

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**Instituto de Ciências Biológicas**  
**Departamento de Bioquímica e Imunologia**  
**Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia**

Siad Cedric Gbadeguetchin Amadou

**MODULAÇÃO DA RESISTÊNCIA DE MOSQUITOS *Aedes Aegypti***  
**AO VÍRUS DA DENGUE PELA ROTENONA, UM INIBIDOR DO COMPLEXO I DA**  
**CADEIA RESPIRATÓRIA**

Belo Horizonte  
2020

Siad Cedric Gbadeguetchin Amadou

**MODULAÇÃO DA RESISTÊNCIA DE MOSQUITOS *Aedes Aegypti*  
AO VÍRUS DA DENGUE PELA ROTENONA, UM INIBIDOR DO COMPLEXO I DA  
CADEIA RESPIRATÓRIA**

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Bioquímica e imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Imunologia.

Orientador: Profa. Dr. João Trindade Marques

Co-orientador: Dr. Álvaro Gil Ferreira

Belo Horizonte  
2020

043

Amadou, Siad Cedric Gbadeguetchin.

Modulação da resistência de mosquitos *Aedes aegypti* ao vírus da dengue pela rotenona, um inibidor do complexo I da cadeia respiratória [manuscrito] / Siad Cedric Gbadeguetchin Amadou. – 2020.

51 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Profa. Dr. João Trindade Marques. Co-orientador: Dr. Álvaro Gil Ferreira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia.

1. Bioquímica e imunologia. 2. Dengue. 3. Rotenona. 4. Mosquito. 5. Suscetibilidade a Doenças. 6. Resistência a Doenças. I. Marques, João Trindade. II. Ferreira, Álvaro Gil Araújo. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 577.1



Universidade Federal de Minas Gerais  
 Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG  
 Av. Antônio Carlos, 6627 - Pampulha  
 31270-901 - Belo Horizonte - MG  
 e-mail: pg-biq@icb.ufmg.br (31)3409-2615



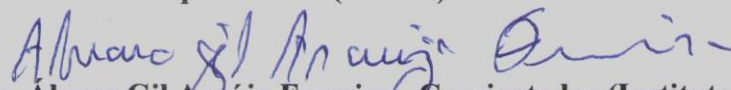
**ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE SIAD CEDRIC GBADEGUETCHIN AMADOU, orientado pelo Prof. João Trindade Marques. Aos vinte e sete dias do mês de fevereiro de 2020 às 14:00 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da dissertação de Mestrado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado ""Modulação da resistência de mosquitos *Aedes aegypti* ao vírus da dengue pela rotenona, um inibidor do complexo I da cadeia respiratória"", requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Imunologia, área de concentração: Imunologia. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Álvaro Gil Araújo Ferreira, da Fiocruz-MG, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dr. Maurício Roberto Viana Sant'Anna (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado; Dr. Luis Henrique Franco (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado; Dr. Álvaro Gil Araújo Ferreira - Coorientador (Instituto René Rachou - FIOCRUZ - MG), aprovado. Pelas indicações o candidato foi considerado:**

APROVADO  
 REPROVADO

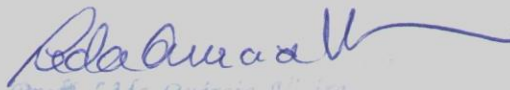
O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 27 de fevereiro de 2020.

  
 Dr. Maurício Roberto Viana Sant'Anna (UFMG)

  
 Dr. Luis Henrique Franco (UFMG)

  
 Dr. Alvaro Gil Araújo Ferreira - Coorientador (Instituto René Rachou - FIOCRUZ - MG)

Curso de PG em Bioquímica e Imunologia  
 ICB - UFMG  
 Av. Antônio Carlos, 6627  
 CEP 31270-901 - BH - MG

  
 Prof. Lídia Quêrcia V. Tra  
 Coordenadora do Curso de Pós-graduação  
 em Bioquímica e Imunologia  
 ICB - UFMG

## **Agradecimentos**

Agradeço primeiramente à Allah por guiar meus passos e por todas as oportunidades de aperfeiçoamento concedidas. À minha família, especialmente aos meus pais Professor Mouftaou Amadou Sanni e Mme Jeanna Dossoumou, sem esquecer meus queridos irmãos Abdel Fawarz Amadou, Lawal Dine Amadou, e Abdel Rachad Amadou.

Ao Prof<sup>o</sup> João Trindade Marques pela orientação paciente, incentivo e presença constantes, conselhos, e por todo encorajamento e confiança.

Ao Dr Álvaro Gil Ferreira pela ajuda essencial durante a execução desse projeto.

Agradeço à Profa. Fabíola pelo agradável convívio no laboratório.

Não poderia deixar de agradecer aos meus colegas do Laboratório de RNAi pela colaboração científica e pelos laços de amizade formados ao longo destes anos de convivência.

Agradeço o Laboratório de Neurobioquímica, por sempre serem prestativas e presentes em todos os momentos do laboratório.

## Resumo

A *Dengue*, causada pelo dengue virus (DENV), é uma das mais importantes doenças infecciosas no mundo. No momento, não há vacinas ou tratamentos efetivos para a Dengue, o que reforça a necessidade de combate à transmissão do DENV feita por mosquitos vetores principalmente da espécie *Aedes aegypti*. Dados do nosso grupo, sugerem que, dentro de uma mesma população, podem existir mosquitos resistentes (que não se infectam) e susceptíveis (que se infectam) quando alimentados com o mesmo sangue infectado com DENV. Para tentar entender as bases biológicas da diferença entre os mosquitos resistentes e os mosquitos susceptíveis, foram realizadas análises do transcriptoma de cada grupo. Observamos diversas vias diferencialmente enriquecidas entre mosquitos resistentes e susceptíveis, sendo a via da fosforilação oxidativa a que mais se destacou. Esta via é composta por cinco complexos, sendo o complexo I o mais diferencialmente expresso entre os mosquitos susceptíveis e resistentes. Com bases nestes resultados prévios, o objetivo dessa dissertação foi estudar o papel do complexo I da via da fosforilação oxidativa na resistência/suscetibilidade de mosquitos *Aedes aegypti* ao a DENV. Para tal decidimos bloquear quimicamente o complexo I com a droga rotenona, que bloqueia a liberação dos elétrons do complexo I para o complexo III e analisar o efeito resistência/suscetibilidade a DENV em mosquitos adultos. Realizamos experimentos para padronizar a dose de rotenona a ser administrada via oral, e observamos que as concentrações 0,01 mM e 0,001 mM não afetaram significativamente a sobrevivência dos mosquitos. Para avaliar o efeito do bloqueio do complexo I, comparamos a taxa de infecção e carga viral de mosquitos alimentados com sangue contendo estas concentrações de rotenona e DENV1. Observamos que os mosquitos alimentados com sangue contendo rotenona apresentaram uma menor taxa de infecção no intestino médio e carcaça sugerindo que a inibição do complexo I confere resistência à infecção por DENV1. Este estudo valida funcionalmente uma predição de nossos dados de transcriptoma de mosquitos selvagens e abre caminho para o entendimento das bases moleculares da resistência natural de mosquitos ao vírus da dengue.

Palavras-chave: Dengue; Rotenona; Mosquitos; Resistente; Susceptíveis

## Abstract

*Dengue virus*, caused by the dengue virus (DENV), is one of the most important infectious diseases in the world. At the moment, there are no vaccines or effective treatments for DENV, which reinforces the need to combat the transmission of DENV by mosquito vectors mainly of the species *Aedes aegypti*. Data from our group suggest that, between the same population, there may be resistant (not infected) and susceptible (infected) mosquitoes when fed with the same blood infected with DENV. To try to understand the biological basis of the difference between resistant mosquitoes and susceptible mosquitoes, analyzes of the transcriptome of each group were carried out. We observed several differentially enriched pathways between resistant and susceptible mosquitoes, and oxidative phosphorylation being the path that stood out the most. This pathway consists of five complexes, and complex I being the most differentially expressed among susceptible and resistant mosquitoes. Based on these previous results, the objective of dissertation was to study the role of complex I of the oxidative phosphorylation pathway in the resistance / susceptibility of *Aedes aegypti* mosquitoes to DENV. To this end, we decided to chemically block complex I with the drug rotenone, which blocks the release of electrons from complex I to complex III and to analyze the resistance / susceptibility effect to DENV in adult mosquitoes. We performed experiments to standardize the dose of rotenone to be administered orally, and we observed that the concentrations 0.01 mM and 0.001 mM did not significantly affect the survival of mosquitoes. To assess the effect of complex I block, we compared the infection rate and viral load of mosquitoes fed with blood containing these concentrations of rotenone and DENV1. We observed that mosquitoes fed with blood containing rotenone had a lower infection rate in the midgut and carcass, suggesting that inhibition of complex I confers resistance to DENV1 infection. This study functionally validates a prediction of our wild mosquito transcriptome data and opens the way for understanding the molecular basis of mosquitoes' natural resistance to the *Dengue virus*.

Key-words: Dengue; Rotenone; Mosquito; Resistant; Susceptible.

## Lista de figuras

Figura 1 - Ciclo de vida do mosquito <i>Aedes aegypti</i> .....	13
Figura 2 - Rota de infecção do vírus a partir da ingestão do sangue virêmico pelo mosquito fêmea até a transmissão para o próximo hospedeiro mamífero .....	14
Figura 3 - fosforilação oxidativa .....	17
Figura 4 - Visão geral do complexo I .....	18
Figura 5 : Taxa de sobrevivência dos mosquito da linhagem Bangkok após a ingestão de diferentes doses de rotenona .....	27
Figura 6. Sangue expelido após a ingestão de diferentes doses de rotenona .....	28
Figura 7: Expressão do gene <i>ASH1</i> no intestino dois e quatro dias após ingestão de rotenona .....	31
Figura 8: Expressão do gene <i>B18</i> no intestino dois e quatro dias após ingestão de rotenona .....	32
Figura 9 : Expressão do gene <i>ASH1</i> na carcaça dois e quatro dias após ingestão de rotenona .....	33
Figura 10 : Expressão do gene <i>B18</i> na carcaça dois e quatro dias após ingestão de rotenona .....	34
Figura 11: Efeito da rotenona na carga viral de DENV 1 no intestino em mosquitos <i>Ae. aegypti</i> .....	36
Figura 12: Efeito da rotenona na prevalência de DENV 1 no intestino em mosquitos <i>Ae. aegypti</i> .....	37
Figura 13: Efeito da rotenona na carga viral de DENV 1 na carcaça em mosquitos <i>Ae. aegypti</i> .....	38
Figura 14: Efeito da rotenona na prevalência de DENV 1 no carcaça em mosquitos <i>Ae. aegypti</i> .....	39

## Lista de abreviaturas

ADP - Difosfato de adenosina

ATP - Trifosfato de adenosina

Ae.aegypti - *Aedes aegypti*

BSA - Soro albumina bovina

cDNA - DNA complementar

CV- complexo

CTE - Cadeia transportadora de elétrons

DENV – Dengue virus

DENV 1 – Dengue vírus sorotipo 1

DMSO - Dimethyl Sulfoxide

dNTP - dideoxynucleotídeos

DTT – dithiothreitol

EDTA - ácido etileno diamino tetra-acético

FADH<sub>2</sub> - Dinucleotídeo de flavina-adenina reduzido

H<sup>+</sup> - Hidrônio ou próton

NADH - Dinucleotídeo de nicotinamida-adenina reduzida

O<sub>2</sub> – Oxigênio molecular

O<sub>2</sub><sup>-</sup> - Ânion superóxido

PBS - tampão fosfato-salino

PCR - reação em cadeia da polimerase

qPCR - reação em cadeia da polimerase quantitativa

QTL – Quantitative Trait Loci

R – Rotenona

RIG-I - *Retinoic acid-inducible gene 1*

RNA – ácido ribonucleico

RNAi - RNA de interferência

ROS - Espécies reativas de oxigênio, do inglês, *Reactive oxygen species*

RT - transcrição reversa

RT-PCR - transcrição reversa seguida de PCR

SFB – soro fetal bovino

TA - temperatura ambiente

## Sumário

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>10</b>
1.1. Dengue .....	10
1.2. Dengue Vírus .....	11
1.3. Ciclo de transmissão .....	12
1.4. Mosquitos <i>Aedes aegypti</i> .....	12
1.5. Barreiras à infecção e disseminação viral .....	13
1.6. Imunidade antiviral mediada por RNAi .....	14
1.7. Resistência natural de mosquitos ao DENV .....	15
1.8. Oxidação fosforilativa e o complexo I.....	16
<b>2. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>19</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>20</b>
3.1. Objetivo geral .....	20
3.2. Objetivos específicos .....	20
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>21</b>
4.1. Manutenção das colônias de mosquitos <i>Ae.aegypti</i> da linhagem Bangkok .....	21
4.2. Preparo e diluição da rotenona para alimentação dos mosquitos.....	21
4.3. Infecção dos mosquitos com DENV1 via oral .....	22
4.4. Extração do RNA de mosquitos ( intestino média e carcaça) .....	23
4.5. Síntese de cDNA -Transcrição reversa (RT).....	24
4.6. PCR quantitativo (qPCR).....	24
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>26</b>
5.1. Curva de sobrevivência da dose resposta do inibidor Rotenona 0,1mM; 0,01mM; 0,001mM) em mosquitos <i>Ae.aegypti</i> .....	26
5.2. Expressão gênica (ASH1 e B18) das unidades supernumerárias 2 e 4 dias após inibição do Complexo I em mosquito não infectado.....	29
5.3. Efeito da rotenona sobre DENV 1.....	35
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>46</b>
<b>7. CONCLUSÕES .....</b>	<b>46</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>47</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Os mosquitos são pragas importantes para a saúde pública devido à sua importância como vetores para patógenos potencialmente mortais para seres humanos e também devido ao incômodo causado por reações cutâneas provocada pela suas picadas (Peng, Li e Simons, 1998). Das doenças transmitidas por artrópodes, destacamos as arboviroses que são causadas pelos arbovírus. O termo arbovírus vem do inglês 'arthropod-borne viruses', e foi introduzido em 1942 para designar os vírus que requerem um vetor artrópode para que haja transmissão para o hospedeiro vertebrado (WHO 1985). Coletivamente, esses vírus estão entre os maiores encargos para a saúde global, devido à sua ampla prevalência e à severa morbidade e mortalidade que causam em hospedeiros humanos e animais. Exemplos específicos de patógenos transmitidos por mosquitos incluem: o vírus Zika (ZIKV), vírus do Nilo Ocidental (WNV), sorotipos do vírus da dengue 1-4 (DENV 1-4), vírus da encefalite japonesa (JEV), vírus da febre amarela (YFV), vírus da chikungunya (CHIKV) e vírus da febre do Vale do Rift (RVFV). No Brasil, uma das principais arboviroses com elevado impacto na saúde pública é a dengue. Por exemplo, só no ano de 2019, foram registrados pelo Ministério da saúde, 1.544.987 casos de Dengue no Brasil (fonte: <http://saude.gov.br/>).

### 1.1 Dengue

A dengue é uma doença febril aguda que pode originar diversas apresentações clínicas, sendo o curso da infecção no humano iniciado normalmente com um quadro febril e pode agravar-se com hemorragias. O agravamento da doença acontece principalmente nos casos de infecções recorrentes por diferentes sorotipos (Halstead, 1979). Durante o período de 1923 até 1980, o Brasil não registrou casos de dengue em seu território (Braga e Valle, 2007). Porém, com o relaxamento nas políticas de controle, em 1976 o mosquito vetor foi reintroduzido no país possivelmente a partir de Salvador, no estado da Bahia. Neste período, países vizinhos ao Brasil como Venezuela, Colômbia, Suriname, e Caribe já registraram casos de transmissão do DENV. Em 1981, os sorotipos 1 e 4 do DENV foram os primeiros a serem isolados numa epidemia ocorrida em Boa Vista, estado de Roraima (Osanai *et al.*, 1983). Em

pouco tempo, ambos os sorotipos do DENV invadiram a região Sudeste e Nordeste do Brasil, com a introdução subsequente dos sorotipos 2 e 3 nos anos 1990 e 2001, respectivamente (Nogueira *et al.*, 1991, 2001) .

## 1.2 Dengue Vírus

A dengue é causada por vírus da dengue (DENV), que pertence à família Flaviridae, do gênero *Flavivirus* (Weaver e Vasilakis, 2009). O vírus da Dengue possui um RNA de senso positivo de fita simples com aproximadamente 11.000 nucleotídeos (Guzman *et al.*, 2010; Kuhn *et al.*, 2002) . O genoma do DENV possui uma única fase de leitura no qual expressa uma poliproteína de aproximadamente 370 kDa que é processada pós-traducionalmente por proteases de origem viral, bem como de origem celular, dando origem a três proteínas estruturais (C, prM e E) e sete proteínas não estruturais : NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 (Clyde, Kyle e Harris, 2006; Guzman *et al.*, 2010; Luo *et al.*, 2008; Rodenhuis-Zybert, Wilschut e Smit, 2010). O vírus da dengue é classicamente dividido em quatro sorotipos, denominados DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 (Gould e Solomon, 2008) . Apesar dos diferentes sorotipos serem distintos geneticamente, apresentam muitas semelhanças no que diz respeito à epidemiologia bem como nos sintomas que causam. Os humanos são os principais hospedeiros dos quatro sorotipos do DENV, podendo também ser encontrados em outros primatas (Clyde, Kyle e Harris, 2006; Lélé, 1991) . O mosquito *Aedes aegypti* é o principal vetor, fundamentalmente em regiões urbanas. Além deste vetor, existem outras espécies do gênero *Aedes* que podem transmitir o DENV, como por exemplo: *Aedes albopictus*, *Aedes polynesiensis* e *Aedes scutellaris*. No entanto, no Brasil duas espécies estão associadas à transmissão de DENV, sendo *Aedes aegypti* o principal vetor em áreas urbanas e *Aedes albopictus* predominante em áreas periurbanas.

## 1.3 O ciclo de transmissão do DENV

O DENV é transmitido para os humanos por meio da saliva de mosquitos infectados. Essa saliva infectada com DENV é injetada nos humanos quando as

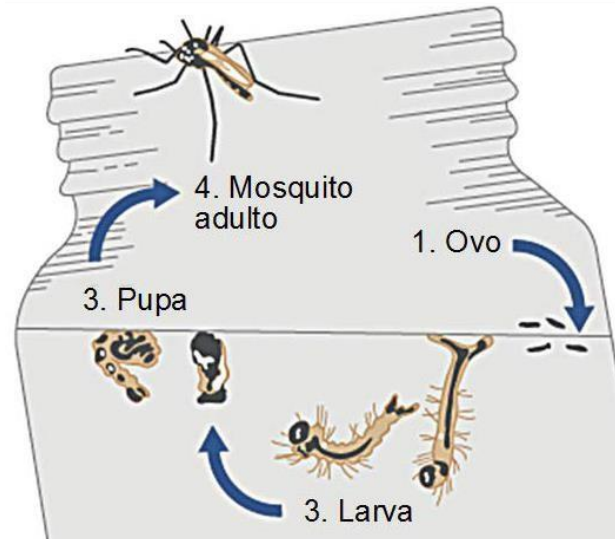
fêmeas de mosquitos se alimentam de sangue para garantir o desenvolvimento dos seus ovos. O ciclo de transmissão inicia-se quando um mosquito não infectado se alimenta de sangue num indivíduo infectado com DENV. O mosquito torna-se então um possível transmissor do DENV. No entanto para o mosquito ser capaz de transmitir o DENV para outros humanos, o vírus presente no sangue ingerido tem de infectar as células do sistema digestivo do inseto e migrar até as suas glândulas salivares. Resumidamente o DENV inicialmente infecta as células do esôfago e intestino do mosquito (Beerntsen, James e Christensen, 2000), e após um período que pode variar de 8 a 12 dias, atinge as células da glândula salivar, tornando o mosquito apto a transmitir o DENV , ao se alimentar novamente em outro hospedeiro.

#### 1.4 Mosquitos vetores *Aedes aegypti*

Conhecido como mosquito da dengue, *Aedes (Stegomyia) aegypti* é um artrópode pertencente à ordem Diptera, subordem Nematocera, família *Culicidae*, e subfamília *Culicinae*. Eles têm uns hábitos diurnos e praticamente não faz nenhum som audível antes de picar. É cosmopolita e muito adaptável, pois colonizou a maioria das regiões tropicais e subtropicais do mundo, com a fêmea realizando a postura dos ovos em recipientes contendo água (**Figura 1**), o que acaba ocorrendo muitas vezes nas cidades, uma vez que estes recipientes são abundantes nestas regiões.

O mosquito inicia o processo de maturação de ovos ao ingerir sangue. Uma única postura pode ter de 100 a 200 ovos e os mosquitos podem ter aproximadamente 5 oviposturas durante sua vida. O ciclo se inicia com a postura dos ovos das fêmeas do mosquito geralmente nas paredes internas de recipientes como jarros de plantas, pneus, copos, etc., que são feitas separadamente num substrato úmido, próximo à água, ou em lugar que podem temporariamente ficar inundados. A fecundação dos ovos acontece durante a postura, e os ovos podem permanecer viáveis por até 1 ano.

Figura 1: Ciclo de vida do mosquito *Aedes aegypti* - Fêmeas do mosquito colocam ovos nas paredes de recipientes destampados. Quando os recipientes são preenchidos, os ovos que entrarem em contato com a água eclodem, dando origem às larvas. Após os 4 estágios do desenvolvimento larval, se transformam em pupas ainda na água. Depois de 2 dias, o mosquito adulto rompe o cefalotórax da pupa, e emerge na superfície da água. O mosquito adulto então pode voar por seu habitat terrestre, reiniciando o ciclo.



Fonte: Adaptado de Nature Education (2011)

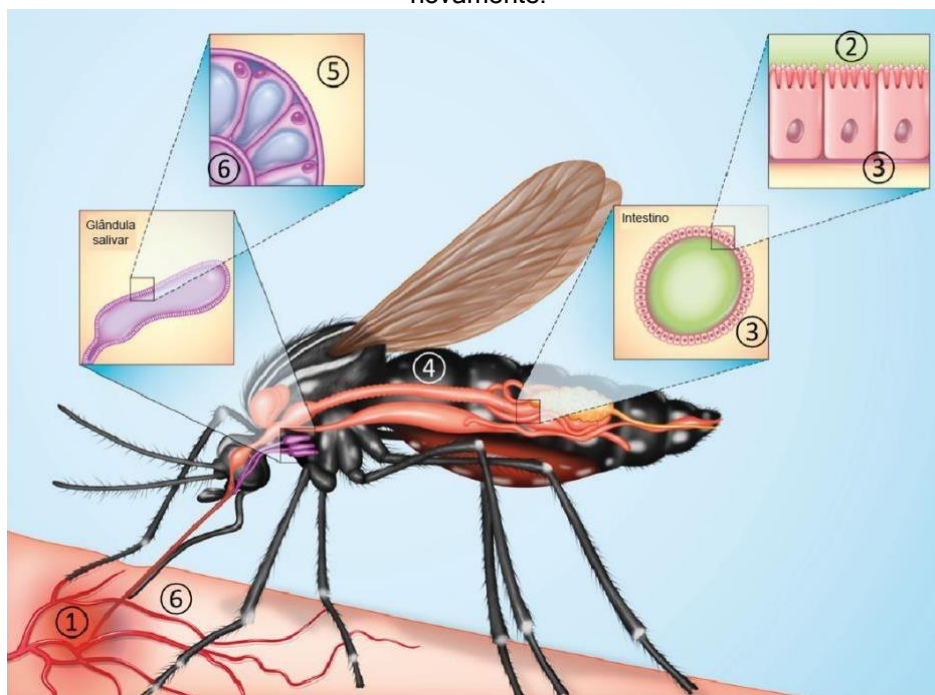
Quando entra em contato com a água, os ovos eclodem dando origem às larvas, que se alimentam de partículas orgânicas na água, como algas, bactéria e organismos microscópicos. Os culicídeos, de uma maneira geral, passam por estágios larvais de desenvolvimento – L1 a L4, passando o maior tempo no estágio L4. Depois entram no estágio de pupa onde não se alimentam neste período. Após mais ou menos 2 dias os mosquitos adultos emergem na superfície da água, e após a cópula e repasto sanguíneo o ciclo é reiniciado. O ciclo do mosquito pode durar de 10 a 15 dias, dependendo das condições do ambiente. Os mosquitos adultos vivem em média entre 30 a 60 dias na natureza, e pode chegar até muito mais dependendo das condições de temperatura e umidade.

### 1.5 As barreiras à infecção viral em mosquitos

Após o repasto sanguíneo feito pelo mosquito fêmea em um hospedeiro infectado, o vírus entra em contato primeiramente com o intestino do mosquito, infectando e replicando nas células epiteliais deste órgão. Depois o vírus passa para a hemolinfa e infecta outros tecidos do inseto, como por exemplo o corpo gorduroso e músculos, até atingir as glândulas salivares, de onde vai ser transmitido para outros

hospedeiros quando a fêmea realiza um novo repasto sanguíneo (**Figura 2**) (Azar e Weaver, 2019). Porém, nem todos os mosquitos que ingerem sangue contaminado se infectam de fato. Alguns fatores podem influenciar a infecção ou não do inseto como a capacidade intrínseca que o mosquito possui de infectar-se sustentar a replicação do patógeno e, conseqüentemente, transmitir a doença, chamada de competência vetorial. Os fatores que influenciam a competência do mosquito incluem temperatura do ambiente, genótipos do mosquito e do vírus e microbiota do intestino do mosquito (Souza-Neto. Powell e Bonizzoni, 2019) .

Figura 2 : Rota de infecção do vírus a partir da ingestão do sangue virêmico pelo mosquito fêmea até a transmissão para o próximo hospedeiro mamífero - (1) A fêmea realiza o repasto sanguíneo e ingere sangue contaminado com vírus; (2) o vírus infecta e replica nas células do intestino (3) e então passa das células epiteliais do intestino para a hemolinfa; (4) o vírus infecta outros órgãos/tecidos do mosquito, como músculo, nervos, corpo gorduroso etc. (5) para depois infectar as glândulas salivares. (6) Daí o vírus é transmitido para outro hospedeiro quando o mosquito se alimentar de sangue novamente.



Fonte: Adaptado de Azar e Wheaver (2019)

## 1.6 Imunidade antiviral mediada por RNAi em mosquitos

Para combater infecção viral, o mosquito *Aedes aegypti*, tal como outras espécies de insetos, possui diferentes mecanismos de defesa antivirais. Vale salientar, no entanto, que os insetos dependem unicamente da imunidade inata como mecanismo de defesa contra patógenos, uma vez que não apresentam imunidade adaptativa como os animais vertebrados. O mecanismo de defesa antiviral mais bem

caracterizado e provavelmente mais importante nos insetos é a via de RNA de interferência (RNAi). No organismo modelo *Drosophila melanogaster* e em outros insetos de forma geral, existem pelo menos 3 vias de RNAi: a via de siRNA (*small interfering RNAs*), via de miRNA (*microRNAs*), e a via de piRNA (*piwiRNAs*), sendo seu funcionamento dependente de componentes e mecanismos moleculares distintos (Ghildiyal e Zamore, 2009). Em insetos, a via de siRNA é uma potente via celular de imunidade antiviral (Olmo *et al.*, 2013), ativada pela formação de RNAs de fita dupla (dsRNA – *double stranded RNA*). Os dsRNAs podem se originar tanto a partir de RNAs virais formados durante a replicação quanto do próprio hospedeiro a partir de mRNAs transcritos em pares anti-senso ou longos grampos. O resultado da ativação desta via é a clivagem processiva dos dsRNAs, gerando pequenos RNAs com tamanho de 21 nucleotídeos (nt), que quando de origem viral são chamados de vsRNAs (*viral small interfering RNAs*). Alguns autores sugerem que a via de piRNA também possa ter papel antiviral nestes organismos (Aguiar *et al.*, 2015; Morazzani *et al.*, 2012; Vodovar *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2010).

Apesar da via de RNAi ter um papel de grande importância na resposta antiviral em insetos, provavelmente existem outros componentes envolvidos na resposta antiviral. Há evidências crescentes de outras vias participarem na resposta antiviral em *Aedes aegypti*, como a via Toll, a via IMD, a via JAK/STAT e autofagia (Samuel, Adelman e Myles, 2018). Recentes estudos mostraram que as mitocôndrias participam de respostas imunes inatas (Gonçalves *et al.*, 2012) contra infecções virais e bacterianas (West *et al.*, 2011) e que os ROS mitocondriais são importantes ativadores da resposta imune do hospedeiro após infecção (Seth *et al.*, 2005; West *et al.*, 2011).

## 1.7 Resistência natural de mosquitos ao DENV

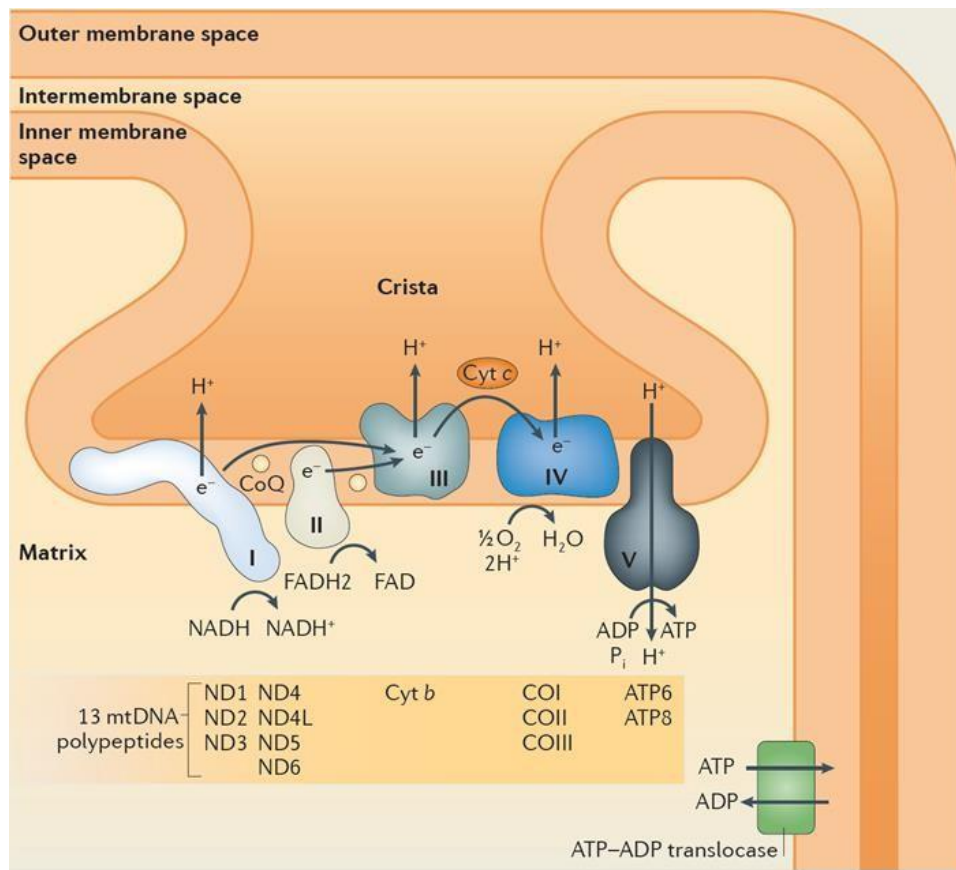
De um modo geral, as vias antivirais presentes em mosquitos tentam combater as infecções virais controlando a replicação viral ou até mesmo evitar uma infecção viral inicial do aparelho digestivo dos mosquitos, tornando deste modo os mosquitos resistentes à infecção. Trabalhos previamente realizados pelo nosso grupo, de fato mostram que dentro de uma mesma população de *Aedes aegypti* podem existir mosquitos resistentes (que não se infectam) e mosquitos suscetíveis (que se infectam) quando alimentados com sangue infectado com DENV. Podemos observar esta

variação de resistência tanto para populações de mosquitos de laboratório como em populações de mosquitos de campo. Com o objetivo de conhecer as bases biológicas, bem como possíveis vias envolvidas na diferença entre os mosquitos resistentes e os mosquitos susceptíveis, previamente, foram realizadas análises de transcriptomas de cada grupo (mosquitos resistentes versus mosquitos susceptíveis). Podemos observar que várias vias foram enriquecidas tanto nos mosquitos resistentes quanto nos susceptíveis. Entre essas vias, a que se destacou mais foi a via da fosforilação oxidativa (Queiroz, 2018). Esta via é composta por cinco complexos, tendo sido o complexo I o que é mais diferencialmente expresso entre os mosquitos susceptíveis e os mosquitos resistentes.

### 1.8 A fosforilação oxidativa em eucariotos

A maior parte do ATP utilizado pelas células eucarióticas é produzido por complexos proteicos presentes na membrana interna das mitocôndrias. Esse complexo é denominado cadeia transportadora de elétrons (CTE) e, como o próprio nome indica, transporta elétrons a partir de um doador reduzido (NADH ou FADH<sub>2</sub>) até o O<sub>2</sub>, que será reduzido a H<sub>2</sub>O na maioria das vezes, quando a célula se encontra em estado fisiológico normal. A CTE é formada por quatro complexos supramoleculares (CI-CIV). O complexo I (CI) recebe elétrons do NADH e os transfere para a ubiquinona; O complexo II (CII) pode receber elétrons do succinato e também direcioná-los para a ubiquinona. O complexo III (CIII) é responsável por transferir elétrons da ubiquinona reduzida para o citocromo c, enquanto o complexo IV (CIV) transfere os elétrons do citocromo c para o O<sub>2</sub> (El-Bacha e Poian, 2012). A energia liberada pela transferência dos elétrons é utilizada para o bombeamento de H<sup>+</sup> através dos CI, CIII e CIV, da matriz para o espaço intermembranas. O acúmulo de H<sup>+</sup> no espaço intermembranas cria um potencial eletroquímico que é responsável pela síntese de ATP (**figura 3**). À medida que os prótons passam de volta para a matriz através da F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ATP-sintase (complexo V), a energia armazenada pelo potencial eletroquímico é transferida para o 14 CV, causando uma mudança conformacional desta enzima que permite a fosforilação do ADP em ATP (Nelson e Cox, 2011).

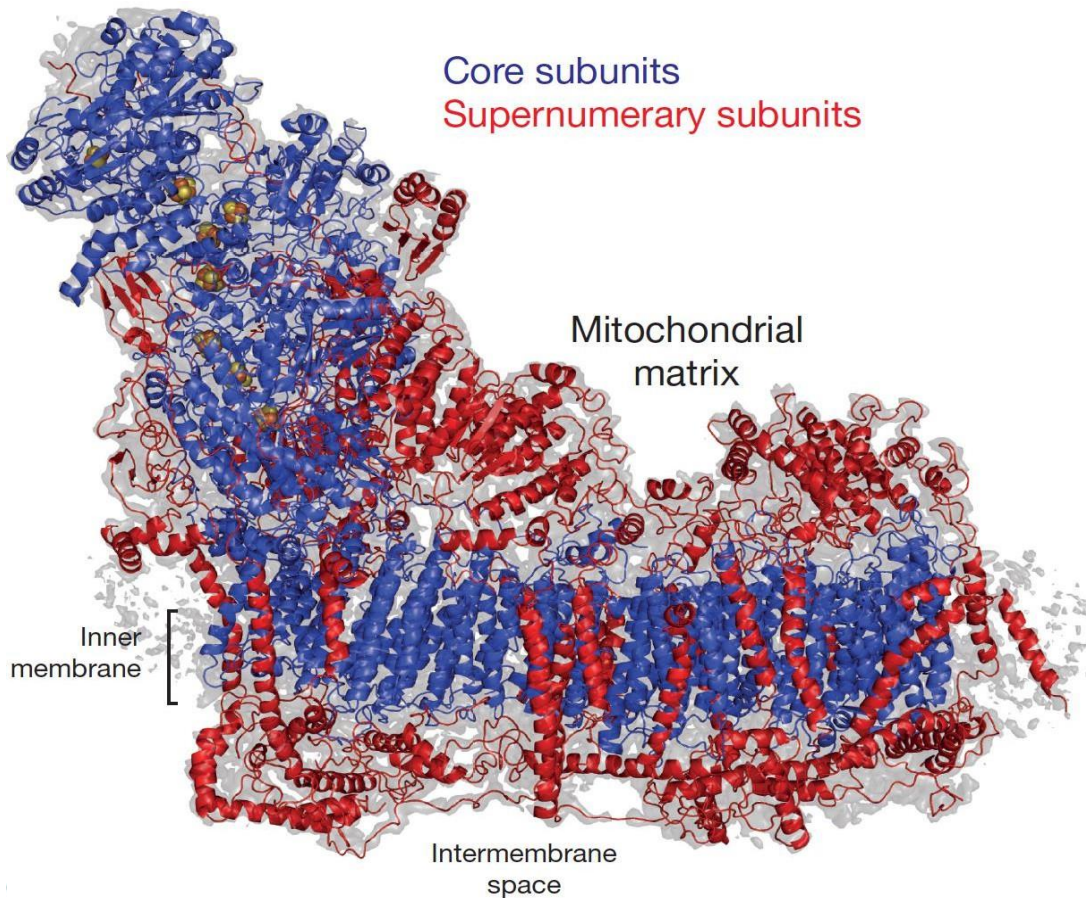
Figura 3 : Processo da fosforilação oxidativa mostrando detalhadamente seus 5 complexo C-I C-II IC-II C-IV C-V



Fonte: Adaptado de Mishra e Chan (2014).

O CI, também chamado de NADH-ubiquinona oxirredutase ou NADH desidrogenase, tem forma de L, apresentando um braço inserido na membrana interna da mitocôndria e o outro braço inserido na matriz. A cada NADH oxidado pelo CI, são catalisadas a transferência de 2 elétrons para a ubiquinona, e a transferência de 4 prótons da matriz para o espaço intermembrana (NELSON, D. L.; COX, M. M., 2011). O CI é a maior e mais complexa enzima da CTE, com uma massa molecular de 1 MDa. Ele possui 14 subunidades centrais, que exercem as funções catalíticas principais da enzima, e são conservadas desde bactérias até os humanos. Além dessas subunidades centrais, o CI de eucariotos também possui cerca de 31 subunidades acessórias, ou supranumerárias, das quais pouco se sabe acerca de suas funções (figura 4).

Figura 4: Estrutura do complexo I - mostra as 14 subunidades principais em azul (clusters FeS em amarelo / laranja), as 31 subunidades supranumerárias em vermelho e a densidade cryoEM em cinza. b, c, Disposição e estruturas das subunidades supranumerárias ao redor da membrana do núcleo.



Fonte: Adaptado de Zhu, Vinothkumar e Hirst (2016)

Já foi observado que algumas subunidades do domínio transmembrana podem dar estabilidade ao complexo e ajudar em sua montagem e organização (Zickermann *et al.*, 2010). Já a subunidade B16.6 de *Bos taurus*, localizada próxima a uma subunidade central, é homóloga a um gene que regula morte celular em humanos (GRIM-19 (Fearnley *et al.*, 2001)). A maior parte das subunidades supranumerárias, entretanto, encontra-se sem função conhecida (Herrmann e Riemer, 2012; Wirth *et al.*, 2016). As mitocôndrias são o principal sítio de transdução de energia celular e também uma fonte significativa de ROS (Bulua *et al.*, 2011).

## 2. JUSTIFICATIVA

O mosquito *Ae. aegypti* é vetor de uma série de arbovírus que causam doenças graves, a seres humanos dentre os quais se destaca o DENV. A Dengue é uma doença de alta prevalência nas regiões tropicais e subtropicais. Segundo o ministério da saúde, no ano 2019, foram reportados 1.544.987 casos de Dengue no Brasil. Considerando ainda que não há no mercado vacinas eficientes nem tratamentos contra o DENV, as atividades de controle de transmissão dessas doenças dependem principalmente do combate ao mosquito vetor *Ae. aegypti*. Para isto, é essencial que a interação entre vírus e o inseto vetor seja melhor conhecida e caracterizada.

Os trabalhos envolvendo a interação inseto-arbovírus podem ser divididos em duas abordagens. A primeira onde o foco é a caracterização das vias antivirais ativadas durante a infecção e como elas afetam a replicação viral no inseto. Outros estudos abordam a caracterização das diferentes barreiras à infecção afetando a probabilidade do mosquito se infectar ou transmitir o vírus. A conexão entre as duas abordagens é essencial para entendermos como as respostas antivirais afetam as barreiras à infecção que determinam a competência vetorial. Neste contexto, é fundamental entender as bases moleculares da diferença entre mosquitos naturalmente resistentes ou susceptíveis à infecção pelos arbovírus para melhor entendermos a competência vetorial do *Ae. aegypti* ao DENV. Este conhecimento seria de grande ajuda para o desenvolvimento de ferramentas de controle da transmissão desta arbovirose.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Este trabalho tem como objetivo geral entender o efeito do complexo I da cadeia respiratória inibido pela rotenona , no controle da infecção do vírus da dengue em mosquitos *Aedes aegypti* .

#### 3.2 Objetivos específicos

- 1- Analisar o efeito do inibidor do complexo I, Rotenona, na sobrevivência dos mosquitos *Ae.aegypti*.
- 2- Analisar a expressão gênica (ASH1 e B18) das unidades supernumerárias do complexo I após a sua inibição com Rotenona em mosquitos *Ae.aegypti*.
- 3- Avaliar o efeito da inibição do Complexo I pela Rotenona sobre a taxa de infecção e carga viral do DENV em mosquitos *Ae.aegypti*.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Manutenção das colônias de mosquitos *Ae.aegypti* da linhagem Bangkok

Os procedimentos de manutenção dos mosquitos e o uso deles para fazer os experimentos foram realizados no insetário do nosso grupo (RNA de interferência) em salas de criação climatizadas, com temperatura de 28°C, umidade de 80% ± 10% e ciclo claro/escuro de 12 h/12 h. Os ovos foram colocados para eclosão em bandejas fechadas contendo 4 litros de água filtrada e suplementada com ração para peixe ornamental TetraMin (Tetra©). Após 5 a 7 dias, as pupas foram capturadas e transferidas para um recipiente plástico com água limpa, e acondicionadas em gaiolas para criação de mosquitos adultos. O recipiente foi mantido na gaiola por até três dias, período suficiente os adultos emergirem. Durante todo o tempo foi oferecido solução de açúcar 10% aos mosquitos.

A manutenção das colônias de mosquitos da linhagem Bangkok foi realizada segundo protocolo padrão do insetário, brevemente descrito a seguir: mosquitos adultos com uma semana após emergirem foram alimentados com camundongo em contato com as gaiolas por 15 a 30 minutos. No segundo dia após a alimentação foi colocado em cada gaiola um copo plástico contendo papel filtro e água no fundo para que as fêmeas fizessem a postura dos ovos. Após dois dias, os papéis de filtro foram coletados, deixados à temperatura ambiente dentro de um plástico até secar, e acondicionados em envelopes. Os ovos são mantidos em temperatura ambiente por até três meses para posterior uso e manutenção da colônia ou produção de mosquitos para a realização de experimentos envolvendo infecção viral.

### 4.2 Preparo e diluição da rotenona para alimentação dos mosquitos.

A administração de rotenona aos mosquitos adultos foi realizada via oral. Para tal foi adicionado ao sangue a rotenona ou veículo (PBS e soro fetal bovino 10%) ao sangue conjuntamente com o DENV1 para realização do repasto sanguíneo. Devido à falta de conhecimento de qual a dose de rotenona necessária para bloquear o complexo da cadeia respiratória em mosquitos da espécie *Aedes aegypti* bem como a natureza tóxica da rotenona, foram realizados experimentos

de padronização usando diferentes doses de rotenona. Inicialmente foi preparado um estoque de rotenona de 100mM diluída em DMSO.

Em seguida está apresentado o protocolo usado para o preparo rotenona de 100mM.

A partir do stock de Rotenona a 100mM diluído em DMSO foram realizadas as seguintes diluições: 0,1mM; 0,01mM; 0,001mM. Para realizar as diluições foram testados vários meios aquosos: meio de cultura Schneider, meio de cultura L15 e PBS 1X. Uma vez que podemos observar que a rotenona precipitava rapidamente em todos os meios aquosos testados, decidimos suplementar o meio com 10% de soro fetal bovino (FBS do inglês fetal bovine serum), a qual reduziu significativamente a precipitação da rotenona. As várias diluições foram realizadas diluindo 10 $\mu$ l da solução mais concentrada em 90 $\mu$ l de PBS 1X.

A presença de FBS ou BSA foi essencial para diluir a rotenona em meio aquoso. Assim, para experimentos com mosquitos, diluímos a rotenona em PBS 1X com 10% de FBS. Como preparamos uma solução concentrada 10X que é mais diluída no veículo (sangue ou sangue + vírus), a concentração final de FBS no sangue usado para realizar o repasto dos mosquitos foi de 1%.

#### 4.3 Infecção dos mosquitos com DENV1 via oral.

O procedimento de infecção por alimentação foi realizado segundo . Brevemente, mosquitos adultos fêmeas com 5 a 7 dias de idade foram colocados em gaiolas com capacidade para 500 cm<sup>3</sup> utilizando um aspirador elétrico. Foram colocadas num número máximo de 100 fêmeas por gaiola, privadas de alimentação com solução de açúcar por um período de 24h antes da alimentação.

Para o preparo do sangue e dos alimentadores artificiais o seguinte procedimento foi realizado: sangue humano total, previamente coletado em tubos com EDTA (Vacurette®), foi centrifugado a 1800g por 15 minutos à temperatura ambiente. Após a centrifugação, o plasma e as células brancas foram descartadas com o auxílio de uma pipeta, restando somente as células da série vermelha. Estas células foram então res-suspendidas com três vezes seu volume de meio RPMI-1640 (Sigma®) não suplementado com SFB nem antibióticos e centrifugadas como descrito acima. Este processo foi repetido por duas vezes. Nos casos em que foi usado sangue de rato não

realizamos do processo de centrifugação. O sangue foi retirado do rato e usado diretamente para o experimento.

O sangue foi misturado com o DENV1 na proporção de 2:1 volumes (0.5ml de sangue e 1ml de vírus). Em seguida foi adicionado a rotenona ou o veículo e misturado tudo em tubos de 2ml. A montagem dos alimentadores com o sangue contaminado foi feita da seguinte forma: alimentadores de vidro cobertos com membrana de tripa de porco foram abastecido com a mistura de sangue, DENV1 e rotenona/veículo e mantido aquecido à temperatura de 37°C através de um banho com circulação de água. Os mosquitos foram deixados em contato com as gaiolas por 1:30 a 2 horas . Após alimentação, os mosquitos foram anestesiados com CO<sub>2</sub> e transferidos para uma placa de Petri sobre o gelo para realizar a seleção das fêmeas ingurgitadas (as fêmeas que alimentaram com sangue). As fêmeas ingurgitadas foram colocadas em novas gaiolas contendo uma solução de açúcar a 10% embebida em algodão, e mantidas em uma área reservada para experimentos de infecção. A solução de açúcar a 10% embebida em algodão utilizada para alimentar estes mosquitos foi trocada todos os dias, a fim de evitar o surgimento de fungos.

Quatro e oito dias após o repasto sanguíneo, os mosquitos foram coletados e dissecados para separar o intestino médio do restante do corpo (o que consideramos ser a carcaça). Após a dissecação dos mosquitos, intestino médio e a carcaça foram colocados separadamente em Trizol (um tubo de 1,5mL com 200uL de Trizol e duas esferas de vidro). Logo em seguida as amostras foram maceradas durante um minuto e meio e estocadas a -80°C para posterior extração de RNA .

#### 4.4 Extração do RNA de mosquitos (intestino médio ou carcaça)

Os mosquitos individualmente dissecados (intestino médio e carcaça) foram coletados em tubos de 1,5ml e homogeneizados com 200 µL de TRIzol® Reagent (Invitrogen™) e macerados com a ajuda de duas esferas de vidro, utilizando o equipamento Mini-BeadBeater-16 (Biospec©) por um minuto e meio. Depois foram incubados por 10 minutos à temperatura ambiente e foram então adicionados 40 µL de clorofórmio (Sigma®) seguido de agitação vigorosa em vórtex por 15 segundos. Após uma incubação por 10 minutos à temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 15000 x g em microcentrífuga a 4°C. Após a centrifugação, a fase aquosa foi transferida para um novo tubo e foi adicionado 4 µg

de glicogênio ultrapuro (Ambion®) em cada amostra, com posterior adição de 100 µL de isopropanol (Sigma®) e agitação leve em vortex. Após incubação por 10 minutos à temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas por 12 minutos a 12000 x g. O sobrenadante foi descartado, e foi adicionado em cada tubo 550 µL de etanol 75% v/v (Sigma®) preparado utilizando água livre de nucleases (Nuclease-Free Water – Ambion®). Após agitação branda em vortex, os tubos foram novamente centrifugados por 10 minutos a 7.500 x g, e em seguida o sobrenadante foi descartado, e o precipitado foi seco pela inversão dos tubos em papel absorvente. Após a secagem do RNA, este foi ressuspensionado em 10 µL de água livre de nucleases (Ambion®) e colocado no gelo durante 1 hora. Depois disso as amostras foram armazenadas imediatamente a -80°C até o momento do uso para realização da síntese de cDNA por transcriptase reversa.

#### 4.5 Síntese de cDNA -Transcrição reversa (RT)

Primeiramente foi feita a desnaturação do RNA através da incubação da mistura RNA, água(Nuclease-Free Water – Ambion®) e Random Primers a 70°C em um termociclador durante 10 minutos, seguido de banho de gelo durante 10 minutos. Em seguida, foram adicionados o tampão da enzima, DTT e duas unidades da enzima transcriptase reversa. Posteriormente, essa mistura foi incubada novamente em um termociclador a 42°C durante 60 minutos e 72°C por 5 minutos. Por fim, a amostra foi estocada a -20°C até o momento do uso para realização do PCR quantitativo (qPCR).

#### 4.6 PCR quantitativo (qPCR)

Para análise da expressão gênica e quantificação relativa da carga viral foi utilizada a técnica de PCR quantitativo, conhecida como Real Time PCR. As reações foram realizadas utilizando-se o kit Power SYBR® GREEN PCR Master Mix (Applied® Biosystems) conforme boletim técnico do fabricante, utilizando o equipamento StepOnePlus™ RealTime PCR System (Applied® Biosystems) ou QuantStudio™ 7 Flex Real-Time PCR System (Applied® Biosystems). As análises foram realizadas utilizando o método do  $\Delta C_t$  calculado em relação ao gene constitutivo codificador para a partícula ribossomal L32 (RpL32 – Ribosomal particle L32).

Os testes estatísticos foram realizados com o apoio instrumental do software Prism 5.0 (Graphpad® Software). A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste D'Agostino e Pearson. Para dados de natureza não paramétrica, foram utilizados kruskal-wallis, com pós-teste de Dunns.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Efeito da inibição do complexo I, usando Rotenona, na sobrevivência dos mosquitos *Ae. aegypti*

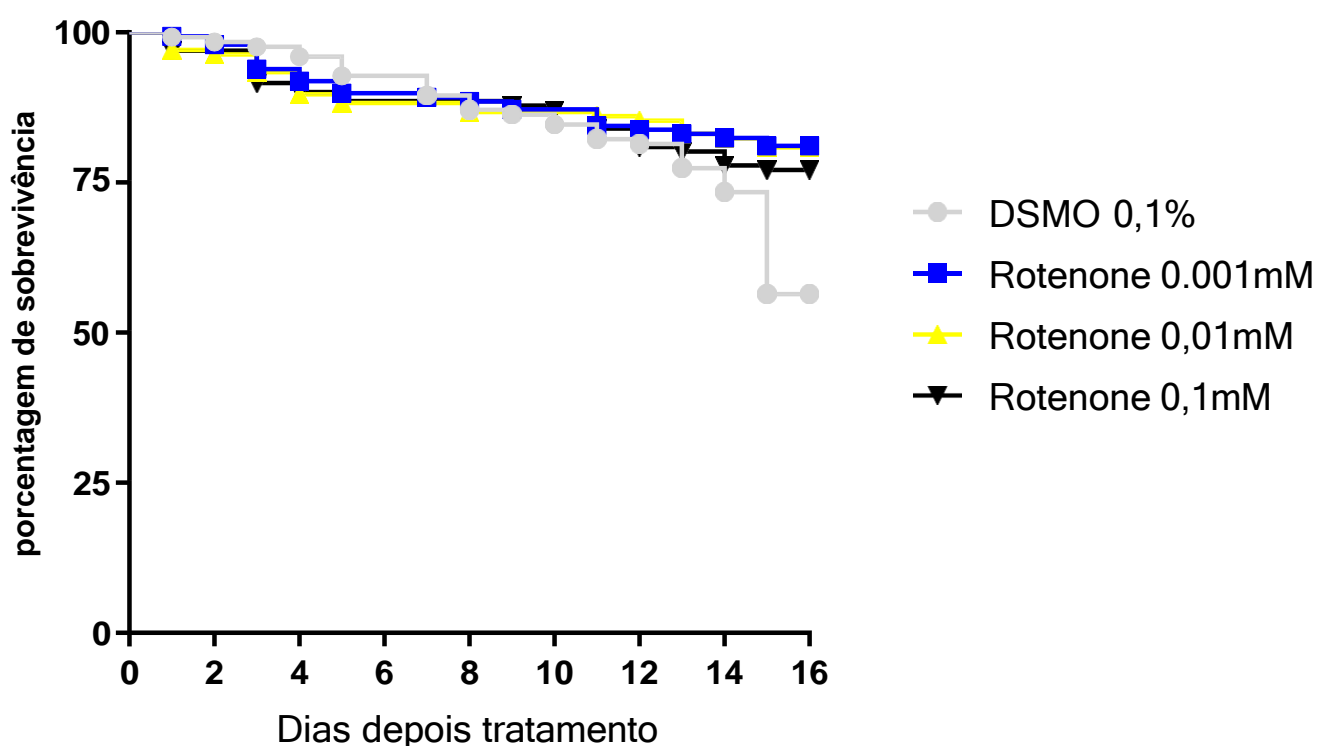
O nosso trabalho tem como objetivo entender o papel do complexo I da cadeia respiratória no controle do vírus da dengue em mosquitos *Aedes aegypti* usando a linhagem de laboratório Bangkok. Como desenho experimental, decidimos bloquear quimicamente o complexo I da cadeia respiratória em mosquitos adultos e avaliar o efeito na resistência à infecção por dengue 1 (DENV1). Para bloquear o complexo I da cadeia respiratória nesta dissertação, utilizamos o composto químico rotenona que é conhecido como um inseticida de amplo espectro e que tem como mecanismo de ação o bloqueio da passagem dos elétrons transportados pela ubiquinona do complexo I para complexo II. Existem poucos trabalhos na literatura sobre o uso de rotenona em animais, tendo sido a maioria desses estudos realizados em culturas celulares e geralmente ligados a estudos de doenças neurodegenerativas (Areizama *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2020). Pelo fato de a rotenona ser um inseticida, começamos os nossos trabalhos por analisar as curvas de sobrevivência de mosquitos usando várias doses de rotenona para definir uma dose que não seria letal para os mosquitos, mas poderia ainda inibir o complexo I da cadeia respiratória e nos permitir avaliar o seu efeito sobre a infecção pelo DENV.

Com objetivo de identificar qual a dose de rotenona máxima que poderia ser administrada no sangue para repasto sem um impacto significativo na sobrevivência dos mosquitos, decidimos avaliar a sobrevivência das fêmeas de mosquitos *Ae. aegypti* após a ingestão de três diferentes doses de rotenona: 0,1mM ; 0,01mM ; 0,001mM. Uma vez que a rotenona foi previamente diluída em DMSO, foi avaliada a sobrevivência de um grupo controle em que só foi adicionado ao sangue DMSO 0,1% (a mesma quantidade de veículo encontrada no sangue contendo as diferentes doses de rotenona). A sobrevivência dos mosquitos foi observada durante 16 dias com um tamanho amostral de pelo menos 80 mosquitos em cada grupo (**Figura 5**). Os mosquitos foram criados, alimentados e mantidos nas mesmas sempre nas mesmas condições. A taxa de sobrevivência foi acompanhada diariamente. Para evitar que outros fatores pudessem interferir com a taxa de sobrevivência, os alimentadores de

água com açúcar, usados após o repasto sanguíneo, foram trocados diariamente para evitar crescimento de bactéria ou fungos.

Como podemos observar na figura 5, não foi observado o grande efeito tóxico das várias doses de rotenona testadas. Foi também observado que não existe diferença significativa entre as doses de 0,1 mM, 0,01mM e 0,001mM de rotenona, e que estas doses têm uma mortalidade muito similar ao grupo onde foi administrado só o veículo (DMSO).

Figura 5: Taxa de sobrevivência dos mosquitos da linhagem Bangkok após a ingestão de diferentes doses de rotenona.

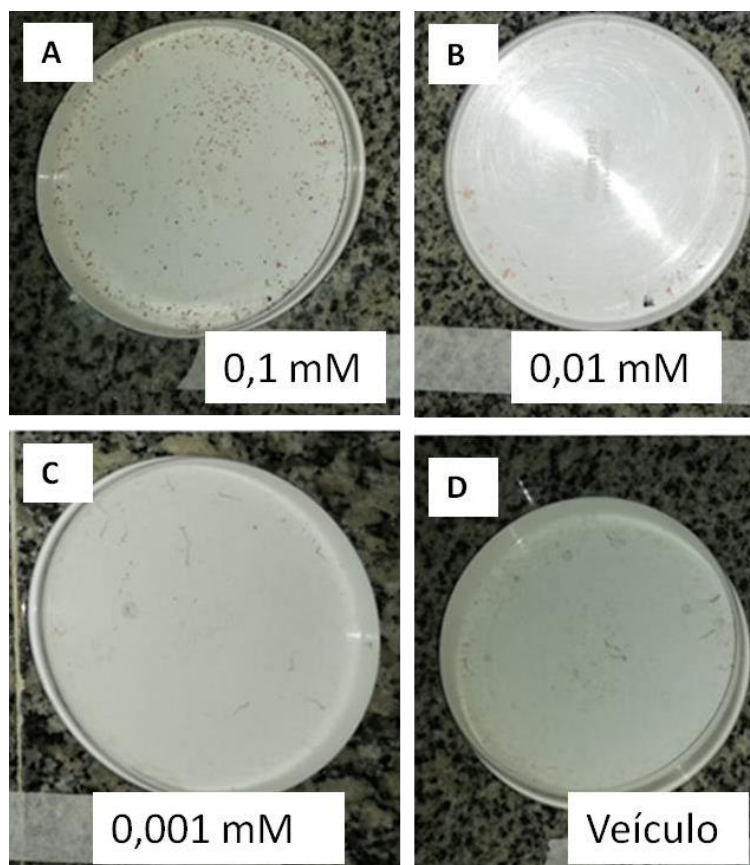


Fonte: Elaborado pelo autor (2020)

No eixo X temos dias após tratamento e no eixo Y a porcentagem de sobrevivência. Para cada grupo foram usadas pelo menos 80 fêmeas com 5 a 7 dias de idade. As diferentes doses de rotenona foram adicionadas ao sangue, o qual foi imediatamente disponibilizado para o repasto sanguíneo dos mosquitos. O repasto sanguíneo foi realizado com alimentadores artificiais usando tripa de porco com membrana para acondicionar o sangue. Os mosquitos foram expostos ao sangue pelo período de uma hora, após o qual foram selecionadas as fêmeas ingurgitadas. A sobrevivência das fêmeas ingurgitadas foi avaliada durante 16 dias. (Mandel-Cox test).

Nestes experimentos também observamos outro aspecto que foi levado em consideração para a escolha da dose de rotenona a ser utilizada no repasto sanguíneo com DENV. Após o repasto sanguíneo, observamos que em alguns casos houve sangue expelido pelos mosquitos. Os mosquitos ficaram durante uma hora expostos aos alimentadores artificiais para repasto sanguíneo e, ao final, foram anestesiados para seleção dos indivíduos ingurgitados que foram removidos da gaiola de alimentação. Durante este procedimento pudemos observar que no fundo das gaiolas haviam pequenas gotículas de sangue nos grupos de mosquitos alimentados com sangue contendo a dose de 0,1 mM de rotenona, sugerindo assim que os mosquitos expeliram pelo menos parte do sangue ingerido (figura 6).

Figura 6: Sangue expelido após a ingestão de diferentes doses de rotenona.



Fonte: Elaborado pelo autor (2020)

Fotografias do fundo das gaiolas onde os mosquitos foram acumulados durante uma hora para repasto sanguíneo. A) Grupo de mosquitos alimentados com 0,1mM de rotenona. B) Grupo de mosquitos alimentados com 0,01mM de rotenona.

C) Grupo de mosquitos alimentados com 0,01mM de rotenona. D) Grupo de mosquitos alimentados somente com o veículo, 0,1% DMSO. Todos os grupos alimentados com rotenona também apresentavam 0,1% de DMSO no volume final de sangue.

Nas doses de 0,01 mM (figura 6 B) e 0,001 mM (figura 6 C) de rotenona observou-se uma taxa de sangue expelido foi mínima, similar ao DMSO na concentração final de 0,1% utilizada como controle (figura 6 D).

Devido à elevada quantidade de sangue expelido quando administramos a dose de rotenona de 0,1mM, decidimos não usar esta dose, uma vez que variações individuais, na quantidade de sangue expelido entre os mosquitos de cada grupo poderiam ter por si só um efeito na quantidade de vírus que iria permanecer no intestino médio. E essa quantidade de vírus retida no intestino médio poderia interferir na taxa de infecção bem como na carga viral desenvolvida pelos mosquitos infectados com DENV1.

Decidimos então escolher a dose de 0,01 mM de rotenona para estudar o efeito da inibição do complexo I da cadeia respiratória, no controle do vírus da dengue em mosquitos *Aedes aegypti*. Com isto, pretendíamos bloquear o complexo I da cadeia respiratória o máximo possível sem impacto significativo na taxa de sobrevivência dos mosquitos.

## 5.2 Efeito da rotenona na expressão gênica das unidades supernumerárias do Complexo I (ASHI e B18).

Com o intuito de melhor entender o efeito da rotenona no complexo I *in vivo* em mosquitos, decidimos avaliar o impacto da rotenona na expressão gênica de genes do complexo I. Optamos por focar os nossos estudos na expressão de duas subunidades supernumerárias, Ashi e B18, uma vez estes genes terem sido os mais diferencialmente expressos em análises de transcriptomas realizadas previamente no nosso laboratório. Tendo em consideração que a rotenona é um inibidor que apresenta um efeito reversível decidimos avaliar a expressão gênica de Ashi e B18 em termos precoces, isto é, dois e quatro dias após a ingestão da rotenona durante o repasto sanguíneo. O racional desta análise da expressão gênica era investigar o efeito da rotenona por si só no complexo I (isto é, independentemente de qualquer infecção viral), desenho experimental se baseou em três grupos: i) mosquitos alimentados com sangue contendo o veículo (DMSO 0,1%); ii) mosquitos alimentados com sangue

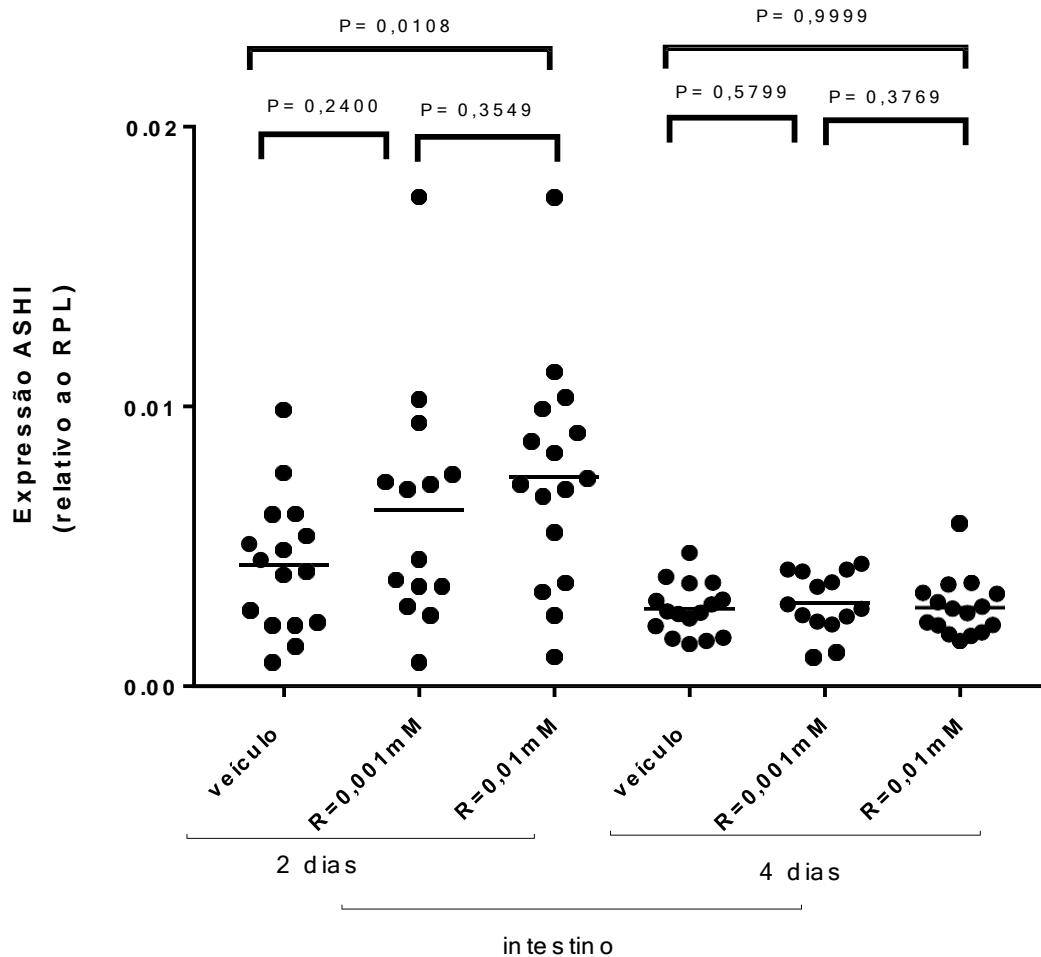
contendo 0,001mM de Rotenona; iii) mosquitos alimentados com sangue contendo 0,01mM de Rotenona. Dois e quatro dias após o repasto sanguíneo, 16 mosquitos de cada grupo foram dissecados de modo a separar o intestino médio da carcaça. Deste modo foi possível avaliar a expressão gênica separadamente no intestino e na carcaça para os dois genes em questão (*Ashi* e *B18*).

Como podemos observar na figura 7, ocorreu um aumento da expressão de *ASHI* no intestino dois dias após a ingestão de rotenona na dose mais elevada (0,01mM), quando comparado com os mosquitos que só ingeriram sangue com o veículo. Quando olhamos para os resultados da expressão gênica deste mesmo gene *Ashi* após a ingestão de uma dose de rotenona mais baixa, podemos verificar que não houve uma diferença estatisticamente significativa comparando com o controle (somente sangue e veículo). Porém podemos observar que existe uma pequena tendência para um aumento da expressão do gene *Ashi*, mesmo nesta dose baixa de rotenona. De um modo geral podemos observar que a rotenona está a promover um aumento da expressão de *Ashi* dois dias após ingestão. No entanto, quatro dias após a ingestão da rotenona, não foi verificado um aumento da expressão do gene *Ashi* no intestino, quer para a dose mais alta de 0,01mM quer para a dose mais baixa de 0,001mM (Figura 7).

Com relação à expressão gênica do gene *B18* no intestino, podemos observar na Figura 8 que não existe um efeito estatisticamente significativo na expressão gênica nos intestinos, entre os mosquitos que ingeriram rotenona e os mosquitos que ingeriram só o veículo. A ausência de um efeito estatisticamente significativo foi observada nas duas doses de rotenona testadas bem como nos dois tempos investigados (dois e quatro dias após a ingestão da rotenona). Apesar da ausência de significância estatística, podemos observar que, dois dias após a ingestão, existe uma tendência para um aumento da expressão do gene *B18* nos intestinos dos mosquitos que ingeriram rotenona, sendo essa tendência mais acentuada na dose maior (0,01mM). Contudo, quatro dias após a ingestão, uma tendência oposta se verificou, isto é, foi observada uma diminuição na expressão do gene *B18* nos mosquitos alimentados com rotenona. Novamente, esta tendência foi mais evidente nos intestinos dos mosquitos alimentados com uma dose maior de rotenona (0,01mM). No entanto, considerando os resultados estatisticamente significativos, apenas podemos

concluir que a rotenona não tem efeito na expressão do gene *B18* no intestino, em ambos os tempos e doses de rotenona testadas.

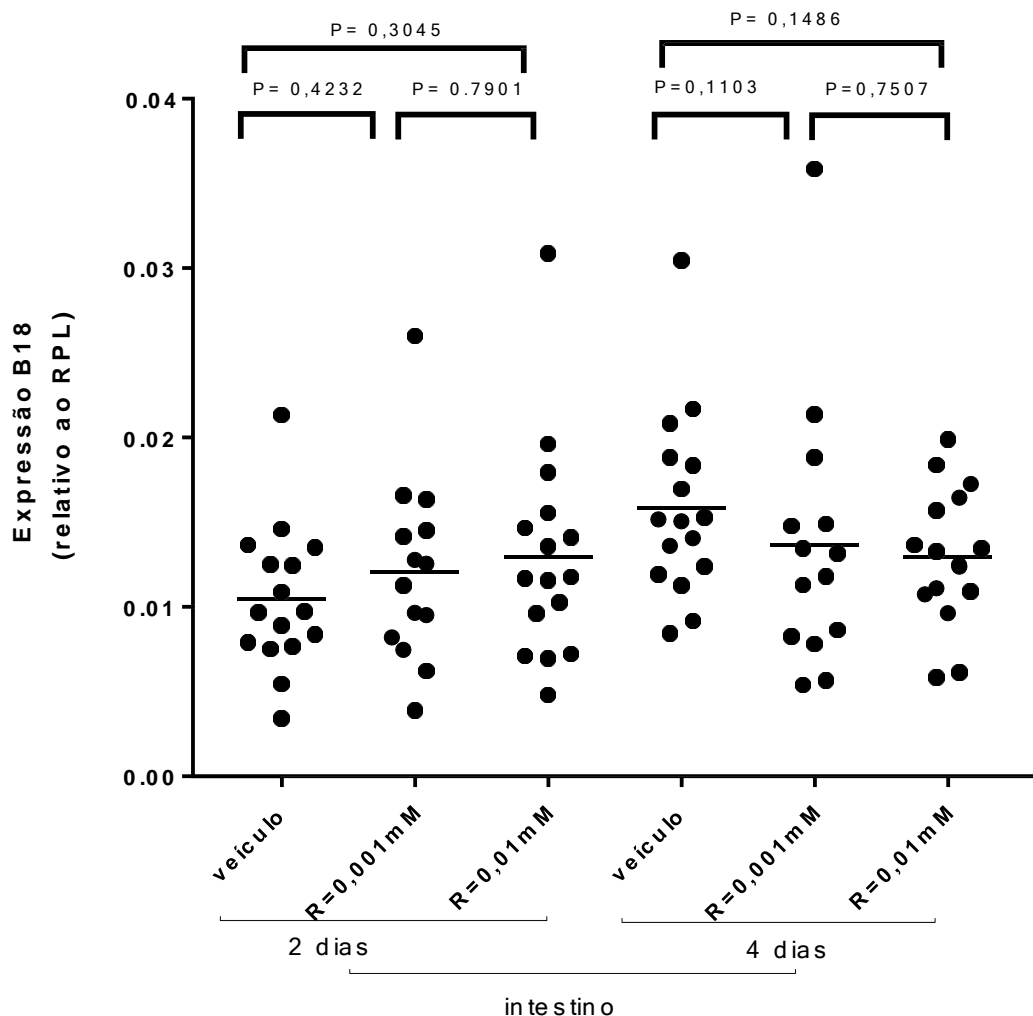
Figura 7: Expressão do gene ASHI no intestino dois e quatro dias após ingestão de rotenona.



Fonte: Elaborado pelo autor (2020)

Fêmeas de mosquitos *Ae. aegypti* da linhagem Bangkok, com 5-7 dias de idade, foram alimentadas com sangue contendo rotenona ou somente o veículo DMSO (0,1%). Dois ou quatro dias após a ingestão, os intestinos foram dissecados para extração individual de RNA para proceder à quantificação da expressão gênica por RT-qPCR. Duas doses de rotenona foram testadas: 0,01 mM e 0,001mM. Cada círculo preto significa um intestino e linha horizontal representa a mediana de cada grupo. Foi utilizado Kruskal-wallis seguido de pós-teste de Dunns.

Figura 8: Expressão do gene *B18* no intestino dois e quatro dias após ingestão de rotenona.

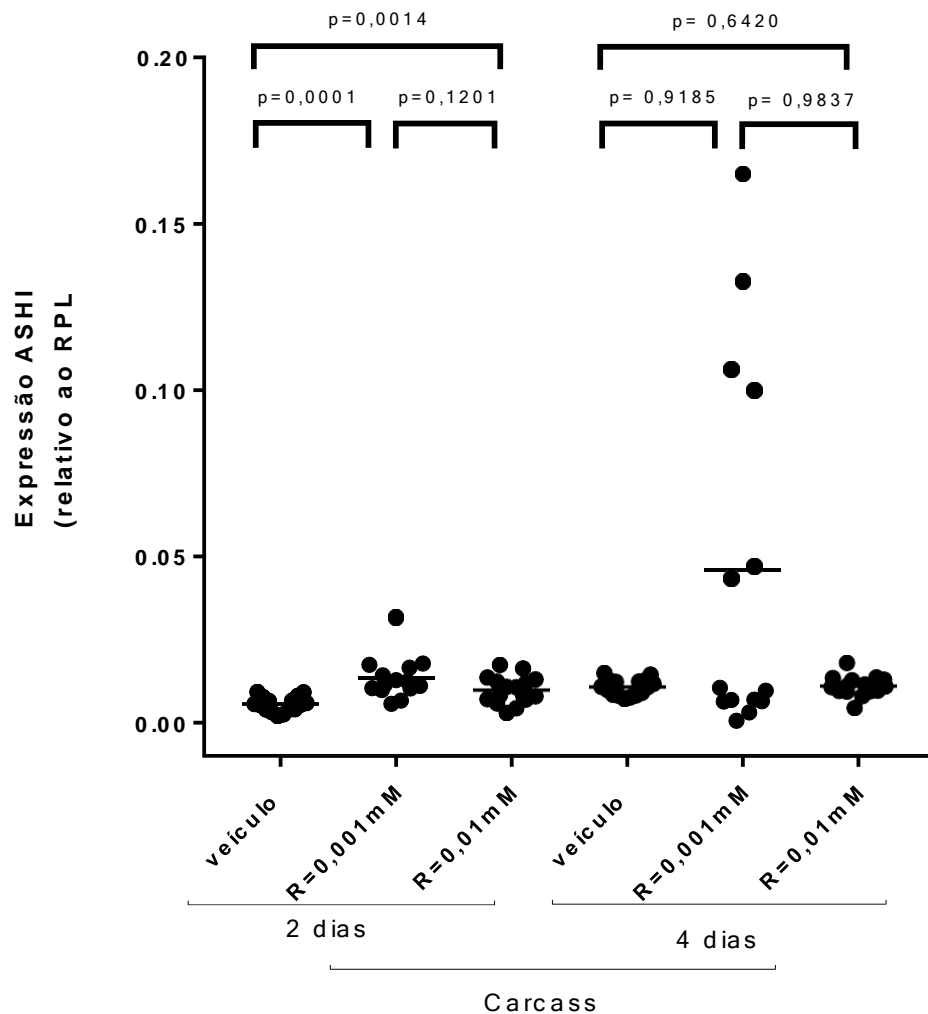


Fêmeas de mosquitos *Ae. aegypti* da linhagem Bangkok, com 5-7 dias de idade, foram alimentadas com sangue contendo rotenona ou somente o veículo DMSO (0,1%). Dois ou quatro dias após a ingestão, os intestinos foram dissecados para extração individual de RNA para proceder à quantificação da expressão gênica por RT-qPCR. Duas doses de rotenona foram testadas: 0,01 mM e 0,001mM. Cada círculo preto significa um intestino e linha horizontal representa a mediana de cada grupo. Foi utilizado Kruskal-wallis seguido de pós-teste de Dunns.

Em seguida fomos avaliar os efeitos da rotenona na expressão gênica na carcaça, o que de algum modo poderia ter uma associação à dispersão. Focando primeiramente na expressão do gene *Ashi* na carcaça dos mosquitos podemos observar na figura 9, que ambas as doses de rotenona induz um aumento

estatisticamente significativo da expressão de *Ashi* dois dias após a ingestão. Contudo, quatro dias após a ingestão da rotenona não foi observado uma diferença estatisticamente significativa para ambas as doses de rotenona testadas (figura 9).

Figura 9: Expressão do gene *ASHI* na carcaça dois e quatro dias após ingestão de rotenona.

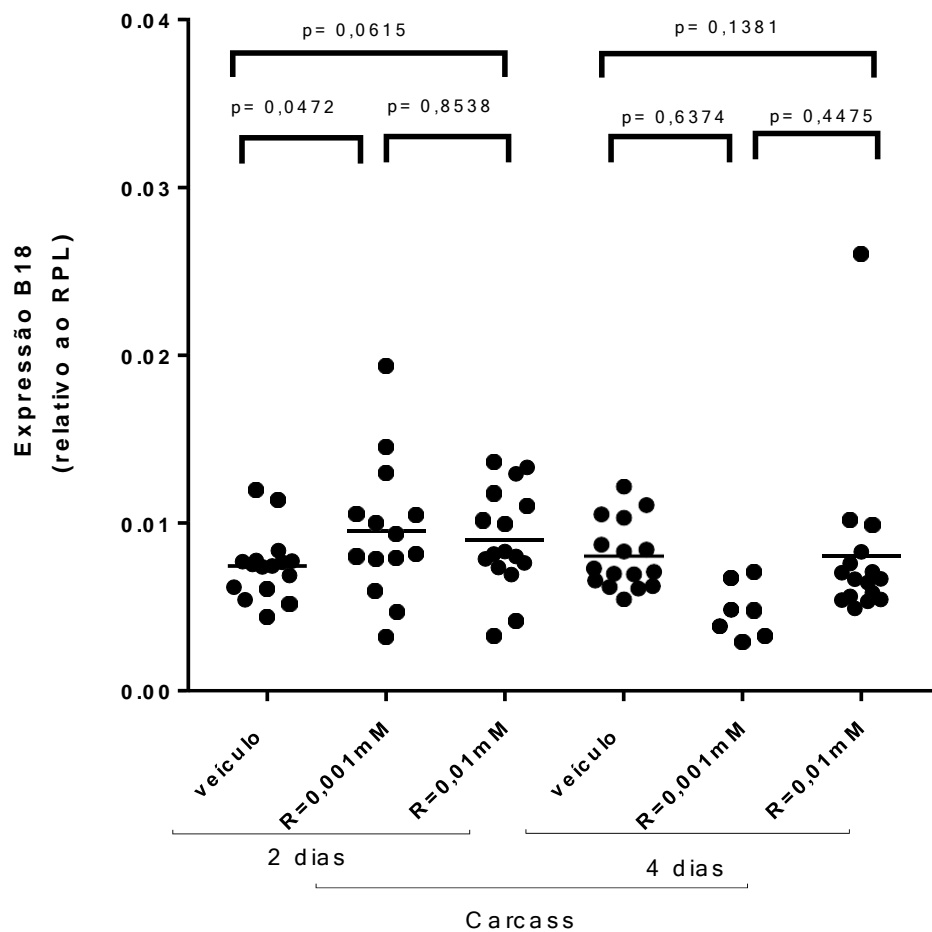


Fonte: Elaborado pelo autor (2020)

Fêmeas de mosquitos *Ae. aegypti* da linhagem Bangkok, com 5-7 dias de idade, foram alimentadas com sangue contendo rotenona ou somente o veículo DMSO (0,1%). Dois ou quatro dias após a ingestão, as carcaças foram dissecadas para extração individual de RNA para proceder à quantificação da expressão gênica por RT-qPCR. Duas doses de rotenona foram testadas: 0,01 mM e 0,001mM. Cada círculo preto significa um intestino e linha horizontal representa a mediana de cada grupo. Foi utilizado Kruskal-wallis seguido de pós-teste de Dunns.

Tal como observado anteriormente no intestino médio, na carcaça não observamos uma alteração da expressão do gene *B18* entre os mosquitos tratados com a dose de rotenona mais elevada (0,01mM) e os mosquitos tratados somente com o veículo, DMSO 0,1% (figura 10). Essa ausência na alteração de expressão na carcaça com a dose mais elevada de rotenona ocorreu quer para dois dias após a ingestão da rotenona quer após quatro dias (figura 10). No entanto, como podemos observar na figura 10, a dose de rotenona mais baixa, de 0,001mM, induziu um aumento estatisticamente significativo da expressão do gene *B18* quando comparado com mosquitos que só ingeriram o veículo DMSO. De salientar que este efeito de aumento de expressão do gene *B18* na carcaça só foi observado dois dias após a ingestão da rotenona (figura 10).

Figura 10: Expressão do gene *B18* na carcaça dois e quatro dias após ingestão de rotenona.



Fonte: Elaborado pelo autor (2020)

Tendo em consideração todos os resultados de expressão gênica, aqui apresentados, podemos inferir que a ingestão de rotenona durante o repasto sanguíneo está a induzir uma alteração da expressão gênica de genes do complexo I da cadeia respiratória. Esse efeito é mais evidente para o gene *Ashi*, no intervalo temporal de dois dias após a ingestão da rotenona, onde é verificado um aumento da expressão quer no intestino quer na carcaça.

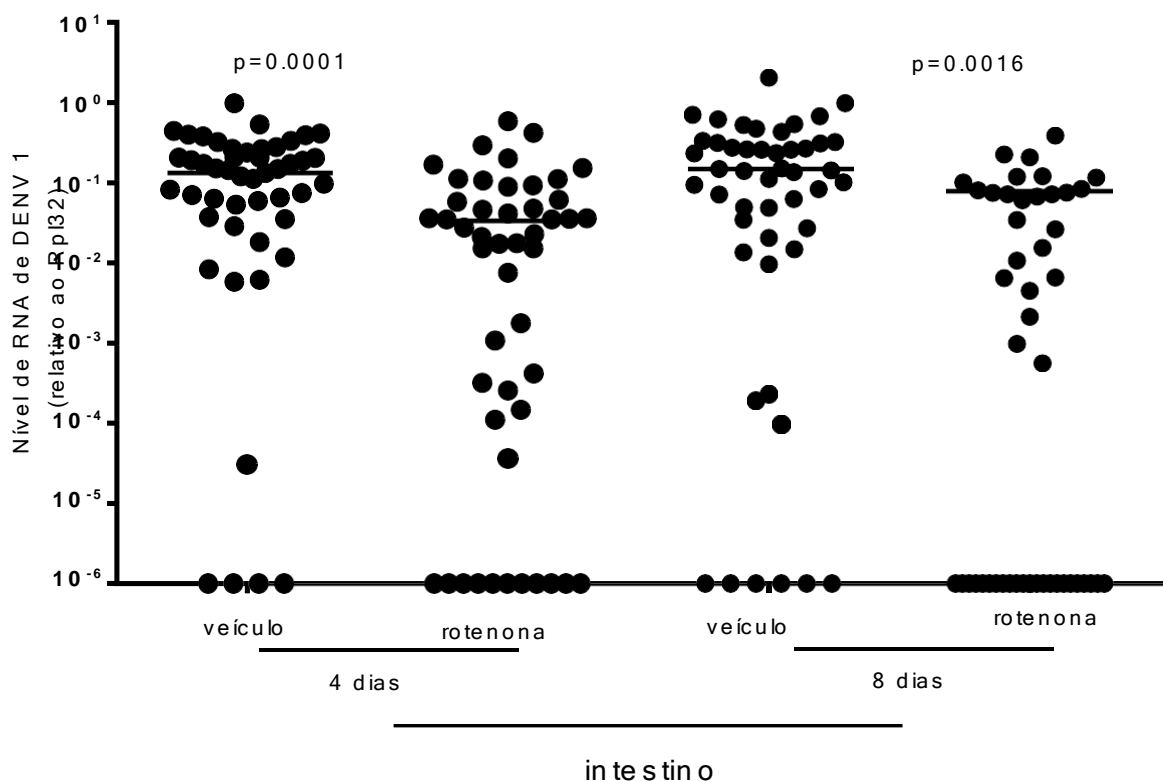
### 5.3 Efeito da rotenona na resistência à infecção de DENV1 em mosquitos *Ae. aegypti*.

Uma vez identificada qual a dose de rotenona para uso em mosquitos adultos *Ae. aegypti* sem redução da sobrevivência e demonstrado que a rotenona está a ter um efeito na expressão gênica de genes do complexo I, decidimos então investigar o efeito da rotenona sobre a resistência/suscetibilidade à infecção por DENV1. Para tal, fêmeas de mosquitos *Ae. aegypti* da linhagem Bangkok, com 5 a 7 dias de idade foram alimentadas com sangue DENV1 e rotenona ou somente o veículo DMSO. A dose de rotenona usada para realizar estes experimentos foi de 0,001 mM diluído em DMSO. Para promover o repasto sanguíneo dos mosquitos, foi retirada a solução contendo 10% de sacarose 24 horas antes, tendo sido substituída por apenas água. Dois grupos de mosquitos foram alimentados: i) um grupo com sangue, DENV1 e 0,001mM de rotenona; ii) um grupo com sangue, DENV1 e somente o veículo (DMSO). Os mosquitos foram expostos aos alimentadores artificiais de sangue, usando tripa de porco, por o período de uma hora. Depois deste período de alimentação, separamos os mosquitos não alimentados dos alimentados. Os mosquitos alimentados, ingurgitados, foram acondicionados em gaiolas contendo uma solução de 10% de sacarose. Quatro e oito dias após o repasto sanguíneo, 48 mosquitos de cada grupo foram dissecados onde foi separado o intestino médio da carcaça. Cada intestino e cada carcaça tiveram o RNA extraído com o objetivo de avaliar a presença de vírus bem com a respectiva carga viral.

Tendo em consideração que o primeiro tecido que tem contato com o vírus presente no bolo alimentar sanguíneo é o epitélio do intestino médio, começamos as nossas análises no intestino médio dos mosquitos. Como podemos verificar na figura

11, os mosquitos que ingeriram rotenona conjuntamente com o sangue e o DENV1 apresentam uma carga viral significativamente mais baixa no intestino comparativamente com os intestinos dos mosquitos que só ingeriram o veículo. Esta diminuição da carga viral observada nos intestinos dos mosquitos que ingeriram rotenona é observada quatro e oito dias após a ingestão (figura 11). Contudo, vale a pena salientar que para oito dias a diminuição observada na carga viral já não tão acentuada com a quatro dias (figura 11).

Figura 11: Efeito da rotenona na carga viral de DENV 1 no intestino em mosquitos *Ae. aegypti*.

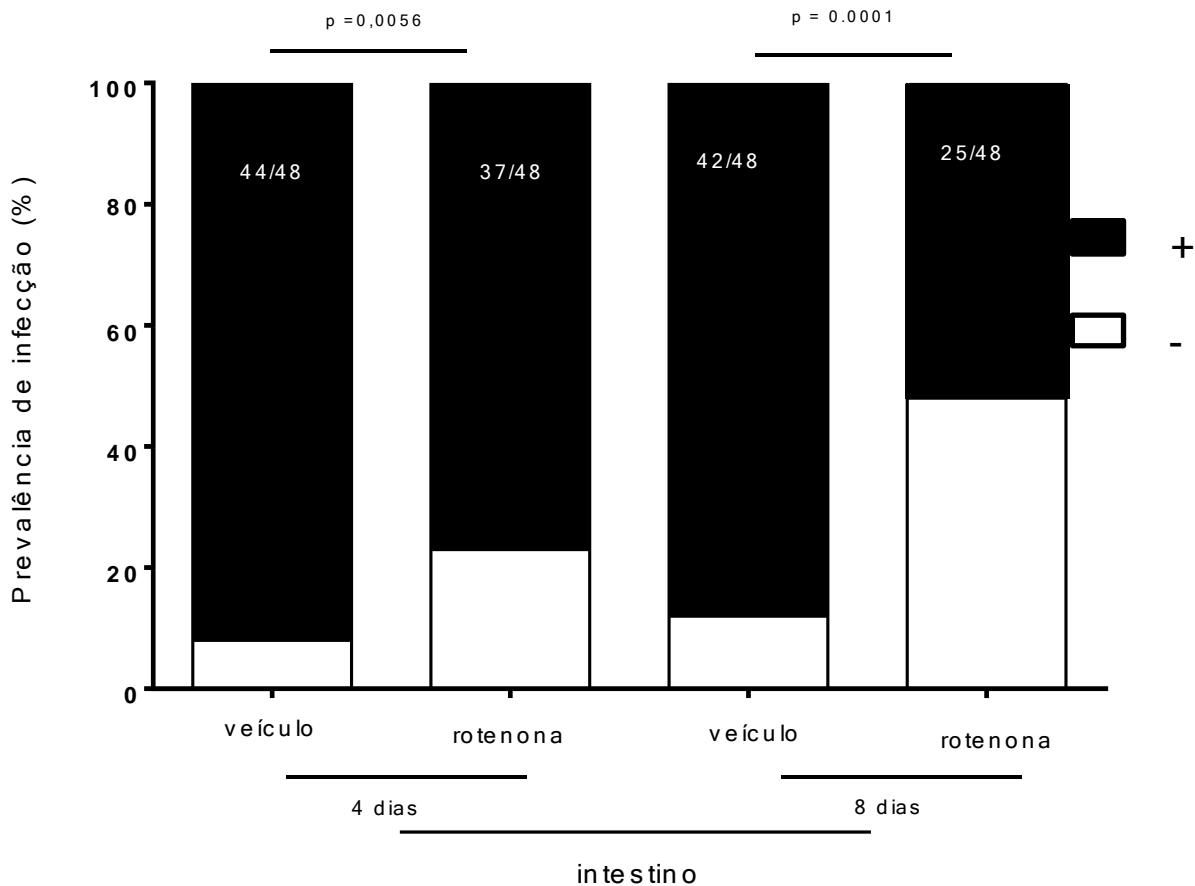


Fonte: Elaborado pelo autor (2020)

Fêmeas de mosquitos *Ae. aegypti* da linhagem Bangkok, com 5-7 dias de idade, foram alimentadas com sangue contendo DENV 1, rotenona (0,01mM) ou somente o veículo DMSO (0,1%). Para cada grupo foi usado um tamanho amostral de 48 mosquitos. Quatro ou oito dias após a ingestão, os intestinos foram dissecados para extração individual de RNA para proceder à quantificação da carga viral de DENV 1. Cada círculo preto significa um intestino. Todos os círculos pretos posicionados na linha do eixo ( $Y=10E-6$ ) são intestinos onde não foi detectado RNA viral. A linha horizontal representa a mediana de cada grupo. Foi utilizado teste de Mann-Whitney.

Adicionalmente, também podemos observar que a taxa de intestinos infectados com DENV1 é significativamente menor nos mosquitos que ingeriram rotenona (figura 12). Esta diminuição na percentagem de intestinos infectados foi observada quer para quatro dias após o repasto quer para oitos dias após (figura 12). No entanto, podemos observar que essa diminuição foi mais acentuada no período de oito dias após o repasto sanguíneo.

Figura 12: Efeito da rotenona na prevalência de DENV 1 no intestino em mosquitos *Ae. aegypti*.

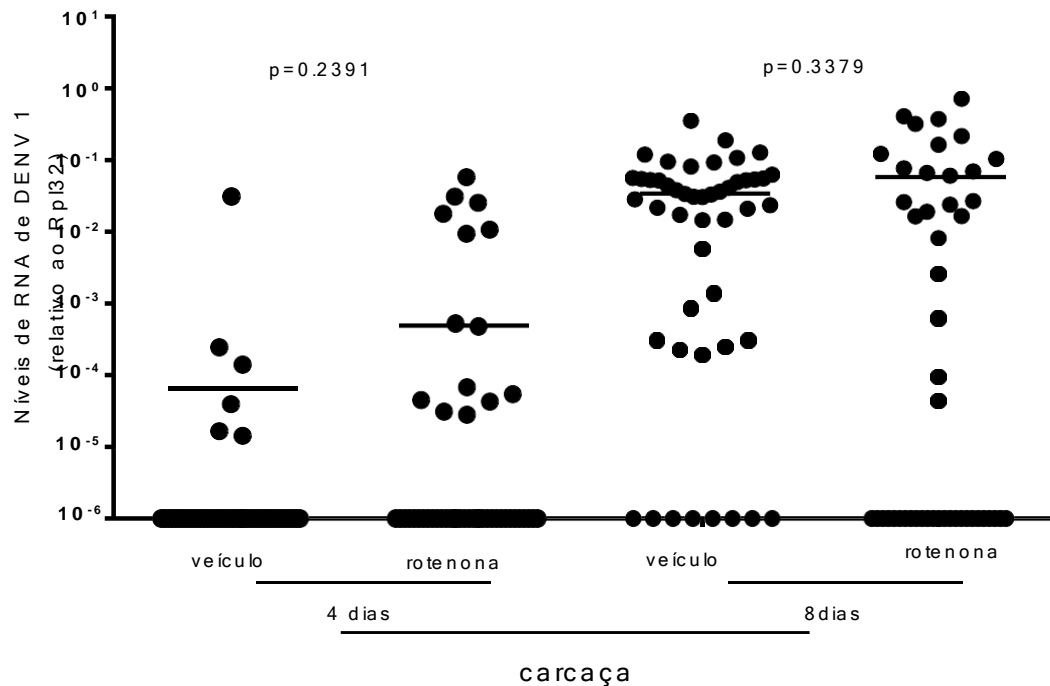


Fonte: Elaborado pelo autor (2020)

Em seguida decidimos então investigar o efeito da rotenona sobre a taxa de infecção e na carga viral na carcaça dos mosquitos, uma vez que seria um indicador da disseminação do vírus do intestino para o resto da cavidade corporal do mosquito. Começando pela análise da carga viral na carcaça, podemos observar que a rotenona não está a impactar na carga viral após a alimentação de sangue infectado com DENV 1 (figura 13). Observamos que não existe uma diferença estaticamente significativa entre a carga viral das carcaças de mosquitos que ingeriram rotenona e das carcaças

de mosquitos que só ingeriram o veículo (figura 13). Esse padrão similar das cargas virais de DENV 1 foi observado tanto para 4 dias após o repasto sanguíneo quer para oito dias (figura 13). Contrariamente ao observado nos intestinos, estes resultados sugerem que a rotenona não está a ter um efeito na carga viral na carcaça.

Figura 13: Efeito da rotenona na carga viral de DENV 1 na carcaça em mosquitos *Ae. aegypti*.



Fonte: Elaborado pelo autor (2020)

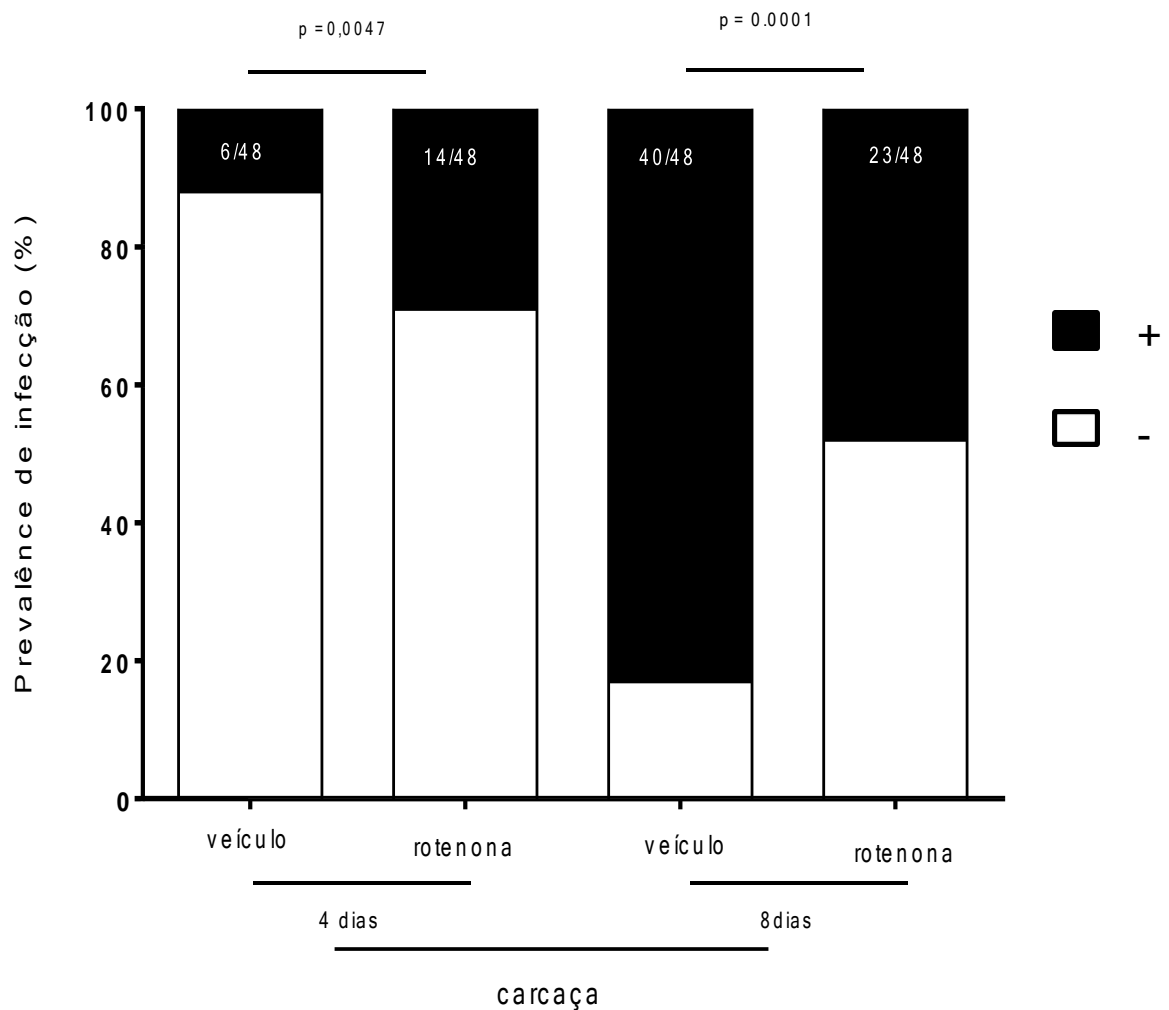
Fêmeas de mosquitos *Ae. aegypti* da linhagem Bangkok, com 5-7 dias de idade, foram alimentadas com sangue contendo DENV 1, rotenona (0,01mM) ou somente o veículo DMSO (0,1%). Para cada grupo foi usado um tamanho amostral de 48 mosquitos. Quatro ou oito dias após a ingestão, as carcaças foram dissecadas para extração individual de RNA para proceder à quantificação da carga viral de DENV 1.

Cada círculo preto significa uma carcaça. Todos os círculos pretos posicionados na linha do eixo ( $Y=10E-6$ ) são carcaças onde não foi detectado RNA viral. A linha horizontal representa a mediana de cada grupo. Foi utilizado teste de Mann-Whitney.

No entanto, quando analisamos a taxa de carcaças infectadas com DENV 1 podemos observar que menos mosquitos apresentam carcaças infectadas com vírus (figura 14). Mais especificamente, verificamos que os mosquitos que ingeriram rotenona apresentam uma menor taxa de intestinos infectados comparativamente com os mosquitos que só ingeriram o veículo (figura 14). Este efeito foi estatisticamente

significativo quer para quatro quer para oito dias após o repasto sanguíneo contendo o vírus e a Rotenona/DMSO (figura 14). Vale salientar que esse efeito foi mais acentuado oito dias após o repasto sanguíneo (figura 14). Em síntese, na carcaça a rotenona apresentou um de efeito de aumento da resistência à infecção por DENV1 em concordância com os efeitos observados na taxa de infecção dos intestinos médios dos mosquitos.

Figura 14: Efeito da rotenona na prevalência de DENV 1 na carcaça em mosquitos *Ae. aegypti*.



Fonte: Elaborado pelo autor (2020)

Fêmeas de mosquitos *Ae. aegypti* da linhagem Bangkok, com 5-7 dias de idade, foram alimentadas com sangue contendo DENV 1, rotenona (0,01mM) ou somente o veículo DMSO (0,1%). Para cada grupo foi usado um tamanho amostral de 48 mosquitos. Quatro ou oito dias após a ingestão, as carcaças foram dissecadas para extração individual de RNA para proceder à confirmação da presença de RNA de DENV 1 através de RT-qPCR. + (área a preto) corresponde à percentagem de

carcaças onde foi detectado RNA de DENV 1. – (área a branco) corresponde à percentagem de carcaças onde não foi detectado RNA de DENV 1. Foi utilizado teste seguido de pós-teste de Mann-Whitney.

## 6. DISCUSSÃO

O objetivo deste trabalho, aqui apresentado, foi estudar o papel do complexo I da via da fosforilação oxidativa na resistência/suscetibilidade a DENV 1 em *Aedes aegypti*. Perante esse objetivo decidimos bloquear quimicamente o complexo I usando rotenona. Trabalhos prévios, realizados em culturas celulares de mamíferos, já tinham usado e confirmado a eficiência da rotenona em bloquear o complexo I (Siddiqui *et al.*, 2013). No entanto, desconhecemos na literatura trabalhos que tenham usado a rotenona para bloquear o complexo I em mosquitos *Ae. aegypti in vivo*. Por esse motivo iniciamos os nossos trabalhos por testar o uso de rotenona em mosquitos *Ae. aegypti*. Decidimos por começar os nossos testes administrando a rotenona via oral, onde foi misturada com o sangue para subseqüente repasto. A decisão de administrar a rotenona via oral se deveu principalmente às seguintes razões: i) em prévias análises de transcriptomas de mosquitos infectados *versus* não infectados foi observado que vários genes do complexo I estavam diferencialmente expressos mais especificamente no intestino médio dos mosquitos; ii) a rotenona ao ser adicionada ao sangue, permite que esta droga seja direcionada para o intestino médio conjuntamente com o restante do bolo alimentar, sendo também o intestino médio o primeiro tecido a ter contato com o vírus e onde ocorre as primeiras replicações virais; iii) a rotenona ser potencialmente de fácil assimilação pelo intestino dos insetos, uma vez que plantas produzem rotenona como inseticida para se proteger de insetos que se alimentam nessas plantas; iv) ser um modo de administração relativamente prático e menos invasivo para os mosquitos quando comparando com administração via injeção no tórax dos mosquitos.

Um problema inicial com o qual nos deparamos foi o fato da rotenona apresentar uma baixa taxa de solubilidade em meios aquosos. Contudo, depois de testarmos vários meios e soluções, conseguimos solubilizar satisfatoriamente a rotenona em DMSO. Para minimizar ao máximo os efeitos tóxicos associados ao DMSO, preparamos os nossos estoques de rotenona de modo a que o volume final

de DMSO no sangue disponibilizado aos mosquitos para repasto fosse apenas de 0,1%, sendo esta concentração descrita na literatura como não tóxica para os insetos.

Devido à elevada taxa de sensibilidade dos insetos à rotenona, comparativamente aos mamíferos (motivo pelo qual também é usada como inseticida), foi necessário primeiramente testar qual a dose de rotenona a adicionar ao sangue de modo a bloquear ao máximo o complexo I, sem afetar a sobrevivência dos mosquitos. Testamos três doses de rotenona: 0,1mM, 0,01mM e 0,001mM. Com a dose de 0,1 mM, vimos que os mosquitos pareciam excretar o sangue ingerido e, por isto, optamos por escolher entre as doses de 0,01mM e 0,001mM. Como o nosso objetivo era bloquear o complexo I o máximo possível e como não observamos uma diferença significativa entre as doses de 0,01 mM e 0,001 mM nos outros parâmetros, optamos pela maior dose para realizar os restantes experimentos.

Na falta de medidas diretas para ensaiar a atividade do complexo I *in vivo*, hipotetizamos que um inibidor do complexo I poderia alterar a expressão de genes associados ao complexo I. Decidimos então começar por observar o efeito da rotenona na expressão gênica de *Ashi* e *B18*, dois genes que foram identificados em análises de transcriptomas como sendo diferencialmente expressos entre mosquitos infectados com DENV e mosquitos não infectados. Verificamos que a expressão do gene *Ashi* aumentou nos mosquitos que ingeriram rotenona comparativamente aos mosquitos que ingeriram somente o veículo. Este resultado pode ser interpretado como se as células de algum modo estivessem notar o estresse oxidativo provocado pela inibição do complexo I pela rotenona e para tentar combater esse estresse induzem um aumento da expressão de *Ashi* para tentar repor a homeostasia celular.

O fato de o aumento da expressão de *Ashi* ser mais acentuado no tempo de quatro dias quando comparado com oito dias após a ingestão de rotenona, suporta a hipótese acima descrita. Assumindo que a rotenona tem um efeito reversível, espera-se que o estresse oxidativo induzido pela rotenona seja mais acentuado nos tempos mais precoces. Seguindo esse racional, as células iriam tentar combater esse estresse oxidativo aumentando a expressão de genes como o *Ashi* também nos tempos mais precoces. À medida que o estresse oxidativo vai sendo combatido e diminuindo, será de esperar que a intensidade do combate também vá diminuindo, logo a expressão de *Ashi* vai também diminuir. O fato de termos observado um maior aumento na expressão de *Ashi* com a dose de rotenona também pode suportar este

raciocínio. Uma vez que será esperado que quanto maior a dose de rotenona maior a inibição do complexo I, que por sua vez induz um maior estresse oxidativo, demandando assim um combate mais exacerbado o que culminaria com um aumento da expressão de *Ashi* também mais exacerbado. No entanto para ter uma melhor noção do que realmente está acontecendo será necessário analisar a expressão de *Ashi* em tempos mais precoces e também tentar correlacionar a expressão do gene com os níveis de estresse oxidativo observados em cada mosquito individualmente. Para tal seria necessário aperfeiçoar um protocolo capaz de quantificar o estresse oxidativo nos intestino dos mosquitos *Ae.aegypti*. Outra dificuldade em interpretar os resultados aqui obtidos relativos à expressão de *Ashi* se devem ao fato de não existir conhecimento se *Ashi* atua como um regulador do complexo I, e se sim, se atua como regulador positivo ou como regulador negativo.

Apesar dos nossos resultados com a expressão de cadeias do complexo I, para podermos ter a certeza que, de fato, o complexo I está sendo bloqueado com a dose 0,1 mM de rotenona, outros estudos serão necessários.

Contudo quando olhamos para os resultados do efeito da rotenona na resistência/susceptibilidade a DENV 1 podemos verificar que a rotenona está a conferir uma proteção antiviral para os mosquitos *Ae. aegypti*. Podemos verificar essa proteção quando quantificamos a carga viral presentes nos intestinos médios dos mosquitos infectados com DENV1. Foi observado que os mosquitos que ingeriram rotenona durante o repasto sanguíneo apresentam uma carga viral muito inferior ( $p = 0.0001$ ) que os mosquitos que só ingeriram o veículo. Lembrando que em estudos prévios foi mostrado que a rotenona pode induzir estresse oxidativo tanto *in vitro* como *in vivo* (Deng, Huang e Lin, 2010; Radad, Rausch e Gille, 2006; Tada-Oikawa *et al.*, 2003). Se de fato a rotenona está a induzir um estresse oxidativo nas células do epitélio do intestino médio, poderíamos deduzir que um estresse oxidativo seria eficaz em reduzir a replicação viral. Várias hipóteses podem ser elaboradas para explicar tal controle da replicação viral. O estresse oxidativo por si só pode conferir um ambiente intracelular não favorável para a replicação do DENV 1 nas células do epitélio do intestino médio. Outra explicação pode ser que as células perante o estresse oxidativo ativem vias antivirais que iram controlar a replicação viral. Uma outra hipótese seria que as células perante o estresse oxidativo mais uma infecção viral de algum modo possam induzir apoptose, eliminando assim as células infectadas com DENV 1. De

ressaltar que estudos prévios mostram que a rotenona é capaz de induzir apoptose em células derivadas de linfomas de células B (Armstrong *et al.*, 2001).

Adicionalmente podemos verificar que a rotenona induziu uma diminuição na taxa de infecção, isto é, menos mosquitos apresentam infecção a quatro e a oito dias após o repasto com sangue infectado com DENV 1. Na nossa opinião esta observação pode ser interpretada de maneiras diferentes. Uma hipótese é que a rotenona induz um estresse oxidativo em tempos precoces de modo a levar que as células fiquem mais resistentes à entrada do DENV 1. Outra hipótese é que os vírus conseguem entrar nas células, mas que de algum modo a inibição do complexo I ou o estresse oxidativo associado promovem uma resposta imune mais eficaz de modo a controlar a replicação viral bem no início culminando numa eliminação total do vírus, de tal forma que quando analisamos a carga viral passado 4 dias do repasto com sangue infectado, já não detectamos DENV1 no intestino dos mosquitos bem como na carcaça, uma vez que seria de esperar que se o vírus foi eliminado no epitélio intestinal nunca chegaria a escapar para a carcaça.

Para tentar entender melhor o que realmente está acontecendo no intestino poderíamos tentar quantificar o vírus em tempos mais precoces, contudo teríamos o problema que poderíamos estar a quantificar DENV 1 que ainda está presente no bolo alimentar, uma vez que a digestão leva cerca de 3 dias para eliminar todo o bolo alimentar do intestino médio dos mosquitos.

Outra abordagem poderia ser investigar se são produzidos pequenos RNAs de origem viral nas células do intestino em tempos precoces, o que indicaria que a célula foi infectada com vírus, e houve uma resposta imune eficaz de modo a conseguir eliminar o vírus por completo em alguns mosquitos. E se de fato a rotenona poderia estar a tornar esta resposta imune ainda mais eficaz de modo que mais mosquitos não apresentariam infecção quer a quatro quer a oito dias. Tecnicamente, esta abordagem poderia ser feita recorrendo a imunofluorescência usando um anticorpo específico para pequenos RNAs de fita dupla, ou sequenciando os pequenos RNAs presentes nas células intestinais para investigar a presença de pequenos RNAs de origem viral.

Contrariamente ao observado nos intestinos, nas carcaças não foi observado uma diminuição da carga viral induzida pela rotenona. Isto pode ser interpretado como sendo que a rotenona só está bloqueando o complexo I nas células do intestino. Ou

por outro lado que a rotenona está a bloquear o complexo em todo o mosquito, mas que depois do vírus ter passado a barreira do intestino qualquer efeito de proteção induzido pela rotenona na carcaça não é suficiente para controlar a replicação viral. Mostrando assim que a resposta antiviral no intestino pode ser de extrema importância no controle dos arbovírus.

Contudo, quando analisamos o efeito da rotenona na taxa de carcaças infectadas com DENV 1 podemos observar que persiste um efeito de proteção 8 dias após o repasto sanguíneo, tal como foi observado na taxa de intestinos infectados. Vale ressaltar que com quatro dias ainda temos uma taxa de infecção nas carcaças relativamente baixa provavelmente devido à própria cinética do vírus. Isto é, o DENV 1 ainda não ter tido tempo para replicar nas células intestinais o suficiente para começar a infectar a carcaça. Isso pode explicar por que ainda não vemos um efeito de proteção da rotenona como vemos a oito dias após o repasto sanguíneo.

De um modo geral podemos observar que a ingestão de rotenona confere uma proteção perante a infecção com DENV 1. Contudo para entender como essa proteção está a acontecer ainda requer vários experimentos adicionais. Por exemplo, será necessário pesquisar se a rotenona de fato está a induzir um aumento da produção de ROS levando a um aumento do estresse oxidativo. Para tal poderia ser realizado um ensaio para quantificar ROS usando MitoSOX, um reagente que é especificamente direcionado para mitocôndrias em células vivas e que é oxidado por superóxido produzindo fluorescência. Outra abordagem poderia ser olhar a morfologia das mitocôndrias usando um marcador específico, como por exemplo, o Mito Tracker.

Para podermos ter uma melhor noção se realmente o complexo I está envolvido na proteção antiviral seria necessário tentar inibir este complexo recorrendo a outras drogas para bloquear este complexo. Poderia ser usada a piericidina A, uma droga que também bloqueia o complexo I, mas que contrariamente à rotenona, tem um efeito irreversível. Seria também importante inibir o complexo III, para ter uma ideia mais abrangente do papel da fosforilação oxidativa na resistência a infecções virais. Isto tendo em conta que só bloqueando o complexo I ainda será possível a produção de ATP uma vez que o processo da fosforilação oxidativa pode começar no complexo II através da entrada de FADH.

Outra abordagem que poderia ser realizar experimentos similares, mas *in vitro*, usando por exemplo culturas de células Aag2, uma linhagem celular usada com

frequência em vários estudos de resposta antiviral. Por último, mas não menos importante, seria necessário avaliar o papel da fosforilação oxidativa na resistência a outros arbovírus, nomeadamente outros sorotipos de dengue (DENV2, DENV3 e DENV4), outros vírus do gênero *Flavivirus* como o Zika vírus e o vírus da febre amarela.

## 7. CONCLUSÕES

- 1- A doses de 0.01 mM e 0.001mM de rotenona são as maiores doses da droga que não causaram mortalidade nem excreção de sangue em mosquitos ingurgitados.
- 2- O tratamento com a dose de 0.01 mM de rotenona leva a um aumento na expressão de genes codificadores de cadeias supernumerárias do complexo I após 2 dias de tratamento no intestino e na carcaça de mosquitos.
- 3- A dose de 0.01 mM de rotenona, inibidor químico do complexo I, aumenta a resistência de mosquitos *Aedes aegypti* ao DENV.

## 8. REFERÊNCIAS

- AGUIAR, E. R. G. R. *et al.* Sequence-independent characterization of viruses based on the pattern of viral small RNAs produced by the host. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. 13, p. 6191-6206, 3 jun. 2015.
- AREIZA-MAZO, N. *et al.* Extracts of *Physalis peruviana* Protect Astrocytic Cells Under Oxidative Stress With Rotenone. **Frontiers in Chemistry**, v. 6, p. 276, 2018.
- ARMSTRONG, J. S. *et al.* Rotenone-Induced G2/M Cell Cycle Arrest and Apoptosis in a Human B Lymphoma Cell Line PW. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 289, n. 5, p. 973-978, 21 dez. 2001.
- AZAR, S. R.; WEAVER, S. C. Vector Competence: What Has Zika Virus Taught Us? **Viruses**, v. 11, n. 9, p. 867, 17 set. 2019.
- BEERNTSEN, B. T.; JAMES, A. A.; CHRISTENSEN, B. M. Genetics of mosquito vector competence. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 64, n. 1, p. 115-137, mar. 2000.
- BRAGA, I. A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: histórico do controle no Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 16, p. 113-118, 2007.
- BULUA, A. C. *et al.* Mitochondrial reactive oxygen species promote production of proinflammatory cytokines and are elevated in TNFR1-associated periodic syndrome (TRAPS). **The Journal of experimental medicine**, v. 208, n. 3, p. 519-533, 14 mar. 2011.
- CLYDE, K.; KYLE, J. L.; HARRIS, E. Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. **Journal of virology**, v. 80, n. 23, p. 11418-11431, dez. 2006.
- DENG, Y.-T.; HUANG, H.-C.; LIN, J.-K. Rotenone induces apoptosis in MCF-7 human breast cancer cell-mediated ROS through JNK and p38 signaling. **Molecular Carcinogenesis**, v. 49, n. 2, p. 141-151, 1 fev. 2010.
- FEARNLEY, I. M. *et al.* GRIM-19, a Cell Death Regulatory Gene Product, Is a Subunit of Bovine Mitochondrial NADH:Ubiquinone Oxidoreductase (Complex I). **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 42, p. 38345-38348, 19 out. 2001.
- GHILDIYAL, M.; ZAMORE, P. D. Small silencing RNAs: an expanding universe. **Nature reviews. Genetics**, v. 10, n. 2, p. 94-108, fev. 2009.
- GONÇALVES, R. L. S. *et al.* Mitochondrial Reactive Oxygen Species Modulate Mosquito Susceptibility to Plasmodium Infection. **PLOS ONE**, v. 7, n. 7, p. e41083, 18 jul. 2012.
- GOULD, E.; SOLOMON, T. Pathogenic flaviviruses. **The Lancet**, v. 371, n. 9611, p. 500-509, 9 fev. 2008.

- GUZMAN, M. G. *et al.* Dengue: a continuing global threat. **Nature reviews. Microbiology**, v. 8, n. 12 Suppl, p. S7-S16, dez. 2010.
- HALSTEAD, S. B. In Vivo Enhancement of Dengue Virus Infection in Rhesus Monkeys by Passively Transferred Antibody. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 140, n. 4, p. 527-533, 1 out. 1979.
- HERRMANN, J. M.; RIEMER, J. Mitochondrial disulfide relay: redox-regulated protein import into the intermembrane space. **The Journal of biological chemistry**, v. 287, n. 7, p. 4426-4433, 10 fev. 2012.
- KUHN, R. J. *et al.* Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. **Cell**, v. 108, n. 5, p. 717-725, 8 mar. 2002.
- LÉLÉ, S. M. Sustainable development: A critical review. **World Development**, v. 19, n. 6, p. 607-621, 1 jun. 1991.
- LUO, D. *et al.* Crystal structure of the NS3 protease-helicase from dengue virus. **Journal of virology**, v. 82, n. 1, p. 173-183, jan. 2008.
- MISHRA, P.; CHAN, D. C. Mitochondrial dynamics and inheritance during cell division, development and disease. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 15, n. 10, p. 634-646, 1 out. 2014.
- MORAZZANI, E. M. *et al.* Production of Virus-Derived Ping-Pong-Dependent piRNA-like Small RNAs in the Mosquito Soma. **PLOS Pathogens**, v. 8, n. 1, p. e1002470, 5 jan. 2012.
- NOGUEIRA, R. M. R. *et al.* Dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome (DHF/DSS) caused by serotype 2 in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 86, p. 269-269, 1991.
- NOGUEIRA, R. M. R. *et al.* Dengue virus type 3 in Rio de Janeiro, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, p. 925-926, 2001.
- OSANAI, C. *et al.* [Dengue outbreak in Boa Vista, Roraima. Preliminary report]. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 25, n. 1, p. 53-54, 1983.
- PENG, Z.; LI, H.; SIMONS, F. E. R. Immunoblot analysis of salivary allergens in 10 mosquito species with worldwide distribution and the human IgE responses to these allergens. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 101, n. 4, p. 498-505, 1 abr. 1998.
- QUEIROZ, L. R. **Assinatura molecular da resistência ao vírus da Dengue em mosquitos *Aedes aegypti***. Dissertação (Mestrado em Bioinformática) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais. Minas Gerais, 2018.
- RADAD, K.; RAUSCH, W.-D.; GILLE, G. Rotenone induces cell death in primary dopaminergic culture by increasing ROS production and inhibiting mitochondrial respiration. **Neurochemistry International**, v. 49, n. 4, p. 379-386, 1 set. 2006.

RODENHUIS-ZYBERT, I. A.; WILSCHUT, J.; SMIT, J. M. Dengue virus life cycle: viral and host factors modulating infectivity. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 67, n. 16, p. 2773-2786, 1 ago. 2010.

SAMUEL, G. H.; ADELMAN, Z. N.; MYLES, K. M. Antiviral Immunity and Virus-Mediated Antagonism in Disease Vector Mosquitoes. **Trends in microbiology**, v. 26, n. 5, p. 447-461, maio 2018.

SETH, R. B. *et al.* Identification and Characterization of MAVS, a Mitochondrial Antiviral Signaling Protein that Activates NF- $\kappa$ B and IRF3. **Cell**, v. 122, n. 5, p. 669-682, 9 set. 2005.

SIDDIQUI, M. A. *et al.* Rotenone-induced oxidative stress and apoptosis in human liver HepG2 cells. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 384, n. 1, p. 59-69, 1 dez. 2013.

SOUZA-NETO, J. A.; POWELL, J. R.; BONIZZONI, M. Aedes aegypti vector competence studies: A review. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 67, p. 191-209, 1 jan. 2019.

TADA-OIKAWA, S. *et al.* Mechanism for generation of hydrogen peroxide and change of mitochondrial membrane potential during rotenone-induced apoptosis. **Life Sciences**, v. 73, n. 25, p. 3277-3288, 7 nov. 2003.

VODOVAR, N. *et al.* Arbovirus-Derived piRNAs Exhibit a Ping-Pong Signature in Mosquito Cells. **PLOS ONE**, v. 7, n. 1, p. e30861, 24 jan. 2012.

WANG, T. *et al.* Neuroprotective effects of Danshensu on rotenone-induced Parkinson's disease models in vitro and in vivo. **BMC Complementary Medicine and Therapies**, v. 20, n. 1, p. 20, 23 jan. 2020.

WEAVER, S. C.; VASILAKIS, N. Molecular evolution of dengue viruses: contributions of phylogenetics to understanding the history and epidemiology of the preeminent arboviral disease. **Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases**, v. 9, n. 4, p. 523-540, jul. 2009.

WEST, A. P. *et al.* TLR signalling augments macrophage bactericidal activity through mitochondrial ROS. **Nature**, v. 472, n. 7344, p. 476-480, 28 abr. 2011.

WIRTH, C. *et al.* Structure and function of mitochondrial complex I. **SI: Respiratory Complex I**, v. 1857, n. 7, p. 902-914, 1 jul. 2016.

WU, Q. *et al.* Virus discovery by deep sequencing and assembly of virus-derived small silencing RNAs. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 4, p. 1606-1611, 26 jan. 2010.

ZHU, J.; VINOCHKUMAR, K. R.; HIRST, J. Structure of mammalian respiratory complex I. **Nature**, v. 536, n. 7616, p. 354-358, 1 ago. 2016.

ZICKERMANN, V. *et al.* Small single transmembrane domain (STMD) proteins organize the hydrophobic subunits of large membrane protein complexes. **FEBS Letters**, v. 584, n. 12, p. 2516-2525, 18 jun. 2010.