M.G, Bonaldo M.C, Brasil P, Lourenço-de-Oliveira R. 2016. First detection of natural infection of *Aedes aegypti* with Zika virus in Brazil and throughout South America. *Mem Inst Oswaldo Cruz.*111(10):655-658.

Fine PE. 1975. Vectors and vertical transmission: an epidemiologic perspective. *Ann N Y Acad Sci.*266: 173–194.

Forattini, O.P. Culicidologia médica. Universidade de São Paulo, São Paulo. 2002.

Forattini, O.P. Entomologia médica. Universidade de São Paulo, São Paulo. 1962.



Gandini M, Reis S.N, Torrentes-Carvalho A. M, Azeredo E.L, Freire M.S, Galler R, Kubelka C.F. 2011. Dengue-2 and yellow fever 17DD viruses infect human dendritic cells, resulting in an induction of activation markers, cytokines and chemokines and secretion of different TNF- $\alpha$  and IFN- $\alpha$  profiles. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 106: 595-605.

Garver, L. S., Dong, Y., Dimopoulos, G. 2009. Caspar controls resistance to *Plasmodium falciparum* in diverse *anopheline* species. *PLoS Pathog*. 5(3).

Geevargheese G, Mavale MS, Ghodke YS, Kode SS, Cicellia D. 2003. Venereal transmission of Japanese encephalitis virus in *Culex quinquefasciatus* and West Nile virus in *Cx. bitaenio-rhynchus*. *Am J Trop Med Hyg* 69:446 – 447.

Geisbert TW, Jahrling PB 2004. Exotic emerging viral diseases: progress and challenges. *Nat Med* 10: S110-121.

Girard Y.A, Klingler K.A, Higgs S.2004. West Nile virus dissemination and tissue tropisms in orally infected *Culex pipiens quinquefasciatus*. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 4: 109–122.

Gubler D.J, Roehrig J.T. Arboviruses (Togaviridae and Flaviviridae). In: Mahy BWJ, Collier L (Org.). *Topley and Wilson's microbiology and microbial infections*. Vol. 1. Virology. New York: Oxford University Press.1998. pp. 579–600.

Gubler D.J. 1996. The global resurgence of arboviral diseases. *Trans R Soc Trop Med Hy*. 90:449–451.

Gubler D.J. 2002. The Global Emergence/Resurgence of Arboviral Diseases as Public Health Problems. *Archives of Medical Research*.33:330-342.

Gusmão D.S, Santos A.V, Marini D.C, Bacci Jr M, Berbert-Molina M.A, Lemos F.J. 2010. Culture-dependent and culture-independent characterization of

microorganisms associated with *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) (L.) and dynamics of bacterial colonization in the midgut. *Acta Trop.* 115: 275-81.

Guo X.X, Li C.X, Deng Y.Q, Xing D, Liu Q.M, Wu Q, Sun AJ, Dong YD, Cao W.C, Qin C.F, Zhao T.Y. 2016. *Culex pipiens quinquefasciatus*: a potential vector to transmit Zika virus. *Emerg Microbes Infect.* 5(9):e102.

Hall-Mendelin S, Pyke A.T, Moore P.R, Mackay I.M, McMahon J.L, Ritchie S.A, Taylor C.T, Moore F.A, van den Hurk A.F. 2016. Assessment of local mosquito species incriminates *Aedes aegypti* as the potential vector of Zika virus in Australia. *PLoS Negl Trop Dis.* 10(9):e0004959.

Halstead S.B. 2008. Dengue virus-mosquito interactions. *Annu Rev Entomol.* 53:273-91.

Hanley KA, Nelson JT, Schirtzinger EE, Whitehead SS, Hanson CT. 2008. Superior infectivity for mosquito vectors contributes to competitive displacement among strains of dengue virus. *BMC Ecol.* 8:1.

Hardy J L, Houk E.J, Kramer L.D, Reeves W.C. 1983. Intrinsic factors affecting vector competence of mosquitoes for arboviruses. *Annu Rev Entomol.* 28: 229-262.

Hart CE, Roundy CM, Azar SR, Huang JH, Yun R, Reynolds E, Leal G, Nava MR, Vela J, Stark PM, Debboun M, Rossi S, Vasilakis N, Thangamani S, Weaver SC. 2017. Zika Virus Vector Competency of Mosquitoes, Gulf Coast, United States. *Emerg Infect Dis.* 23(3):559-560.

Heitmann A, Jansen S, Lühken R, Leggewie M, Badusche M, Pluskota B, Becker N, Vapalahti O, Schmidt-Chanasit J, Tannich E. 2017. Experimental transmission of Zika virus by mosquitoes from central Europe. *Euro Surveill.* 12: 22(2).

Hennessey M, Fischer M, Staples JE. 2016. Zika Virus Spreads to New Areas - Region of the Americas, May 2015-January 2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 29: 65(3): 55-8.

Higgs, S. Beaty, B.J. Natural cycles of vector-borne pathogens. In: Marquardt, W. C. (Ed.). *Biology of disease vectors*. Burlington: Elsevier Academic Press. 2004.

Hilgenboecker K, Hammerstein P, Schlattmann P, Telschow A, Werren JH. 2008. How many species are infected with *Wolbachia*?--A statistical analysis of current data. *FEMS Microbiol Lett*. 281(2):215-20.

Huang YJ, Ayers VB, Lyons AC, Unlu I, Alto BW, Cohnstaedt LW, Higgs S, Vanlandingham DL. 2016. *Culex Species* Mosquitoes and Zika Virus. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 16(10):673-6.

Hussain M, Torres S, Schnettler E, Funk A, Grundhoff A, Pijlman GP, Khromykh AA, Asgari S. 2012. West Nile virus encodes a microRNA-like small RNA in the 3' Untranslated region which up-regulates GATA4 mRNA and facilitates virus replication in mosquito cells. *Nucleic Acids Res*. 40:2210–2223.

Juliano SA, Ribeiro GS, Maciel-de-Freitas R, Castro MG, Codeço C, Lourenço-de-Oliveira R, Lounibos LP. 2014. She's a femme fatale: low-density larval development produces good disease vectors. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 109(8):1070-7.

Karabatsos N. International catalogue of arboviruses, including certain other viruses of vertebrates. *Am Soc Trop Med Hyg* (San Antonio, TX, USA): 1985.

Kramer L.D. 2016. Complexity of virus-vector interactions. *Curr Opin Virol*. 21:81-86.

Kumar A, Singh H.N, Pareek V, Raza K, Dantham S, Kumar P, Mochan S. 2016. A Possible Mechanism of Zika Virus Associated Microcephaly: Imperative Role of Retinoic Acid Response Element (RARE) Consensus Sequence Repeats in the Viral Genome. *Front Hum Neurosci*. 10: 403.

Kuno G., Chang G. J. 2007. Full-length sequencing and genomic characterization of Bagaza, Kedougou, and Zika viruses. *Arch Virol* .152: 687–696.

Lambrechts L, Paaijmans K.P, Fansiri T, Carrington L.B, Kramer L.D, Thomas MB, Scott T.W. 2011. Impact of daily temperature fluctuations on dengue virus transmission by *Aedes aegypti*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 108 (18): 7460-5.

Leake C J. Transovarial transmission of arboviruses by mosquitoes. In: Mayo M.A e Harrap K.A (ed). *Vectors in virus biology*. Academic Press, Florida.1984. pp 63-91

Lemaitre, B.,Hoffmann, J. 2007. The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annu. Rev. Immunol*. 25: 697–743.

Lequime S, Lambrechts L. 2014. Vertical transmission of arboviruses in mosquitoes: a historical perspective. *Infect Genet Evol*. 28: 681–690.

Lequime S, Paul Richard, Lambrechts L. 2016. Determinants of Arbovirus Vertical Transmission in Mosquitoes. *Plos Pathog*. 12(5): e1005548.

Lozovel A.L. *Culicídeos (mosquitos)*. São Paulo. Atheneu, 2001.

Lourenço-de-Oliveira R. Transmissão Vetorial. In: Valle D, Pimenta DN, Cunha RV( org) *DENGUE : TEORIAS E PRÁTICAS*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 2015. pp 127-141. A

Lourenço-de-Oliveira R. Biologia e Comportamento Do Vetor. In: Valle D, Pimenta DN, Cunha RV (org) *DENGUE: TEORIAS E PRÁTICAS*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 2015.pp 75-92. B

Macnamara F.N. 1954.Zika virus: a report on three cases of human infection during an epidemic of jaundice in Nigeria. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 48(2):139-45.

Magalhaes T, Leandro D. C, Ayres C. F. 2010. Knock-down of REL2, but not defensin A, augments *Aedes aegypti* susceptibility to *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. *Acta Trop.* 113(2): 167-173.

Marano G, Pupella S, Vaglio S, Liunbruno G.M, Grazzini G. 2015. Zika virus and the never-ending story of emerging pathogens and transfusion medicine. *Blood Transfus.* 1–6.

Marquardt W. C. Biology of disease vectors. Burlington: Elsevier Academic Press. 2004.

Marchette N.J, Garcia R, Rudnick A.1969. Isolation of Zika virus from *Aedes aegypti* mosquitoes in Malaysia. *Am J Trop Med Hyg.* 18(3):411–5.

Mavale M.S, Fulmali P.V, Geevarghese G, Arankalle V.A, Ghodke Y.S, Kanojia PC, Mishra A.C. 2006. Venereal transmission of Chandipura virus by *Phlebotomus papatasi* (Scopoli). *Am J Trop Med Hyg.*75 (6):1151-2.

Mavale M, Geevarghese G, Ghodke Y.S, Fulmali P.V, Singh A, Mishra A.C, 2005. Vertical and venereal transmission of maintenance and evolution. In: Gubler DJ, Vasilakis N (eds). *Arboviruses: Molecular Biology, Evolution and Control*. Norfolk, United Kingdom: Calister Academic Press. 2016. pp 191–218.

Mavale M, Parashar D, Sudeep A, Gokhale M , Geevarghese Y.G , Akhilesh V .2010. Venereal Transmission of Chikungunya Virus by *Aedes aegypti* Mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 83(6): 1242.

Monath TP.1994. Vector-borne emergent disease. *Ann N Y Acad Sci.*740:126-8.

Moreira LA, Iturbe-Ormaetxe I, Jeffery JA, Lu G, Pyke AT, Hedges LM, Rocha BC, Hall-Mendelin S, Day A, Riegler M, Hugo LE, Johnson KN, Kay BH, McGraw EA, van den Hurk AF, Ryan PA, O'Neill SL. 2009. A *Wolbachia* symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with dengue, Chikungunya, and *Plasmodium*. *Cell.* 139(7):1268-78.

- Musso D, Gubler DJ, 2016. Zika virus. *Clin Microbiol Rev.* 29: 487–524.
- Okuda K, de Souza Caroci A, Ribolla P.E, de Bianchi A.G, Bijovsky A.T. 2002. Functional morphology of adult female *Culex quinquefasciatus* midgut during blood digestion. *Tissue Cell.* 34: 210–219.
- Ovenden J.R, Mahon R.J. 1984. Venereal transmission of Sindbis virus between individuals of *Aedes australis* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol.* 21 (3):292-5.
- PAHO (2016). Zika-Actualización Epidemiológica Regional de la OPS (Américas) - [http://www2.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&id=11599&Itemid=41691&lang=es](http://www2.paho.org/hq/index.php?option=com_content&id=11599&Itemid=41691&lang=es). Acesso em 03 de Janeiro de 2017.
- Petersen E, Polen K, Meaney-Delman D, et al. 2016. Update: Interim Guidance for Health Care Providers Caring for Women of Reproductive Age with Possible Zika Virus Exposure — United States. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 65 (12).
- Ramírez J.L, Short S.M, Bahia A.C, Saraiva R.G, Dong Y, Kang S. 2014. *Chromobacterium Csp\_P* reduces malaria and dengue infection in vector mosquitoes and has entomopathogenic and in vitro antipathogen activities. *PLoS Pathog.* 10(10): e1004398.
- Ramírez J.L, Souza-Neto J, Cosme R.T, Rovira J, Ortiz A, Pascale J.M. 2012. Reciprocal tripartite interactions between the *Aedes aegypti* midgut microbiota, innate immune system and dengue virus influences vector competence. *PLoS Negl Trop Dis.* 6(3): e1561.
- Rasmussen S.A, Jamieson D.J, Honein M.A, Petersen L.R. 2016. Zika Virus and Birth Defects - Reviewing the Evidence for Causality. *N Engl J Med.* 374(20):1981-7.

Reeves W.C. 2004. Overwintering of arboviruses Epidemiology and Control of Mosquito-borne Arboviruses in California. *J Calif Mosq Vector Control Assoc.* 357–382.

Rosen L. 1987. Sexual transmission of dengue viruses by *Aedes albopictus*. *Am J Trop Med Hyg.* 37: 398-402.

Rosen L.1988. Further observations on the mechanism of vertical transmission of flaviviruses by *Aedes mosquitoes*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 39(1): 123-126.

Sampathkumar P, Sanchez JL.2016. Zika Virus in the Americas: A Review for Clinicians. *Mayo Clin Proc.*91(4):514-21.

Sánchez-Vargas I, Scott JC, Poole-Smith BK, Franz AW, Barbosa-Solomieu V, Wilusz J, Olson KE, Blair CD. 2009. Dengue virus type 2 infections of *Aedes aegypti* are modulated by the mosquito's RNA interference pathway. *PLoS Pathog* 5(2):e1000299.

Shin S.W, Kokoza V, Bian G, Cheon H.M, Kim Y.J, Raikhel A.S. 2005. REL1, a homologue of *Drosophila dorsal*, regulates toll antifungal immune pathway in the female mosquito *Aedes aegypti*. *J Biol Chem.* 280(16):16499-16507.

Shroyer D.A.1990. Venereal transmission of St. Louis encephalitis virus by *Culex quinquefasciatus* males (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol.* 27(3):334-7.

Sim S, Dimopoulos G. 2010. Dengue virus inhibits immune responses in *Aedes aegypti* cells. *PLoS One.* 5(5): e10678

Sim S, Jupatanakul N, Dimopoulos G. 2014. Review Mosquito Immunity against *Arboviruses Viruses*. 4479-4504.

Smith DR, Arrigo NC, Leal G, Muehlberger LE, Weaver SC. 2007. Infection and dissemination of Venezuelan equine encephalitis virus in the epidemic mosquito vector, *Aedes taeniorhynchus*. *Am J Trop Med Hyg.* 77: 176–187.

Souza-Neto, J. A, Sim S, Dimopoulos G. 2009. An evolutionary conserved function of the JAK-STAT pathway in anti-dengue defense. *Proc Natl Acad Sci U S A*.106 (42):17841-17846.

Sylvestre G, Gandini M, Maciel-de-Freitas R. Age-Dependent Effects of Oral Infection with Dengue Virus on *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Feeding Behavior, Survival, Oviposition Success and Fecundity. *PLoS One*.8(3); 2013.

Tamura K, Battistuzzi FU, Billing-Ross P, Murillo O, Filipowski A, Kumar S. 2012. Estimating divergence times in large molecular phylogenies. *Proc Natl Acad Sci U S A*.109:19333–19338.

Tan CH, Wong PJ, Li MI, Yang H, Ng LC, O'Neill SL.2017. wMel limits Zika and chikungunya virus infection in a Singapore Wolbachia-introgressed *Ae. aegypti* strain, wMel-Sg. *PLoS Negl Trop Dis*.11(5):e0005496.

Thangamani S, Huang J, Charles E, Guzman H, Tesh RB. 2016. Vertical Transmission of Zika Virus in *Aedes Aegypti* Mosquitoes. *Am J Trop Med Hyg* 95 (5): 1169-1173.

Tesh RB. Transovarial Transmission of Arboviruses in Their Invertebrate Vectors In: Harris KF (ed). Current topics in vector research. New-York, NY: Praeger; 1984. pp. 57–76.

Thompson WH, Beaty BJ. 1977. Venereal transmission of La Crosse (California encephalitis) arbovirus in *Aedes triseriatus* mosquitoes. *Science*. 196: 530 – 531.

Turell, M.J. Horizontal and vertical transmission of viruses by insect and tick vectors. In: Monath TP (ed). The Arboviruses: Epidemiology and Ecology. CRC Press, Boca Raton, Florida. 1988. pp. 127–52



Vasilakis N, Cardoso J, Hanley KA, Holmes EC, Weaver SC.2011. Fever from the forest: prospects for the continued emergence of sylvatic dengue virus and its impact on public health. *Nat Rev Microbiol.* 9(7):532-41.

Vasilakis N, Weaver SC. 2008. The history and evolution of human dengue emergence. *Adv Virus Res.* 72: 1–76.

Vazeille M, Moutailler S, Coudrier D, Rousseaux C, Khun H, Huerre M, Thiria J, Dehecq J.S, Fontenille D, Schuffenecker I, Despres P, Failloux A.B.2007. Two Chikungunya isolates from the outbreak of La Reunion (Indian Ocean) exhibit different patterns of infection in the mosquito, *Aedes albopictus*. *PLoS One.* 2(11):1168.

Vega-Rúa A, Zouache K, Girod R, Failloux AB, Lourenço-de-Oliveira R. 2014.High level of vector competence of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from ten American countries as a crucial factor in the spread of Chikungunya virus. *J Virol.* 88(11):6294-306.

Villegas L.M, Pimenta P.2014. Metagenomics, paratransgenesis and the Anopheles microbiome: a portrait of the geographical distribution of the anopheline microbiota based on a meta-analysis of reported taxa. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 109(5): 672-84.

Watts D.M, Grimstad P.R, DeFoliart G.R, Yuill T.M, Hanson R.P.1973. Laboratory transmission of Lacrosse encephalitis virus by several species of mosquitoes. *J Med Entomol.*10 (6):583-6.

Weaver S.C, Reisen W.K.2010.Present and future arboviral threats. *Antiviral Res.* 85 (2): 328-345.

Weger-Lucarelli J, Rückert C, Chotiwan N, Nguyen C, Garcia Luna SM, Fauver JR et al. 2016. Vector competence of American mosquitoes for three strains of Zika virus. *PLoS Negl Trop Dis.*10(10):e0005101.

Whiteman MC, Wicker JA, Kinney RM, Huang CY, Solomon T, Barrett AD.2011. Multiple amino acid changes at the first glycosylation motif in NS1 protein of West

Nile virus are necessary for complete attenuation for mouse neuroinvasiveness. *Vaccine*. 29(52):9702-10.

Xi Z, Ramirez J.L, Dimopoulos G. 2008. The *Aedes aegypti* toll pathway controls dengue virus infection. *PLoS Pathog*. 4(7): e1000098.

Zouache K, Fontaine A, Vega-Rua A, Mousson L, Thiberge J.M, Lourenco-De-Oliveira R, Caro V, Lambrechts L, Failloux AB. 2014. three-way interactions between mosquito population, viral strain and temperature underlying chikungunya virus transmission potential. *Proc Biol Sci*. 7:281.

Zug R, Hammerstein P. 2012. Still a host of hosts for *Wolbachia*: analysis of recent data suggests that 40% of terrestrial arthropod species are infected. *PLoS One*. 7(6):e38544.

## 8. APÊNDICE

### 8.1 Tabela qRT-PCR das cabeças fêmeas dos ensaio 2 e 3

**Tabela 8: Resultado RT-qPCR das fêmeas do ensaio 2**

cepa viral	RT-qPCR	
	Ct	Quantificação
RioU1	Undetermined	-
RioU1	Undetermined	-
RioU1	Undetermined	-
RioU1	Undetermined	-
RioU1	Undetermined	-
RioU1	Undetermined	-
RioU1	Undetermined	-
RioU1	Undetermined	-
RioU1	Undetermined	-
RioU1	Undetermined	-
RioU1	Undetermined	-
RioU1	Undetermined	-
RioU1	Undetermined	-
RioU1	Undetermined	-
RioU1	Undetermined	-
RioU1	34,06	110,2
RioU1	Undetermined	-
RioU1	Undetermined	-
RioU1	Undetermined	-
RioU1	Undetermined	-
RioU1	18,991	919.407,88
RioU1	Undetermined	-
RioU1	35,378	50,029
RioU1	Undetermined	-
RioU1	Undetermined	-
RioU1	Undetermined	-
RioU1	Undetermined	-
RioU1	Undetermined	-
RioU1	Undetermined	-
RioU1	Undetermined	-
RioU1	Undetermined	-
RioU1	Undetermined	-

**Tabela 9: Resultado RT-qPCR das fêmeas do ensaio 3**

cepa viral	RT-qPCR	
	Ct	Quantificação
RioS1	Undetermined	-
RioS1	Undetermined	-
RioS1	Undetermined	-
RioS1	Undetermined	-
RioS1	Undetermined	-
RioS1	Undetermined	-
RioS1	18,025	1.749.754,00
RioS1	26,947	4.330,35
RioS1	38,87	1,422
RioS1	Undetermined	-
RioS1	Undetermined	-
RioS1	Undetermined	-
RioS1	18,457	1.309.185,13
RioS1	18,592	1.194.829,75
RioS1	17,69	2.192.482,75
RioS1	18,347	1.409.558,00
RioS1	33,703	45,973
RioS1	31,977	146,873
RioS1	31,628	185,76
RioS1	18,475	1.293.534,38
RioS1	32,514	102,315
RioS1	18,696	1.114.403,50
RioS1	33,231	63,176
RioS1	35,407	14,617
RioS1	37,27	4,175
RioS1	34,923	20,247
RioS1	19,072	865.287,44
RioS1	31,723	174,181
RioS1	35,503	13,704
RioS1	37,324	4,026

## 8.2 Resultado da RT-PCR do pool de macho positivo do ensaio 1

Pool5	Cepa viral	Ensaio	RT-qPCR	
			Ct	Quantificação
P582	RioS1	1	18,807	207,287.250

## 8.3 Tabela dos ovos de *Aedes aegypti* da Urca (F2) de fêmeas infectadas e não infectadas pelo ZIKV RioS1.

Progenitora	Ovos	
	Postura	Eclosão
Não infectadas	85	76
	25	0
	60	12
	75	16
	62	8
	41	7
	61	2
	86	45
	46	29
	45	11
	77	63
	76	36
	Infectadas	0
51		2
0		-
80		6
20		0
7		2
14		11
95		20
73		24
100		4
30		23
48		10
112		39
0		-
40		43
37		3
78	27	
79	2	

#### 8.4 Tabela do resultado da qRT-PCR das fêmeas de *Aedes aegypti* Urca (F2) e Goiânia(F2)

Pop	RT-qPCR	
	Ct	Quantificação
UR	25	216,055
UR	30	3,082.771
UR	Undetermined	0
UR	23	1,645.402
UR	20	17,537.207
UR	Undetermined	0
UR	19	22242.688
UR	24	48,898.804
UR	21	64,638.525
UR	Undetermined	0
GO	Undetermined	0
GO	21	8,917.777
GO	27	4,220.585
GO	28	20,459.852
GO	Undetermined	0
GO	Undetermined	0
GO	22	39,238.997
GO	18	51,870.754
GO	Undetermined	0
GO	Undetermined	0

### 8.5 Tabela do resultado da RT-PCR dos machos e solução açucarada do ensaio 4

Macho/ solução açucarada	População	Cepa viral	Ensaio	RT-qPCR	
				Ct	Quantificação
Macho	Goiânia	RioU1	1	-	-
Macho	Goiânia	RioU1	1	21	3,908.467
Macho	Goiânia	RioU1	1	-	-
Macho	Goiânia	RioU1	1	-	-
Macho	Goiânia	RioU1	1	-	-
Macho	Goiânia	RioU1	1	21,6	2,175.320 2
Macho	URCA	RioU1	1	-	-
Macho	URCA	RioU1	1	-	-
Solução Açucarada	-	-	1	Undetermined	-
Solução Açucarada	-	-	1	Undetermined	-
Solução Açucarada	-	-	1	Undetermined	-
Solução Açucarada	-	-	1	Undetermined	-
Solução Açucarada	-	-	1	34	0,097

## 8.6 Tabelas do resultado da qRT-PCR das fêmeas de *Aedes aegypti* do ensaio 5 (ZIKV Rio U1 e ZIKV PE243).

Cepa viral	qRT-PCR			
	Corpo		Cabeça	
	ct	Quantificação	ct	Quantificação
RioU1	Undetermined	-	-	-
RioU1	17,761	1.131.342,75	37,796	5,737
RioU1	18,98	525.803,75	28,41	3.285,18
RioU1	33,547	56,83	Undetermined	-
RioU1	30,925	294,258	27,537	5.930,63
RioU1	17,63	1.231.885,63	Undetermined	
RioU1	17,18	1.630.585,50	22,227	215.376,03
RioU1	33,232	69,24	Undetermined	-
RioU1	Undetermined	-	Undetermined	-
RioU1	Undetermined	-	Undetermined	-
RioU1	Undetermined	-	Undetermined	-
RioU1	14,584	8.298.440,50	21,366	385.577,06
RioU1	Undetermined	-	Undetermined	-
RioU1	37,048	6,328	Undetermined	-
RioU1	35,898	13,014	Undetermined	-
RioU1	38,723	2,214	Undetermined	-
RioU1	Undetermined	-	Undetermined	-
RioU1	Undetermined	-	Undetermined	-
RioU1	33,376	63,294	Undetermined	-
RioU1	34,017	42,331	Undetermined	-
RioU1	17,42	1.401.074,00	39,231	2,174
RioU1	17,21	1.600.809,50	Undetermined	
RioU1	Undetermined	-	Undetermined	-
RioU1	36,789	7,44	Undetermined	-
RioU1	36,751	7,624	Undetermined	-
RioU1	20,26	235.898,55	Undetermined	-
RioU1	21,75	92.883,34	Undetermined	-
RioU1	35,608	15,611	-	-
RioU1	17,41	1.410.536,88	20,289	798.817,31

Cepa viral	qRT-PCR			
	Corpo		Cabeça	
	Ct	Quantificação	Ct	Quantificação
PE243	36,585	8,46	Undetermined	-
PE243	36,197	10,789	Undetermined	-
PE243	34,976	23,197	Undetermined	-
PE243	36,547	8,665	Undetermined	-
PE243	37,336	5,283	Undetermined	-
PE243	Undetermined	-	-	-
PE243	36,821	7,295	-	-
PE243	31,602	192,507	Undetermined	-
PE243	39,548	1,32	-	-
PE243	39,261	1,58	-	-
PE243	Undetermined	-	-	-
PE243	39,285	1,556	-	-
PE243	Undetermined	-	-	-
PE243	Undetermined	-	-	-
PE243	Undetermined	-	-	-
PE243	Undetermined	-	-	-
PE243	36,844	7,193	Undetermined	-
PE243	Undetermined	-	-	-
PE243	38,664	2,297	Undetermined	-
PE243	22,14	72.568,76	26,913	9.041,25
PE243	Undetermined	-	-	-
PE243	Undetermined	-	-	-
PE243	Undetermined	-	-	-
PE243	Undetermined	-	-	-
PE243	36,748	7,635	Undetermined	-
PE243	Undetermined	-	-	-
PE243	Undetermined	-	-	-
PE243	Undetermined	-	-	-
PE243	Undetermined	-	-	-



### 8.7 Tabela do resultado da qRT-PCR macho positivo de *Aedes aegypti* do ensaio 5.

Cepa viral	Ensaio	RT-qPCR	
		ct	Quantificação
RioU1	5	17,182	1.548.838,88

### 8.8 Alinhamento ZIKV Rio-S1 x prole *Aedes aegypti* (ensaio 1)

582 Rio-S1	TGACTCTTGGGGCCAGCGCATGGCTCATGTGGCTCTCGGAAATTGAGCCAGCCAGAATTG TGACTCTTGGGGCCAGCGCATGGCTCATGTGGCTCTCGGAAATTGAGCCAGCCAGAATTG *****	6780 6780
582 Rio-S1	CATGTGTCCTCATTGTTGTGTTCCATTGCTGGTGGTGGCTCATACTGAGCCAGAAAAGC CATGTGTCCTCATTGTTGTGTTCCATTGCTGGTGGTGGCTCATACTGAGCCAGAAAAGC *****	6840 6840
582 Rio-S1	AAAGATCTCCCCAGGACAACCAAATGGCAATCATCATCATGGTAGCAGTAGGTCTTTGG AAAGATCTCCCCAGGACAACCAAATGGCAATCATCATCATGGTAGCAGTAGGTCTTCTGG ***** **	6900 6900
582 Rio-S1	GCTTGATTACCGCCAATGAACTCGGATGGTTGGAGAGAACAAGAGTGACCTAAGCCATC GCTTGATTACCGCCAATGAACTCGGATGGTTGGAGAGAACAAGAGTGACCTAAGCCATC *****	6960 6960
582 Rio-S1	GGACACCCCGTGAAAGCATGCTGCTGGCCTTGGCCTCGTGTCTTTTGCAAACCTGCGATCT GGACACCCCGTGAAAGCATGCTGCTGGCCTTGGCCTCGTGTCTTTTGCAAACCTGCGATCT *****	3900 3900
582 Rio-S1	CCGCCTTGGAAAGGCGACCTGATGGTTCTCATCAATGGTTTTGCTTTGGCCTGGTTGGCAA CCGCCTTGGAAAGGCGACCTGATGGTTCTCATCAATGGTTTTGCTTTGGCCTGGTTGGCAA *****	3960 3960
582 Rio-S1	TACGAGCGATGGTTGTTCCACGCACTGATAACATCACCTTGGCAATCCTGGCTGCTCTGA TACGAGCGATGGTTGTTCCACGCACTGATAACATCACCTTGGCAATCCTGGCTGCTCTGA *****	4020 4020
582 Rio-S1	CACCACTGGCCCGGGGCACACTGCTTGTGGCGTGGAGAGCAGGCCTTGCTACTTGCAGGG CACCACTGGCCCGGGGCACACTGCTTGTGGCGTGGAGAGCAGGCCTTGCTACTTGCAGGG *****	4080 4080
582 Rio-S1	GGTTTATGCTCCTCTCTCTGAGGGGAAAAGGCAGTGTGAAGAAGAAGTACCATTTGTCA GGTTTATGCTCCTCTCTCTGAGGGGAAAAGGCAGTGTGAAGAAGAAGTACCATTTGTCA *****	4140 4140
582 Rio-S1	TGGCCCTGGGACTAACCCTGTGAGGCTGGTCGACCCCATCAACGTGGTGGGACTGCTGT TGGCCCTGGGACTAACCCTGTGAGGCTGGTCGACCCCATCAACGTGGTGGGACTGCTGT *****	4200 4200

**9. ALINHAMENTO ZIKV RIO-U1 X MACHO AEDES AEGYPTI INFECTADO SEXUALMENTE X FÊMEAS INFECTADAS ORALMENTE (ENSAIO 4).**

1276 Rio-U1	TTGCCCCGGCATAACAGCATCAGGTGCATAGGAGTCAGCAATAGGGACTTTGTGGAAGGTA TTGCCCCGGCATAACAGCATCAGGTGCATAGGAGTCAGCAATAGGGACTTTGTGGAAGGTA *****	1020 1020
1276 Rio-U1	TGTCAGGTGGGACTTGGGTTGATGTTGTCTTGAACATGGAGGTTGTGTACCCTAATGG TGTCAGGTGGGACTTGGGTTGATGTTGTCTTGAACATGGAGGTTGTGTACCCTAATGG *****	1080 1080
1276 Rio-U1	CACAGGATAAACCGACTGTCGACATAGAGCTGGTACAACAACAGTCAGCAACATGGCGG CACAGGATAAACCGACTGTCGACATAGAGCTGGTTACAACAACAGTCAGCAACATGGCGG *****	1140 1140
1276 Rio-U1	AGGTAAGATCCTACTGCTATGAGGCATCAATATCAGACATGGCTTCGGACAGCCGCTGCC AGGTAAGATCCTACTGCTATGAGGCATCAATATCAGACATGGCTTCGGACAGCCGCTGCC *****	1200 1200
1276 Rio-U1	CAACACAAGGTGAAGCCTACCTTGACAAGCAATCAGACACTCAATATGTCTGCAAAAAGAA CAACACAAGGTGAAGCCTACCTTGACAAGCAATCAGACACTCAATATGTCTGCAAAAAGAA *****	1260 1260

Rio-U1 Pool 1276	CTTGGCTTTTGGGAAGCTCAACGAGCCAAAAAGTCATATACTTGGTCATGATACTGCTGA CTTGGCTTTTGGGAAGCTCAACGAGCCAAAAAGTCATATACTTGGTCATGATACTGCTGA CTTGGCTTTTGGGAAGCTCAACGAGCCAAAAAGTCATATACTTGGTCATGATACTGCTGA *****	960 960 960
Rio-U1 Pool 1276	TTGCCCCGGCATAACAGCATCAGGTGCATAGGAGTCAGCAATAGGGACTTTGTGGAAGGTA TTGCCCCGGCATAACAGCATCAGGTGCATAGGAGTCAGCAATAGGGACTTTGTGGAAGGTA TTGCCCCGGCATAACAGCATCAGGTGCATAGGAGTCAGCAATAGGGACTTTGTGGAAGGTA *****	1020 1020 1020
Rio-U1 Pool 1276	TGTCAGGTGGGACTTGGGTTGATGTTGTCTTGAACATGGAGGTTGTGTACCCTAATGG TGTCAGGTGGGACTTGGGTTGATGTTGTCTTGAACATGGAGGTTGTGTACCCTAATGG TGTCAGGTGGGACTTGGGTTGATGTTGTCTTGAACATGGAGGTTGTGTACCCTAATGG *****	1080 1080 1080
Rio-U1 Pool 1276	CACAGGATAAACCGACTGTCGACATAGAGCTGGTACAACAACAGTCAGCAACATGGCGG CACAGGATAAACCGACTGTCGACATAGAGCTGGTTACAACAACAGTCAGCAACATGGCGG CACAGGATAAACCGACTGTCGACATAGAGCTGGTACAACAACAGTCAGCAACATGGCGG *****	1140 1140 1140
Rio-U1 Pool 1276	AGGTAAGATCCTACTGCTATGAGGCATCAATATCAGACATGGCTTCGGACAGCCGCTGCC AGGTAAGATCCTACTGCTATGAGGCATCAATATCAGACATGGCTTCGGACAGCCGCTGCC AGGTAAGATCCTACTGCTATGAGGCATCAATATCAGACATGGCTTCGGACAGCCGCTGCC *****	1200 1200 1200