

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

Ezequiel Aparecido Salvador

**CARACTERIZAÇÃO DO CICLO DE INFECÇÃO DO *Zika virus* EM MOSQUITOS  
*Aedes aegypti***

BELO HORIZONTE

2021

Ezequiel Aparecido Salvador

**CARACTERIZAÇÃO DO CICLO DE INFECÇÃO DO *Zika virus* EM MOSQUITOS  
*Aedes aegypti***

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 para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Imunologia.

Orientador: Prof. Dr. João Trindade Marques

BELO HORIZONTE

2021

043 Salvador, Ezequiel Aparecido.  
Caracterização do ciclo de infecção do *Zika virus* em mosquitos *Aedes aegypti*  
[manuscrito] / Ezequiel Aparecido Salvador. - 2021.

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

Orientador: Prof. Dr. João Trindade Marques.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de  
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia.

1. Bioquímica e imunologia. 2. Zika virus. 3. Aedes. 4. Tropismo Viral. 5.  
Replicação Viral. I. Marques, João Trindade. II. Universidade Federal de Minas  
Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. 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 EZEQUIEL APARECIDO SALVADOR.** Aos vinte e oito dias do mês de abril de 2021 às 14:00 horas, reuniu-se de forma “on line” pela plataforma “meet.google.com”, 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 "Caracterização do ciclo de infecção do Zika virus em mosquitos *Aedes aegypti*", 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. João Trindade Marques, da Universidade Federal de Minas Gerais, 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. Jose Henrique M. Oliveira (Universidade Federal de Santa Catarina), aprovado; Dr. Gustavo Batista de Menezes (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado; Dr. João Trindade Marques - Orientador (Universidade Federal de Minas Gerais), 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, 28 de abril de 2021.



Documento assinado digitalmente  
 Jose Henrique Maia Campos de Oliveira  
 Data: 28/04/2021 16:25:46-0300  
 CPF: 095.946.997-44  
 Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

Dr. Jose Henrique M. Oliveira (Universidade Federal de Santa Catarina)

Dr. Gustavo Batista de Menezes (UFMG)

Dr. João Trindade Marques - Orientador (UFMG)

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente à minha família, mãe, pai e irmã pelos valores que foram transmitidos e o apoio imensurável para que eu siga meus objetivos.

À Universidade Federal de Minas Gerais e ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia pela oportunidade de adquirir e multiplicar conhecimentos em um ambiente incentivador.

Ao Prof. João Marques, por abrir as portas do seu laboratório, pela paciente supervisão e oportunidades.

Ao Prof. Gustavo Martins e ao Kenner Fernandes (Laboratório de Biologia Molecular de Insetos - UFV) por me receberem no seu laboratório para discutir protocolos e realizar os primeiros testes de inclusão de mosquitos em material histológico.

À Prof. Fernanda Radicchi Campos Lobato de Almeida (Laboratório de Biologia Estrutural e Reprodução -UFMG) por disponibilizar a infraestrutura para processamento das amostras em parafina e ao André Oliveira por todas conversas produtivas que auxiliaram na otimização do processo.

Ao Isaque Faria por toda ajuda na produção e titulação do vírus.

Agradecimentos também ao Centro de Aquisição e Processamento de Imagens (CAPI-ICB UMFG) e aos técnicos pelos treinamentos e disponibilidade.

A todos os meus colegas do Laboratório RNAi e do Laboratório de Neurobioquímica que literalmente dividimos o mesmo espaço. MUITÍSSIMO obrigado por toda a troca de conhecimento, brincadeiras e risos, a caminhada é mais alegre quando acompanhada.

As agencias de fomento CNPq e CAPES pelo suporte financeiro que permitiram a realização desse projeto.

Por fim, agradeço a todos os integrantes da rede de laboratórios UFMG para diagnóstico da COVID-19 por toda a energia depositada e ensinamentos sobre trabalho em conjunto e dedicação para enfrentar esse momento desafiador que estamos vivendo.

## Resumo

O mosquito *Aedes aegypti* é responsável por transmitir aos humanos as principais arboviroses de importância médica, como o vírus Zika (ZIKV). Estratégias para bloquear a transmissão destes vírus por interferência direta no inseto vetor podem ser uma forma importante de conter as infecções por ZIKV. Compreender o padrão de replicação e o tropismo do vírus no vetor pode facilitar a identificação de tecidos-chave para a replicação viral e auxiliar na elucidação de alvos para bloquear a competência vetorial do mosquito. Nesse estudo buscamos entender como ocorre o ciclo de infecção e o padrão de replicação do ZIKV em mosquitos *Ae. aegypti*, utilizando ensaios de microscopia. Desafiámos oralmente mosquitos *Ae. aegypti* em camundongos AG129 infectados com ZIKV e verificamos o estado de infecção e a carga viral da carcaça e do intestino médio dissecado dos mosquitos por qPCR. Após a confirmação da infecção, procedemos à avaliação da cinética e do tropismo viral para os tecidos do mosquito. Para isso, padronizamos uma estratégia de inclusão de mosquitos em parafina que foi feita em amostras coletadas nos dias 4, 8 e 14 pós-desafio oral em camundongos. Em seguida, realizamos a imunomarcação utilizando anticorpos anti-dsRNA (RNA de dupla fita), um intermediário da replicação viral, nas secções dos mosquitos, as quais foram submetidas à microscopia de fluorescência e confocal. A marcação para replicação viral foi positiva para os seguintes órgãos e tecidos do mosquito ao longo do ciclo de infecção: intestino médio, corpo gorduroso, gânglio abdominal, glândula salivar e sistema nervoso central. As análises sugerem que a disseminação sistêmica do ZIKV é provavelmente condicionada ao tempo de infecção do mosquito e alcança os órgãos secundários ao intestino de maneira ascendente a anatomia do vetor. Apresentamos que a replicação viral acontece de maneira polarizada na porção apical do epitélio intestinal, apontando um potencial microambiente para a formação de fábricas viral do intestino do mosquito. Dessa forma, fornecemos informações sobre tropismo viral e a dinâmica de replicação do ZIKV em mosquitos em laboratório, estabelecendo os primeiros passos para a caracterização do ciclo de infecção do ZIKV no vetor *Ae. aegypti*.

Palavras-chaves: Zika virus. *Aedes aegypti*. Tropismo viral. Replicação viral.

## Abstract

Major arboviruses of medical importance, such as the *Zika virus* (ZIKV), are transmitted by the *Aedes aegypti* mosquitoes. Blocking viral transmission by directly targeting the insect vector can be an important strategy to contain the transmission of ZIKV infections. Understanding tissue tropism and the pattern of viral replication in different cell types in the insect vector will facilitate the identification of key tissues for viral replication and targets to interfere with mosquito vector competence. In this study, our major goal was to understand how the infection cycle and the replication pattern of ZIKV occurs in *Ae. aegypti* mosquitoes using microscopy. We challenged *Ae. aegypti* mosquitoes orally in AG129 mice infected with ZIKV and checked the infection status and viral load of the carcass and midgut dissected from the mosquitoes by qPCR. After confirming the infection, we proceeded to evaluate the kinetics and viral tropism for the mosquito tissues. To accomplish this, we standardized a protocol the paraffin inclusion of mosquitoes and applied it to samples collected on days 4, 8 and 14 post-oral challenge. Next, we utilized an antibody specific for dsRNA (double-stranded RNA), an intermediate of viral replication, for immunostaining of mosquito sections. The slides were evaluated by fluorescence and confocal microscopy. The staining for viral replication was positive for the following organs and tissues of the mosquito: midgut, fat body, abdominal ganglion, salivary gland and central nervous system. The analyses suggest that the systemic spread of ZIKV is conditioned by the time of infection in the mosquito and reaches the organs secondary to the midgut upwardly to the anatomy of the vector. We also show that viral replication occurs in a polarized manner in the apical portion of the intestinal epithelium, pointing out a potential microenvironment for the formation of viral factories in the mosquito's gut. Thus, we provide information on viral tropism and the replication dynamics of ZIKV in mosquitoes in the laboratory, establishing the first steps for the characterization of the ZIKV infection cycle in the *Ae. aegypti* vector.

Keywords: Zika virus. *Aedes aegypti*. Viral tropismo. Viral replication.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição geográfica de mosquitos <i>Aedes aegypti</i> . .....	12
Figura 2. Ciclos de Transmissão do Zika virus. ....	13
Figura 3. Esquema da organização genômica do Zika virus. ....	16
Figura 4. Ciclo de vida do mosquito <i>Ae. aegypti</i> . ....	17
Figura 5. Barreiras e disseminação viral no vetor <i>Ae. aegypti</i> . ....	19
Figura 6. Cinética da infecção de ZIKV em mosquitos <i>Ae. aegypti</i> . ....	30
Figura 7. Padronização de técnica de imunofluorescência para detecção de dsRNA..	32
Figura 8. . Cinética da replicação do ZIKV no intestino de mosquitos <i>Ae. aegypti</i> . ....	35
Figura 9. Replicação viral em células epiteliais do intestino de mosquitos <i>Ae. aegypti</i> . ....	36
Figura 10. Cinética da replicação do ZIKV no corpo gorduroso de mosquitos <i>Ae. aegypti</i> .....	38
Figura 11. Cinética da replicação do ZIKV no gânglio abdominal de mosquitos <i>Ae. aegypti</i> . ....	39
Figura 12. Cinética da replicação do ZIKV na glândula salivar de mosquitos <i>Ae. aegypti</i> . ....	41
Figura 13. Cinética da replicação do ZIKV no sistema nervoso central de mosquitos <i>Ae.</i> <i>aegypti</i> . ....	43
Figura 14. Índice de disseminação da replicação viral de ZIKV em mosquitos <i>Ae. aegypti</i> .....	44
Figura 15. Localização celular da marcação de dsRNA em tecidos de mosquitos <i>Ae. aegypti</i> infectado com ZIKV. ....	46



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Título viral e origem da amostra de Zika virus.....	24
Tabela 2. Cinética de replicação do ZIKV em mosquitos <i>Ae. aegypti</i> .....	33

## LISTA DE ABREVIATURAS

CEUA	-	Comitê de Ética no Uso de Animais
CMC	-	Carboxmetilcelulose
DENV	-	<i>Dengue virus</i>
dpi	-	dias pós infecção
dsRNA	-	double-stranded RNA
FBS	-	<i>Fetal Bovine Serum</i>
MEB	-	<i>Midgut Escape Barrier</i>
MIB	-	<i>Midgut Infection Barrier</i>
OMS	-	<i>Organização Mundial de saúde</i>
PFU	-	<i>Plaque-Forming Unit</i>
PIE	-	<i>Periodo de Incubação Extrínseco</i>
RVF	-	<i>Rift Valley Fever</i>
SGEB	-	<i>Salivary Gland Escape Barrier</i>
SGIB	-	<i>Salivary Gland Infection Barrier</i>
SINV	-	<i>Sindbis virus</i>
ssRNA	-	<i>single stranded RNA</i>
VEEV	-	<i>Venezuelan Equine Encephalitis Virus</i>
WNV	-	<i>West Nile virus</i>
ZIKV	-	<i>Zika virus</i>

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	10
1.1 Doenças associadas ao zikv .....	10
1.1.2. Ciclo de transmissão .....	12
1.1.3 Zika vírus.....	14
1.2 Mosquitos <i>aedes aegypti</i> .....	16
2. JUSTIFICATIVA .....	22
3. OBJETIVOS .....	23
3.1 Objetivo geral .....	23
3.1.1 Objetivos específicos.....	23
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	24
4.1 Produção e titulação do zika vírus.....	24
4.2 Manutenção das colônias de mosquitos <i>Aedes aegypti</i> .....	25
4.3 Infecção por alimentação dos mosquitos com zikv .....	25
4.4 Quantificação relativa de carga viral e prevalência da infecção .....	26
4.4.1 Dissecção e extração do rna total de mosquitos .....	26
4.4.2 Transcrição Reversa (RT) .....	27
4.4.3 PCR quantitativo (qPCR).....	27
4.5 Microscopia .....	28
4.5.1 Fixação e inclusão em parafina.....	28
4.5.2 Imunofluorescência .....	28
5. RESULTADOS .....	30
5.1 Caracterização da infecção de mosquitos <i>Ae. aegypti</i> pelo zikv .....	30
5.2 Padronização da detecção de dsrna por imunofluorescência em tecidos de mosquitos <i>ae. aegypti</i> incluídos em material histológico.....	31
5.3 Caracterização da replicação viral de zikv em mosquitos <i>Ae. aegypti</i> .....	33
5.4 Índice de disseminação da replicação viral do zikv em mosquitos <i>Aedes aegypti</i> ...	44
5.5 Biologia celular da replicação viral em mosquitos <i>Ae. aegypti</i> .....	45
6. DISCUSSÃO .....	46
7. CONCLUSÃO.....	54

REFERÊNCIAS.....	56
ANEXO.....	63

## 1 INTRODUÇÃO

Existem numerosas subespécies e linhagens que diferem em suas origens geográficas e competência para a transmissão de patógenos humanos (BEERNTSEN; JAMES; CHRISTENSEN, 2000). Os arbovírus transmitidos por mosquitos são responsáveis por epidemias de doenças infecciosas emergentes e reemergentes ao longo do mundo (NYARUABA et al., 2019). O *Zika virus* (ZIKV) pertencente à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus* (RUBIN; GREENE; BADEN, 2016) é um arbovirus transmitido aos seres humanos através da picada de mosquitos hematófagos *Aedes spp*, principalmente, *Aedes aegypti* (MARCONDES; XIMENES, 2016). O ZIKV é responsável por grandes epidemias em vários países das Américas (HIGUERA; RAMÍREZ, 2019).

### 1.1 Doenças associadas ao ZIKV

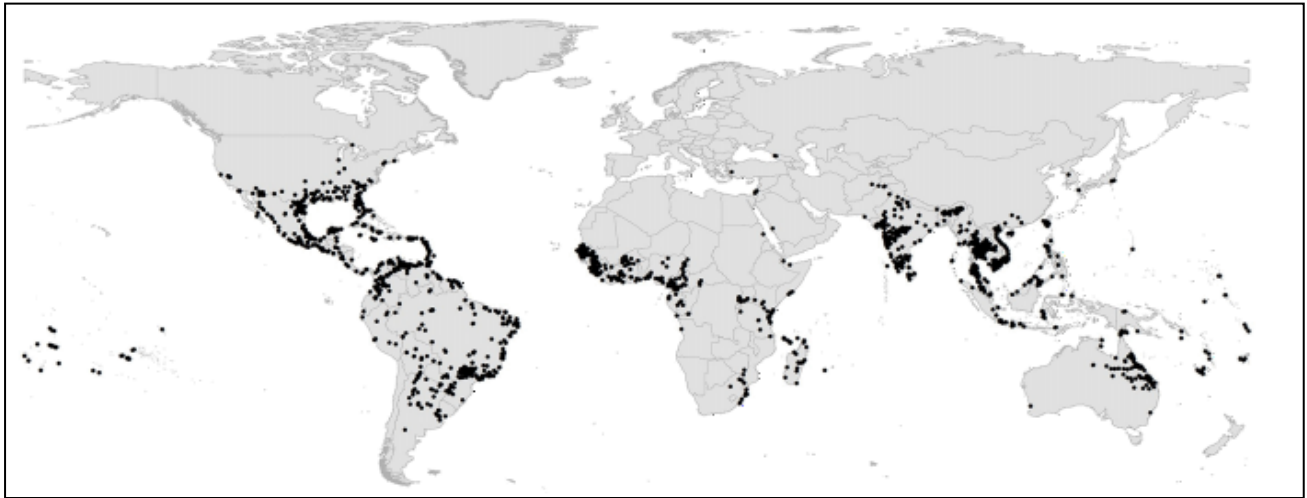
A principal forma de transmissão do ZIKV é através do mosquito *Aedes aegypti* durante o repasto sanguíneo. O ZIKV infecta principalmente fibroblastos dérmicos, queratinócitos epidérmicos e células dendríticas imaturas em humanos (WANG et al., 2017). É geralmente uma infecção assintomática ou com período de incubação que varia entre 3 a 14 dias e sintomas autolimitantes como febre, dores musculares e mal-estar, similar às manifestações clínicas do também *Flavivirus Dengue virus* (DENV) (WHO, 2018). Entretanto, a infecção por ZIKV também tem sido associada a alterações congênitas como microcefalia e prejuízos neurológicos em adultos, incluído mielite e a síndrome de Guillain-Barré (MALKKI, 2016; OEHLER et al., 2014). O RNA viral do ZIKV também foi detectado em placentas (VENCESLAU et al., 2020) e em tecido cerebral de fetos humanos (NORONHA et al., 2016) caracterizando um perfil de tropismo distinto do comumente observado para os demais vírus da família *Flaviviridae* (WANG et al., 2017).

### 1.1.1 Epidemiologia

O ZIKV foi originalmente isolado em 1947 na Floresta de Uganda através de um programa de vigilância e pesquisa de novos agentes virais (DICK; KITCHEN; HADDOW, 1952). A ocorrência desta arbovirose ficou restrita à faixa equatorial da Ásia e África por décadas (ATTAR, 2016; MUSSO; CAO-LORMEAU; GUBLER, 2015). Em 2007, uma epidemia de infecção por ZIKV ocorreu na Micronésia e com base em estudos sorológicos aproximadamente 70% da população testaram positivo para ZIKV (DUFFY et al., 2009; LANCIOTTI et al., 2008). Contudo, a expansão endêmica do vírus ganhou destaque somente em 2013, com a epidemia na Polinésia Francesa que resultou casos graves com quadros característicos de síndrome de Guillain-Barré (CAO-LORMEAU et al., 2016; MUSSO et al., 2015).

Entre 2015 e 2016 o número de casos nas Américas aumentou exponencialmente. Também houve uma crescente nos relatos de prejuízos neurológicos e microcefalia em associação a infecção por ZIKV. Esses relatos foram principalmente observados no Brasil. O espalhamento acelerado da transmissão de ZIKV gerou um estado de alerta aos programas de saúde pública e medidas emergenciais partindo da Organização Mundial de Saúde (OMS) (FARIA et al., 2016).

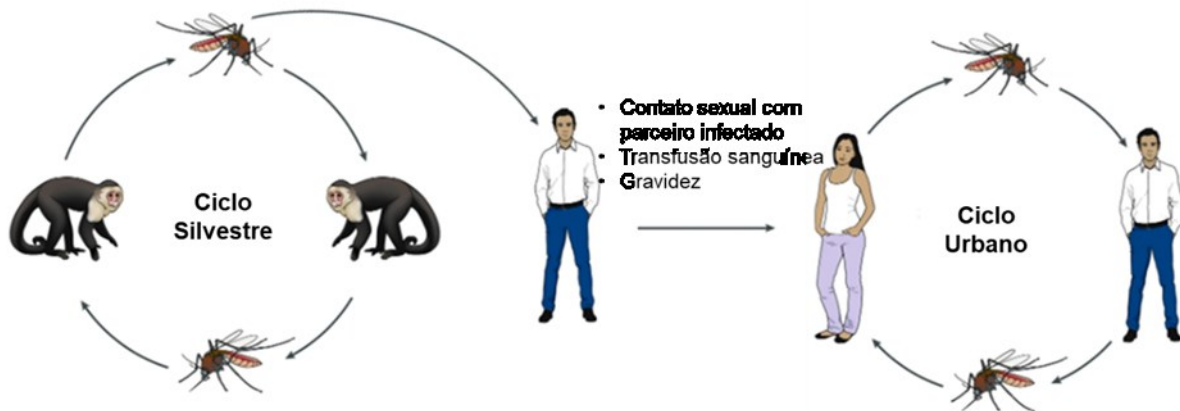
A epidemia mais recente por ZIKV ocorreu em 2018 na Índia e estudos filogenéticos retratam que os casos foram decorrentes de uma cepa asiática do vírus, atribuindo potencial epidêmico a essa cepa que pode circular em outras regiões (YADAV et al., 2019). Levantamentos epidemiológicos relatam que 87 países e territórios apresentam evidências de transmissão autóctone de ZIKV por mosquitos ao longo das Américas, África, Sudeste da Ásia e Pacífico Ocidental. Outros 61 países e territórios (correspondentes a países de todas as regiões cobertas pela OMS) têm evidências de vetores competentes estabelecidos do *Aedes aegypti*, mas ainda não documentaram a transmissão do ZIKV. Um mapa da distribuição mundial de mosquitos *Aedes aegypti* é apresentado na Figura 1. É eminente o potencial risco de um espalhamento do ZIKV para outros países, bem como a possibilidade de reemergência ou reintrodução em áreas com relatos anteriores de transmissão (WHO, 2019).



**Figura 1. Distribuição geográfica de mosquitos *Aedes aegypti*.** Pontos em pretos representam áreas positivas para o vetor *Aedes aegypti*. Adaptado de KAMAL et al., 2018.

### 1.1.2. Ciclo de transmissão

A transmissão do ZIKV ocorre principalmente por meio de mosquitos vetores e é categorizada em dois ciclos; silvestre e urbano que se concentram principalmente em regiões tropicais e subtropicais. No ciclo silvestre estão envolvidos primatas não humanos e diferentes espécies de mosquitos. O ciclo urbano é caracterizado pela transmissão do ZIKV entre humanos e mosquitos *Aedes spp.*, principalmente *Aedes aegypti* e em menor escala *A. albopictus* (SONG et al., 2017). A transmissão entre humanos ocorrem em casos esporádicos de contato sexual com um parceiro infectado, transfusão de sangue ou transmissão vertical (KURSCHEIDT et al., 2019). Os ciclos de transmissão são representados na Figura 2.



**Figura 2. Ciclos de Transmissão do Zika vírus.** Em ambientes urbanos e suburbanos, o ZIKV é transmitido principalmente em um ciclo de transmissão humano-mosquito-humano através do vetor *Aedes aegypti*, mas pode ocorrer transmissões esporádicas entre humanos através do contato sexual com um parceiro infectado, transfusão de sangue e gravidez. Na África ZIKV é transmitido em um ciclo de Silvestre entre primatas não humanos e espécies de mosquitos *Aedes* que habitam a floresta. Podem ocorrer interações entre o ciclo Silvestre e urbano. Adaptado de KURSCHEIDT et al. 2019.

Presumisse que o ZIKV possa ser transmitido por mosquitos arbóreos de primatas não humanos para humanos quando existe proximidade dos ambientes, interligando os dois ciclos de transmissão. O ZIKV foi isolado em regiões na África e na Ásia em diferentes espécies de mosquitos do gênero *Aedes*, tais como: *A. africanus*, *A. apicoargenteus*, *A. furcifer*, *A. luteocephalus*, *A. opok*, e *A. vittatus*. O que retrata o potencial dessas espécies em atuar como vetores para a transmissão de ZIKV em áreas endêmicas nessas regiões (BERTHET et al., 2014; KURSCHEIDT et al., 2019; MCCRAE; KIRYA, 1982).

O ciclo de transmissão ZIKV inicia-se com a picada de fêmeas do mosquito, que estabelecem contato com o vírus no repasto sanguíneo em indivíduos infectados. O vírus infecta as células epiteliais do intestino médio e se espalha sistematicamente para outros tecidos do mosquito, quando o vírus promove a infecção produtiva da glândula salivar, esse vetor pode dar continuidade ao ciclo infectando um novo hospedeiro durante a alimentação sanguínea (DU et al., 2019).

De maneira geral o estabelecimento dos ciclos de transmissão de arbovirus apresentam aspectos complexos devido ao ambiente distinto que o vírus enfrenta para



promover a infecção e replicação em organismos de vertebrados e invertebrados. O vírus precisa lidar com respostas imunológicas inatas e adaptativas na infecção do hospedeiro vertebrado e se replicar para títulos suficientes que permitam a transmissão para o próximo vetor artrópode. A diversidade presente nas populações virais possui papel importante para facilitar a evasão do sistema imunológico por tempo suficiente para a transmissão (FORRESTER; COFFEY; WEAVER, 2014). Ao passo que a competência vetorial é aparentemente influenciada pela variação genética do vírus e do vetor (GUBLER et al., 1979) e também pela densidade populacional do vetor em um dado ambiente (SONG et al., 2017).

Na infecção em humanos (seção 1.1) e outros vertebrados a resposta imune montada é capaz de eliminar ou sucumbir o vírus. Em contrapartida, os mosquitos uma vez infectados permanecem carregando o agente viral. O ZIKV, assim como outros arbovirus infectam as células do mosquito sem causar danos significativos, com poucas evidências dos efeitos citopáticos, que geralmente são bem observados na infecção de células de vertebrados (FORRESTER; COFFEY; WEAVER, 2014). Essa relação entre o vírus e as células infectadas contribui para a infecção permanente dos mosquitos. A resposta imune em mosquitos não é bem compreendida, somente algumas vias imunes são descritas aos vetores das arboviroses, como a presença de resposta de RNA interferente (RNAi), documentada até então em três vias: a resposta do pequeno RNA interferente (siRNA), a via do micro RNA (miRNA) e a resposta do RNA tipo piwi (piRNA). Sugere-se que a infecção vetorial de longo prazo seja resultado da supressão viral a respostas de siRNA (revisado por LUCAS; MYLES; RAIKHEL, 2013).

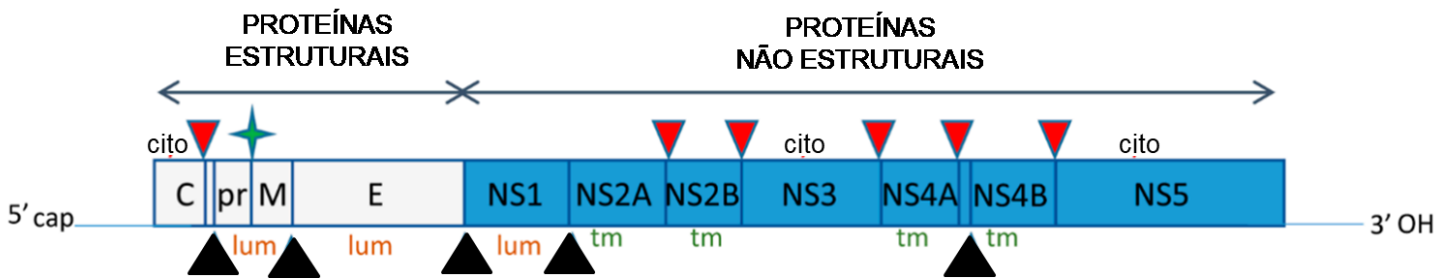
### **1.1.3 Zika vírus**

O ZIKV é uma partícula envelopada com diâmetro aproximado de 50 nm e um genoma com 10.794 kb de comprimento, compreendendo uma molécula de RNA de fita simples de sentido positivo (ssRNA +) com duas regiões não codificadoras (3' e 5') e um quadro de leitura aberto longo que codifica uma poliproteína: 5'-C-prM-E-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5-3'. A poliproteína é clivada em três proteínas estruturais: capsídeo (C), envelope (E), precursor de membrana (prM) e sete proteínas não

estruturais (NS): NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 (Figura 3) (KAZMI et al., 2020; OLAGNIER et al., 2016).

Acredita-se que a infecção das células por ZIKV aconteça por endocitose mediada por receptor. Esses receptores putativos possuem componentes tais como CD209, Tyro3 e AXL que interagem com a estrutura viral e permitem a internalização do ZIKV mediada por clatrina. O microambiente ácido no endossoma favorece a liberação do genoma viral no citoplasma por promover a fusão entre as proteínas do envelope do vírus e a membrana endossômica (MOHD ROPIDI et al., 2020).

O RNA liberado é usado tanto como mensageiro (RNAm) para a tradução das proteínas virais, quanto como molde para sua própria replicação. Um RNA fita dupla (dsRNA) é sintetizado a partir do RNA genômico fita simples ( ssRNA +). O dsRNA é então transcrito / replicado, gerando novos RNAm virais que também culminam em novos genomas virais ( ssRNA +) (LINDENBACH; THIEL; RICE, 2007). A replicação do genoma do ZIKV acontece nos complexos de replicação associados à membrana do retículo endoplasmático (SAW et al., 2019). Para a condução do processo de tradução o ZIKV utiliza a maquinaria da célula do hospedeiro para produzir uma única poliproteína viral que então clivada pela serina protease do vírus (NS2B-NS3) e protease da célula hospedeira em peptídeos individuais (SAGER et al., 2018). Quando incorporados em virions, essas partículas são transportadas para a membrana plasmática (via secretora), passando por maturação ao longo do caminho e saem da célula por exocitose (ROSSIGNOL et al., 2017).



**Figura 3. Esquema da organização genômica do Zika vírus.** Representação da poliproteína do ZIKV e seus respectivos sítios de clivagem em peptídeos individuais em relação ao retículo endoplasmático. Cito: lado citoplasmático, lum: Lúmen, tm: transmembrana. Triângulos vermelhos representam sítios de clivagens de protease viral NS2B-NS3 no lado citoplasmático do retículo endoplasmático. Triângulos em preto indicam clivagens realizadas por proteases celulares dentro do lúmen do retículo endoplasmático. A estrela verde indica o sítio de clivagem final da maturação da proteína M realizada pela protease furina residente em Golgi. Adaptado de SAGER et al. 2018.

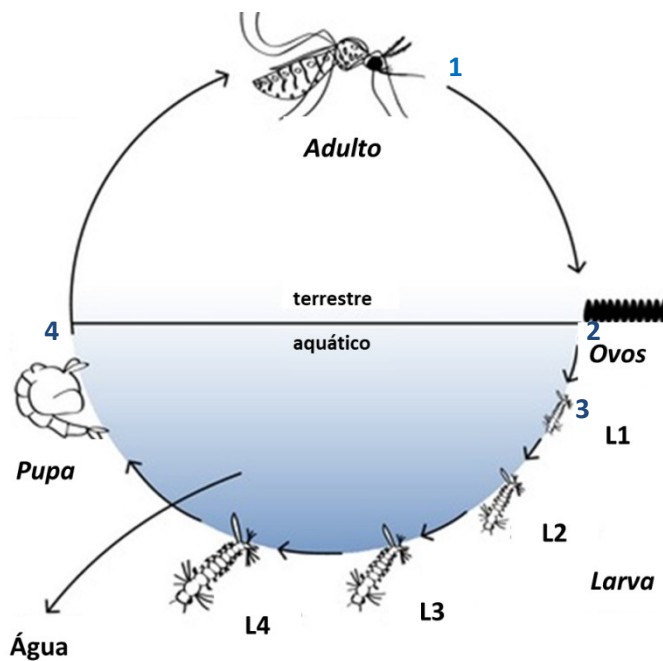
## 1.2 Mosquitos *Aedes aegypti*

O *Aedes aegypti* pertence à ordem Diptera, subordem Nematocera, família Culicidae, subfamília Culicinae, Gênero *Aedes*, Subgênero *Stegomyia* (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994) é reconhecido como o mais importante vetor de patógenos humanos em áreas urbanas devido à sua capacidade de se adaptar a vários habitats larvais (PIOVEZAN et al., 2019). O *A. aegypti* é responsável por transmitir as principais arboviroses de relevância médica, como Febre amarela, Chikungunya e Dengue, além do Zika vírus. O mosquito possui hábitos antropofílicos e diurnos, praticamente não emite som audível e possuem extrema habilidade em escapar da vítima sob ameaça durante o repasto sanguíneo (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994).

Para o metabolismo energético, tanto os mosquitos machos quanto fêmeas depende da ingestão de carboidratos, na natureza usualmente são provenientes de seivas, flores e frutos. O acúmulo de glicogênio e triglicérides é determinante para a atividade e longevidade dos mosquitos. A alimentação sanguínea das fêmeas está relacionada primordialmente ao desenvolvimento dos ovos. Com grande resistência à dessecação, os ovos podem continuar viáveis por até um ano (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994).

Quando em contato com água, os ovos eclodem dando origem às larvas, que se alimentam de partículas orgânicas na água. A eclosão dos ovos e proliferação de mosquitos *Aedes aegypti* é condicionada a locais/ recipientes com água parada, sem excesso de matéria orgânica em decomposição e sais, e preferencialmente ocorre em locais sombreados e ou com fundo escuro (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994).

As larvas passam por quatro estágios de desenvolvimento: L1, L2, L3 e L4, passando o maior tempo no último estágio, também caracterizado como estágio pré-pupal. Em seguida as larvas evoluem para o estado de pupa (não há alimentação durante esse estágio) e em cerca de dois dias os mosquitos adultos emergem na superfície da água. Após a cópula e subsequente repasto sanguíneo das fêmeas o ciclo é reiniciado (Figura 4). O ciclo dos mosquitos *Aedes aegypti* podem variar entre 10 a 15 dias, dependendo das condições do ambiente, como temperatura, alimentação e densidade de larvas (CHRISTOPHERS, 1961).

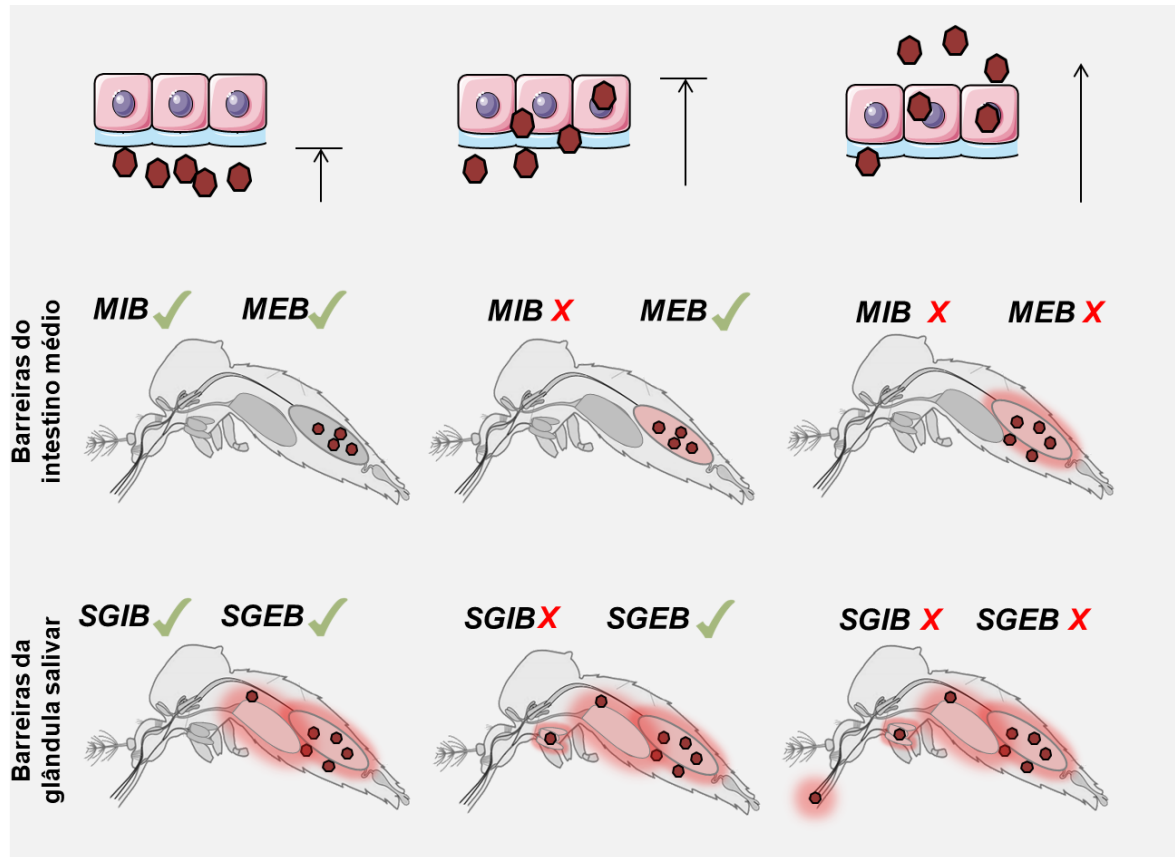


**Figura 4. Ciclo de vida do mosquito *Aedes aegypti*.** A figura esquematiza as etapas da proliferação dos mosquitos *Aedes aegypti*. 1) Os mosquitos fêmeas ovipositam em recipientes com água; 2) O período de incubação dos ovos pode ser de alguns dias a vários meses após a postura. Ovos eclodem quando submersos em água. 3) Os quatro estágios do desenvolvimento larval acontecem em água, L1: 2 mm,  $2,0 \pm 0,1$  dias; L2: 3 mm,  $0,9 \pm 0,1$  dias; L3: 4 mm,  $1,2 \pm 0,1$  dias e L4: 5 mm,  $2,1 \pm 0,3$  dias. 4) As pupas se tornam mosquitos adultos em 2-3 dias. Adaptado de COON et al (2014).

### 1.2.1 Barreiras e disseminação viral em mosquitos

A competência vetorial está relacionada às barreiras no mosquito que o vírus precisa superar. São descritos quatro principais barreiras: barreira da infecção do intestino médio (*Midgut Infection Barrier* – MIB), barreira do escape do intestino médio (*Midgut Escape Barrier* – MEB), barreira da infecção da glândula salivar (*Salivary Gland Infection Barrier* – SGIB) e barreira de escape da glândula salivar (*Salivary Gland Escape Barrier* – SGEB) (Figura 5). Os fatores e mecanismos, como a resposta antiviral, que controlam essas barreiras são determinantes para que o vetor adquira, mantenha e transmita o vírus. Sugere-se que os arbovírus e seus vetores estão constantemente co-evoluindo devido à especificidade conferida a linhagens e ou espécies de arbovirus em superar os fatores relacionados à competência vetorial (revisado em FRANZ et al., 2015).

A infecção produtiva por arbovirus em mosquito inicia-se com a ingestão do sangue contendo o vírus durante a alimentação em um hospedeiro vertebrado seguida da infecção e replicação no intestino médio; disseminação do intestino médio para tecidos secundários; amplificação sistêmica do vírus; infecção das glândulas salivares e liberação do vírus em ductos salivares para transmissão a um novo hospedeiro vertebrado (HARDY et al., 1983).



**Figura 5. Barreiras e disseminação viral no vetor *Aedes aegypti*.** Para disseminação sistêmica o vírus precisa superar barreiras de tecido do intestino médio e glândula salivar. Hexágonos em vermelho representam as partículas virais. As imagens sequenciais representam as barreiras e a infecção permissiva em cada um dos casos: MIB, barreira da infecção do intestino médio; MEB, barreira do escape do intestino médio; SGIB, barreira da infecção da glândula salivar; SGEB, barreira de escape da glândula salivar. Fonte: do autor.

Com a alimentação sanguínea, o sangue contendo vírus entra em contato com o lúmen do intestino do mosquito, postula-se que o vírus necessita entrar nas células epiteliais do intestino médio em algumas horas – por endocitose mediada por receptor – antes da formação da matriz peritrófica. A capacidade de infectar as células do intestino representam superar a MIB. Os vírions produzidos, são então transportados para a porção basal das células epiteliais, próximo à lâmina basal do intestino médio (CUI et al., 2019) que constitui uma rede de componentes da matriz extracelular (principalmente

colágeno tipo IV e laminina) que reveste o epitélio intestinal do mosquito (YURCHENCO; O'REAR, 1994). A ingestão e digestão de farinha de sangue pelo mosquito afetam fortemente a estrutura e a morfologia do intestino médio e essa distensão causa uma redução na densidade dos microvilos e um alongamento da lâmina basal. Essa condição está intimamente ligada com o escape do ZIKV pela MEB e disseminação do ZIKV para tecidos secundários (ARMSTRONG et al., 2020). Tipicamente os arbovirus infectam hemocitos (DENV e *Sindbis virus* – SINV) (SALAZAR et al., 2007; WANG et al., 2011), corpo gorduroso, tecido neural (DENV, *West Nile virus* - WNV, *Rift Valley Fever* – RVF) (GIRARD; KLINGLER; HIGGS, 2004; KADING et al., 2014; SALAZAR et al., 2007) e, ocasionalmente, tecido muscular (*Venezuelan Equine Encephalitis Virus* – VEEV e WNV) (GIRARD; KLINGLER; HIGGS, 2004; WEAVER, 1986) antes de infectar as glândulas salivares.

As glândulas salivares do mosquito são órgãos emparelhados localizados no tórax. Cada glândula consiste em três lobos, dois distais e um lobo central mais curto. Especula-se que os lobos laterais/distais das glândulas salivares dos mosquitos vetores possuam receptores que permitem a endocitose de arbovírus (SALAZAR et al., 2007). Ao alcançar e promover infecção dos lobos da glândula salivar o vírus ultrapassa a terceira barreira da competência vetorial (SGIB). Após a replicação, o vírus é depositado nas cavidades dos ductos das células acinare, o que pode levar à transmissão do vírus a um novo hospedeiro durante o repasto sanguíneo, o que corresponde superar a última barreira da competência vetorial (SGEB) e a manutenção da assiduidade do ciclo de transmissão viral (FRANZ et al., 2015).

Entretanto, padrão de disseminação viral sistêmica até a infecção produtiva da glândula salivar, que garante a manutenção do ciclo de transmissão ainda não é bem compreendido (LEE et al., 2019), com intuito de explorar o tropismo viral em mosquitos *Aedes aegypti* Salazar e colaboradores (2007) avaliaram a presença de antígeno de DENV 2 em tecidos do mosquito em diferentes dias após a infecção (dpi). Para a maioria dos mosquitos a detecção aconteceu em 4 dpi no intestino médio e corpo gorduroso, 7 dpi nas glândulas salivares e 10 dpi no sistema nervoso central. Contudo, em um número significativo dos mosquitos avaliados (36%), a presença do vírus na glândula salivar foi detectada em tempos precoces (4 dpi), sugerindo que o período de incubação extrínseca

possa ser menor do que o preconizado para aborvirus. Além disso, discute-se que após a disseminação a partir do intestino médio o vírus requeira um meio de amplificação para que possa alcançar as glândulas salivares com eficiência (GIRARD; KLINGLER; HIGGS, 2004; HARDY et al., 1983) Ampliar conhecimento sobre essas condições é um passo importante para elucidar os fatores que levam a transmissão bem sucedida de vírus a partir vetores artrópodes para os hospedeiros humanos. A compreensão das interações vírus-vetor pode facilitar o desenho de estratégias de controle da transmissão vetorial (LEE et al., 2019).



## 2. JUSTIFICATIVA

O mosquito *Aedes aegypti* é responsável por transmitir os principais arbovirus de importância médica, como o Zika. A infecção por este vírus tem sido associada a manifestações graves como alterações congênitas e síndrome de Guillain-Barré (MALKKI, 2016). Grandes epidemias por Zika virus, sobretudo nas Américas, foram relatadas ao longo da década de 2010 (HIGUERA; RAMÍREZ, 2019). Esse cenário fundamenta a necessidade de esforços para o controle dessa aborvirose.

Devido a ausência de vacinas e tratamentos eficientes (REY et al., 2018), o combate à transmissão desta doença depende principalmente do controle do vetor *Aedes aegypti*. Entretanto, medidas de controle vetorial, como o uso de inseticidas, tem sido cada vez mais ineficientes e frequentemente falham (KAUFFMAN; KRAMER, 2017). A falta de conhecimento sobre as interações vírus-vetor é uma condição limitante para o desenho de estratégias direcionadas ao controle da transmissão vetorial (HUANG; HIGGS; VANLANDINGHAM, 2019). Os mosquitos controlam a replicação viral, presumivelmente sem comprometer o seu *fitness*, o que permite a transmissão viral eficiente de um hospedeiro para outro (THAM et al., 2018). No vetor, o vírus deve lidar com as respostas imunes inatas e superar barreiras teciduais para promover a disseminação sistêmica e infecção da glândula salivar de maneira que garanta a transmissão para hospedeiros vertebrados (FRANZ et al., 2015). Entender o padrão de replicação e o tropismo do vírus no vetor *Ae. aegypti* pode facilitar a identificação de tecidos chaves para a competência vetorial e o direcionamento de novas estratégias para o controle da transmissão viral por vetores.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Caracterizar a disseminação e tropismo tecidual do ZIKV em mosquitos *Aedes aegypti*.

##### 3.1.1 Objetivos específicos

- a) Padronizar estratégias de microscopia em tecidos de mosquitos incluídos em material histológico;
- b) Padronizar a detecção de marcadores de replicação viral por imunofluorescência;
- c) Caracterizar, por microscopia de fluorescência, a disseminação sistêmica e tropismo tecidual do ZIKV em mosquitos *Aedes aegypti* após repasto sanguíneo;
- d) Quantificar a replicação viral em tecidos de mosquitos *Aedes aegypti* ao longo do curso de infecção

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Produção e titulação do Zika vírus

O ZIKV foi inoculado em uma MOI de 0,01 em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado com 5% de Soro Fetal Bovino (FBS) e antibióticos Penicilina ( $10^4$  UI / L), Estreptomicina (10 mg / L) - P / E, sobre a monocamadas de células A549. A adsorção foi realizada por 1h a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, onde o frasco de cultivo foi homogeneizado suavemente a cada 15 minutos. Após adsorção, o frasco teve seu volume mínimo completado com o meio DMEM suplementado e foi novamente incubado a 37°C e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Após 4-5 dias de infecção e o desenvolvimento do efeito citopático característico, o sobrenadante celular foi coletado, clarificado por centrifugação a 1200 G por 3 min a 4 ° C. O clarificado foi distribuído em microtubos em alíquotas de 400 µL armazenado a -80°C. O título viral foi determinado através da contagem do número de unidades formadoras de placas (PFU) utilizando células A549. Para tal,  $6 \times 10^6$  células A549 foram adicionadas a cada poço de uma placa de 6 poços e incubada por 24h a 37°C e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. No dia seguinte, cada poço foi inoculado com 400 µL de uma diluição da amostra de ZIKV produzido em meio DMEM suplementado, passando por 1 hora de adsorção a 37°C e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Ao término da etapa de adsorção adicionou-se a cada poço aproximadamente 2 mL de carboxmetilcelulose (CMC) a 2% em meio DMEM e manteve-se a placa a 37°C e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Ao fim do quinto dia de infecção, as células foram fixadas com 10% de formaldeído em PBS e coradas com solução de cristal violeta. O cálculo do título viral foi realizado pelo número de placas virais detectadas multiplicado pelo inverso da diluição, divididos pelo volume do inóculo em mL. O título viral e linhagem utilizada neste trabalho estão descritos na tabela 1.

**Tabela 1. Título viral e origem da amostra de Zika virus**

<b>Vírus</b>	<b>Isolado</b>	<b>Título viral (pfu/mL)</b>
<i>Zika vírus</i>	BRPE243/2015	$2,4 \times 10^6$

#### 4.2 Manutenção das colônias de mosquitos *Aedes Aegypti*

Os mosquitos *Aedes aegypti* (Linhagem *Bangkok*) foram mantidos em estufa a 28°C e umidade relativa de 70-80%, em fotoperíodo de 12: 12h claro: escuro e solução de sacarose a 10% *ad libitum*. Para manutenção as fêmeas realizaram o repasto sanguíneo em camundongos da linhagem Balb/c anestesiados com cetamina / xilazina (80 / 8mg kg<sup>-1</sup>). Três dias após a alimentação sanguínea, um recipiente plástico revestido com papel filtro contendo água foi colocado dentro da gaiola para que as fêmeas realizassem a oviposição. A postura era retirada da gaiola após três dias e seca por 48 horas.

Os ovos foram eclodidos de maneira sincronizada sob vácuo por 30 minutos em água desmineralizada. Após a eclosão, o conteúdo foi transferido para bandejas contendo 2L de água desmineralizada onde as larvas foram mantidas até o estágio de pupa. As larvas foram alimentadas com ração para peixe ornamental (*Tetra Pond*). As pupas foram capturadas e transferidas para um recipiente plástico com água, e acondicionadas em gaiolas por até 2-3 dias, período suficiente para os adultos emergirem.

#### 4.3 Infecção por alimentação dos mosquitos com ZIKV

As infecções foram realizadas utilizando camundongos deficientes em IFN -  $\alpha/\beta$  conforme modelos previamente descritos para infecções por flavivírus (TAN et al., 2010). O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMG sob o protocolo de submissão número 337/2016 (Anexo 1). Camundongos AG129 foram injetados intraperitonealmente com 10<sup>5</sup> PFU de ZIKV ou sobrenadante clarificado de monocamada de células A549 sem infecção (controle não infectado - MOCK). Os camundongos foram anestesiados no terceiro dia após injeção - pico de viremia - utilizando cetamina / xilazina (80 / 8mg kg<sup>-1</sup>) e colocados sobre recipientes cobertos com mosquiteiros contendo mosquitos fêmeas adultos de 5 a 7 dias de idade. A alimentação foi permitida por 1h. Os mosquitos foram anestesiados a 4°C e transferidos para uma

placa de Petri sobre o gelo, as fêmeas que alimentaram com sangue foram então separadas e colocadas em novas gaiolas para a condução dos experimentos.

#### **4.4 Quantificação relativa de carga viral e prevalência da infecção**

##### **4.4.1 Dissecção e extração do RNA total de mosquitos**

Foram coletados mosquitos nos dias 4, 8 e 14 após a infecção. Para a coleta os mosquitos foram anestesiados a 4°C e posteriormente transferidos para placas de Kline (sobre gelo) contendo solução de PBS. Foi dissecado o intestino médio de cada mosquito, o restante foi considerado carcaça. Cada amostra (intestino médio ou carcaça) foi identificada e homogeneizada individualmente em 200 µL de TRIzol® Reagent (Invitrogen™) e 2-3 *beads* de vidro (1,0 mm de diâmetro), utilizando o equipamento Mini-BeadBeater-16 (*Biospec*) por 90 segundos. O homogeneizado foi incubado por 10 minutos à temperatura ambiente e foram então adicionados 40 µL de clorofórmio (*Sigma*) seguido de agitação vigorosa em vortex por 15 segundos e incubação por 10 minutos à temperatura ambiente. Após, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 12000g em microcentrífuga a 4°C e então a fase aquosa de cada amostra foi transferida para um novo tubo contendo 5µg de glicogênio ultrapuro (*Ambion*), posteriormente foi adicionado 100 µL de isopropanol (*Sigma*) seguido de agitação leve em vortex. Após incubação por 10 minutos à temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 1200 g. O sobrenadante foi descartado, e foi adicionado em cada tubo 1000µL de etanol 75% v/v (*Sigma*) preparado utilizando água livre de nucleases (*Ambion*). Após agitação em vortex, os tubos foram novamente centrifugados por 5 minutos a 7500 g, e em seguida o sobrenadante foi descartado, e o precipitado foi seco por inversão dos tubos em papel absorvente. Após a secagem, o RNA obtido foi ressuspenso em 10 µL de água livre de nucleases (*Ambion*). As amostras foram armazenadas a -80°C até o momento do uso.

#### 4.4.2 Transcrição reversa (RT)

O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado a partir de 200 ng do RNA total extraído utilizando a enzima Transcriptase Reversa M-MLV (*Promega*), com tampão da enzima (250 mM Tris-HCl pH8,3; 375 mM KCl; 15 mM MgCl<sub>2</sub> pH 8,3), 15 mM de *Random Primers*, 10 µM de dNTPs, 0,1 mM de DTT e água livre de RNase (*Ambion*) para um volume final de 20 µL. Primeiramente foi feita a desnaturação do RNA com incubação da RNA e *Random Primers* a 70°C em termociclador durante 10 minutos, seguido de banho de gelo. Após, foram adicionados o tampão da enzima, DTT e a enzima transcriptase reversa. Essa solução foi incubada novamente em termociclador a 42°C durante 60 minutos e 72°C por 5 minutos. Por fim, a amostra de cDNA gerada foi estocada a -20°C até o momento do uso.

#### 4.4.3 PCR quantitativo (qPCR)

Para a quantificação relativa da carga viral, o cDNA sintetizado foi utilizado para a técnica de PCR quantitativo utilizando o equipamento QuantStudio™ 7 Flex Real-Time PCR System (Applied Biosystems). As reações foram realizadas com enzima Taq DNA polimerase (*Promega*), tampão da enzima (0,1 M Tris-HCl pH8,3; 0,5 M KCl; 0,1% Triton-X 100 pH 8,3), 25mM de MgCl<sub>2</sub>, 10 µM de dNTPs, 10x SyBR Green, *Primers* específicos ZIKV, F= 5'CAGACTGCGACAGTTCGAG3', R= 5'CGCGTTTTAGCATATTGACAATC3' ou para o gene de referência Rpl32 (gene constitutivo codificador para a partícula ribossomal L32), F= 5'AGCCGCGTGTTGTACTIONCTG3', R= 5'ACTTCTTCGTCCGCTTCTTG3' e água de injeção para um volume final de 15 µL. As análises foram realizadas utilizando o método do  $2^{-\Delta Ct}$  calculado em relação ao Rpl32.

## 4.5 Microscopia

### 4.5.1 Fixação e inclusão em Parafina

As pernas e asas foram removidas dos mosquitos e foi feita uma abertura na pleura abdominal de cada mosquito com auxílio de *Microtesoura SuperFine Vannas Scissors (blades 3mm)*, para otimizar a entrada do fixador. Os mosquitos foram submersos em solução de paraformaldeído a 4% sob agitação por 1 hora. A seguir, foram desidratados em série de etanol em concentração crescente: 70, 80, 90, 95 e 100% (30 min/etapa), diafanizados em xilol (15 min/2 vezes), embebidos (30min/3vezes) e incluídos em Parafina *Paraplast Plus* Leica. A microtomia dos mosquitos incluído em parafina foi realizada com navalhas *High profile* Leica 818. Cortes de 10 µm de espessura foram fixados em lâminas de vidro silanizada *Perfecta* e secas em estufa por 2 horas a 37 ° C.

### 4.5.2 Imunofluorescência

Os cortes histológicos com 10µm de espessura foram desparafinados por duas imersões em xilol (10min/etapa) e hidratados em concentrações decrescentes de álcool etílico 100, 95, 90 80 e 70% e por último em água desmineralizada (10 min/etapa). Em seguida, foi conduzida a recuperação antigênica induzida por calor. Para tal, as lâminas foram imersas em tampão citrato 10mM pH 6 e aquecidas em forno de micro-ondas (700W) em cinco etapas de cinco minutos. Após, as lâminas foram climatizadas em temperatura ambiente por 30 min e lavadas com PBS 1X pH 7,4. A permeabilização de membranas foi realizada com três imersões (5min/etapa) em PBS-T 0,3% (Triton x100 0,3% em PBS). Após permeabilização, foi realizado bloqueio de ligações inespecíficas com solução de BSA 2% por 90 min. As lâminas então foram depositadas em uma câmara úmida para o processo de imunomarcção. Os cortes foram incubados overnight a 4°C com anticorpo primário J2 anti-dsRNA (monoclonal,IgG2a - Scicons, Hungary) diluído 1:100 em PBS 1X. No dia seguinte, os cortes foram lavados três vezes com PBS 1X (10min/etapa) e incubados com anticorpo secundário Alexa Fluor 546nm (Molecular Probes, 1:400), Faloidina 488 nm (coloração de filamentos de actina) (Molecular Probes,

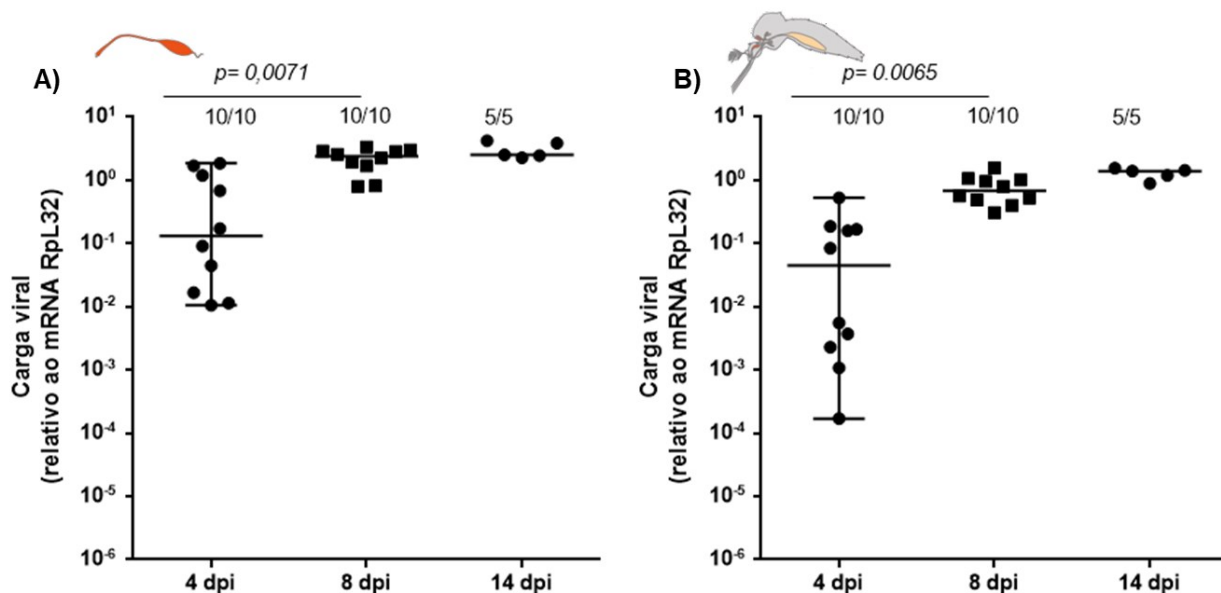
1:100), e hoechst (coloração de DNA) (Molecular Probes, 1:500) por 90 min. Após incubação, as lâminas foram novamente lavadas por três vezes com PBS 1X (10min/etapa) e montadas com lamínulas sobre líquido de montagem *Hydromount* (National Diagnostics). As imagens foram adquiridas em microscópio de fluorescência Apotome.2 (Zeiss) utilizando objetiva de 20x. As áreas de marcação de fluorescência para dsRNA (J2) e DNA (Hoechst) foram mensurada para cada órgão/tecido usando *ImageJ* v1.51e (<https://imagej.nih.gov/ij/>), os valores foram expressos pela razão área positiva para dsRNA/DNA. Para mensurar a variação da densidade das áreas positivas para replicação viral (dsRNA/DNA) foi realizada uma análise de variância (ANOVA) seguida de teste de comparação múltipla de Sidak. As análises estatísticas foram realizadas com software Prism 6.0 (Graphpad Software). Imagens confocais de cada órgão também foram adquiridas no microscópio LSM 880 (Zeiss) em 8-10 planos focais em serie Z (10µm) utilizando objetiva de 20x. A reconstituição tridimensional baseada em imagens confocais de cada órgão foi realizada no software *FluoRender* v2.26 utilizando a função *Polygon mesh*.



## 5. RESULTADOS

### 5.1 Caracterização da infecção de mosquitos *Ae. aegypti* pelo ZIKV

Desafiamos oralmente mosquitos *Ae. aegypti* com camundongos AG129 infectados com ZIKV. Até 10 mosquitos foram coletados nos dias 4, 8 e 14 após o repastado sanguíneo para avaliar o status e cinética da infecção por ZIKV. Utilizamos qPCR com iniciadores padronizados em nosso laboratório (ver seção métodos) para mensurar a carga viral em intestinos e carcaças de mosquitos *Ae. aegypti*. O genoma viral foi detectado em todos os mosquitos avaliados (n=25) tanto no intestino (Figura 6A) quanto na carcaça (Figura 6B).

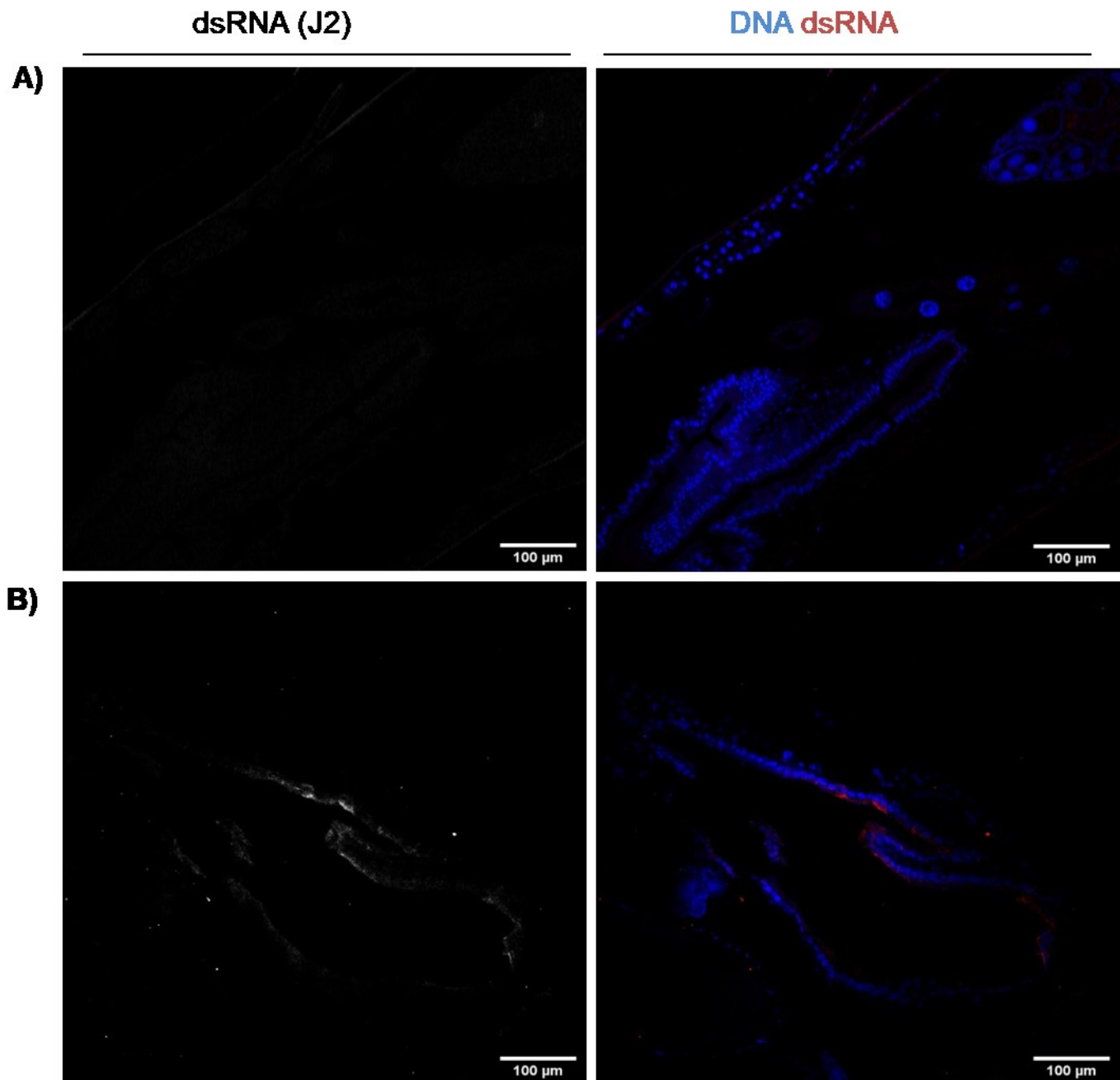


**Figura 6. Cinética da infecção de ZIKV em mosquitos *Ae. aegypti*.** **A)** Carga viral e prevalência da infecção por ZIKV em intestinos dissecados e testados individualmente. **B)** Carga viral e prevalência da infecção por ZIKV na carcaça de mosquitos testados individualmente. Os mosquitos foram alimentados em camundongo AG129 infectado com 10<sup>5</sup> PFU de ZIKV. A especificidade dos produtos amplificados foi confirmada através da curva de dissociação. Os gráficos mostram a relação entre a carga viral e a expressão do gene constitutivo Rpl32 mensurada por qPCR. O número de indivíduos infectados e o total estão indicados em cada ponto. A significância estatística foi determinada usando o teste de comparação múltipla de Dunn's para grupos infectados em diferentes momentos após a alimentação.

Com a confirmação de infecção bem-sucedida por qPCR seguimos para a avaliação da cinética da replicação viral em órgãos/ tecidos dos mosquitos por estratégias de microscopia.

## **5.2 Padronização da detecção de dsRNA por imunofluorescência em tecidos de mosquitos *Ae. aegypti* incluídos em material histológico**

Avaliamos protocolos baseados na inclusão amostras em parafina e historesina para a padronização da detecção de dsRNA por imunofluorescência em mosquitos *Ae aegypti*. A imunomarcagem de tecidos dissecados de mosquitos *Ae. aegypti* seguida da inclusão em historesina foi anteriormente empregada por SILVA et al., 2019. Utilizando esse protocolo verificamos a possibilidade de imunomarcagem em tecidos de mosquitos a partir de mosquitos inteiros após abertura da pleura abdominal e fixação em paraformaldeído 4%. Entretanto, somente a marcação para DNA foi observada após inclusão em historesina e microtomia (Figura 7A). Em paralelo avaliamos alternativas baseadas na inclusão de mosquitos em parafina. Brevemente, os mosquitos foram incluídos em parafina e após microtomia e fixação em lâmina, as secções foram hidratadas e desparafinadas conforme procedimento padrão para amostras em parafina (Higgs et al. 1997) e procedemos o protocolo de imunomarcagem. Nesse estágio, o protocolo não foi capaz de gerar nenhum sinal fluorescente (dados não mostrados), em seguida avaliamos o processo de imunomarcagem após a inclusão de um tampão de recuperação antigênica (tampão citrato - ver seção métodos) e esse passo foi suficiente para estabelecermos detecção de dsRNA por imunofluorescência a partir de amostras incluídas em parafina, conforme Figura 7B. Após padronização, a inclusão em parafina foi o método adotado para todos os experimentos apresentados na sequência.



**Figura 7. Padronização de técnica de imunofluorescência para detecção de dsRNA.. A)** Secção do intestino de mosquitos infectados com ZIKV em 8 dpi e processados em historesina, o protocolo teste não foi capaz de gerar sinal para dsRNA por IF. **B)** Secção do intestino de mosquitos infectados com ZIKV em 8 dp e processados em parafina, o protocolo teste foi capaz de detectar dsRNA por IF. Os mosquitos processados foram alimentados oralmente em camundongos AG129 infectados com ZIKV e são oriundos de um mesmo experimento de infecção.

### 5.3 Caracterização da replicação viral de ZIKV em mosquitos *Ae. aegypti*

Foram coletados mosquitos nos dias 4, 8 e 14 após alimentação oral em camundongos AG129 infectados com ZIKV, os mosquitos foram incluídos em parafina (n=4/ por dia de infecção – dpi) e processados para imunofluorescência para acessar a replicação viral (marcação para dsRNA) em diferentes tecidos. As áreas de marcação de fluorescência para dsRNA (J2) e DNA (Hoechst) foram mensurada para intestino, o único tecido que demonstrou sugestão de replicação viral em todos os tempos avaliados. Os valores foram expressos pela razão área positiva para dsRNA/DNA para obtermos uma relação aproximada de área de replicação viral por célula. Os tecidos que apresentaram focos de replicação viral ao longo do curso acompanhado foram intestino, corpo gorduroso, gânglio abdominal, glândula salivar e sistema nervoso central (Tabela 2).

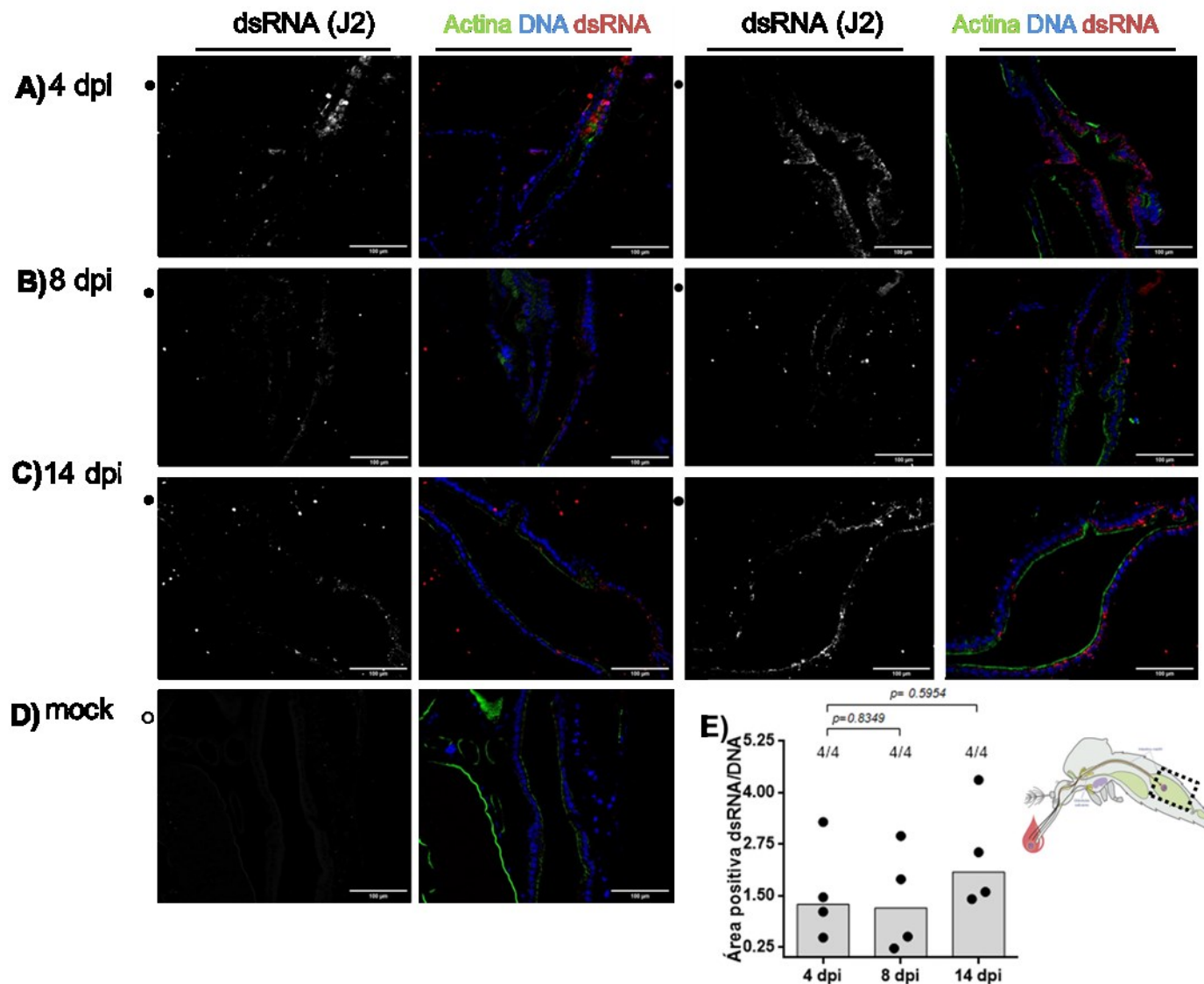
**Tabela 2. Cinética de replicação do ZIKV em mosquitos *Ae. aegypti***

<b>INTESTINO</b>	■	■	■
<b>CORPO GORDUROSO</b>	■	■	■
<b>GÂNGLIO ABDOMINAL</b>	■	■	■
<b>GLÂNDULA SALIVAR</b>	■	■	■
<b>SISTEMA NERVOSO CENTRAL</b>	■	□	■
	<b>4 dpi</b>	<b>8 dpi</b>	<b>14 dpi</b>

■ 100% ■ 75% ■ 50% ■ 25% □ 0%

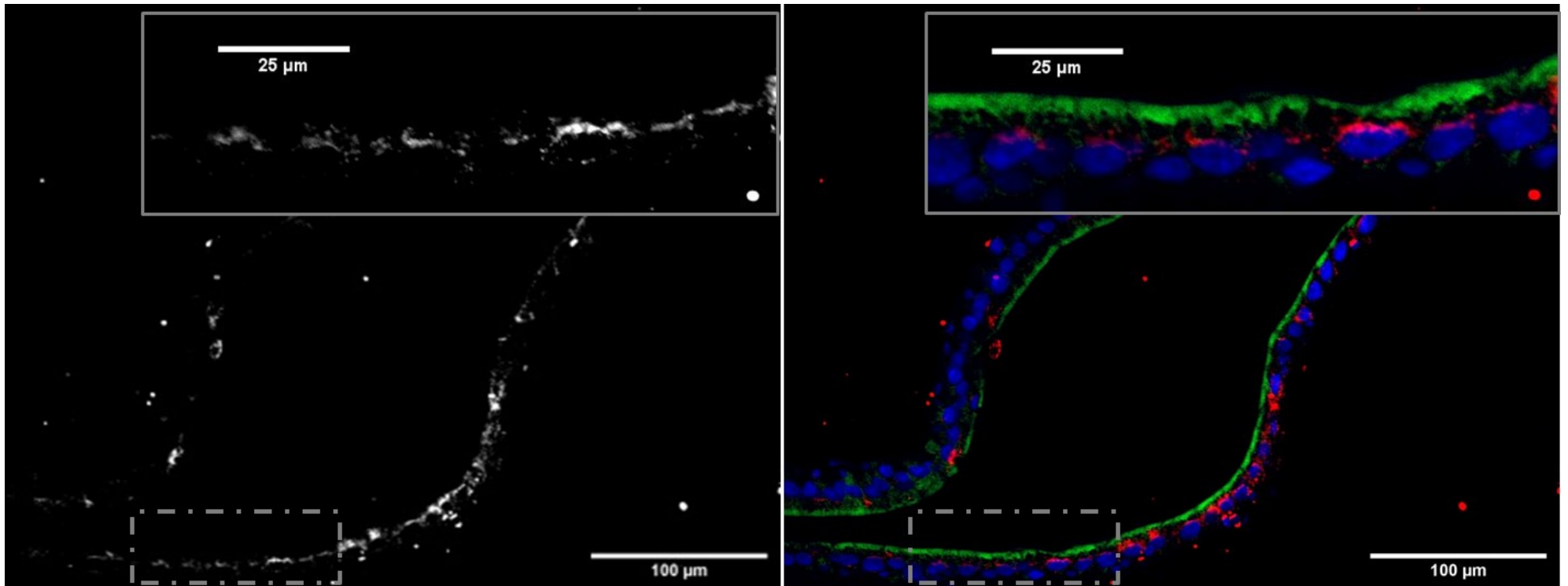
As taxas de infecção em órgão/tecido são mostradas na escala de cinza. As porcentagens foram obtidas com base no número de mosquitos positivos para dsRNA em cada órgão (n = 4/ tempo).

Todos os mosquitos avaliados foram positivos para dsRNA no intestino a partir do dia 4 dpi (Figura 8), reproduzindo a prevalência da infecção observada por qPCR. A área de marcação para dsRNA (dsRNA/célula) no intestino não variou significativamente nos tempos avaliados (Figura 8E), no entanto no primeiro momento avaliado (4 dpi – Figura 8A), dois perfis foram observados nos mosquitos avaliados; 1) focos de replicação viral condicionados principalmente na porção distal do intestino e 2) um padrão de marcação para dsRNA difundido em vários pontos da camada de células do epitélio intestinal. O perfil de replicação difundido, sem concentração aparente, foi observado em todos os mosquitos avaliados em 8 dpi (Figura 8B) e 14 dpi (Figura 8C).



**Figura 8.** . Cinética da replicação do ZIKV no intestino de mosquitos *Aedes aegypti*. **A)** IF de intestinos de mosquitos infectados com ZIKV em 4dpi. **B)** IF de intestinos de mosquitos infectados com ZIKV em 8dpi. **C)** IF de intestinos de mosquitos infectados com ZIKV em 14dpi. **D)** IF de intestinos de mosquitos não infectados (mock). **E)** Quantificação da densidade dsRNA. As áreas de marcação foram quantificadas com ImageJ e expressas como a área de marcação dsRNA dividida pela área de marcação para DNA para cada intestino. A análise comparativa da densidade de marcação ente os tempos de infecção foi realizada pelo método Sidak. dsRNA (anticorpo J2) é apresentado em vermelho, actina (faloidina) em verde e DNA (Hoechst 33342) em azul. Duas representativas imagens de cada tempo são apresentadas. Barra: 100μm.

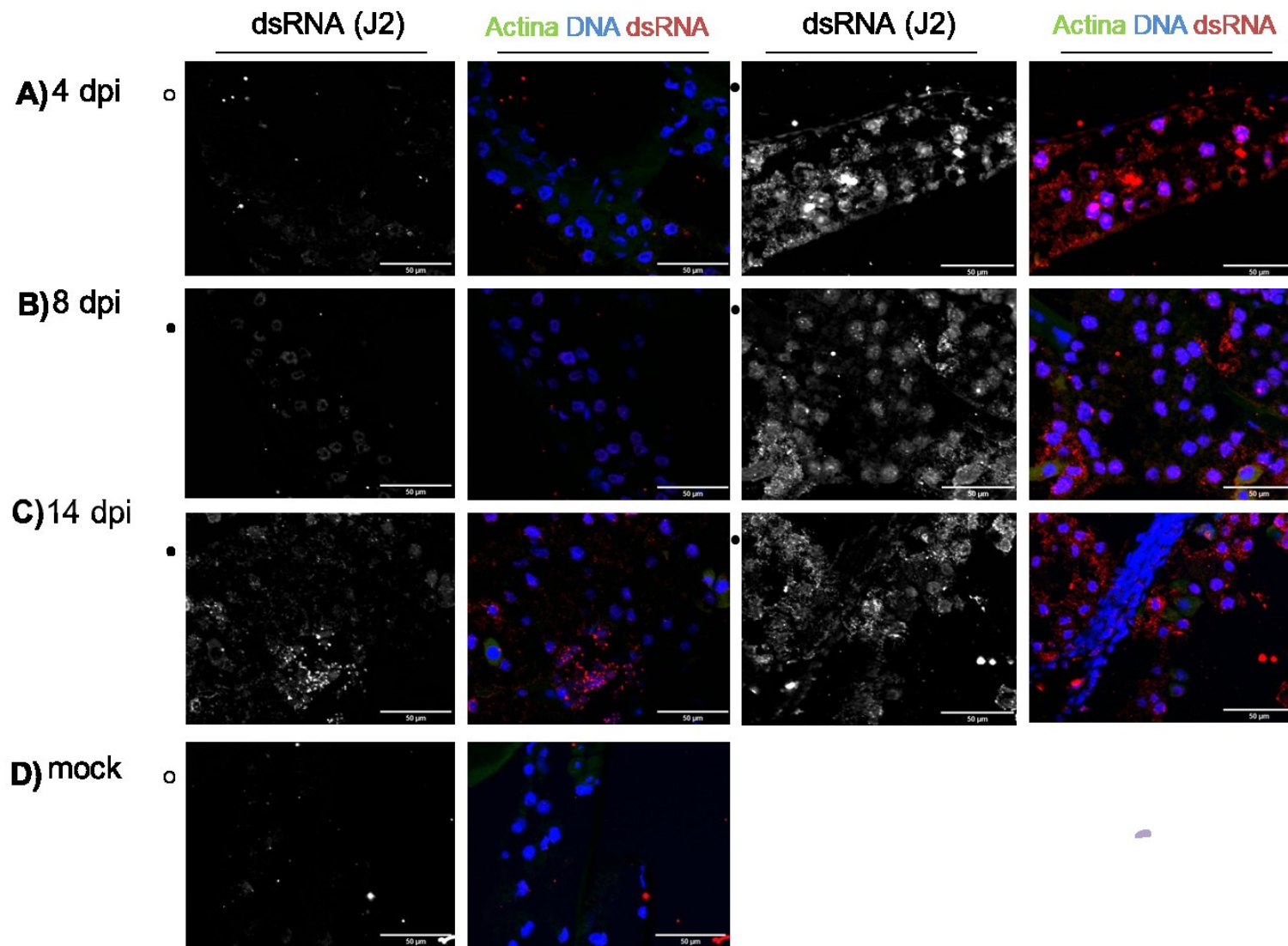
A dispersão da replicação viral parece acontecer em toda a extensão do intestino do mosquito em 14 dpi. Alguns pontos sugestivos de replicação viral apresem na porção basolateral das células do epitélio intestinal do mosquito, contudo esses pontos principalmente concentram-se na porção apical das células epiteliais (Figura 9) sugerindo um microambiente propicio para a replicação viral.



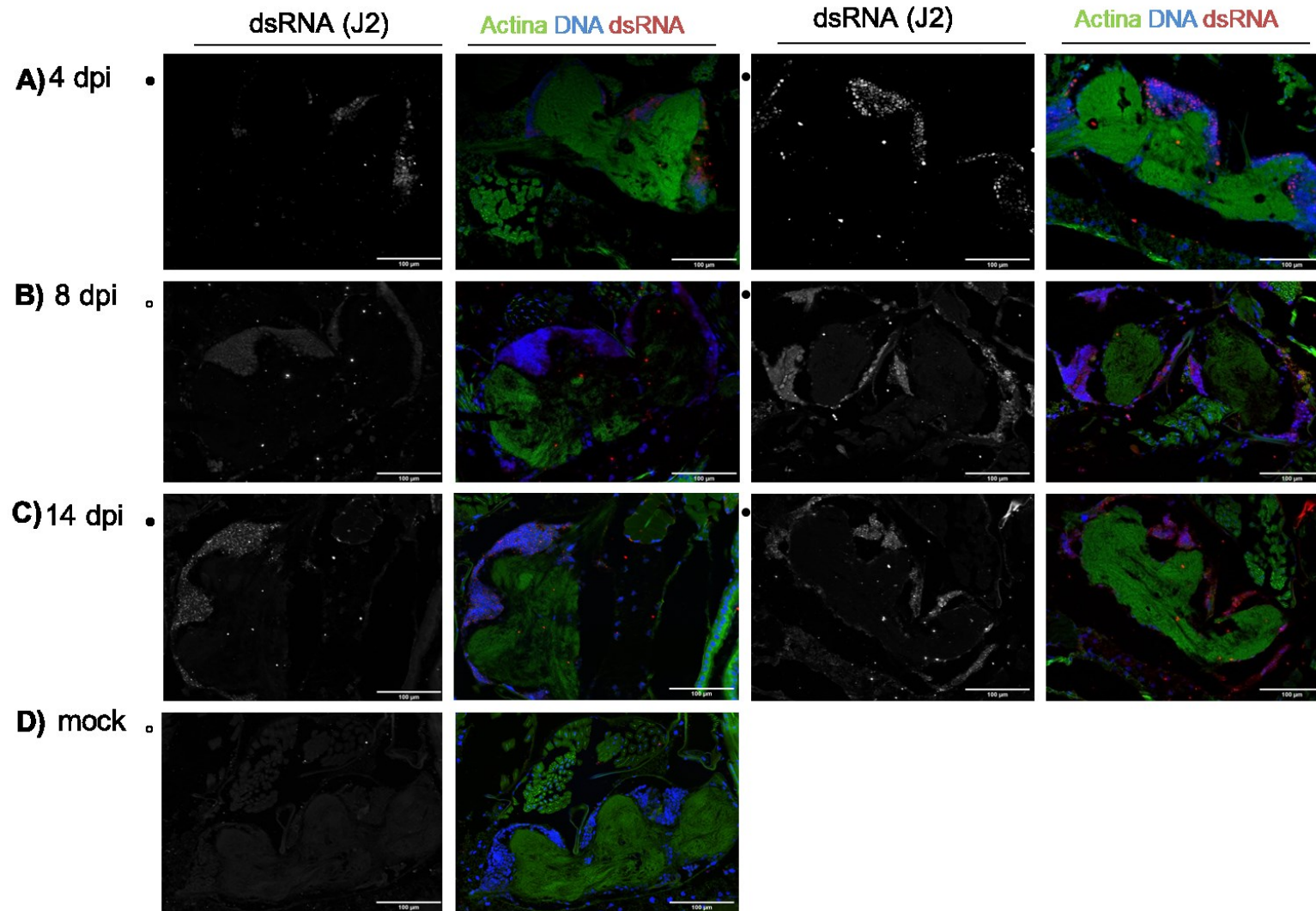
**Figura 9. Replicação viral em células epiteliais do intestino de mosquitos *Aedes aegypti*.** O retângulo na porção inferior apresenta a região ampliada no alto da imagem. A imagem ampliada destaca a localização apical da marcação para dsRNA. DNA (Hoechst 33342 ) é apresentado em azul, actina (faloidina) em verde e dsRNA (anticorpo J2) em vermelho.

O corpo gorduroso e gânglio abdominal também foi positivo para dsRNA a partir do 4 dpi (Figuras 10A e 11A) e continuou sendo detectado em 8 (Figuras 10B e 11B) e 14 dpi (Figuras 10C e 11C). Evidenciando a alta prevalência de infecção por ZIKV na carcaça do vetor mesmo em tempos precoces, como também observado por qPCR.



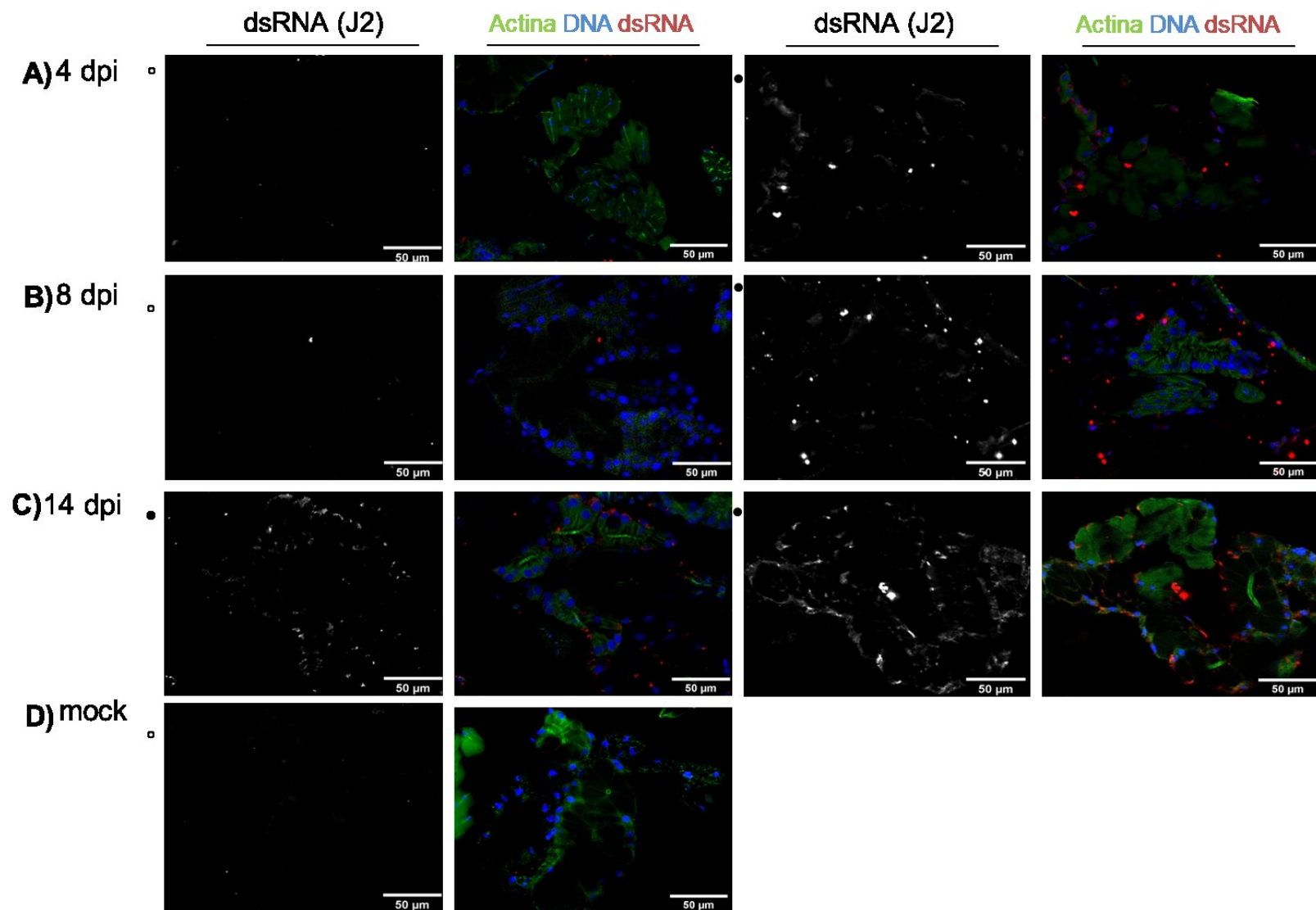


**Figura 10. Cinética da replicação do ZIKV no corpo gorduroso de mosquitos *Aedes aegypti*.** **A)** IF do corpo gorduroso de mosquitos infectados com ZIKV em 4dpi. **B)** IF do corpo gorduroso de mosquitos infectados com ZIKV em 8dpi. **C)** IF do corpo gorduroso de mosquitos infectados com ZIKV em 14dpi. **D)** IF do corpo gorduroso de mosquitos não infectados (mock). dsRNA (anticorpo J2) é apresentado em vermelho, actina (faloidina) em verde e DNA (Hoechst 33342) em azul. Duas representativas imagens de cada tempo são apresentadas. Barra: 50µm



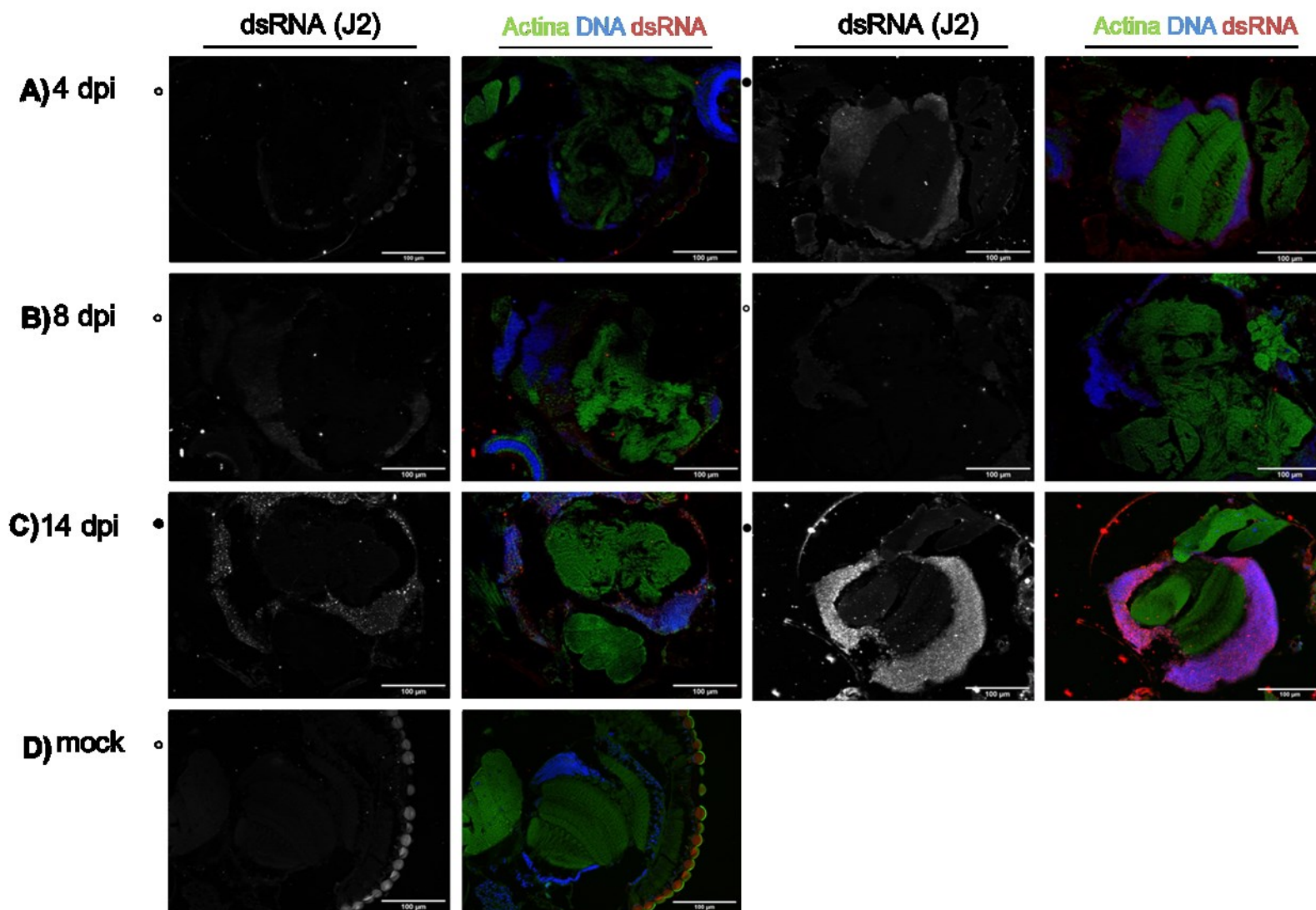
**Figura 11. Cinética da replicação do ZIKV no gânglio abdominal de mosquitos *Aedes aegypti*.** **A)** IF do gânglio abdominal de mosquitos infectados com ZIKV em 4dpi. **B)** IF do gânglio abdominal de mosquitos infectados com ZIKV em 8dpi. **C)** IF do gânglio abdominal de mosquitos infectados com ZIKV em 14dpi. **D)** IF do gânglio abdominal de mosquitos não infectados (mock). dsRNA (anticorpo J2) é apresentado em vermelho, actina (faloidina) em verde e DNA (Hoechst 33342) em azul. Duas representativas imagens de cada tempo são apresentadas. Barra: 100µm.

A glândula salivar, órgão diretamente relacionado com a competência vetorial, foi positiva para dsRNA em mosquitos em tempos precoces (50% dos mosquitos em 4 dpi/ 25% dos mosquitos em 8 dpi) e em 100% dos mosquitos avaliados em 14 dpi (Figura 12). A sugestão de replicação na glândula salivar em todos os tempos foi acompanhada com a replicação no intestino, corpo gorduroso e gânglio abdominal.



**Figura 12. Cinética da replicação do ZIKV na glândula salivar de mosquitos *Aedes aegypti*.** **A)** IF da glândula salivar de mosquitos infectados com ZIKV em 4dpi. **B)** IF da glândula salivar de mosquitos infectados com ZIKV em 8dpi. **C)** IF da glândula salivar de mosquitos infectados com ZIKV em 14dpi. **D)** IF da glândula salivar de mosquitos não infectados (mock). dsRNA (anticorpo J2) é apresentado em vermelho, actina (faloidina) em verde e DNA (Hoechst 33342) em azul. Duas representativas imagens de cada tempo são apresentadas. Barra: 50µm.

O sistema nervoso central do mosquito também apresenta focos sugestivos de replicação viral (Figura 13). A marcação de dsRNA foi observada somente naqueles mosquitos que dsRNA também foi detectado dsRNA na glândula salivar. Mas a infecção da glândula não foi sempre acompanhada da detecção no SNC. Sugerindo que o SNC é o último tecido a se infectar, provavelmente devido à organização anatômica. O tropismo é evidente para todos os mosquitos em 14 dpi e visualmente a replicação viral acontece em maior extensão em 14 dpi em comparação com a marcação em tempos precoce (4dpi).

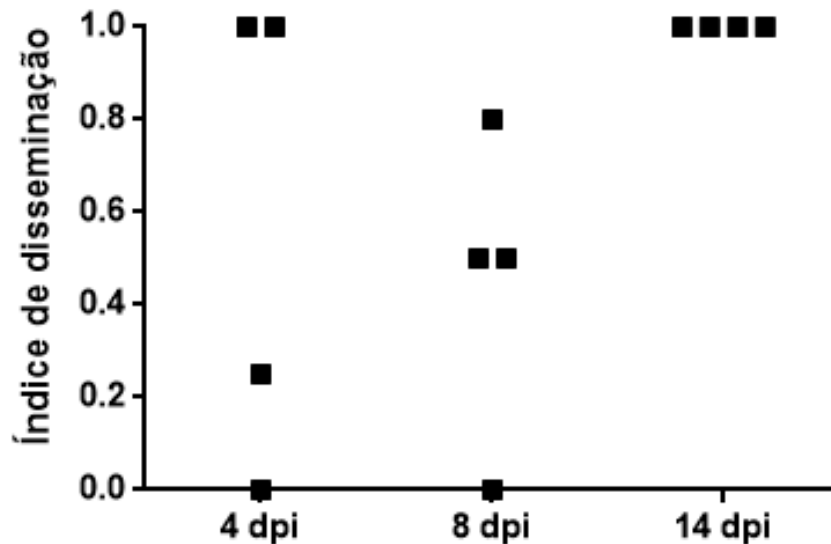


**Figura 13. Cinética da replicação do ZIKV no sistema nervoso central de mosquitos *Aedes aegypti*.** A) IF do SNC de mosquitos infectados com ZIKV em 4dpi. B) IF do SNC de mosquitos infectados com ZIKV em 8dpi. C) IF do SNC de mosquitos infectados com ZIKV em 14dpi. D) IF do SNC de mosquitos não infectados (mock). dsRNA (anticorpo J2) é apresentado em vermelho, actina (faloidina) em verde e DNA (Hoechst 33342) em azul. Duas representativas imagens de cada tempo são apresentadas. Barra: 100µm.

#### 5.4 Índice de disseminação da replicação viral do ZIKV em mosquitos *Aedes aegypti*

Um índice de disseminação da replicação viral do ZIKV em mosquitos *Aedes aegypti* foi construído com base nos órgãos/tecidos positivos para dsRNA além do intestino. A presença ou ausência de dsRNA foi pontuada nos quatro tecidos que em algum momento a marcação para dsRNA foi detectada (corpo gorduroso, gânglio abdominal, glândula salivar e sistema nervoso central) e o número de tecidos positivos para dsRNA foi dividido por quatro para fornecer o índice de disseminação.

A Figura 14 apresenta o índice de disseminação da replicação viral, o qual em linhas gerais apresenta uma dinâmica ascendente da disseminação relacionada ao tempo de infecção, assumido que todos os mosquitos avaliados alcançam o maior valor atribuído (índice 1) em 14 dpi.

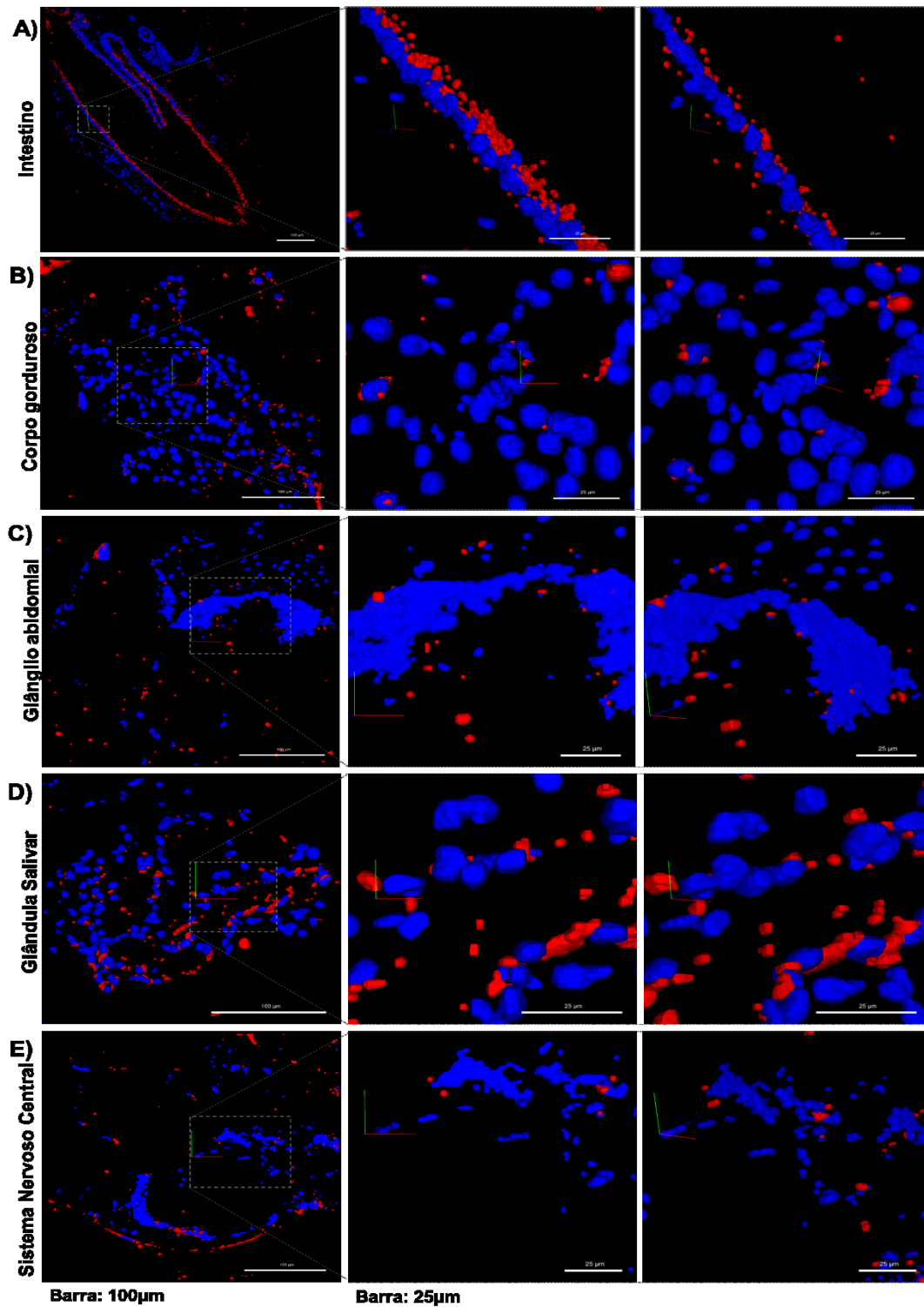


**Figura 14.** Índice de disseminação da replicação viral de ZIKV em mosquitos *Aedes aegypti*. A presença ou ausência de dsRNA foi pontuada nos quatro tecidos a seguir e o número de tecidos positivos para dsRNA foi dividido por quatro para fornecer o índice de disseminação: corpo gordo; gânglios abdominais, glândula salivar e sistema nervoso central.

### **5.5 Biologia celular da replicação viral em mosquitos *Ae. aegypti***

A caracterização da biologia celular da replicação de Flavivirus é principalmente dada por cultura de células de mamíferos e de mosquitos (HARAK; LOHMANN, 2015). Entender a relação do vírus com as células de diferentes tecidos do vetor pode esclarecer parâmetros importantes para biologia de vírus que não são observados em cultura de células e também pode representar uma oportunidade para o desenho de estratégias para conter a propagação do vírus. Nesse sentido, fizemos a reconstituição tridimensional dos tecidos de mosquitos infectados com ZIKV para observar a localização da replicação viral (Figura 15). A marcação para dsRNA notavelmente assume uma concentração perinuclear nas células provenientes de todos os tecidos de mosquitos *Ae. Aegypti* infectados com ZIKV. Com pontos de replicação difusos para maioria das células nos tecidos secundário (Figura 15B – corpo gorduroso, C – gânglio abdominal, D- glândula salivar e E – sistema nervoso central) e evidente polarização na por celular apical no epitélio intestinal como apontado na Figura 9 e evidenciado na reconstituição tridimensional apresentada na Figura 15A.





**Figura 15. Localização celular da marcação de dsRNA em tecidos de mosquitos *Ae aegypti* infectado com ZIKV. A) Perfil de marcação dsRNA no intestino; B) Perfil de marcação dsRNA no corpo gorduroso; C) Perfil de marcação dsRNA no gânglio abdominal ; D) Perfil de marcação dsRNA na glândula salivar; E) Perfil de marcação dsRNA no sistema nervoso central. dsRNA (anticorpo J2) é apresentado em vermelho e DNA (Hoechst 33342) em azul.**

## 6. DISCUSSÃO

Em contraste com a patologia da infecção por ZIKV em humanos, os mosquitos aparentemente controlam a replicação viral sem comprometer a sua aptidão, permitindo a transmissão viral eficiente de um hospedeiro para outro (THAM et al., 2018). No inseto vetor, o vírus deve lidar com as respostas imunes inatas e superar barreiras físicas teciduais associadas à infecção ao intestino médio e glândula salivar do inseto para promover a transmissão para hospedeiros vertebrados (FRANZ et al., 2015). A falta de conhecimento sobre as interações vírus-vetor é uma condição limitante para o desenho de estratégias direcionadas ao controle da transmissão viral pelo vetor (HUANG; HIGGS; VANLANDINGHAM, 2019). Nesse estudo buscamos caracterizar o ciclo e a dinâmica da infecção pelo *Zika virus* em mosquitos *Ae. aegypti*.

Especificamente, estabelecemos a infecção dos mosquitos *Ae. aegypti* em desafio oral com camundongos AG129 infectados por ZIKV e verificamos a disseminação viral por avaliar a carga viral em intestino e carcaças nos dias 4, 8 e 14 após o desafio (Figura 6), no qual obtivemos 100% de prevalência de infecção dos mosquitos. A alta prevalência da infecção viral em linhagens de laboratório de mosquitos *Ae. aegypti* é relatada em para experimentos utilizando camundongos AG129 (URAKI et al., 2018) e frequentemente observada em experimentos do nosso grupo (OLMO et al., 2018).

A carga viral tanto do intestino médio quanto da carcaça foi maior para os mosquitos coletados em 8 dpi em relação a avaliação inicial (4 dpi), sugerindo replicação e disseminação viral nos mosquitos ao longo do tempo. Não houve variação significativa na carga viral entre os mosquitos avaliados nos dias 8 e 14, inferindo uma saturação da replicação viral. A estabilização da detecção de carga viral entre 8 e 14 dpi em mosquitos *Ae. aegypti* já foi descrita anteriormente (COSTA-DA-SILVA et al., 2017). Com a confirmação de infecção bem-sucedida por qPCR seguimos para a avaliação da cinética da replicação viral em órgãos/ tecidos dos mosquitos por estratégias de microscopia.

Evidências diretas para replicação viral são experimentalmente delimitadas pela detecção de intermediários replicativos, como genoma senso negativo ou RNA de fita dupla (dsRNA) (RAQUIN; LAMBRECHTS, 2017), anticorpos anti-dsRNA são comumente empregados para inferir se há replicação viral por imunofluorescência (IF) (MATEER;

PAESSLER; HUANG, 2019; WESTAWAY; KHROMYKH; MACKENZIE, 1999). Portanto, buscamos estabelecer um protocolo para a detecção de dsRNA por imunofluorescência em tecidos de mosquitos *Ae aegypti*.

A inclusão de tecidos em parafina e glicol metacrilato (historesina) é frequentemente empregada em técnicas histológicas. Alguns estudos baseados em detecção de antígeno virais em mosquitos vetores partiram da inclusão de amostras em parafina (GIRARD; KLINGLER; HIGGS, 2004; HUGO et al., 2019; SLONCHAK et al., 2020) e outros para órgãos dissecados demonstraram resultados satisfatórios para técnicas de imunofluorescência em historesina (FIAZ et al., 2019; SILVA et al., 2019). Nesse sentido, exploramos abordagens baseada nesses métodos para a estabelecermos a detecção de dsRNA por imunofluorescência em mosquitos *Ae aegypti*.

Para os testes realizados com base na inclusão em historesina optamos por proceder a imunomarcagem antes da inclusão do tecido em material histológico, conforme SILVA et al., 2019. Contudo, não obtivemos sucesso para a detecção de marcação anti-dsRNA em mosquitos infectados por ZIKV utilizando esse protocolo (Figura 7A). Embora esse método de imunomarcagem anterior ao processamento histológico já tenha sido empregada em outros trabalhos, essa técnica foi essencialmente usada em intestino dissecados de mosquitos (FIAZ et al., 2019; SILVA et al., 2019). Logo, quando aplicamos essa abordagem para mosquitos inteiros pontos técnicos podem ser considerados e alternativamente testados para estabelecer a imunomarcagem, como explorar tempo e concentrações de anticorpos que podem não ter sido suficientes para difusão por toda a cavidade do mosquito. Outra possibilidade tecnicamente viável é promover a imunomarcagem diretamente nas secções do mosquito incluído em historesina mediante a um processo de deplastificação (BAKO et al., 2015; ZBAEREN; ZBAEREN-COLBOURN; HAEBERLI, 2007) de maneira similar como foi realizado com a inclusão de parafina, no qual conseguimos estabelecer a imunomarcagem para dsRNA (Figura 7B) especialmente com adição de um passo de recuperação antigênica com tampão citrato, frequentemente empregado em protocolos de imunofluorescência para tecidos inclusos em material histológico (DOUCET et al., 2017; FELICIONI et al., 2020; K R; JONES; UDUPA, 2016).

Após a implementação dos protocolos as secções dos mosquitos foram avaliadas quanto a positividade para dsRNA, densidade da marcação (área de marcação

dsRNA/DNA) e a localização da marcação em relação ao núcleo e / ou polaridade da célula em cada tecido ou órgão acometido. Revelamos que a replicação do ZIKV acontece no intestino, corpo gorduroso, gânglio abdominal, glândula salivar e sistema nervoso central (Tabela 2).

Todos os mosquitos avaliados foram positivos para dsRNA no intestino a partir do dia 4 dpi (Figura 8), reproduzindo a prevalência da infecção observada por qPCR e demonstrando alta susceptibilidade de infecção em linhagens de laboratório. A infecção bem-sucedida do vírus é resultado da superação de gargalos importantes como susceptibilidade genética e fatores físicos, como a matriz peritrófica que reveste o epitélio intestinal após a alimentação sanguínea e a arquitetura polarizada das células epiteliais do intestino (BONFINI; LIU; BUCHON, 2016; FORRESTER; COFFEY; WEAVER, 2014).

A dinâmica de infecção do intestino apresentou pontos de replicação por toda a extensão do órgão, com concentração aparente dos focos de replicação viral na porção distal do intestino em mosquitos em 4 dpi (50%/2 – Figura 8A) e um padrão de marcação para dsRNA difundido pela camada de células do epitélio intestinal recorrente nos demais estágios da infecção (Figura 8A, Figura 8B – 8 dpi e 8C – 14 dpi) sugerindo que vírus dissemina rapidamente para as células adjacentes a partir de um ponto inicial de infecção. A concentração inicial da replicação pode preferencialmente ocorrer na porção distal do intestino de mosquitos devido maior densidade de membranas do retículo endoplasmático e mitocôndrias nessa região. A porção distal do intestino também é o local onde principalmente acontece a absorção de componentes do sangue (HECKER, 1977), o que pode favorecer o estabelecimento da replicação viral.

A detecção de dsRNA difundida no intestino ainda em 4 dpi e principalmente em 8 e 14 dpi, prediz que a formação de partículas virais pode ocorrer por toda a extensão do intestino, entretanto ainda é necessário avaliar a presença do antígeno viral, como por identificação de proteínas estruturais do ZIKV, assumindo que não detectamos a presença do antígeno, mas uma forma sugestiva da replicação viral. Para DENV-2, a detecção do antígeno viral em mosquitos *Ae. aegypti* infectados por via oral é relatada a partir do 3 dpi no intestino em pequenos focos que aumentam radialmente até atingir grande parte ou todo o intestino (7-10 dias) (Salazar et al 2007).

Junto a replicação viral no intestino, a detecção de dsRNA também foi observada nos demais órgãos em 4 dias pós infecção: corpo gorduroso (50%/2 – Figura 10), gânglio abdominal (75%/3 – Figura 11), glândula salivar (50%/2 – Figura 12) e sistema nervoso central (50%/2 – Figura 13), inferindo uma flutuação na permissibilidade dos tecidos de mosquitos a replicação viral. Contudo a disseminação viral completa para todos os mosquitos avaliados em um estágio do ciclo de infecção por ZIKV somente foi relatada em 14 dpi (Tabela 2 e Figura 14), apontado que para a maioria dos mosquitos nas condições avaliadas é requerido um período superior a 8 dias para disseminação sistêmica ocorra efetivamente. De maneira similar Salazar et al (2007) demonstrou que mosquitos *Ae. aegypti* infectados por DENV-2 também apresentam significativa flutuação no ciclo da infecção, no referido estudo 36% dos mosquitos avaliados foram positivos para DENV em 4 dpi, mas a infecção na glândula salivar somente foi detectada na maior parte dos mosquitos em 10 dpi.

O perfil caracterizado no nosso estudo sugere permissividade à infecção da glândula salivar em tempos precoce (4 dpi), o que pode resultar em um tempo de incubação extrínseco (PIE) precoce. No entanto é possível que o acúmulo viral não seja suficiente para a manutenção do ciclo de transmissão nesse momento, assumindo que uma infecção produtiva é alcançada quando as barreiras de infecção e de escape são superadas em resposta a infecção de células acinares, onde o vírus se acumula até a liberação das partículas virais junto ao próximo repasto sanguíneo (HARDY et al., 1983). Idealmente um maior número de mosquitos deve ser avaliado e experimentos adicionais tais como quantificação da carga viral na saliva e/ou glândula salivar devem ser conduzidos para pontuação mais precisa a respeito de um tempo de incubação extrínseco. O PIE desempenha um papel importante na definição das taxas de transmissão, tendo em vista que o estabelecimento de PIE precoce pode aumentar o número de oportunidades para a transmissão de patógenos durante a vida de um mosquito (MACDONALD, 1957).

Os mosquitos que foram positivos para dsRNA na glândula salivar independente do estágio/dia da infecção, necessariamente apresentaram replicação nos tecidos secundários corpo gorduroso e gânglio abdominal apontando que disseminação ocorre

de forma ascendente a anatomia do vetor, conforme apresentado para os Flavírus WNV e DENV (GIRARD; KLINGLER; HIGGS, 2004, SALAZAR et al 2007).

A infecção do SNC a partir de 4 dpi (Figura 13) pode ter uma associação importante com o espalhamento da transmissão do ZIKV, Gaburro e colaboradores (2018) usando microeletrodos para registrar a atividade elétrica em cultura de neurônios primários de mosquitos *Ae. aegypti* mostraram um aumento da atividade neuronal quando a infecção por ZIKV acontece e maior atividade locomotora nos mosquitos avaliados, o que pode significar maior aptidão na busca do vertebrado quando o vírus atinge o SNC.

O índice de disseminação da replicação viral apresentado na Figura 14 traduz a dinâmica ascendente da disseminação relacionada ao tempo de infecção, onde parte dos mosquitos avaliados alcançaram altos índices de disseminação em tempos precoces (50%/2 apresentam índice 1 em 4 dpi e 25%/1 índice 0.8 em 8 dpi), mas somente em 14 dpi todos os mosquitos avaliados alcançam o maior valor atribuído (índice 1) indicando a infecção em todos os tecidos. Em uma visão geral, a flutuação nos índices de disseminação viral, que sugerem disseminação sistêmica em tempos precoces para uma porção dos vetores, é um ponto compartilhado entre os estudos de cinética e tropismo viral em artrópodes (LAPOINTE et al., 2011; NOVELO et al., 2019; SALAZAR et al., 2007).

Para melhor caracterizar a biologia celular da replicação do ZIKV também verificamos o padrão da marcação de dsRNA em cada órgão acometido. As análises dos tecidos revelaram uma concentração perinuclear de dsRNA nas células provenientes de mosquitos *Ae. Aegypti* infectados com ZIKV (Figura 15). Esse resultado é remanescente do padrão observado em culturas de células infectada por *Flavivirus* (CORTESE et al., 2017; TEO; CHU, 2014; WELSCH et al., 2009).

Embora a marcação perinuclear de dsRNA seja constante para células de todos os tecidos, os sítios sugestivos de fabrica viral de ZIKV difere entre intestino e os tecidos secundários. Vários sítios de dsRNA são observados nas marcações para as células do corpo gorduroso (Figura 15B), gânglio abdominal (Figura 15C), glândula salivar (Figura 15D) e sistema nervoso central (Figura 15E). Enquanto, a marcação para dsRNA parece concentrada em uma única porção celular (apical) no epitélio intestinal como sugerido na

Figura 9 e melhor evidenciado na reconstituição tridimensional apresentada na Figura 15A.

Durante a replicação viral, o dsRNA formado frequentemente colocaliza com proteínas não estruturais virais como demonstrado para linhagens celulares infectadas com DENV2 (JUNJHON et al., 2014; WELSCH et al., 2009) e ZIKV (CORTESE et al., 2017). Esses complexos replicativos (fabricas virais) acontecem em vesículas associadas ao retículo endoplasmático (JUNJHON et al., 2014). Nesse contexto, a replicação do ZIKV no intestino de mosquitos *Aedes aegypti* concentrada na porção apical das células indica uma provável polarização de um microambiente propício para a formação de fabricas viral no epitélio intestinal.

Sabe-se que a formação de um microambiente ácido no endossoma é essencial para a liberação do genoma viral no citoplasma por promover a fusão entre as proteínas do envelope do vírus e a membrana endossômica, permitindo a replicação (MOHD ROPIDI et al., 2020). O estabelecimento de pH ácido em compartimento endossômicos é dado principalmente pela bomba de prótons ATPase vacuolar (V-ATPase). A relação direta entre a atividade de V-ATPase e o estabelecimento da infecção por ZIKV foi demonstrada por Li e colaboradores (2020), onde o silenciamento das células T98G com siV-ATPase (siRNA direcionado à V-ATPase) foi suficiente para reduzir significativamente o número de cópias de RNA genômico viral e a produção de vírus infeccioso. Interessantemente, Patrick e colegas (2006) ao descrever aspectos fisiológicos do mosquito *Aedes aegypti*, encontraram que a polaridade celular dada no epitélio intestinal reflete em diferenças espaciais que remete a função das células especialmente em relação à localização da V-ATPase que aparece predominantemente na porção apical das células. Nesse sentido é razoável que a prevalência da presença de V-ATPase, responsável pela manutenção do pH nos endossomas contribua positivamente o para a polarização da replicação viral (dsRNA) na porção apical do epitélio intestinal, de maneira complementar para os demais tecidos, que não apresentam evidente polaridade celular também não há uma delimitação espacial dos sítios de replicação viral que aparecem em vários pontos das células que compõem os demais órgãos do vetor.

Tomado em conjunto, apresentamos a alta permissibilidade em laboratório de mosquitos *Aedes aegypti* para o vírus ZIKV e revelamos que o ciclo da infecção passa pela replicação viral no epitélio intestinal no qual a replicação acontece de maneira particular à polaridade celular e se espalha provavelmente de maneira ascendente a anatomia do vetor para o corpo gorduroso, gânglio abdominal, glândula salivar e sistema nervoso central e que a disseminação é majoritariamente condicionada ao tempo de infecção.



## 7. CONCLUSÃO

Nesse estudo padronizamos estratégias de microscopia em tecidos de mosquitos incluídos em parafina para a detecção da replicação viral (dsRNA) por imunofluorescência e quantificação da área tomada por replicação viral em tecidos de mosquitos *Aedes aegypti* ao longo do curso de infecção. Dessa forma, promovemos a caracterização do ciclo de infecção do *Zika virus* em mosquitos *Aedes aegypti* e apresentamos que o ZIKV possui tropismo para intestino, corpo gorduroso, gânglio abdominal, glândula salivar e sistema nervoso central do mosquito. Adicional a isso, nossos dados mostram que a replicação do ZIKV acontece de maneira polarizada na porção apical no epitélio intestinal do mosquito *Aedes aegypti*.

## 8. PERSPECTIVAS

- Proceder os experimentos descritos na dissertação com maior número de mosquitos em cada estágio da infecção por ZIKV.
- Proceder imunofluorescência para proteína do envelope do ZIKV (anticorpo 4G2) em mosquitos *Ae. aegypti*.
- Proceder imunofluorescência para marcadores de organelas envolvidas na replicação viral (Ex.: Complexo de golgi/ anticorpo *Anti-GM130* e reticulo endoplasmático/ anticorpo *Anti-Calnexina*).

## REFERÊNCIAS

- ARMSTRONG, P. M. et al. Successive blood meals enhance virus dissemination within mosquitoes and increase transmission potential. **Nature Microbiology**, v. 5, n. 2, p. 239–247, 2020.
- ATTAR, N. ZIKA virus circulates in new regions. **Nature Reviews Microbiology**, p. 2016, 2016.
- BAKO, P. et al. Methyl methacrylate embedding to study the morphology and immunohistochemistry of adult guinea pig and mouse cochleae. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 254, p. 86–93, 2015.
- 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.
- BERTHET, N. et al. Molecular Characterization of Three Zika Flaviviruses Obtained from Sylvatic Mosquitoes in the Central African Republic. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 14, n. 12, p. 862–865, 1 dez. 2014.
- BONFINI, A.; LIU, X.; BUCHON, N. From pathogens to microbiota: How *Drosophila* intestinal stem cells react to gut microbes. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 64, p. 22–38, 2016.
- CAO-LORMEAU, V.-M. et al. Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study. **Lancet (London, England)**, v. 387, n. 10027, p. 1531–1539, 9 abr. 2016.
- CHRISTOPHERS. *Aedes Aegypti*: The Yellow Fever Mosquito. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 10, n. 1, p. 112–113, 1961.
- CONSOLI, R. A. G. B.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. Mosquitos de importância sanitária do Brasil. **FIOCRIZ** 1994..
- CORTESE, M. et al. Ultrastructural Characterization of Zika Virus Replication Factories. **Cell reports**, v. 18, n. 9, p. 2113–2123, 28 fev. 2017.
- COSTA-DA-SILVA, A. L. et al. Laboratory strains of *Aedes aegypti* are competent to Brazilian Zika virus. **PloS one**, v. 12, n. 2, p. e0171951–e0171951, 10 fev. 2017.
- CUI, Y. et al. Zika Virus Dissemination from the Midgut of *Aedes aegypti* is Facilitated by Bloodmeal-Mediated Structural Modification of the Midgut Basal Lamina. **Viruses** , 2019.
- DICK, G. W. A; KITCHEN, S. F.; HADDOW, A. J. Zika virus. I. Isolations and serological specificity. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 46, n. 5, p. 509–520, 1952.

DOUCET, M. et al. Preclinical development of a vaccine against oligomeric alpha-synuclein based on virus-like particles. **PloS one**, v. 12, n. 8, p. e0181844–e0181844, 10 ago. 2017.

DU, S. et al. Aedes mosquitoes acquire and transmit Zika virus by breeding in contaminated aquatic environments. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, p. 1324, 2019.

DUFFY, M. R. et al. Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. **The New England journal of medicine**, v. 360, n. 24, p. 2536–2543, 2009.

FARIA, N. R. et al. Zika virus in the Americas: Early epidemiological and genetic findings. **Science (New York, N.Y.)**, v. 352, n. 6283, p. 345–349, 15 abr. 2016.

FELICIONI, F. et al. Postnatal development of skeletal muscle in pigs with intrauterine growth restriction: morphofunctional phenotype and molecular mechanisms. **Journal of Anatomy**, v. 236, n. 5, p. 840–853, 1 maio 2020.

FIAZ, M. et al. Pyriproxyfen, a juvenile hormone analog, damages midgut cells and interferes with behaviors of Aedes aegypti larvae. **PeerJ**, v. 7, p. e7489–e7489, 4 set. 2019.

FORRESTER, N. L.; COFFEY, L. L.; WEAVER, S. C. Arboviral bottlenecks and challenges to maintaining diversity and fitness during mosquito transmission. **Viruses**, v. 6, n. 10, p. 3991–4004, 23 out. 2014.

FRANZ, A. W. E. et al. Tissue Barriers to Arbovirus Infection in Mosquitoes. **Viruses**, v. 7, n. 7, p. 3741–3767, 8 jul. 2015.

G., M. **The Epidemiology and Control of Malaria**. Amen House, Warwick Square, London E.C.4.: Oxford University Press, 1957.

GABURRO, J. et al. Neurotropism and behavioral changes associated with Zika infection in the vector Aedes aegypti. **Emerging microbes & infections**, v. 7, n. 1, p. 68, 25 abr. 2018.

GIRARD, Y. A.; KLINGLER, K. A.; HIGGS, S. West Nile Virus Dissemination and Tissue Tropisms in Orally Infected Culex pipiens quinquefasciatus. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 4, n. 2, p. 109–122, 1 jun. 2004.

GUBLER, D. J. et al. Variation in Susceptibility to Oral Infection with Dengue Viruses among Geographic Strains of Aedes Aegypti \*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 28, n. 6, p. 1045–1052, 1 nov. 1979.

HARAK, C.; LOHMANN, V. Ultrastructure of the replication sites of positive-strand RNA viruses. **Virology**, v. 479–480, p. 418–433, 2015.

HARDY, J. L. et al. Intrinsic Factors Affecting Vector Competence of Mosquitoes for

Arboviruses. **Annual Review of Entomology**, v. 28, n. 1, p. 229–262, 1 jan. 1983.

HECKER, H. Structure and function of midgut epithelial cells in culicidae mosquitoes (insecta, diptera). **Cell and Tissue Research**, v. 184, n. 3, p. 321–341, 1977.

HIGUERA, A.; RAMÍREZ, J. D. Molecular epidemiology of dengue, yellow fever, Zika and Chikungunya arboviruses: An update. **Acta Tropica**, v. 190, p. 99–111, 2019.

HUANG, Y.-J. S.; HIGGS, S.; VANLANDINGHAM, D. L. Arbovirus-Mosquito Vector-Host Interactions and the Impact on Transmission and Disease Pathogenesis of Arboviruses. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 22, 23 jan. 2019.

HUGO, L. E. et al. Vector competence of Australian *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* for an epidemic strain of Zika virus. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 4, p. e0007281, 4 abr. 2019.

JUNJHON, J. et al. Ultrastructural characterization and three-dimensional architecture of replication sites in dengue virus-infected mosquito cells. **Journal of virology**, v. 88, n. 9, p. 4687–4697, maio 2014.

K R, V.; JONES, D.; UDUPA, V. A simple and effective heat induced antigen retrieval method. **MethodsX**, v. 3, p. 315–319, 8 abr. 2016.

KADING, R. C. et al. Deletion of the NSm virulence gene of Rift Valley fever virus inhibits virus replication in and dissemination from the midgut of *Aedes aegypti* mosquitoes. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 8, n. 2, p. e2670–e2670, 13 fev. 2014.

KAMAL, M. et al. Mapping the global potential distributions of two arboviral vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* under changing climate. **PloS one**, v. 13, n. 12, p. e0210122–e0210122, 31 dez. 2018.

KAUFFMAN, E. B.; KRAMER, L. D. Zika Virus Mosquito Vectors: Competence, Biology, and Vector Control. **The Journal of infectious diseases**, v. 216, n. suppl\_10, p. S976–S990, 15 dez. 2017.

KAZMI, S. S. et al. A review on Zika virus outbreak, epidemiology, transmission and infection dynamics. **Journal of biological research (Thessalonike, Greece)**, v. 27, p. 5, 4 mar. 2020.

KURSCHEIDT, F. A. et al. Persistence and clinical relevance of Zika virus in the male genital tract. **Nature Reviews Urology**, v. 16, n. 4, p. 211–230, 2019.

LANCIOTTI, R. S. et al. Genetic and Serologic Properties of Zika Virus Associated with an Epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. **Emerging Infectious Disease journal**, v. 14, n. 8, p. 1232, 2008.

LAPOINTE, P. et al. La gestion des activités éducatives de la direction et le

fonctionnement de l' école primaire. **Simon Fraser University**, v. 1, n. 2011, p. 179–214, 2011.

LEE, W.-S. et al. Mosquito antiviral defense mechanisms: a delicate balance between innate immunity and persistent viral infection. **Parasites & Vectors**, v. 12, n. 1, p. 165, 2019.

LI, M. et al. Characterization of Zika Virus Endocytic Pathways in Human Glioblastoma Cells. **Frontiers in microbiology**, v. 11, p. 242, 6 mar. 2020.

LINDENBACH, B. D.; THIEL, H.-J.; RICE, C. M. Flaviviridae: The Viruses and Their Replication. In: **Fields Virology**. 5. ed. [s.l: s.n.]. p. 1101–1151.

LUCAS, K. J.; MYLES, K. M.; RAIKHEL, A. S. Small RNAs: a new frontier in mosquito biology. **Trends in parasitology**, v. 29, n. 6, p. 295–303, jun. 2013.

MALKKI, H. Zika virus infection could trigger Guillain–Barré syndrome. **Nature Reviews Neurology**, v. 12, p. 187, 18 mar. 2016.

MARCONDES, C. B.; XIMENES, M. DE F. F. DE M. Zika virus in Brazil and the danger of infestation by Aedes (Stegomyia) mosquitoes. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 49, n. 1, p. 4–10, fev. 2016.

MATEER, E.; PAESSLER, S.; HUANG, C. Confocal Imaging of Double-Stranded RNA and Pattern Recognition Receptors in Negative-Sense RNA Virus Infection. **Journal of visualized experiments : JoVE**, n. 143, p. 10.3791/59095, 26 jan. 2019.

MCCRAE, A. W. R.; KIRYA, B. G. Yellow fever and Zika virus epizootics and enzootics in Uganda. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 76, n. 4, p. 552–562, 1 jan. 1982.

MOHD ROPIDI, M. I. et al. Endoplasmic reticulum: a focal point of Zika virus infection. **Journal of Biomedical Science**, v. 27, n. 1, p. 27, 2020.

MUSSO, D. et al. Detection of Zika virus in saliva. **Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology**, v. 68, p. 53–5, 2015.

MUSSO, D.; CAO-LORMEAU, V. M.; GUBLER, D. J. Zika virus: following the path of dengue and chikungunya? **The Lancet**, v. 386, n. 9990, p. 243–244, 2015.

NORONHA, L. DE et al. Zika virus damages the human placental barrier and presents marked fetal neurotropism. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 111, n. 5, p. 287–293, maio 2016.

NOVELO, M. et al. Intra-host growth kinetics of dengue virus in the mosquito Aedes aegypti. **PLOS Pathogens**, v. 15, n. 12, p. e1008218, 2 dez. 2019.

NYARUABA, R. et al. Arboviruses in the East African Community partner states: a review of medically important mosquito-borne Arboviruses. **Pathogens and Global Health**, v. 113, n. 5, p. 209–228, 4 jul. 2019.

OEHLER, E. et al. Zika virus infection complicated by Guillain-Barre syndrome[mdash]case report, French Polynesia, December 2013. **Euro Surveill**, v. 19, 2014.

OLAGNIER, D. et al. Mechanisms of Zika Virus Infection and Neuropathogenesis. **DNA and cell biology**, v. 35, n. 8, p. 367–372, ago. 2016.

OLMO, R. P. et al. Control of dengue virus in the midgut of *Aedes aegypti* by ectopic expression of the dsRNA-binding protein Loqs2. **Nature Microbiology**, v. 3, n. 12, p. 1385–1393, 2018.

PATRICK, M. L. et al. P-type Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase and V-type H<sup>+</sup>-ATPase expression patterns in the osmoregulatory organs of larval and adult mosquito *Aedes aegypti*; **Journal of Experimental Biology**, v. 209, n. 23, p. 4638 LP – 4651, 1 dez. 2006.

PIOVEZAN, R. et al. Spatial-temporal distribution of *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* and locations of recycling units in southeastern Brazil. **Parasites & vectors**, v. 12, n. 1, p. 541, 14 nov. 2019.

RAQUIN, V.; LAMBRECHTS, L. Dengue virus replicates and accumulates in *Aedes aegypti* salivary glands. **Virology**, v. 507, p. 75–81, 2017.

REY, F. A. et al. The bright and the dark side of human antibody responses to flaviviruses: lessons for vaccine design. **EMBO Reports**, v. 19, n. 2, p. 206–224, 27 fev. 2018.

ROSSIGNOL, E. D. et al. Zika virus induced cellular remodelling. **Cellular Microbiology**, v. 19, n. 8, p. e12740, 1 ago. 2017.

RUBIN, E. J.; GREENE, M. F.; BADEN, L. R. Zika Virus and Microcephaly. **New England Journal of Medicine**, v. 374, n. 10, p. 984–985, 10 mar. 2016.

SAGER, G. et al. Role of Host Cell Secretory Machinery in Zika Virus Life Cycle. **Viruses**, v. 10, n. 10, p. 559, 15 out. 2018.

SALAZAR, M. I. et al. Dengue virus type 2: replication and tropisms in orally infected *Aedes aegypti* mosquitoes. **BMC microbiology**, v. 7, p. 9, 30 jan. 2007.

SAW, W. G. et al. Structure and flexibility of non-structural proteins 3 and -5 of Dengue- and Zika viruses in solution. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 143, p. 67–77, 2019.

SILVA, L. L. DE S. et al. Exposure of mosquito (*Aedes aegypti*) larvae to the water extract and lectin-rich fraction of *Moringa oleifera* seeds impairs their development and

future fecundity. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 183, p. 109583, 2019.

SLONCHAK, A. et al. Zika virus noncoding RNA suppresses apoptosis and is required for virus transmission by mosquitoes. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 2205, 2020.

SONG, B.-H. et al. Zika virus: History, epidemiology, transmission, and clinical presentation. **Journal of Neuroimmunology**, v. 308, p. 50–64, 15 jul. 2017.

TEO, C. S. H.; CHU, J. J. H. Cellular vimentin regulates construction of dengue virus replication complexes through interaction with NS4A protein. **Journal of virology**, v. 88, n. 4, p. 1897–1913, fev. 2014.

THAM, H.-W. et al. Viral Determinants and Vector Competence of Zika Virus Transmission. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 1040, 23 maio 2018.

URAKI, R. et al. Altered vector competence in an experimental mosquito-mouse transmission model of Zika infection. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 3, p. e0006350, 5 mar. 2018.

VENCESLAU, E. M. et al. Adequate Placental Sampling for the Diagnosis and Characterization of Placental Infection by Zika Virus **Frontiers in Microbiology** , 2020.

WANG, A. et al. Zika virus genome biology and molecular pathogenesis. **Emerging microbes & infections**, v. 6, n. 3, p. e13–e13, 22 mar. 2017.

WANG, Z. et al. A systematic study on hemocyte identification and plasma prophenoloxidase from *Culex pipiens quinquefasciatus* at different developmental stages. **Experimental Parasitology**, v. 127, n. 1, p. 135–141, 2011.

WEAVER, S. C. Electron Microscopic Analysis of Infection Patterns for Venezuelan Equine Encephalomyelitis Virus in the Vector Mosquito, *Culex (Melanoconion) Taeniopus*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 35, n. 3, p. 624–631, 1 maio 1986.

WELSCH, S. et al. Composition and three-dimensional architecture of the dengue virus replication and assembly sites. **Cell host & microbe**, v. 5, n. 4, p. 365–375, 23 abr. 2009.

WESTAWAY, E. G.; KHROMYKH, A. A.; MACKENZIE, J. M. Nascent Flavivirus RNA Colocalized in Situ with Double-Stranded RNA in Stable Replication Complexes. **Virology**, v. 258, n. 1, p. 108–117, 1999.

WHO. **Zika virus**. 2018. Disponível em: < <https://www.paho.org/pt/topicos/zika>>.

WHO. **ZIKA EPIDEMIOLOGY UPDATE**. 2019. Disponível em: < <https://www.who.int/emergencies/diseases/zika/zika-epidemiology-update-july->



2019.pdf>.

YADAV, P. D. et al. Zika virus outbreak in Rajasthan, India in 2018 was caused by a virus endemic to Asia. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 69, p. 199–202, 2019.

YURCHENCO, P. D.; O'REAR, J. J. Basal lamina assembly. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 6, n. 5, p. 674–681, 1994.

ZBAEREN, J.; ZBAEREN-COLBOURN, D.; HAEBERLI, A. High-Resolution Immunohistochemistry on Improved Glycol Methacrylate—Resin Sections. **Journal of Histotechnology**, v. 30, n. 1, p. 27–33, 1 mar. 2007.

## ANEXO

APROVAÇÃO DO PROTOCOLO EXPERIMENTAL PELO COMITÊ DE ÉTICA NO  
USO DE ANIMAIS (CEUA)

UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Prezado(a):

Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.

**Protocolo CEUA:** 337/2016**Título do projeto:** Vias antivirais envolvidas no controle da infecção de Zika e Dengue virus em mosquitos *Aedes aegypti* e sua transmissão para hospedeiros vertebrados.**Finalidade:** Pesquisa**Pesquisador responsável:** Joao Trindade Marques**Unidade:** Instituto de Ciências Biológicas**Departamento:** Departamento de Bioquímica e Imunologia**Situação atual:** [Decisão Final - Aprovado](#)

Aprovado na reunião do dia 13/03/2017.

Belo Horizonte, 14/03/2017.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG

[https://aplicativos.ufmg.br/solicite\\_ceua/](https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/)

Universidade Federal de Minas Gerais  
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha  
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005  
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil  
Telefone: (31) 3409-4516  
[www.ufmg.br/bioetica/ceua](http://www.ufmg.br/bioetica/ceua) - [cetea@prpq.ufmg.br](mailto:cetea@prpq.ufmg.br)