

LUIZA DOS SANTOS FELIX

**ASPECTOS CELULARES E MOLECULARES DO PROCESSO DE INTERAÇÃO  
DOS VIRUS DENGUE E ZIKA COM O MOSQUITO VETOR**

Instituto de Ciências Biológicas  
Universidade Federal de Minas Gerais  
Fevereiro/2022

LUIZA DOS SANTOS FELIX

**ASPECTOS CELULARES E MOLECULARES DO PROCESSO DE INTERAÇÃO  
DOS VIRUS DENGUE E ZIKA COM O MOSQUITO VETOR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Biologia Celular do Departamento de Morfologia, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular

Orientador (a): Dr. Paulo F. P. Pimenta

Co-Orientador (a): Dra. Raquel S. M. Godoy

Instituto de Ciências Biológicas  
Universidade Federal de Minas Gerais  
Fevereiro/2022

043

Felix, Luiza dos Santos.

Aspectos celulares e moleculares do processo de interação dos vírus Dengue e Zika com o mosquito vetor [manuscrito] / Luiza dos Santos Felix. – 2022.

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

Orientador (a): Dr. Paulo F. P. Pimenta. Co-Orientador (a): Dra. Raquel S. M. Godoy.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular.

1. Biologia Celular. 2. Arbovirus. 3. *Aedes*. 4. Carga Viral. 5. Infecção. 6. Zika vírus. 7. Vírus da Dengue. I. Pimenta, Paulo Filemon Paolucci. II. Godoy, Raquel S. M. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 576



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR

**ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE LUIZA DOS SANTOS FELIX**

**351/2022 \_ ENTRADA 2º/2019 \_ 2019721257**

Às **quatorze horas** do dia **08 de fevereiro de 2022**, reuniu-se, por meio de Plataforma On-Line, a Comissão Examinadora da Dissertação, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: "**ASPECTOS CELULARES E MOLECULARES DO PROCESSO DE INTERAÇÃO DOS VIRUS DENGUE E ZIKA COM O MOSQUITO VETOR**", requisito final para obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, **Dr. Paulo Filemon Paolucci Pimenta**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

<b>Prof./Pesq.</b>	<b>Instituição</b>	<b>Indicação</b>
Dr. Paulo Filemon Paolucci Pimenta	FIOCRUZ	APROVADA
Dra. Cristina Guatimosim Fonseca	UFMG/ICB	APROVADA
Dr. Leonardo Barbosa Koerich	UFMG	APROVADA
Dra. Camila Rodrigues de Carvalho	Instituto Pesquisa René Rachou-FIOCRUZ	APROVADA

Pelas indicações, a candidata foi considerada: **APROVADA**

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. **Belo Horizonte, 08 de fevereiro de 2022.**

Dr. Paulo Filemon Paolucci Pimenta

Dr<sup>a</sup>. Cristina Guatimosim Fonseca

Dr. Leonardo Barbosa Koerich

Dr<sup>a</sup>. Camila Rodrigues de Carvalho

Obs: Este documento não terá validade sem a assinatura do Coordenador



Documento assinado eletronicamente por **Fernanda Radicchi Campos Lobato de Almeida, Coordenador(a)**, em 11/02/2022, às 12:08, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Cristina Guatimosim Fonseca, Professora do Magistério Superior**, em 11/02/2022, às 17:54, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Camila Rodrigues de Carvalho, Usuária Externa**, em 14/02/2022, às 10:02, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Leonardo Barbosa Koerich, Professor do Magistério Superior**, em 14/02/2022, às 10:31, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Paulo Filemon Paolucci Pimenta, Usuário Externo**, em 11/03/2022, às 20:29, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador 1249977 e o código CRC FCBC5EF.

## **Agradecimentos**

Agradeço aos meus familiares e amigos pelo apoio, incentivo e companheirismo durante essa caminhada. Vocês são essenciais!

Ao meu orientador, Dr. Paulo Pimenta, por me receber como aluna, pela confiança, incentivo e todo ensinamento ao longo dos anos. À minha coorientadora, Dra. Raquel Godoy, pelas inúmeras horas em laboratório, por todas as conversas, e claro, por todo incentivo, paciência e ensinamentos durante essa caminhada. À Dra. Nágila Secundino por toda disponibilidade, ajuda e incentivo. A todos vocês, muito obrigada!

Aos amigos da Entomologia Médica por todo companheirismo, apoio e momentos compartilhados!

Ao Instituto René Rachou (FIOCRUZ MINAS) pelo apoio estrutural que permitiu a conclusão desse trabalho.

À UFMG (Universidade Federal de Minas Gerais), em especial ao Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e seus professores, por todo apoio e ensinamento ao longo dos anos.

Às agências de fomento CAPES, FAPEMIG e CNPq pelo apoio financeiro.

## RESUMO

As arboviroses são doenças negligenciadas transmitidas por mosquitos vetores. Apesar de terem recebido um maior reconhecimento na última década, o número de casos e óbitos ainda é alarmante. Dengue e Zika são doenças virais que fazem parte desse grupo, e apresentam alta incidência em países tropicais. A mitigação de tais doenças consiste principalmente em estratégias de controle da população de mosquitos vetores. No Brasil, o principal vetor dos vírus dengue (DENV) e Zika (ZIKV) é o *Aedes aegypti*. Apesar dos esforços para reduzir os casos de ambas as doenças, a circulação de DENV e ZIKV gera frequentes episódios de surto. Por esse motivo, estudos envolvendo a interação vírus-vetor são necessários e possuem potencial de contribuir com as estratégias de controle das arboviroses. O presente estudo avalia a competência vetorial de populações de *A. aegypti* de uma cidade endêmica (Belo Horizonte/MG) para a transmissão de DENV e ZIKV em 7 dias após infecção (dpi) – infecção inicial, e 14 dpi – infecção tardia; e descreve a cinética da replicação viral a nível celular através da análise morfológica de células C6/36. Nossos resultados mostraram que o perfil de infecção das populações de *A. aegypti* é modulado de acordo com o flavivírus estudado, não havendo similaridade entre a competência vetorial e a carga viral. Em relação à infecção pelo DENV, a depender da população analisada, a competência vetorial pode diminuir, aumentar ou permanecer a mesma de 7 para 14 dpi. Para ZIKV, ela aumenta ou permanece a mesma. No decorrer da infecção, ZIKV tende a acumular-se nas glândulas salivares dos vetores, enquanto para DENV, o acúmulo de partículas virais não possui um padrão, variando de acordo com a população estudada. Apesar de DENV e ZIKV pertencerem à mesma família viral e serem estruturalmente similares, observamos diferenças em seus perfis de infecção em células da linhagem C6/36. No período mais adiantado da infecção por DENV, observamos a intensificação dos efeitos citopáticos, com redução dos filamentos de actina, formação de grupos celulares, e destruição da monocamada. Para a infecção por ZIKV, notamos a presença de inúmeras células multinucleadas. Com isso, constatamos que as diferenças nos efeitos citopáticos variam de acordo com o patógeno estudado e com o tempo pós-infecção.

**Palavras-chave:** *Aedes aegypti*, DENV, ZIKV, infecção viral, arbovírus, competência vetorial, carga viral, células, C6/36.

## ABSTRACT

Arboviruses are neglected diseases transmitted by mosquito vectors. Despite having received greater recognition in the last decade, the number of cases and deaths is still alarming. Dengue and Zika are viral diseases that are part of this group and have a high incidence in tropical countries. Mitigation of such diseases consists mainly of population control strategies of mosquito vectors. In Brazil, the main vector of dengue (DENV) and Zika (ZIKV) viruses is *Aedes aegypti*. Despite efforts to reduce cases of both diseases, the circulation of DENV and ZIKV generates frequent outbreak episodes. For this reason, studies involving the virus-vector interaction are necessary and have the potential to contribute to arbovirus control strategies. The present study evaluates the vector competence of *A. aegypti* populations from an endemic city (Belo Horizonte/MG) for the transmission of DENV and ZIKV in 7 days after infection (dpi) – initial infection, and 14 dpi – late infection; and describes the kinetics of viral replication at the cellular level through the morphological analysis of C6/36 cells. Our results showed that the infection patterns of *A. aegypti* populations are modulated according to the flavivirus studied, with no similarity between vector competence and viral load. Regarding DENV infection, depending on the analyzed population, vector competence may decrease, increase or remain the same from 7 to 14 dpi. For ZIKV, it increases or remains the same. During the course of infection, ZIKV tends to accumulate in the salivary glands of vectors, while for DENV, the accumulation of viral particles does not have a pattern, varying according to the population studied. Although DENV and ZIKV belong to the same viral family and are structurally similar, we observed differences in their infection profiles in cells of the C6/36 lineage. In the later period of DENV infection, we observed an intensification of the cytopathic effects, with reduction of actin filaments, formation of cell groups, and destruction of the monolayer. For ZIKV infection, we noticed the presence of numerous multinucleated cells. Thus, we found that the differences in the cytopathic effects vary according to the pathogen studied and the post-infection time.

**Key-words:** *Aedes aegypti*, dengue, Zika, viral infection, arbovirus, vector competence, viral load, cells, C6/36.

## LISTA DE ABREVIACÕES

A.	<i>Aedes</i>
C	Glicoproteína do capsídeo
CV	Competência vetorial
DENV	Vírus dengue
DPI	Dias após infecção
E	Glicoproteína do envelope
GS	Glândula salivar
H	Horas
IM	Intestino médio
L15	Meio Leibowitz
M	Glicoproteína de membrana
MEB	Barreira de escape do intestino médio
MIB	Barreira de infecção do intestino médio
ml	Mililitros
MP	Matriz peritrófica
PBS	Phosphate-buffered saline
PIE	Período de incubação extrínseca
PNS	Glicoproteína não estrutural
prM	Proteína precursora de membrana
RE	Retículo endoplasmático
SEB	Barreira de escape da glândula salivar
SFB	Soro fetal bovino
SIB	Barreira de infecção da glândula salivar
TTO	Transmissão Transovariana
TV	Transmissão Vertical
ZIKV	Vírus Zika
µL	Microlitros

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Ciclo de transmissão DENV e ZIKV. ....	14
<b>Figura 2:</b> Estágios do ciclo de vida do <i>Aedes aegypti</i> . ....	16
<b>Figura 3:</b> Morfologia da cabeça de <i>Aedes aegypti</i> – (A) fêmea; (B) macho. ....	17
<b>Figura 4:</b> Distribuição geográfica de <i>Aedes aegypti</i> e <i>Aedes albopictus</i> , principais vetores de dengue e Zika. ....	17
<b>Figura 5:</b> Estrutura viral – (A) Representação esquemática do envelope proteico viral; (B) Ilustração esquemática da disposição das proteínas estruturais. ....	19
<b>Figura 6:</b> Estrutura do genoma dos <i>Flavivirus</i> . ....	20
<b>Figura 7:</b> Ciclo de replicação de <i>Flavivirus</i> em células do mosquito vetor. ....	22
<b>Figura 8:</b> Etapas de uma infecção por <i>Flavivirus</i> em mosquito vetor. ....	24
<b>Figura 9:</b> Trato digestivo do mosquito <i>Aedes aegypti</i> . ....	24
<b>Figura 10:</b> Representação esquemática de uma infecção do IM permissiva, da MIB e MEB. ....	26
<b>Figura 11:</b> A glândula (GS) de fêmeas de <i>A. aegypti</i> . ....	27
<b>Figura 12:</b> Regiões administrativas da cidade de Belo Horizonte. ....	29
<b>Figura 13:</b> Infecção experimental. ....	31

## LISTA DE FOTOMICROGRAFIAS

- Fotomicrografia 1:** Células C6/36 não infectadas – (A) visão da monocamada celular por microscopia de luz de campo claro. (B) detalhes dos filopódios (setas) e dos núcleos celulares (azul) em microscopia confocal; vermelho: filamentos de actina. .... 59
- Fotomicrografia 2:** Imunomarcação de células C6/36 no 1º dia pós-infecção – (A) células não infectadas. (B) células infectadas por DENV. (C) células infectadas por ZIKV. Setas finas: células infectadas; setas cheias: filopódios; verde: vírus; azul: núcleos; vermelho: filamentos de actina..... 60
- Fotomicrografia 3:** Imunomarcação de células C6/36 no 2º dia pós-infecção – (A) células não infectadas; (B) células infectadas por DENV; (C) células infectadas por ZIKV. Setas finas: vírus no citoplasma celular; setas cheias pretas: vírus nos filopódios; asteriscos: células multinucleadas; setas cheias brancas: filopódios; verde: vírus; azul: núcleos; vermelho: filamentos de actina. .... 62
- Fotomicrografia 4:** Imunomarcação de células C6/36 no 3º dia pós-infecção – (A) células não infectadas; (B) células infectadas por DENV; (C) células infectadas por ZIKV. Setas finas: vírus no citoplasma celular; asteriscos: células multinucleadas; setas cheias brancas: filopódios; verde: vírus; azul: núcleos; vermelho: filamentos de actina..... 63
- Fotomicrografia 5:** Imunomarcação de células C6/36 no 4º dia pós-infecção – (A) células não infectadas; (B) células infectadas por DENV; (C) células infectadas por ZIKV. Setas finas: vírus no citoplasma celular; cabeças de seta: agrupamentos celulares; asteriscos: células multinucleadas; setas cheias brancas: filopódios; verde: vírus; azul: núcleos; vermelho: filamentos de actina. .... 65
- Fotomicrografia 6:** Imunomarcação de células C6/36 no 5º pós-infecção – (A) células não infectadas; (B) células infectadas por DENV; (C) células infectadas por ZIKV. Setas finas: vírus no citoplasma celular; cabeças de seta: agrupamentos celulares; setas cheias brancas: filopódios; verde: vírus; azul: núcleos; vermelho: filamentos de actina. .... 66
- Fotomicrografia 7:** Imunomarcação de células C6/36 no 6º dia pós-infecção – (A) células não infectadas; (B) células infectadas por DENV; (C) células infectadas por ZIKV. Setas finas: vírus no citoplasma celular; cabeças de seta: agrupamentos celulares; asteriscos: células multinucleadas; setas cheias brancas: filopódios; verde: vírus; azul: núcleos; vermelho: filamentos de actina. .... 68

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>12</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>12</b>
2.1 DENV e ZIKV .....	12
2.2 Vetor urbano .....	15
2.3 Estrutura viral .....	19
2.4 Ciclo viral .....	21
2.5 Competência vetorial .....	23
2.6 Intestino médio: sítio inicial da infecção .....	24
2.7 Glândula salivar .....	26
<b>3. MATERIAIS E METODOLOGIA.....</b>	<b>29</b>
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>35</b>
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>73</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>75</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As doenças negligenciadas afetam mais de um bilhão de pessoas por todo o mundo e geram um gasto econômico maior que um bilhão de dólares anualmente (WHO, 2021). Apesar de terem recebido um maior reconhecimento na última década, o número de óbitos ainda é alarmante (MOLYNEUX, 2013; WHO, 2021). Dengue e Zika são doenças virais que fazem parte desse grupo, são transmitidas por mosquitos vetores e possuem alta incidência em países tropicais como o Brasil (CARNEIRO, TRAVASSOS, 2016; WHO, 2021).

Apesar da importância médica e econômica das doenças dengue e Zika, muitos aspectos do ciclo de vida dos vírus (agentes etiológicos) nos mosquitos (hospedeiro invertebrado) continuam sem respostas. Nesse sentido, com o propósito de trazer informações com potencial de auxiliar nas estratégias de combate aos vírus e consequentemente reduzir os casos de ambas as doenças, propomos um estudo detalhado sobre a competência vetorial do *Aedes aegypti*, principal mosquito transmissor dos vírus dengue (DENV) e Zika (ZIKV) no Brasil, além da análise da cinética da infecção em nível celular utilizando-se células de cultura derivadas de vetor.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 DENV e ZIKV

Flaviviridae é uma família viral de grande importância para a saúde pública que compreende os gêneros *Flavivirus*, *Pestivirus* e *Hepacivirus* (SHOPE, MEEGAN, 1997; KUNO et al., 1998). *Flavivirus*, à qual pertence o DENV e o ZIKV, inclui mais de 70 tipos de vírus, a maioria sendo classificada como arbovírus devido à participação de um vetor artrópode no ciclo de transmissão (SHOPE, MEEGAN, 1997). DENV e ZIKV são os *Flavivirus* de maior importância médica, pois inúmeros casos de dengue e febre do Zika são registrados mundialmente a cada ano (LINDEBACH; RICE, 2007).

O DENV é um vírus de RNA, com orientação positiva, e envelopada. Ele apresenta um complexo formado por quatro sorotipos distintos, que são DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4. Todos os sorotipos podem ser encontrados em uma mesma região, o que aumenta o risco de múltiplas infecções, uma vez em que não há resposta imune cruzada entre os sorotipos (TAUIL, 2001; BENNET et al., 2002; LINDEBACH e RICE 2007; GONÇALVES et al., 2014). A dengue, resultante das infecções pelo DENV, possui

incidência mundial, com maior prevalência em regiões tropicais e subtropicais. Seus aspectos clínicos são caracterizados por sintomas que englobam estágio febril agudo, dor de cabeça, artralgia (dor nas articulações), mialgia (dor muscular), vermelhidão cutânea e dor retro-orbitária (dor nos olhos), podendo evoluir para a forma clínica severa, que por sua vez pode levar à morte (CDC 2021; WHO, 2021). Estima-se que mais de 390 milhões de casos sejam reportados anualmente. Em 2021 mais de um milhão de casos foram reportados apenas nas Américas.

No Brasil, acredita-se que os primeiros relatos de dengue ocorreram em meados do século XIX e início do século XX. Entretanto, a circulação do DENV só foi laboratorialmente confirmada em 1982, com o isolamento dos sorotipos DENV-1 e DENV-4, em Roraima. Posteriormente, no Rio de Janeiro foi isolado sorotipo DENV-2 e o primeiro registro de dengue hemorrágica. No ano de 2003, ainda no Rio de Janeiro, houve o isolamento do sorotipo DENV-3. Desde sua introdução no Brasil, a dispersão dos sorotipos do DENV ocorreu de forma rápida, causando epidemias em diversas regiões (IOC, 2020).

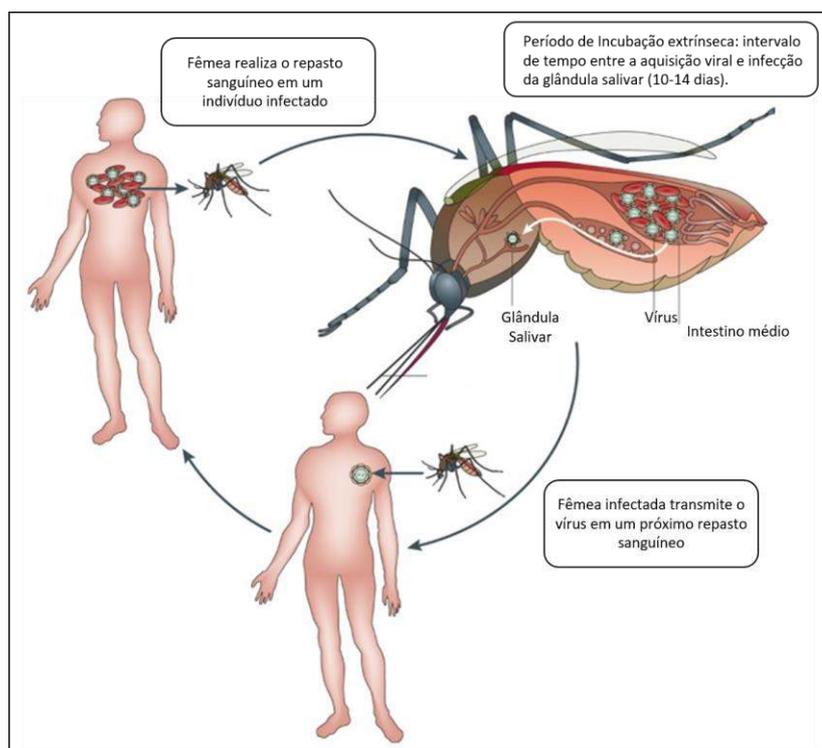
Similarmente ao DENV, o ZIKV é um vírus de RNA de senso positivo, envelopado. Ele possui duas linhagens principais que se diversificaram em novas sublinhagens, sendo a primeira originária do continente Africano e a outra do continente Asiático. Essa última é a responsável pela atual expansão viral pelo mundo (FAYE et al., 2014; BOYER et al., 2018). As manifestações clínicas da infecção por ZIKV incluem sintomas como febre, artralgia, vermelhidão cutânea, mialgia e dores de cabeça. Contudo, complicações mais severas como microcefalia e síndrome de *Guillain-Barré* podem ser desenvolvidas em decorrência da infecção (CDC 2019; WEAVER et al., 2016; WHO, 2019).

O primeiro isolamento do ZIKV foi realizado a partir do soro coletado de primatas não humanos, em 1947, na floresta Zika em Uganda. A identificação viral pioneira em vetores ocorreu em 1948, no qual ZIKV foi isolado a partir de indivíduos da espécie *Aedes africanus*. Por fim, o primeiro caso de infecção em humanos ocorreu em 1954, confirmado a partir da análise do soro de uma pessoa em estado febril (DUFFY et al., 2009). O primeiro registro de casos fora das regiões africana e asiática ocorreu em 2007, na Micronésia (DUFFY et al., 2009). Entre 2007 e 2013, não houve novos registros de infecção pelo ZIKV. O vírus reemergiu em 2013 e se disseminou rapidamente pela região das Américas, causando um surto de grande magnitude no Brasil em 2015. Há casos de

Zika reportados em mais de 80 países, e no período entre 2015-2018 mais de 800 mil casos foram notificados nas Américas (PAHO, 2019; CDC, 2019; WHO, 2021).

A principal forma de transmissão de DENV e ZIKV ocorre através da picada de fêmeas de *A. aegypti* infectadas. No Brasil, este é o principal vetor urbano e o *Aedes albopictus* é considerado vetor secundário (WONG et al., 2013; GUERBOIS et al., 2016; FERREIRA-DE-BRITO et al., 2016; AZAR et al., 2017; SMARTT et al., 2017). O ciclo de transmissão de viral se inicia quando fêmeas de *A. aegypti* realizam o repasto sanguíneo em um indivíduo infectado. Uma vez dentro do vetor, o vírus multiplica-se no intestino médio (IM), dissemina-se para órgãos secundários, e alcança a glândula salivar (GS), podendo ser transmitido em um próximo repasto sanguíneo (figura 1) (Guzman et al., 2016). Uma vez infectada, a fêmea é capaz de transmitir o vírus por toda sua vida.

**Figura 1:** Ciclo de transmissão DENV e ZIKV.



**Fonte:** Adaptado de Guzman et al., (2016).

Além da aquisição viral por meio do repasto sanguíneo, existem outras vias pelas quais os arbovírus circulam e se mantêm em populações vetoriais. Os mecanismos reconhecidos até o presente momento são: transmissão vertical (TV), que pode ocorrer por transmissão transovariana (TTO) e/ou transmissão *Trans-Egg*; e a transmissão venérea (LEQUIME; LAMBRECHTS, 2014). A TV consiste na transmissão de um

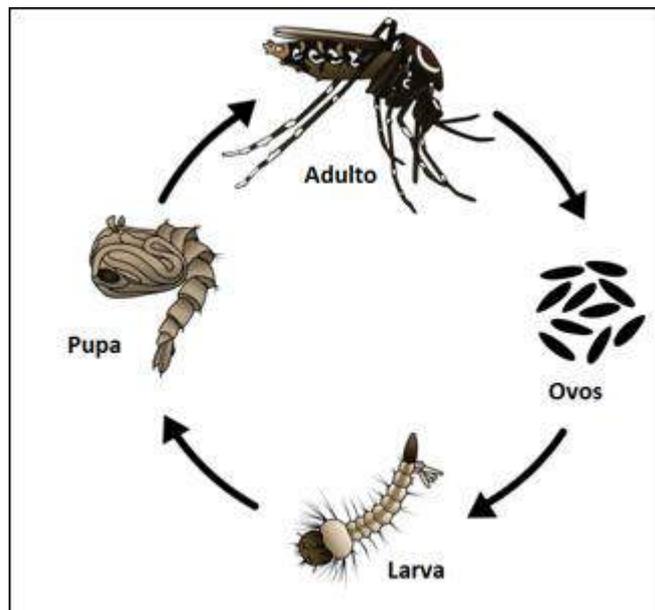
arbovírus de uma fêmea infectada à sua prole, independente do mecanismo. TTO ocorre quando o vírus é capaz de infectar os tecidos do ovário da fêmea e a transmissão Trans-Egg ocorre no momento da oviposição dos ovos já fertilizados (BOYER et al., 2018; LEQUIME; LAMBRECHTS, 2014). Por fim, a transmissão venérea ocorre quando um macho proveniente de uma prole de uma fêmea infectada transmite o vírus horizontalmente a outra fêmea no momento da cópula (BOYER et al., 2018; LEQUIME; LAMBRECHTS, 2014).

A mitigação de arboviroses consiste principalmente em estratégias direcionadas para o controle da população de mosquitos vetores, o que engloba o uso de inseticidas, controle e remoção de criadouros artificiais, e uso de telas protetoras em residências (ZARA et al., 2016; BEATY et al., 2010). Entretanto, a circulação de DENV e ZIKV continua ocorrendo e, nos frequentes episódios de surto, sobrecarregam as autoridades públicas. Com isto, atenta-se para a expansão do conhecimento sobre a interação arbovirus-vetor, visando o desenvolvimento de novos métodos de controle de arboviroses para complementar as estratégias já estabelecidas. A descoberta de intervenções que reduzam ou interrompam o ciclo viral no vetor seria um passo importante pois influenciaria diretamente a competência vetorial, assim contribuindo para a redução de casos de dengue e Zika (FRANZ et al., 2015).

## **2.2 Vetor urbano**

No Brasil, estudos de isolamento viral realizados em indivíduos de laboratório e coletados em campo apontam o mosquito *A. aegypti* como principal vetor urbano de dengue e Zika. Assim como todas as outras espécies de mosquitos (Diptera, Culicidae), os *A. aegypti* são insetos holometábolos por apresentarem formas imaturas morfológica e biologicamente distintas da adulta. Seu ciclo de vida passa pelas fases de ovo, larva (4 estádios ou instares), pupa e adulto em um período de 8 a 10 dias (Figura 2) (MARCONDES, 2001). Assim que os mosquitos adultos emergem, eles permanecem em repouso sobre a água para fortalecimento de seu exoesqueleto, e, após um período de 24 horas (h), já se encontram aptos para se alimentarem e reproduzirem (MARCONDES, 2001; TAVEIRA et al., 2001).

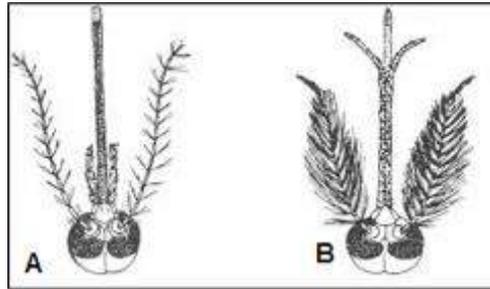
**Figura 2:** Estágios do ciclo de vida do *Aedes aegypti*.



**Fonte:** Adaptado de Fiocruz (2019) e CDC (2020).

Fêmeas e machos de *A. aegypti* são morfologicamente distintos. A diferenciação entre os sexos pode ser realizada analisando características morfológicas, como por exemplo, aparato bucal e antenas. As fêmeas possuem hábitos hematófagos primariamente antropofílicos, e a ingestão de sangue é fundamental para a maturação dos ovários. Por ingerir sangue, a fêmea possui aparelho bucal picador-sugador, necessário para a realização de repasto sanguíneo, enquanto os machos, que não se alimentam de sangue, possuem aparelho sugador, ideal para alimentação de néctar de plantas e frutas. Quanto às antenas, os machos possuem mais pelos em sua distribuição, conferindo um aspecto plumoso, enquanto as fêmeas apresentam antenas de aspecto piloso (Figura 3) (MARCONDES, 2001).

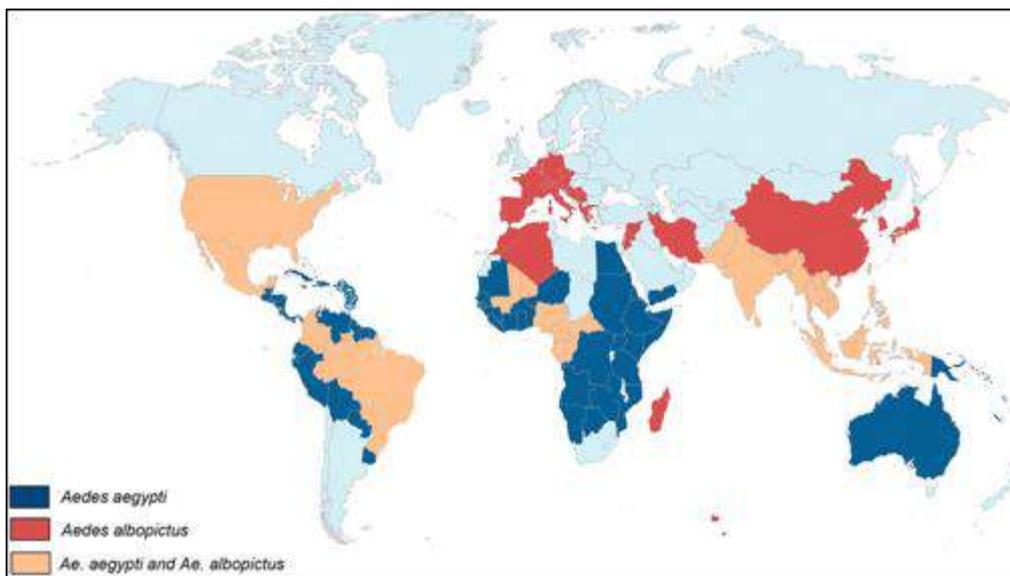
**Figura 3:** Morfologia da cabeça de *Aedes aegypti* – (A) fêmea; (B) macho.



**Fonte:** Adaptado de Eiras (2005).

O *A. aegypti* apresenta distribuição mundial (Figura 4), colonizando principalmente países de clima tropical, onde sua presença coincide diretamente com áreas de transmissão de dengue e Zika (MARCONDES, 2001; WHO, 2021). A espécie apresenta hábitos diurnos e tem preferência por ambientes domiciliares, sendo intimamente relacionado ao ser humano (MARCONDES, 2001). A manutenção de seu ciclo de vida depende diretamente de fatores ambientais. Condições como qualidade da água de criadouros impactam na sobrevivência das larvas e proliferação de adultos (MARCONDES, 2001).

**Figura 4:** Distribuição geográfica de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*, principais vetores de dengue e Zika.



**Fonte:** Houé et al. (2019).

A cópula pode ocorrer em locais isolados, quando há apenas um casal para realizar o acasalamento, ou em formação de enxames, onde há vários casais em áreas externas extensas. Após o acasalamento, as fêmeas armazenam os espermatozoides em espermatecas, onde o óvulo será fecundado somente em seu momento de passagem pelo oviduto (MARCONDES, 2001). A oviposição ocorre dentro de duas horas a partir do pôr do sol ou após o seu nascer (MARCONDES, 2001). Cada fêmea é capaz de ovipor até 200 ovos de até 1mm de comprimento. A partir do momento em que são depositados isoladamente em criadouros, passam por embriogênese, e após um período sua casca sofre alteração de cor e se tornam resistentes à dessecação. Os ovos são de diapausa facultativa, eclodindo rapidamente em contato com a água, mas permanecem viáveis enquanto passam por períodos de dessecação (MARCONDES, 2001).

Os locais de oviposição de *A. aegypti* são as paredes de qualquer material capaz de armazenar água e fonte de matéria orgânica. Os criadouros artificiais podem ser garrafas, pneus, latas, vasos de planta, caixas d'água. Porém, estes indivíduos apresentam adaptabilidade para se estabelecerem em outros locais como bromélias e esgoto a céu aberto de centros urbanos (BESERRA et al., 2009; MARCONDES, 2001).

Após a embriogênese dos ovos e sua maturação, as larvas rompem sua casca e saem para o meio aquático. Elas possuem o corpo alongado e de coloração esbranquiçada. O tempo do crescimento larval e o desenvolvimento de seus quatro estádios são condicionados por condições de seus criadouros, que devem oferecer bom suprimento alimentar e condições climáticas favoráveis para que elas cheguem à forma adulta (MARCONDES, 2001).

A longevidade dos adultos depende de fatores genéticos, das condições ambientais às quais estão expostos, da nutrição enquanto larvas e presença ou não de predadores naturais. Condições ambientais como umidade e temperatura elevadas tornam os adultos mais ativos, sendo essa última também um fator que estimula o repasto sanguíneo das fêmeas (TAVEIRA et al., 2001).

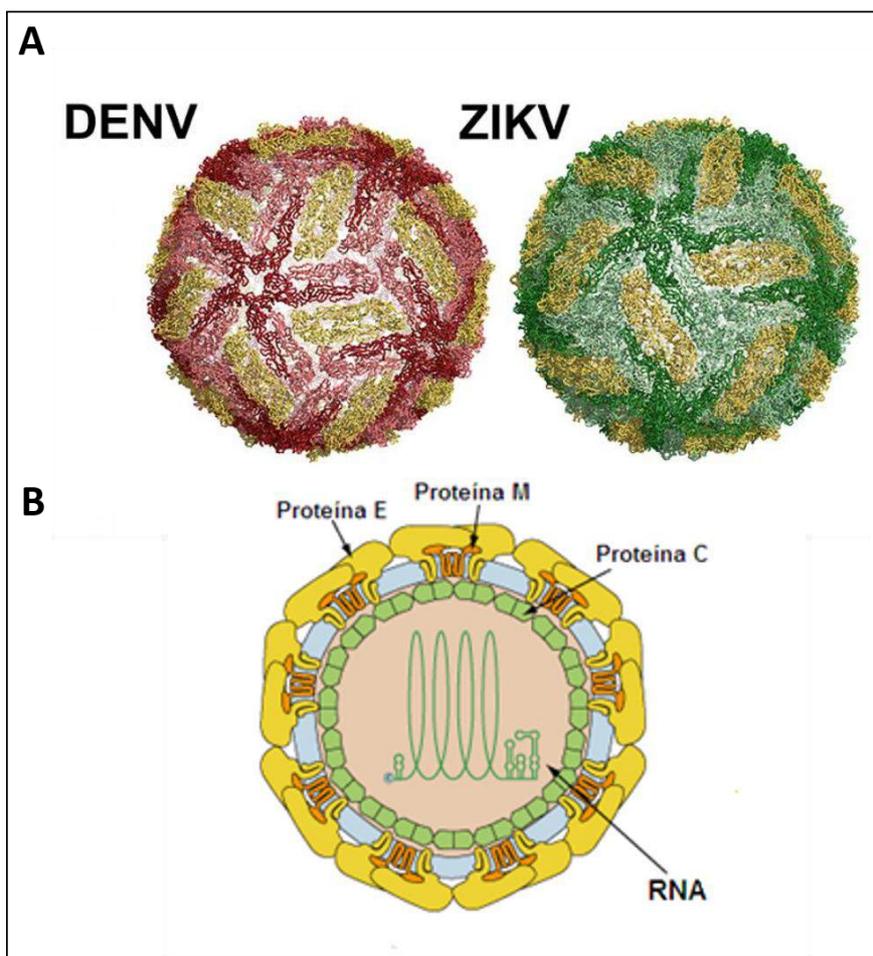
Normalmente, machos possuem uma sobrevida de poucos dias, enquanto fêmeas apresentam uma maior longevidade para que possam se reproduzir, havendo registros de fêmeas que sobreviveram por até 100 dias (MARCONDES, 2001). Ao longo do seu período de vida, as fêmeas são capazes de realizar diversas alimentações sanguíneas ao decorrer do dia, até estarem completamente ingurgitadas, o que aumenta

consideravelmente as chances de aquisição e transmissão de patógenos (TAVEIRA et al., 2001).

### 2.3 Estrutura viral

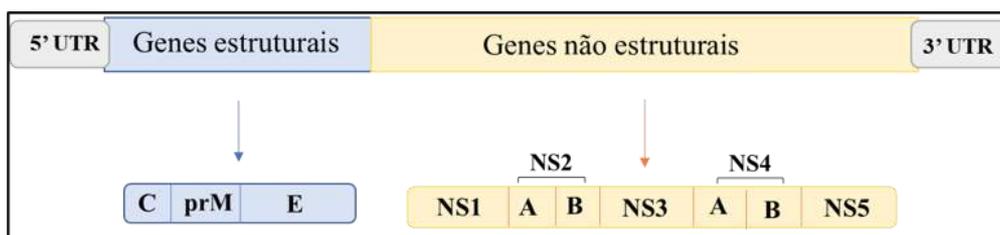
Os *Flavivirus*, como o DENV e o ZIKV, são pequenas partículas virais ( $\approx 50$  nm) cobertas por um envelope proteico de arranjo icosaédrico (Figura 5A - B). Seu material genético consiste em uma fita simples de RNA de orientação positiva, de 11kb, com regiões não codificantes nas extremidades 5' e 3', protegida por um capsídeo (LINDEBACH; THIEL; RICE., 2007; PIERSON, DIAMOND, 2012; PIERSON, KIELIAN, 2013). O material genético codifica uma proteína que posteriormente é clivada em três novas proteínas estruturais: as glicoproteínas do capsídeo (C), de membrana (M) e do envelope (E); e sete proteínas não estruturais (PNS) (Figura 6) [NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5] (LINDEBACH; THIEL; RICE, 2007; PIERSON, DIAMOND, 2012; PIERSON, KIELIAN, 2013).

**Figura 5:** Estrutura viral – (A) Representação esquemática do envelope proteico viral; (B) Ilustração esquemática da disposição das proteínas estruturais.



Fonte: Adaptado de Viral Zone (2018) e de UNC Health and UNC School of Medicine (2018).

**Figura 6:** Estrutura do genoma dos *Flavivirus*.



Fonte: A autora (2021).

A glicoproteína C é primariamente responsável pela estruturação do capsídeo, e a glicoproteína M atua na formação da membrana glicoprotéica viral. As partículas virais imaturas apresentam uma proteína precursora de membrana (prM), a qual na medida em que ocorre a maturação de novas partículas virais dentro da via secretora, o ambiente

ácido provoca mudanças conformacionais na prM, originando a glicoproteína M madura (LINDEBACH; THIEL; RICE., 2007).

A proteína do envelope (E) medeia a ligação do vírus às células e a fusão de membranas. Ela é composta por três domínios: domínio I ou central, responsável por conectar os demais domínios; domínio II, responsável pela dimerização e por apresentar o peptídeo de fusão; e o domínio III, região que interage com os receptores celulares (LINDEBACH; THIEL; RICE, 2007).

As PNS estão envolvidas em processos de replicação (NS1, NS2, NS4), síntese do RNA viral (NS5), evasão da resposta imune (NS2, NS4, NS5), atividade proteolítica (NS3) e montagem de partículas virais maduras (NS1). A NS1 é uma proteína altamente conservada entre os *Flavivirus* que participa da formação do complexo replicativo. Ela também está envolvida na evasão da resposta imune. Quando encontrada associada a regiões do retículo endoplasmático (RE), pode ser transportada para outros domínios celulares, ou para a via secretora. NS2A e NS2B são proteínas transmembrana relacionadas à montagem e replicação viral no RE. Acredita-se que também estejam relacionadas à permeabilização de membranas, disseminação viral no hospedeiro invertebrado e à inibição do sistema imune. Já a NS3, uma das maiores proteínas codificadas pelo genoma viral, possui dois domínios. O primeiro interage com a NS2B, formando um complexo proteolítico que cliva as proteínas virais; e o segundo possui atividade de helicase, estando envolvido no processo de replicação viral. A NS4A e a NS4B atuam no processo de replicação viral, estabilizando RNAs de fita dupla e realizando mudanças conformacionais na membrana do RE. Elas modulam a resposta imune, inibindo a via de sinalização JAK/STAT. Por fim, a NS5 possui um domínio C-terminal com atividade de polimerase, sendo responsável pela replicação do RNA viral; e um domínio N-terminal com atividade de metiltransferase, a qual sintetiza o Cap localizado na porção 5' do genoma viral. A presença do Cap mimetiza o RNA do hospedeiro, auxiliando as partículas virais a escaparem da resposta imunológica. (LINDEBACH; THIEL; RICE., 2006; SILVA, 2019).

## 2.4 Ciclo viral

O ciclo viral é dependente de mecanismos celulares intrínsecos do hospedeiro. As partículas virais provenientes de um repasto sanguíneo infectante devem invadir as células, replicarem-se e disseminarem-se no interior do vetor. A entrada dos vírus nas

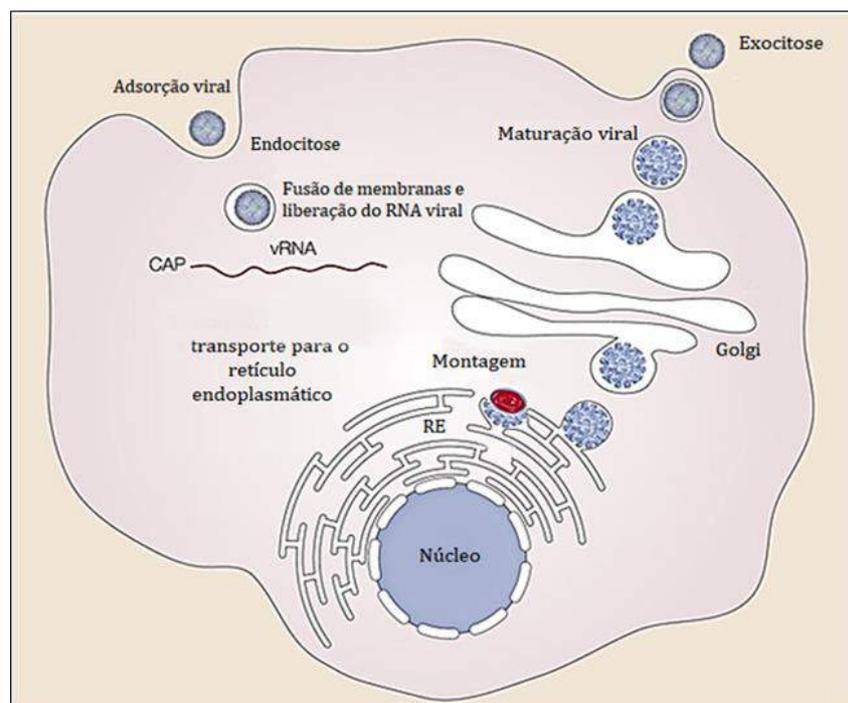
células ocorre em três etapas. Na primeira, a partícula viral se encontra aderida à membrana plasmática da célula hospedeira. Na segunda etapa, as partículas virais são internalizadas por meio de endocitose e, na terceira, a partícula viral penetra no citoplasma da célula hospedeira (HASE, SUMMERS, ECKELS, 1988).

O ciclo de DENV e ZIKV no *A. aegypti* (Figura 7) inicia-se com a interação entre o domínio III da proteína E com os receptores da célula hospedeira. Em seguida, as partículas virais penetram nas células do intestino médio por endocitose mediada por clatrina. O baixo pH das vesículas endocíticas induz a fusão entre o envelope viral e a membrana da vesícula, liberando o nucleocapsídeo no citoplasma (LINDEBACH; THIEL; RICE., 2006). O vírus é transportado pela via endocítica passando por endossomos iniciais, endossomos tardios e lisossomos. Esse processo envolve a participação de microtúbulos e microfilamentos, ocasionando interferências na dinâmica do citoesqueleto das células infectadas (LINDEBACH; THIEL; RICE., 2006; MOSSO et al., 2008).

Assim que o nucleocapsídeo chega ao citoplasma da célula hospedeira, ele dissocia-se e libera o RNA genômico. Essa liberação ocorre com mais frequência próximo ao RE, onde o RNA é traduzido em uma poliproteína viral. A poliproteína é clivada por proteases virais e celulares, originando múltiplas proteínas funcionais. As proteínas não estruturais estão envolvidas no processo de transcrição do genoma, replicação e processamento de proteínas, e os novos RNAs sintetizados interagem com as proteínas estruturais, originando novas partículas virais imaturas (LINDEBACH; THIEL; RICE., 2006).

Tais partículas são transportadas para o complexo de Golgi, onde ocorre a clivagem da prM, originando a proteína M. Após esse processo, as partículas virais tornam-se maduras e finalmente são liberadas pelo sistema de transporte do complexo de Golgi, onde se encontram livres para infectar novas células (LINDEBACH; THIEL; RICE., 2006).

**Figura 7:** Ciclo de replicação de *Flavivirus* em células do mosquito vetor.



**Fonte:** Adaptado de Mukhopadhyay e Kuhn (2005).

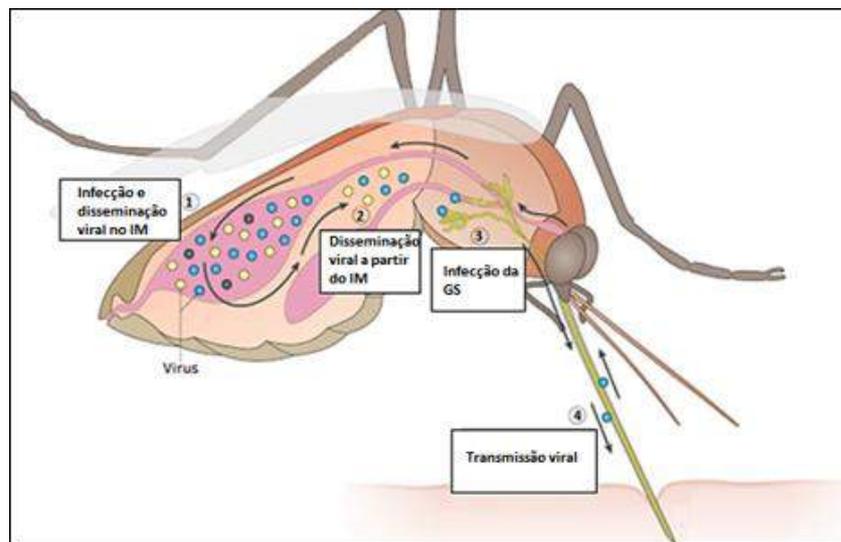
Apesar da importância do entendimento dos mecanismos de entrada dos flavivírus nas células dos vetores e início do processo de replicação e disseminação viral, a identificação e o papel desempenhado pelos fatores celulares envolvidos nesses processos são pouco compreendidos.

## 2.5 Competência vetorial

A Competência vetorial (CV) é definida como a proporção de mosquitos nos quais o vírus pode completar seu ciclo de vida, ou seja, é a permissividade intrínseca de um vetor para infecção, replicação e transmissão de um patógeno (GONÇALVES et al., 2014; HARDY et al., 1983).

A eficácia de uma infecção no mosquito vetor depende do sucesso das seguintes etapas consecutivas (Figura 8): a) infecção inicial no intestino médio (IM); b) disseminação da infecção no IM; c) disseminação a partir do IM para tecidos secundários; c) amplificação viral em outros tecidos fora do IM; d) infecção das glândulas salivares (GS) e finalmente; e) transporte viral para os ductos das GS, de onde as partículas virais podem ser transmitidas ao hospedeiro vertebrado em um próximo repasto sanguíneo (HARDY et al., 1983; FRANZ et al., 2015; BLACK et al., 2002).

**Figura 8:** Etapas de uma infecção por *Flavivirus* em mosquito vetor.



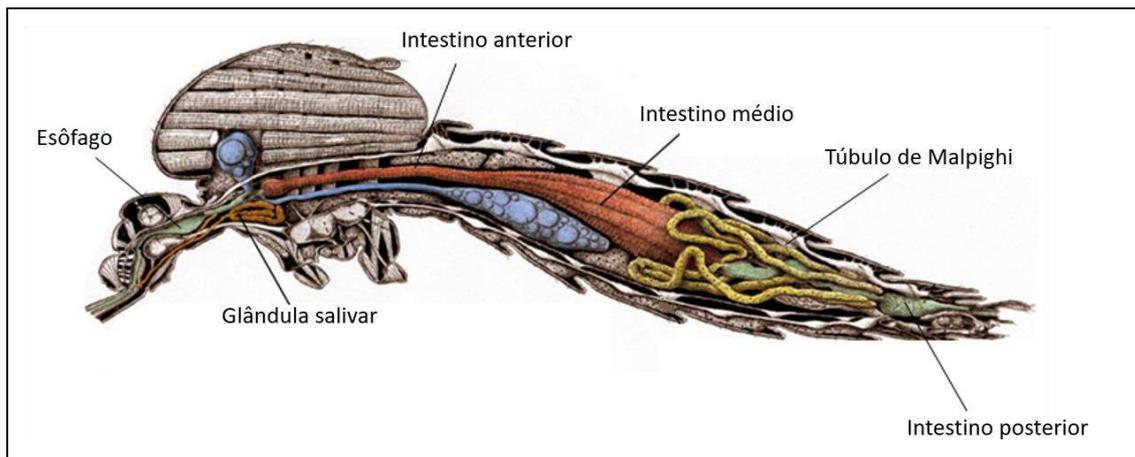
**Fonte:** Adaptado de Weaver et al. (2021).

As barreiras naturais do vetor, como a matriz peritrófica, barreira de infecção e escape do IM e da GS juntamente com fatores intrínsecos e extrínsecos (abióticos) podem influenciar o estabelecimento da infecção arboviral (FRANZ et al., 2015; KRAMER; CIOTA, 2015). Os fatores intrínsecos compreendem as respostas imunes do vetor, a microbiota e processos celulares, como a autofagia e o estresse oxidativo (HARDY et al., 1983; FRANZ et al., 2015; GLORIA-SORIA et al., 2017; VILLEGAS et al., 2018). Já os fatores extrínsecos englobam as condições ambientais, a longevidade do vetor, sua densidade populacional e seu contato com hospedeiros vertebrados. Juntamente com as barreiras naturais, ambos fatores modulam a habilidade do vetor de se infectar e determinam seu perfil de infecção (HARDY et al., 1983; KRAMER; CIOTA, 2015).

## 2.6 Intestino médio: sítio inicial da infecção

O tubo digestivo do vetor pode ser dividido em três regiões (Figura 9): a) parte inicial do trato digestivo ou intestino anterior (*foregut*), que se estende a partir da boca e inclui o esôfago e a faringe; b) parte mediana do trato digestivo ou intestino médio (IM) (*midgut*); e c) parte final do trato digestivo ou intestino posterior (*hindgut*), que se estende a partir do IM até o ânus (DONG et al., 2017; FRANZ et al., 2015).

**Figura 9:** Trato digestivo do mosquito *Aedes aegypti*.



**Fonte:** Adaptado por Paulo Pimenta de Jobling (1987).

O IM é responsável por quase a totalidade da digestão dos mosquitos e, por sua vez, se divide em duas porções, anterior e posterior. A digestão do sangue ocorre na porção posterior do IM das fêmeas, onde, devido à presença sanguínea, os núcleos das células epiteliais sofrem condensação e as mitocôndrias aumentam de tamanho (HARDY et al., 1983; FRANZ et al., 2015).

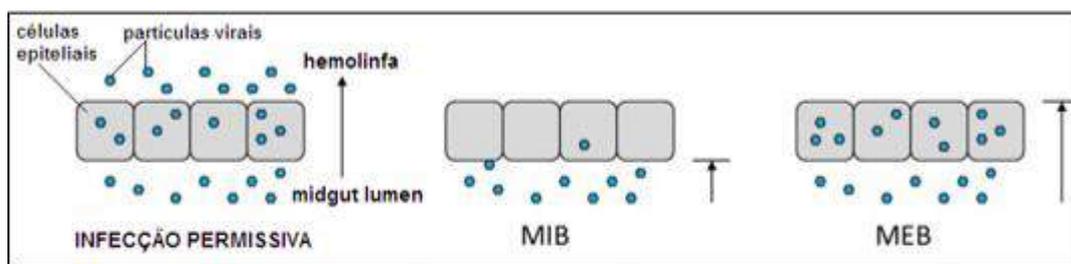
Após o repasto sanguíneo infectante, as maiorias das partículas virais penetram e infectam as células epiteliais do IM das fêmeas antes da formação uma membrana acelular em torno do bolo alimentar, denominada matriz peritrófica (MP) (FRANZ et al., 2015; BLACK et al., 2002). A MP é formada por quitina e proteínas e tem papel de isolar o alimento do epitélio do intestino médio, protegendo-o contra microrganismos. Em *A. aegypti*, a formação da MP ocorre cerca de 4-8 h após o repasto sanguíneo (FRANZ et al., 2015; BOLOGNESI, 2005).

O processo de infecção individual das células epiteliais ocorre através de ligações que os arbovírus estabelecem com receptores localizados na membrana celular, com subsequente remoção do revestimento viral e penetração na célula (HARDY et al., 1983). Após o estabelecimento da infecção, acontece a replicação intracelular do vírus seguida pela transcrição e tradução do genoma viral, culminando na maturação dos novos vírus.

O organismo do mosquito apresenta duas principais barreiras para impedir a infecção (FRANZ et al., 2015; BLACK et al., 2002). A primeira, chamada de barreira de infecção do IM (MIB), está associada à incapacidade dos vírus de infectar e se disseminar nas células epiteliais do IM (Figura 10). Tal fato pode ocorrer por falta de receptores para o vírus na superfície celular, ou ausência de permissividade das células à infecção (BENNETT et al., 2002). A formação da MP, a resposta imune do vetor, e a interação

com a microbiota intestinal contribuem para a MIB (FRANZ et al., 2015; KRAMER; CIOTA, 2015). A segunda barreira é a de escape do intestino médio (MEB), a qual, por sua vez, está associada à ineficiência do arbovírus de escapar das células epiteliais do IM e infectar outros órgãos (Figura 10) (BLACK et al., 2002).

**Figura 10:** Representação esquemática de uma infecção do IM permissiva, da MIB e MEB.



**Fonte:** Adaptado de Franz et al. (2015).

A partir do momento em que o vírus atravessa as barreiras iniciais, ocorre sua disseminação para tecidos secundários como corpo gorduroso, tecido nervoso, órgãos reprodutivos e GS. Uma vez que a GS é infectada, os vírus podem ser transmitidos a um hospedeiro vertebrado em um próximo repasto sanguíneo (HARDY et al., 1983; DONG et al., 2017).

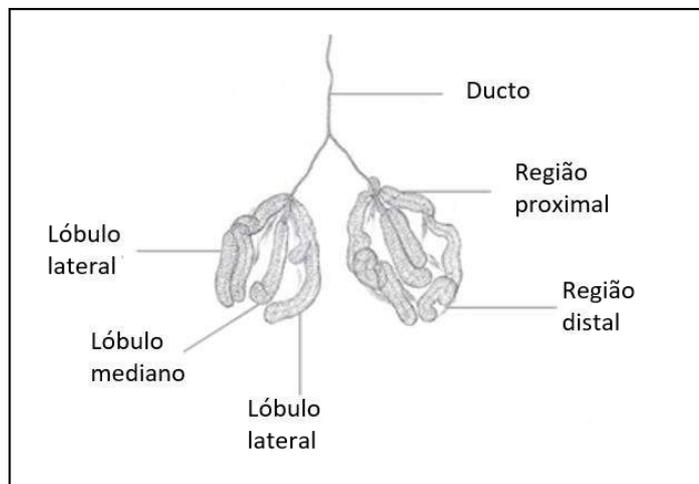
## 2.7 Glândula salivar

A glândula salivar (GS) dos mosquitos está diretamente relacionada à transmissão de doenças, uma vez que se configura como uma via pela qual o patógeno é capaz de deixar o corpo do vetor e se estabelecer em um hospedeiro durante o repasto sanguíneo (SNODGRASS, 1959). Ela é um órgão par, localizado no tórax, próximo à região anterior do ventrículo dorsal. Cada GS é formada por dois lobos constituído por três lóbulos que são divididos em dois laterais e um mediano (Figura 11). Os lobos e os lóbulos são conectados ductos que se conectam a um ducto salivar principal (SNODGRASS, 1959).

Os lóbulos laterais são divididos em regiões distais e proximais. A região proximal está envolvida com a secreção de enzimas típicas da alimentação à base de açúcar, enquanto a região distal produz enzimas relacionadas ao repasto sanguíneo. Os lóbulos medianos não possuem região distal sendo formado somente pelas regiões proximais. A

infecção arboviral nas GS normalmente se inicia na região distal dos lóbulos (HARDY et al., 1983).

**Figura 11:** A glândula (GS) de fêmeas de *A. aegypti*.



**Fonte:** Adaptado de Vega-Rua et al., (2015).

Inicialmente, os arbovírus atravessam a lâmina basal que reveste a GS para infectar as células, onde posteriormente atingirão o lúmen, e serão finalmente aptos à transmissão durante o próximo repasto sanguíneo (HARDY et al., 1983). A infecção das GS, assim como do IM, passa por barreiras contra a infecção e disseminação viral. A barreira de infecção da glândula salivar (SIB) previne a ocorrência de replicação viral e infecção dos lobos, enquanto a barreira de escape da glândula salivar (SEB) impede o posterior deslocamento viral para o lúmen dos ductos (HARDY et al., 1983).

Algumas substâncias são injetadas junto com a saliva durante o repasto no hospedeiro vertebrado. Estas possuem componentes anti-hemostáticos e capazes de aumentar a capacidade de replicação viral. Já as proteínas próprias da saliva exercem atividades vasodilatadoras e anticoagulantes, como forma de maximizar a qualidade e eficiência do repasto sanguíneo (KRAMER; CIOTA, 2015).

Como visto anteriormente, as interações patógeno-vetor refletem diretamente na competência vetorial para a transmissão de DENV e ZIKV. Tem sido demonstrado que a susceptibilidade do *A. aegypti* à infecção e transmissão de ambos os arbovírus exibe uma variação em indivíduos de populações distintas (GONÇALVES et al., 2014). Unindo isso ao fato de que este vetor é altamente adaptado à convivência em áreas urbanas, expondo os seres humanos a constantes riscos, é importante determinar o nível de influência da

variabilidade entre subpopulações de indivíduos na competência vetorial de *A. aegypti* provenientes de áreas com alta incidência de casos de dengue e Zika.

Em relação a infecção viral no vetor, após um repasto sanguíneo infectante, o intestino médio é o primeiro órgão invadido pelo patógeno. Para prosseguir com a invasão, o vírus precisa escapar da MIB e MEB do IM, a fim de se disseminar até a hemocele e alcançar os órgãos secundários, como a GS. Esta desempenha um papel fundamental na competência vetorial, uma vez que está diretamente envolvida na transmissão do vírus ao hospedeiro vertebrado.

Por fim, conhecer a estrutura e morfologia celular e possíveis alterações decorrentes da infecção torna-se crucial para uma melhor compreensão das interações vetor-patógeno. Dados obtidos a partir deste estudo tem potencial de contribuir futuramente para o estabelecimento de novas estratégias de redução da circulação de *Flavivirus* como o DENV e o ZIKV em seus hospedeiros invertebrados.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Avaliar os efeitos da infecção de distintas populações *A. aegypti* por DENV e ZIKV, analisando sua competência vetorial e carga viral nas infecções iniciais e tardias; e descrever comparativamente as modificações morfofuncionais resultantes da entrada e disseminação de ambos os vírus em infecções *in vitro* de linhagem celular C6/36.

### **2.2 Objetivos específicos**

Quanto à avaliação da competência vetorial em diferentes populações de *A. aegypti*:

- a) Reconhecer o perfil de infecção por DENV e ZIKV em diferentes populações de *A. aegypti* de Belo Horizonte, uma cidade endêmica;
- b) Determinar as taxas de infecção disseminada e a competência vetorial dessas populações de *A. aegypti* para a transmissão de DENV e ZIKV;
- c) Determinar a carga viral no corpo e na cabeça de *A. aegypti* durante as infecções iniciais (7 dpi) e tardias (14 dpi).

Quanto à infecção e replicação viral em linhagem celular C6/36:

- a) Analisar comparativamente a cinética da infecção *in vitro* de células em cultivo pelo DENV e ZIKV através da microscopia confocal.

- b) Identificar e comparar a distribuição intracelular dos dois arbovírus durante o processo de infecção.
- c) Averiguar possíveis alterações no citoesqueleto das células infectadas pelo dois arbovírus.

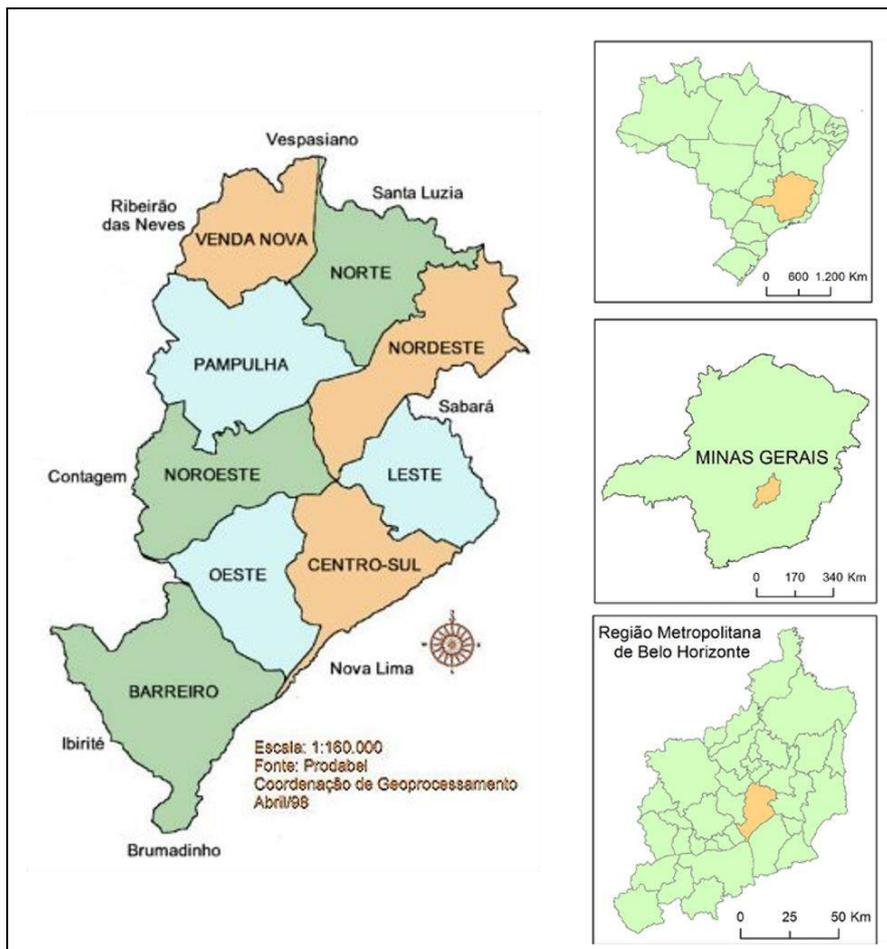
### **3 MATERIAIS E METODOLOGIA**

#### **3.1 Avaliação da competência vetorial de diferentes subpopulações de *A. aegypti***

##### **3.1.1 Áreas de estudo**

O estudo de competência vetorial foi conduzido na cidade de Belo Horizonte, capital de Minas Gerais, região endêmica para as doenças dengue e Zika. A cidade é dividida em nove regiões administrativas (Figura 12), que são: Norte, Noroeste, Nordeste, Leste, Oeste, Centro-Sul, Venda- Nova, Barreiro e Pampulha (PBH, 2019). Para a realização deste estudo comparativo, ovos dos mosquitos foram coletados de cada uma das nove regionais supracitadas.

**Figura 12:** Regiões administrativas da cidade de Belo Horizonte.



Fonte: Adaptado de PBH., (2021).

### 3.1.2 Manutenção da colônia de *A. aegypti*

Amostras de ovos que são regularmente coletadas em campo pelo Serviço de Vigilância do estado com a finalidade de controle dos vetores foram transferidas para o insetário do Laboratório de Entomologia Médica do Instituto René Rachou e mantidos até atingirem a fase adulta. Após a eclosão dos ovos, as larvas foram alimentadas com ração para peixes e as pupas foram transferidas para gaiolas até o nascimento das formas adultas. Estas foram mantidas em ambiente controlado, com temperatura de 28°C, umidade relativa do ar de 80%, fotoperíodo de 12 h e alimentadas com solução de glicose a 10% (BEPA, 2016).

### 3.1.3 Cepa viral e multiplicação viral em células C6/36

Para os experimentos de infecção experimental com DENV e ZIKV foram utilizadas as cepas DENV-2/SPH e ZikaSPH, respectivamente. Ambos os vírus foram replicados em células C6/36 (*A. albopictus*). Estas foram cultivadas em meio Leibowitz

(L15) contendo 5% de soro fetal bovino (SFB), 100 UI/ml de penicilina e 20µg/ml de gentamicina em incubadora B.O.D à 28°C.

### 3.1.4 Infecção experimental

Para os experimentos de infecção com DENV e ZIKV, 250 fêmeas de cada regional administrativa foram submetidas ao repasto sanguíneo infectante. Foi utilizado um sistema artificial de alimentação que simula a temperatura de um hospedeiro vertebrado, no qual pequenos recipientes de vidro (alimentadores) são aquecidos por banho maria (Figura 13). Cada alimentador foi revestido com parafilme e preenchido com uma mistura de 2/3 de sangue de camundongo (*Mus musculus*) com o plasma previamente inativado e 1/3 do sobrenadante de células C6/36 infectadas com DENV e ZIKV de título viral  $1 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub>/mL (vírus recém cultivados).

**Figura 13:** Infecção experimental.



**Fonte:** A autora (2022).

O tempo de repasto foi de 30min. Ao término do processo de alimentação, as fêmeas não alimentadas foram retiradas das gaiolas por aspiração manual. As fêmeas ingurgitadas foram mantidas no infectório a 28°C e alimentadas diariamente com solução açucarada a 10% por um período de 14 dias após a infecção (dpi) As etapas de infecção e manutenção dos mosquitos infectados foram realizadas seguindo normas internacionais de segurança e executadas dentro do infectório.

### 3.1.5 Dissecção

Para a análise das taxas de infecção, infecção disseminada e competência vetorial, 10 fêmeas de cada regional administrativa foram dissecadas nos períodos de 7 e 14dpi.

Para isso, as fêmeas foram anestesiadas no freezer (-20°C) por 5 minutos e transferidas para uma placa de Petri contendo tampão fosfato-salino (Phosphate-buffered saline – PBS) alocada sobre o gelo. As fêmeas foram colocadas em lâminas, e dissecadas com o auxílio de um microscópio estereoscópio (Zeiss - Stemi DV4) e estiletes. A dissecação foi realizada a partir da separação do corpo e da cabeça contendo as glândulas salivares. As amostras obtidas foram estocadas individualmente em tubos de 1,5 mL DNase/RNase free devidamente identificados e acondicionadas no freezer -70°C.

### **3.1.6 Extração de RNA viral**

As amostras foram maceradas em 200µL (microlitros) de PBS com auxílio de pistilo plástico e macerador Pellet Pestle® Motor (Sigma-Aldrich®, Saint Louis, Missouri), seguido de centrifugação por 15s (pode colocar 15s e em todos segundos) a 8.000 rpm. 140µL do sobrenadante foi processado para extração do RNA viral com a utilização do QIAamp® Viral RNA mini Kit (Qiagen®, Venlo, Limburgo). Em novos tubos, foi adicionado o sobrenadante e 560µL da mistura de tampão AVL+RNA carreador. As amostras foram vortexadas por 15seg e incubadas por 10min à temperatura ambiente. Adicionou-se 560µL de etanol (96-100%) e as amostras foram vortexadas novamente.

A solução anterior foi transferida para um tubo com coluna de mini spin e centrifugadas à 8000 rpm por 1min, descartando o líquido filtrado. Após filtragem de todo o conteúdo, as colunas contendo os RNAs foram transferidas para novos tubos coletores, adicionando em seguida, 500µL do tampão AW1 e centrifugando novamente por 1 min à 8000 rpm.

O líquido filtrado foi descartado e as colunas foram transferidas a novos tubos coletores. Adicionou-se 500µL de tampão AW2, e as colunas foram centrifugadas por 3 min à 14000 rpm. Os tubos coletores foram descartados e as colunas transferidas para tubos do tipo Eppendorf de 1,5mL, devidamente identificados. Em seguida, 60µL de tampão AVE foram adicionados a cada tubo, e o material foi centrifugado a 8000 rpm durante 1 min para eluição do RNA.

### **3.1.7 RT-PCR**

A presença de cópias virais foi detectada por meio de RT-PCR, utilizando o equipamento 7500 Fast Real Time PCR (Applied Biosystems) e kit the TaqMan™ Fast

Virus 1-Step (Thermo Fisher Scientific®). Todas as análises foram realizadas em duplicatas, com curva padrão, controle positivo e negativo.

### **3.1.8 Análise estatística**

Os dados foram analisados utilizando o programa GraphPad Prism 7.0. Testes Mann-Whitney foram utilizados para avaliar diferenças significativas em relação à mediana de cópias virais obtidas para as diferentes populações. Testes ANOVA Two-Way e Teste de Tukey foram utilizados para comparar as taxas de IR, DIR e CV em 7dpi e 14dpi. A carga viral no corpo e cabeça dos mosquitos foi avaliada utilizando os testes Kruskal-Wallis e ANOVA One-Way. Valores onde  $P < 0.05$  foram considerados significativos.

## **3.2 Análise morfofuncional de células C6/36 infectadas**

### **3.2.1 Cultivo celular e infecção com DENV-2 e ZIKV**

Células C6/36 foram cultivadas em meio L15 contendo 5% de SFB, 100 UI/ml de penicilina e 20µg/ml de gentamicina em incubadora B.O.D (do inglês “Biochemical Oxygen Demand”) à 28°C até atingirem confluência de 70 - 80%. A monocamada foi lavada 2x com PBS, seguida pela adição de meio L15 + antibióticos. Em seguida, os vírus (DENV ou ZIKV) foram inoculados à monocamada e incubados por 2h em estufa B.O.D. Após, adicionou-se 2% de SFB. A titulação viral foi calculada pelo método TCID<sub>50</sub>. Em 5 dpi, alíquotas do sobrenadante celular foram coletadas e a presença viral foi detectada por meio de qPCR, conforme descrito anteriormente.

### **3.2.2 Cultivo celular em placas de 24 poços**

Células C6/36 naive foram suspensas utilizando tripsina 0,25% e contadas em câmara de Neubauer. Posteriormente,  $1 \times 10^5$  células foram transferidas para lamínulas aderidas ao fundo de placas de 24 poços. As monocamadas foram cultivadas em meio L15 com SFB a 5% e 100 UI/ml de penicilina e 20µg/ml de gentamicina em incubadora B.O.D à 28°C por 24h. As amostras foram lavadas 2x com PBS 1x, seguido pela adição de meio L15 + antibióticos. Para a infecção, foi adicionado 1/3 parte do sobrenadante de células infectadas (DENV ou ZIKV) de título viral  $1 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub>/mL e 2/3 de meio L15 + antibióticos. As células foram mantidas em estufa B.O.D por 2h e após esse período,

acrescentou-se 2% de SFB. As células foram mantidas em cultura e coletadas até o sexto dia após infecção.

### **3.2.3 Imunofluorescência**

As lamínulas contendo as culturas das células C6/36 foram coletadas e fixadas em paraformaldeído 4% + tampão Zamboni por 35 minutos. Em seguida, o material foi lavado 5 vezes em PBS e tratado 3 vezes em PBST (1% Triton X-100 em PBS) por 20 minutos. O material foi lavado novamente e incubado *overnight* com o anticorpo primário anti-flavívirus (1:80) (mouse monoclonal D1-4G2-4-15, Merck Millipore). No dia seguinte, o material foi lavado em PBST e incubado por 3h com anticorpo secundário conjugado com FITC (anti-mouse Alexa fluor 488, 1:200, Thermo-Fisher), seguido de nova lavagem e incubação com o marcador de componentes do citoesqueleto por 20 minutos (Phalloidin - Alexa Fluor 546, 1:100, Thermo Fisher Scientific). Por fim, o material foi incubado com marcador nuclear TOPRO-3 (1:1000, Thermo-Fisher) por 30 minutos e montado em lâminas de microscopia com meio de montagem Mowiol. As amostras foram visualizadas, analisadas e fotografadas em microscópio Zeiss LSM 510 META.

## 4 RESULTADOS

## PLOS NEGLECTED TROPICAL DISEASES

## RESEARCH ARTICLE

## Dengue and Zika virus infection patterns vary among *Aedes aegypti* field populations from Belo Horizonte, a Brazilian endemic city

Raquel Soares Maia Godoy<sup>1</sup> , Luiza dos Santos Felix<sup>1,2</sup> , Alessandra da Silva Orfanó<sup>1</sup>, Bárbara Aparecida Chaves<sup>3,4</sup> , Paula Monalisa Nogueira<sup>1</sup>, Breno dos Anjos Costa<sup>1,5</sup>, Aline Silva Soares<sup>1,2</sup>, Cinthia Catharina Azevedo Oliveira<sup>1</sup> , Rafael Nacif-Pimenta<sup>1</sup>, Breno Mello Silva<sup>6</sup> , Ana Paula Duarte<sup>3,4</sup>, Marcus Vinicius Guimarães de Lacerda<sup>3,4,7</sup> , Wuelton Marcelo Monteiro<sup>3,4</sup>, Nágila Francinete Costa Secundino<sup>1,3,4</sup> , Paulo Filemon Paolucci Pimenta<sup>1,2,3,4</sup> 

**1** Instituto de Pesquisas René Rachou, FIOCRUZ, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, **2** Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, **3** Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, Manaus, Amazonas, Brazil, **4** Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brazil, **5** Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, FIOCRUZ, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, **6** Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais, Brazil, **7** Instituto Leônidas e Maria Deane, FIOCRUZ, Manaus, Amazonas, Brazil

 These authors contributed equally to this work.

\* [pfppimenta@gmail.com](mailto:pfppimenta@gmail.com)



### OPEN ACCESS

**Citation:** Godoy RSM, Felix LdS, Orfanó AdS, Chaves BA, Nogueira PM, Costa BdA, et al. (2021) Dengue and Zika virus infection patterns vary among *Aedes aegypti* field populations from Belo Horizonte, a Brazilian endemic city. *PLoS Negl Trop Dis* 15(11): e0009839. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009839>

**Editor:** Ran Wang, Beijing Children's Hospital, Capital Medical University, CHINA

**Received:** January 31, 2021

**Accepted:** September 24, 2021

**Published:** November 2, 2021

**Copyright:** © 2021 Godoy et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the manuscript and its [Supporting Information files](#).

**Funding:** The authors received no specific funding for this work.

**Competing interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

### Abstract

Dengue virus (DENV) and Zika virus (ZIKV) belong to the same viral family, the Flaviviridae. They cause recurring threats to the public health systems of tropical countries such as Brazil. The primary Brazilian vector of both viruses is the mosquito *Aedes aegypti*. After the mosquito ingests a blood meal from an infected person, the viruses infect and replicate in the midgut, disseminate to secondary tissues and reach the salivary gland (SG), where they are ready to be transmitted to a vertebrate host. It is thought that the intrinsic discrepancies among mosquitoes could affect their ability to deal with viral infections. This study confirms that the DENV and ZIKV infection patterns of nine *Ae. aegypti* field populations found in geographically separate health districts of an endemic Brazilian city vary. We analyzed the infection rate, disseminated infection, vector competence, and viral load through quantitative PCR. Mosquitoes were challenged using the membrane-feeding assay technique and were tested seven and fourteen days post-infection (early and late infection phases, respectively). The infection responses varied among the *Ae. aegypti* populations for both flaviviruses in the two infection phases. There was no similarity between DENV and ZIKV vector competencies or viral loads. According to the results of our study, the risk of viral transmission overtime after infection either increases or remains unaltered in ZIKV infected vectors. However, the risk may increase, decrease, or remain unaltered in DENV-infected vectors depending on the mosquito population. For both flaviviruses, the viral load persisted in the body even until the late infection phase. In contrast to DENV, the ZIKV accumulated in the SG over time in all the mosquito populations. These findings are novel and may help direct the development of control strategies to fight dengue and Zika outbreaks in endemic

regions, and provide a warning about the importance of understanding mosquito responses to arboviral infections.

### Author summary

Dengue and Zika are neglected diseases caused by viruses transmitted to humans by mosquitoes (vector-borne diseases). The primary vector of both diseases is *Aedes aegypti*, a highly abundant mosquito in tropical countries and adapted to the urban habitat. The viral cycle in the vector starts when the mosquito bites an infected person and acquires the viruses through the blood meal. When the infected blood reaches the mosquito's midgut, the viruses invade the epithelial cells and disseminate in several organs until they reach the salivary glands, enabling viral transmission to the next person. However, the mosquitoes have developed strategies to combat the viral invasion and dissemination in their body, making this journey a challenge to the viruses. Herein, we show that the mosquito responses against dengue and Zika viruses are distinct. In addition, mosquitoes from separate populations of the same city have different abilities to deal with the viruses in both cases, dengue and Zika infections. Our results show the diversity of responses that the mosquitoes may present to viral infections. These findings may better direct disease control strategies to combat dengue and Zika outbreaks in endemic regions.

## 1. Introduction

Dengue virus (DENV) and Zika virus (ZIKV) are single-stranded positive-sense RNA viruses that cause recurrent threats to public health systems in many countries located in tropical and subtropical zones of the globe. DENV is currently present in the Americas, Asia, Africa, the Caribbean and Pacific, with Brazil being considered the most affected country in 2020, followed by Paraguay, Mexico, Vietnam, and Malaysia in the top five rank of DENV cases [1]. Regarding to ZIKV, the regions at risk are the Americas, South-East Asia, and Western Pacific. As of July 2019, 87 countries and territories presented evidence of ZIKV transmission, including Brazil [2]. Both DENV and ZIKV belong to the *Flavivirus* genus, cycle between humans and mosquitoes of the genus *Aedes*, and are mainly spread through the bite of its principal vector, *Aedes aegypti* and, to a lesser extent, the secondary vector *Aedes albopictus* [3–6].

Dengue outbreaks are suggested to have firstly occurred in the French West Indies and Panama in the 1600s. After the 1960s, when DENV was introduced to the Americas, dengue cases strongly increased, and many epidemics arose [7]. Currently, DENV is the cause of the most important arthropod-borne viral infection worldwide, with about 100–400 million cases reported annually [8,9]. In the Americas, more than 3 million dengue cases were reported in 2019, followed by more than 2 million in 2020 [10]. In contrast with the long period encompassed from the first dengue outbreak until today, Zika presented its first outbreak less than two decades ago, in 2007, in Micronesia [11,12]. After that, new cases were only related in 2013 [13], when the virus reemerged, spread rapidly across the Americas, and subsequently caused a significant outbreak in Brazil in 2015. The global number of Zika cases reported annually is not well determined. However, it is known that in the Americas, there were more than 976 thousand cases of ZIKV infections in the period between 2016 and 2021 [14].

Both DENV and ZIKV have distinct circulating strains worldwide. The DENV complex is formed by four antigenically distinct virus serotypes (DENV-1, DENV-2, DENV-3, and

DENV-4) [15], all of which circulate in Brazil [16]. Each of these serotypes may present multiple lineages [17], and it is known that these distinct serotypes co-circulate in some urban areas causing coinfections or subsequential cases involving more than one serotype, which increases the human risk of acquiring severe dengue symptoms [16,18,19]. Unlike DENV, ZIKV has had only two major lineages identified, an African and an Asian lineage, with the latter being the most widespread in Brazil [20]. All the strains of DENV and ZIKV can cause a wide spectrum of health disorders, such as severe flu-like symptoms, severe bleeding, organ impairment and or plasma leakage, nausea, aches, and pains (eye pain, typically behind the eyes, muscle, joint, or bone pain). The ZIKV has also been responsible for cases of microcephaly in newborns [21,22].

The extensive global distribution of *Ae. aegypti* [23] and the high vector competence of these mosquitoes that transmit DENV and ZIKV contribute to the broad range of regions at risk of dengue and Zika outbreaks. Multiple factors determine the development of the viral infection in the mosquito vector and the efficiency of the dissemination and subsequent viral transmission. Extrinsic factors, such as the room temperature; and intrinsic factors, such as the midgut microbiota [24–26] and the mosquito's genetics, influence the virus-vector interactions [27–29]. The mosquito's genetics phenotypically determines the action of their innate immune response against viral replication and spread [30], which implies that genetic variability may generate distinct abilities to deal with the viruses. These interactions are biologically complex and may affect the competence of different *Ae. aegypti* populations in transmitting specific virus strains or serotypes.

To establish an infection after the ingestion of the infected blood meal, the virus first must survive, infect and replicate in the midgut cells (midgut infection barrier, MIB) of the *Ae. aegypti* mosquito, then escape to the hemolymph (midgut escape barrier, MEB) to disseminate and reach other organs such as the salivary gland (SG). Once inside the SG, the virus can be transmitted to vertebrate hosts through the subsequent blood-feeding [29–32]. This interval of time of the virus life cycle inside the vector, from the ingestion of the infected blood meal until the vector becomes infectious, is called the "extrinsic incubation period (EIP)". It is well known that the EIP for both viruses is strongly affected by extrinsic factors, such as fluctuations in room temperature [33,34]. At constant temperature conditions, EIP tends to reduce as the temperature increases [35,36]. However, concerning the effects of the intrinsic factors in the EIP, little is understood.

The mosquito's geographic origin has been shown to influence the vector's competence in transmitting viruses. The primary factors that may explain the variabilities in the viral susceptibility among the vector populations are their genetic differences and or intrinsic microbiomes [37], which may occur at macro- and micro-geographic scales [28,38–41]. Despite the impact of dengue and Zika diseases on the global health systems, only a few studies have evaluated the ability of *Ae. aegypti* to be infected and transmit DENV and ZIKV in the context of population variability. Therefore, this study aimed to determine an assumed vector's competence and other associated parameters, such as the infection rate, disseminated infection rate, and the viral load in distinct mosquito populations derived from nine well-defined *Ae. aegypti* field populations in Belo Horizonte, a large and long-standing endemic Brazilian city [42,43]. Mosquito eggs were collected in the field sites and the adult females derived from them at F3-F4 generations were used in experiments. We tested whether the infection responses of the populations change differentially depending on the post-infection period. As DENV and ZIKV belong to the same viral family [3], we investigated any association between them regarding the viral infection. As such, the determination of the patterns of DENV and ZIKV infection response and variability among mosquitoes may help global health systems understand how

the intrinsic factors of these vectors drive their defense mechanisms against the *Flavivirus* invasion.

## 2. Methods

### Ethics statement

This study was conducted in accordance with the Manual for the Use of Animals, published by the Oswaldo Cruz Foundation, Ministry of Health of Brazil (Decree 3179). The Ethics Committee approved it for the Use of Animals, Oswaldo Cruz Foundation (approval number L-1715), and the Animal Research Ethics Committee at the Tropical Medicine Foundation Dr. Heitor Vieira Dourado (approval number 002380/2016).

### *Ae. aegypti* collection

The *Ae. (Stegomyia) aegypti* eggs were collected using ovitraps distributed in the health districts of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil (latitude 19° 56' S, longitude 43° 56' W, and altitude of 915 m above sea level). The city is the capital of Minas Gerais, has 2,521,564 inhabitants [44], and is the sixth-largest city in Brazil and the third-most populous metropolitan area in the country. It is divided into nine health districts, named Northern, Northeastern, Eastern, Barreiro, South-Central, Western, Northwestern, Pampulha and Venda Nova [44,45]. A total of thirty ovitraps were positioned for 5 days in several points of the nine health districts considering previous knowledge of the presence of *Ae. aegypti*. The eggs from the thirty ovitraps (from 30 to 200 per ovitrap) derived from each district were mixed and allowed to hatch and then reared until the adult stage. The *Ae. aegypti* mosquitoes were selected, separated and each collection was named according to the health district of origin. The mosquitoes were kept at a controlled temperature of 28°C, 80% relative humidity, and 12 h/12 h light-dark photoperiod. They were raised until enough specimens (F3-F4 generations) were used for the experimental infections. All samples of the first-generation adults (parental generation) derived from the field-sampled eggs were checked for natural DENV and ZIKV infection status using Real-Time PCR (qPCR), as described below.

### Virus culture

The DENV-2 (GenBank accession number KP188569; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) and ZIKV (ZikaSPH2015) [46] viruses circulating in Brazil were used in the experiments. The two viruses were maintained and propagated in C6/36 cultures with Leibowitz-15 medium, supplemented with 2% inactivated fetal bovine serum, 20 µg/mL gentamicin, 5 µg/mL amphotericin B, 200 U/mL penicillin (Sigma Aldrich, St Louis) [47]. Before the vector experiments, the two multiplying viruses were quantified by virus titration on Vero cells [Plaque forming unit (PFU/ml)] using a standard plaque assay [48].

### DENV and ZIKV infections of *Ae. aegypti*

Before the infection experiments, representative sub-samples of the first generation of the *Ae. aegypti* adults were processed using qRT-PCR to confirm they were negative for natural viral infections. This examination of possible DENV or ZIKV natural infection of the mosquitoes was necessary since this study was developed with adult female mosquitoes derived from field-collected eggs from endemic areas. Approximately 500 five-day-old *Ae. aegypti* mosquitoes from each health district were divided into two groups and simultaneously infected with DENV or ZIKV via a membrane feeding assay (water-jacketed glass feeder device covered with Parafilm) with blood meals containing either of the viruses. Virus titers of  $1 \times 10^5$  plaque-

forming units per mL from C6/36 cell culture supernatants of one of the viruses were mixed with fresh mouse blood (2:1) and offered to the mosquitoes as described elsewhere [48,49]. Mosquitoes were allowed to feed for 30 min on the infective blood meals. Fully engorged mosquitoes (at least 150 individuals from each health district) were separated and maintained with a 10% sugar meal *ad libitum* for 14 days. Two groups of 20 mosquitoes from each health district were checked for infections at 7 days post-infection (dpi) and 14 dpi. The period of 7 dpi and 14 dpi were named “early infection” and “late infection”, respectively, since the extrinsic incubation period (EIP) of DENV and ZIKV in *Ae. aegypti* are around 14 dpi at room temperature (around 28° C) [50–52].

### Extraction and quantification of viral RNA by real-time PCR

Ten mosquitoes that had been experimentally infected with DENV or ZIKV from each health district were randomly chosen at 7 dpi and 14 dpi. These were anesthetized on ice and dissected under a stereoscope. Their bodies and head/SG (head with the attached salivary gland) were individualized and transferred to separate microtubes. According to the manufacturer's instructions, the viral RNA was extracted from each sample using the QIAamp viral RNA mini kit (Qiagen) and subsequently stored at -70°C. The detection of viral copies was performed using qRT-PCR. The reaction was conducted in a 7500 Fast Real-Time PCR machine (Applied Biosystems) using the TaqMan Fast Virus 1-Step (Thermo Fisher Scientific). The viral RNA extracted from the bodies and head/SG of female mosquitoes were tested. All the analyses were performed in duplicate with standard curves, and with positive and negative controls. The negative controls were mosquitoes from the health districts that had been submitted to a non-infective blood meal, and the positive ones were *Ae. aegypti* mosquitoes from a colonized PP strain used routinely and always presents viral detection after an infective blood meal [26].

### Infection rate, disseminated infection rate and vector competence

The infection rate (IR), disseminated infection rate (DIR), and vector competence (VC) were determined for DENV and ZIKV to characterize the infection pattern of the nine mosquito populations of Belo Horizonte. The IR was calculated as the proportion of infected mosquito bodies related to the total number of tested mosquitoes. The DIR was the proportion of infected mosquito heads/salivary glands (head/SG) related to the number of infected mosquito bodies. The VC was the proportion of infected mosquitoes with viral detection in the head/SG to all tested mosquitoes [28]. Mosquitoes were not assayed for salivary gland infection or actual virus transmission. Therefore, the VC was assumed to be the same as the rate of virus dissemination to the head/SG tissues.

### Statistical analysis

Two-way ANOVA (multiple comparisons) and Tukey's range test were used to compare the IR, DIR, and VC values among the early and late DENV and ZIKV infections (7 dpi and 14 dpi) considering all possible combinations. Mann-Whitney U tests were used to evaluate significance among viral load medians in the bodies and head/SG of each DENV and ZIKV infected mosquito population at 7 and 14 dpi. Similarly, the data from each population were analyzed together as representative of the entire city mosquito population. The evaluation of the body viral loads and head/SG viral loads among all populations was performed using Kruskal-Wallis one-way ANOVA tests. All statistical analyses were performed in GraphPad Prism, version 7.00 (La Jolla, CA, USA), and P values  $\leq 0.05$  were considered statistically significant.

### 3. Results

#### Variation in the DENV infection of the *Ae. aegypti* populations

**DENV early infection.** At 7 dpi, the DENV IRs for the mosquitoes from the Northeastern, Eastern, Barreiro, South-Central, Western, and Northwestern districts were 100%, and from the Pampulha and Venda Nova districts were 60% and 20%, respectively. The DIRs for mosquitoes from the Northeastern, Eastern, Barreiro, Western, and Venda Nova districts were 100%, and for the Pampulha, South-Central, and Northern districts, they were 83.3%, 90%, and 66.6%, respectively. The VCs for the mosquitoes from the Northeastern, Eastern, Barreiro, Western, and Northwestern districts were 100%, and for the Northern, Pampulha, and Venda Nova districts, they were 60%, 50%, and 20%, respectively (Fig 1A).

**DENV late infection.** At 14 dpi, the IRs became 90% for the mosquitoes from the South-Central and Western populations and the rest became 100%. The DIRs for the mosquitoes from the Northeastern, Barreiro, Northwestern, Pampulha, and Venda Nova districts were 100%; for the Northern, Eastern, and South-Central districts, they were 90%; and for the Western district, the DIR was 80%. The VCs for the mosquitoes from the Northeastern, Barreiro, Northwestern, Pampulha, and Venda Nova districts were 100% and, for the Northern, Eastern and South-Central districts, the VCs were 90%, while the VC for the Western district was 80% (Fig 1A).

#### Variation in the ZIKV infection of the *Ae. aegypti* populations

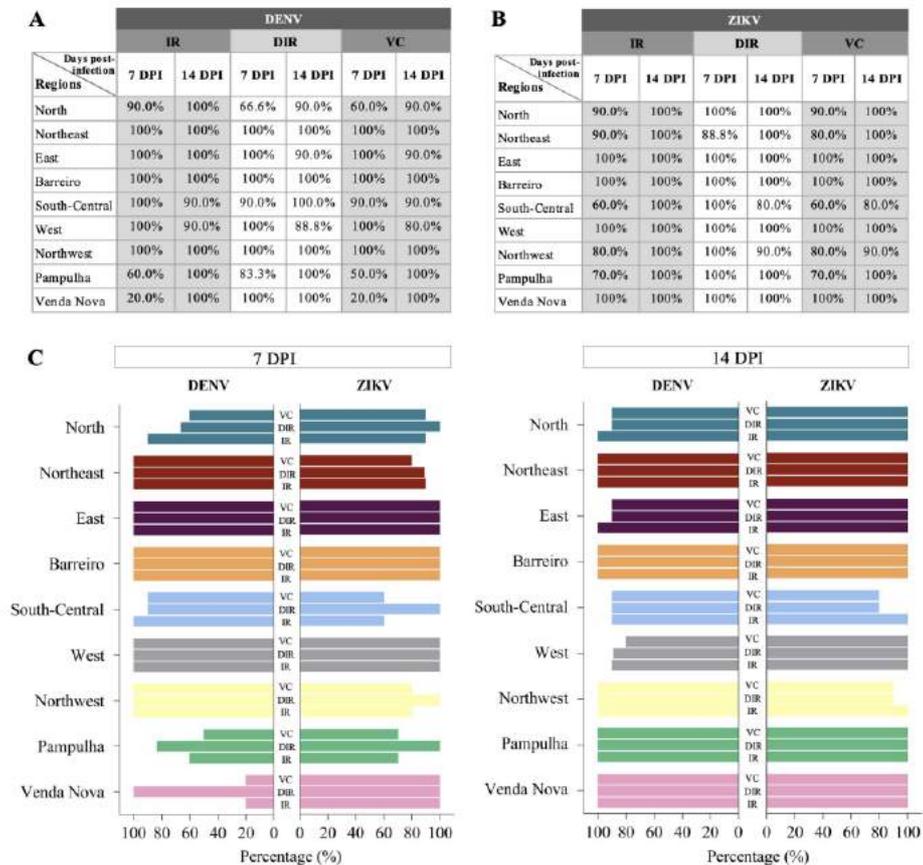
**ZIKV early infection.** At 7 dpi, the ZIKV IRs for the mosquitoes from Eastern, Western, Barreiro and Venda Nova districts were 100%, from the Northern and Northeastern districts, these were 90%, and from the Northwestern, Pampulha, and South-Central districts, IRs were 80%, 70% and 60%, respectively. The DIRs were 100% among all mosquito populations except for those from the Northeastern district, which presented 88.8%. The VCs for the Eastern, Barreiro, Western and Venda Nova districts were 100%, for the Northwestern and Northeastern districts, these were 80%, and for the South-Central district, VC was 60% (Fig 1B).

**ZIKV late infection.** At 14 dpi, the IRs became 100% for all mosquito populations. The DIRs were 100% for all populations, except for those in the Northwestern and South-Central districts, with 90% and 80%, respectively. The VCs were 80% and 90% for the South-Central and Northwestern districts, respectively, and 100% for all other populations (Fig 1B).

The IR, DIR, and VC rates of early and late infections of DENV and ZIKV for each *Ae. aegypti* population were statically analyzed and showed no equivalence among data collected from the different populations in both early and late infections (Fig 1C). The analyzed rates that increased, decreased or remained unaltered from 7 to 14 dpi are represented for each population in a map of the city of Belo Horizonte (Fig 2). In addition, considering the above rates for the total *Ae. aegypti* populations of the city (i.e., analyzing all health districts together), there were no significant differences among DENV and ZIKV infections in early and late infections.

#### Viral RNA quantification in the *Ae. aegypti* populations

**DENV early infection.** At 7 dpi, the overall median of DENV RNA copies in the mosquito bodies from all nine populations measured using qPCR was  $3 \times 10^6$ . The highest quantity of RNA copies was from the populations from the Barreiro and Western ( $2 \times 10^8$ ) districts, and the lowest was from the populations from the Venda Nova district (zero). The other values (in ascending order) were from the Pampulha ( $2 \times 10^2$ ), Northern ( $1 \times 10^4$ ), South-Central ( $2 \times 10^7$ ), Northwestern ( $3 \times 10^7$ ), Northeastern ( $4 \times 10^7$ ), and Eastern ( $1 \times 10^8$ ) districts. In the nine

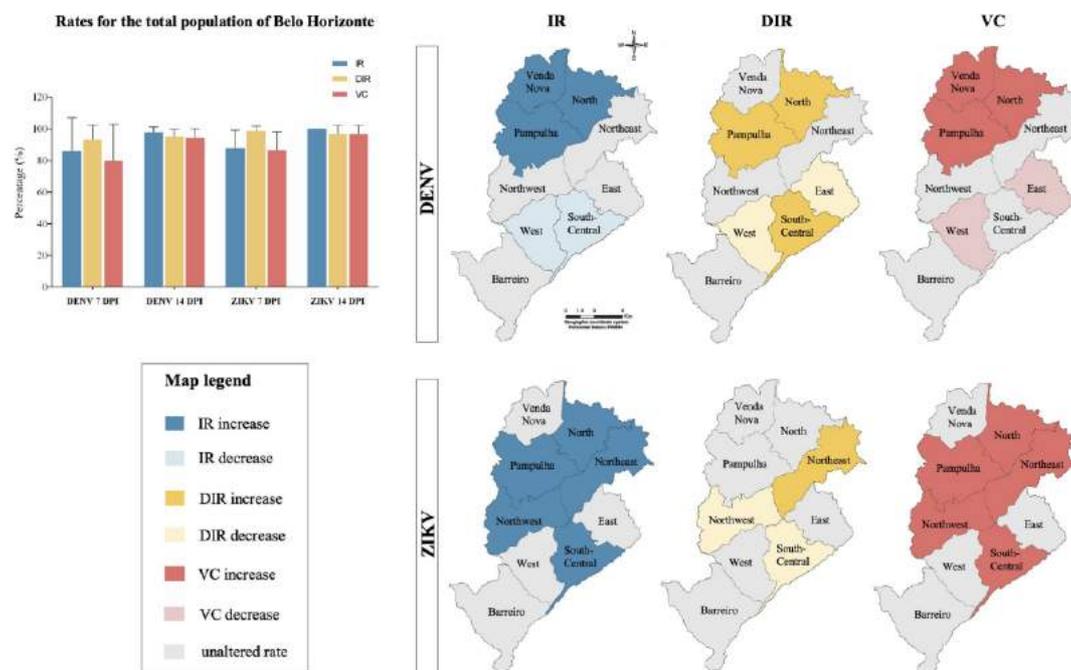


**Fig 1. IR, DIR, and VC for the nine *Ae. aegypti* populations infected with DENV and ZIKV, at 7 and 14 days post-infection (dpi).** A-B: Values of IR, DIR, and VC for the *Ae. aegypti* populations infected with DENV (A) and ZIKV (B). C: Comparison of the pattern of IR, DIR, and VC sets for each population, previously described in A-B, between DENV and ZIKV at 7 and 14 dpi. The bars represent the rates and were disposed of in a model that highlights each population's specific patterns. No association is detected between DENV and ZIKV infection patterns of the populations, neither in 7 nor in 14 dpi. IR: Infection rate, the proportion of infected mosquitoes of the total number of mosquitoes tested. DIR: Disseminated infection rate, the proportion of infected head/salivary gland (SG) of the total number of infected mosquitoes. VC: vector competence, the proportion of infected head/SG of the total number of tested mosquitoes.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009839.g001>

populations, the overall median DENV RNA copies in all mosquito head/SG was  $3 \times 10^4$ . The highest quantity of RNA copies was from the populations from the Northern district ( $2 \times 10^8$ ), and the lowest one was from the populations from the Venda Nova district (zero). The other values (in ascending order) were from the South-Central ( $9 \times 10^2$ ); Western ( $4 \times 10^4$ ); Northwestern and Barreiro ( $1 \times 10^5$ ); Eastern ( $7 \times 10^5$ ); and Northeastern and Pampulha ( $1 \times 10^6$ ) districts (S1A Fig).

The quantity of DENV RNA copies in the mosquito head/SG did not significantly differ from the bodies in the populations from the Northern, Pampulha, and Venda Nova districts



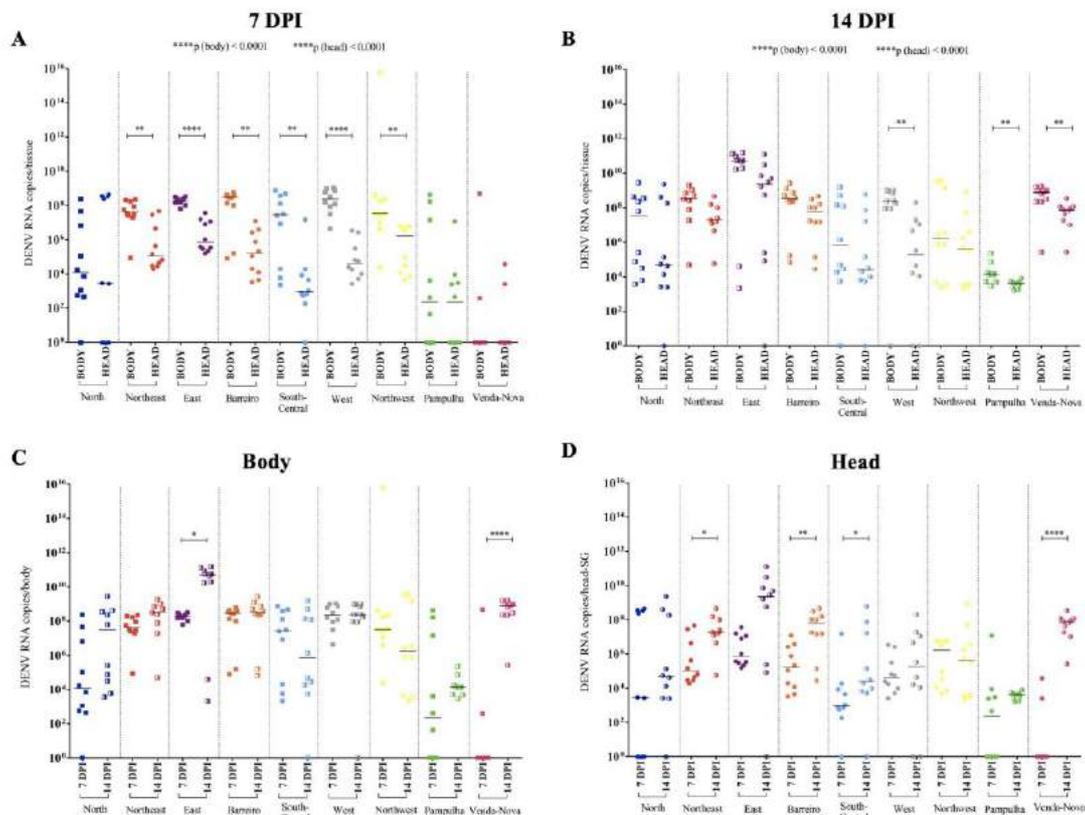
**Fig 2.** The graph shows the mean values of the infection rate (IR), disseminated infection rate (DIR), and vector competence (VC) for DENV and ZIKV at early infection (7 days post-infection—dpi), and late infection (14 dpi), considering the *Aedes aegypti* mosquitoes from all regions of Belo Horizonte. The schematic maps show the rates that increased, decreased or remained unaltered from 7 to 14 dpi. (The schematic maps were adapted from a previously published map [28], source: <https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-3305-7-320/figures/2>).

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009839.g002>

( $p > 0.9999$ ,  $p = 0.5594$ ,  $p > 0.9999$ , respectively). In contrast, the quantities of DENV RNA copies were greater in the mosquito bodies when compared to the head/SG for the Northeastern (\*\* $p = 0.0021$ ), Eastern (\*\*\*\* $p < 0.0001$ ), Barreiro (\*\* $p = 0.0021$ ), South Central (\*\* $p = 0.0011$ ), Western (\*\*\*\* $p < 0.0001$ ), and Northwestern (\* $p = 0.0021$ ) districts. The DENV viral load differ among the populations for both the body (\*\*\*\* $p < 0.0001$ ) and head/SG (\*\*\*\* $p < 0.0001$ ) (Fig 3A).

**DENV late infection.** At 14 dpi, the overall median of DENV RNA copies in the mosquito bodies was  $2 \times 10^8$  for all nine populations. The highest quantity of RNA copies was from the Eastern district ( $2 \times 10^{10}$ ), and the lowest was from the Pampulha district ( $1 \times 10^4$ ). In ascending order, the other values were from the South-Central ( $7 \times 10^5$ ), Northwestern ( $1 \times 10^6$ ), Northern ( $3 \times 10^7$ ), Northeastern and Barreiro ( $3 \times 10^8$ ), and Venda Nova districts ( $9 \times 10^8$ ). The overall median DENV RNA copies in mosquito head/SG was  $8 \times 10^6$  for all nine populations. The greatest quantity of RNA copies was from the Eastern district ( $2 \times 10^9$ ), and the lowest was from the Pampulha district ( $4 \times 10^3$ ). The other values (in ascending order) were from the South-Central ( $2 \times 10^4$ ), Northern ( $4 \times 10^4$ ), Western ( $1 \times 10^5$ ), Northwestern ( $4 \times 10^5$ ), Northeastern ( $1 \times 10^7$ ), Barreiro ( $6 \times 10^7$ ), and Venda Nova districts ( $7 \times 10^7$ ) (S1A Fig).

The quantity of DENV RNA copies in the mosquito head/SG did not differ significantly from the bodies in the populations from the Northern, Eastern, Barreiro, South-Central, and



**Fig 3. DENV viral load per body and head/salivary gland (SG) of *Ae. aegypti* at 7 and 14 days post-infection (dpi).** A: DENV viral load per head/SG and body at 7 dpi in *A. aegypti* females from each district of Belo Horizonte. Each dot represents a tested female. B: DENV viral load per head/SG and body at 14 dpi in *A. aegypti* females from each district of Belo Horizonte. Each dot represents a tested female. C-D: Representation of the previous data (A-B) in another layout model to highlight the differences in DENV viral load between 7 and 14 dpi in the body (C) and head/SG (D) of the *Ae. aegypti* mosquitoes from each of the nine populations of Belo Horizonte. Fully filled and half-filled squares represent viral load in the mosquito bodies at 7 and 14 dpi, respectively. Fully filled and half-filled circles represent viral load in the mosquito head/SG at 7 and 14 dpi, respectively. P values  $> 0.05$  (not significant) are not represented. P values  $\leq 0.05$ ,  $\leq 0.01$ ,  $\leq 0.001$ ,  $\leq 0.0001$  are summarized with one, two, three, and four asterisks, respectively.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009839.g003>

Northwestern districts ( $p = 0.2761$ ,  $p = 0.0623$ ,  $p = 0.0749$ ,  $p = 0.4043$ ,  $p = 0.3473$ , respectively). The DENV RNA copies were in greater quantities in the mosquito bodies than in the head/SG of the populations of the Western ( $**p = 0.0029$ ), Pampulha ( $**p = 0.0078$ ) and Venda Nova ( $**p = 0.0039$ ) districts. The DENV viral loads differed among the populations for both the body ( $****p < 0.0001$ ) and head/SG ( $****p < 0.0001$ ) (Fig 3B).

The analyzed periods of the post-infection showed increases in the quantities of DENV RNA copies in the mosquito bodies from early to late infections in the populations of the Eastern ( $*p = 0.0232$ ) and Venda Nova ( $****p < 0.0001$ ) districts. No significant differences were detected for the Northern, Northeastern, Barreiro, South Central, Western, Northwestern, and Pampulha districts ( $p = 0.0627$ ,  $p = 0.0786$ ,  $p = 0.4727$ ,  $p = 0.6706$ ,  $p = 0.8928$ ,  $p = 0.1639$ ,

$p = 0.1720$ , respectively) (Fig 3C). In addition, there was an increase in the quantity of DENV RNA copies in the mosquito head/SG in the populations of the Northeastern ( $*p = 0.0172$ ), Barreiro ( $**p = 0.0021$ ), South Central ( $*p = 0.0238$ ), and Venda Nova ( $****p < 0.0001$ ) districts. No significant differences were detected for the Northern, Western, Northwestern, and Pampulha districts ( $p = 0.5252$ ,  $p = 0.5149$ ,  $p = 0.5191$ ,  $p = 0.$ ,  $p = 0.0917$ , respectively) (Fig 3D).

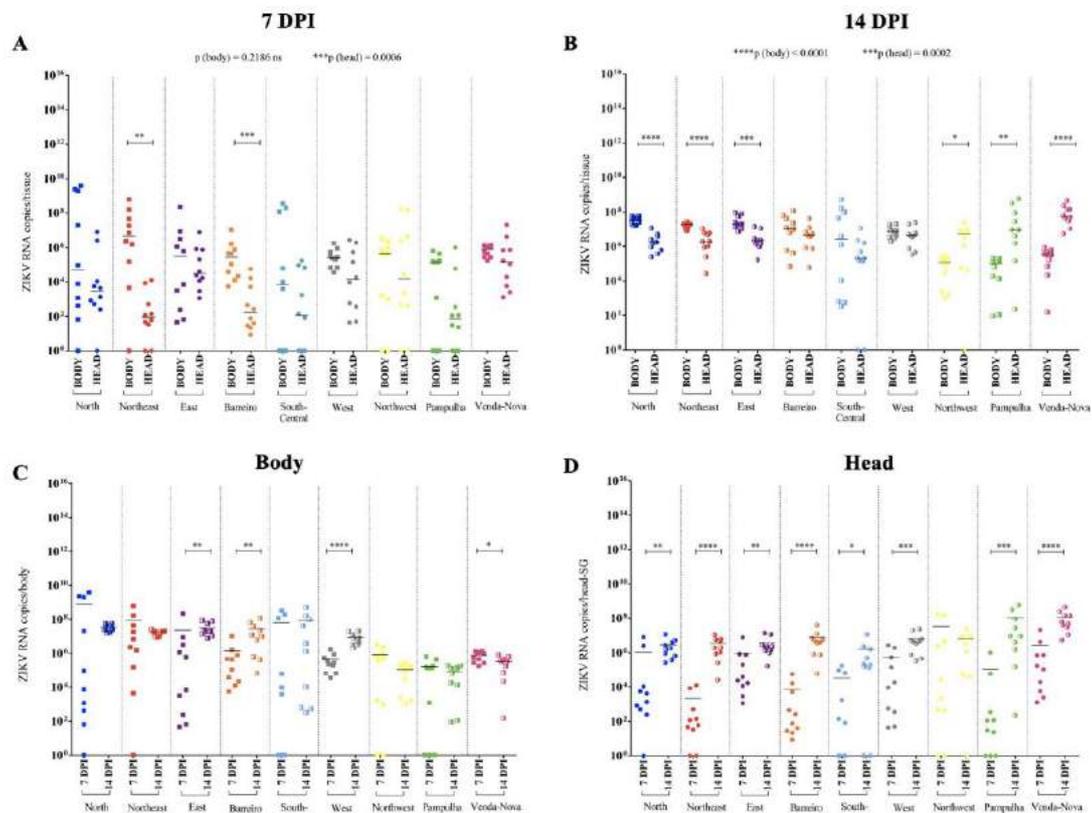
**ZIKV early infection.** At 7 dpi, the overall median ZIKV RNA copies in mosquito bodies was  $4 \times 10^5$  for all nine populations when measured using qPCR. The greatest number of RNA copies was from the Northeastern district ( $4 \times 10^6$ ), and the lowest was from the South-Central district ( $7 \times 10^3$ ). The other quantities (in ascending order) were from Pampulha ( $1 \times 10^5$ ), Barreiro and Western ( $2 \times 10^5$ ), Eastern ( $3 \times 10^5$ ), Northern ( $5 \times 10^5$ ), and Venda Nova districts ( $7 \times 10^5$ ). In all nine populations, the overall median ZIKV RNA copies for mosquito head/SG was  $3 \times 10^6$ . The greatest quantity of RNA copies was from the Venda Nova district population ( $1 \times 10^5$ ) and the lowest one was from the Pampulha district ( $7 \times 10^1$ ). The other values (in ascending order) were from the Northeastern ( $9 \times 10^1$ ), Barreiro and South-Central ( $1 \times 10^2$ ), Northern ( $3 \times 10^3$ ), Western and Northwestern ( $1 \times 10^4$ ), and Eastern districts ( $3 \times 10^4$ ) (S1B Fig).

The number of ZIKV RNA copies in the mosquito head/SG did not significantly differ from the bodies in the populations from the Northern, Eastern, South Central, Western, Northwestern, Pampulha, and Venda Nova districts ( $p = 0.3630$ ,  $p = 0.9502$ ,  $p = 0.4988$ ,  $p = 0.1419$ ,  $p = 0.8405$ ,  $p = 0.2161$ ,  $p = 0.1419$ , respectively). The ZIKV RNA copies were greater in number in the mosquito bodies than in the head/SG for the populations of the Northeastern ( $**p = 0.0021$ ), and Barreiro ( $**p = 0.003$ ) districts. The ZIKV viral load did not differ among the populations for the body ( $p = 0.2186$ ), but differ for the head ( $****p = 0.0006$ ) (Fig 4A).

**ZIKV late infection.** At 14 dpi, the overall median ZIKV RNA copies in mosquito bodies for all nine populations was  $8 \times 10^6$ . The greatest quantity of RNA copies was from the Northern district ( $2 \times 10^7$ ) and the lowest from the Pampulha district ( $9 \times 10^4$ ). The other quantities (in ascending order) were from the Northwestern ( $1 \times 10^5$ ), Venda Nova ( $3 \times 10^5$ ), South-Central ( $2 \times 10^6$ ), Western ( $7 \times 10^6$ ), and Northeastern, Eastern, and Barreiro districts ( $1 \times 10^7$ ). The overall median ZIKV RNA copies in mosquito head/SG for all nine populations was  $4 \times 10^6$ . The greatest value of RNA copies was from the Venda Nova district ( $5 \times 10^7$ ) and the lowest from the South-Central district ( $2 \times 10^5$ ). The other quantities (in ascending order) were from the Northern and Northeastern ( $1 \times 10^6$ ); Eastern ( $2 \times 10^6$ ); Barreiro and Western ( $4 \times 10^6$ ); Northwestern ( $5 \times 10^6$ ); and Pampulha districts ( $8 \times 10^6$ ) (S1B Fig).

The ZIKV RNA copies in the mosquito head/SG did not differ from the bodies of the populations of the Barreiro, South Central, and Western districts ( $p = 0.3104$ ,  $p = 0.3056$ ,  $p = 0.3104$ , respectively). In contrast, the quantities of ZIKV RNA copies were greater in the bodies than in the head/SG of the mosquitoes from the Northern ( $****p < 0.0001$ ), Northeastern ( $****p < 0.0001$ ), and Eastern districts ( $****p = 0.0002$ ). However, the quantities of ZIKV RNA copies were smaller in the mosquito bodies than in the head/SG of the mosquitoes from the Northwestern ( $*p = 0.0354$ ), Pampulha ( $**p = 0.0014$ ), and Venda Nova districts ( $****p < 0.0001$ ). The ZIKV viral load differed among the populations for both the body ( $****p < 0.0001$ ) and head ( $****p = 0.0002$ ) (Fig 4B).

The analyzed periods of the post-infection showed increases in the quantities of ZIKV RNA copies in the mosquito bodies from early to late infections in the populations of the Eastern ( $**p = 0.0021$ ), Barreiro ( $**p = 0.0089$ ), Western ( $****p < 0.0001$ ) and Venda Nova ( $*p = 0.0431$ ) districts. No significant differences were detected for the Northern, Northeastern, South Central, Northwestern, and Pampulha districts ( $p = 0.1883$ ,  $p = 0.2761$ ,  $p = 0.3030$ ,

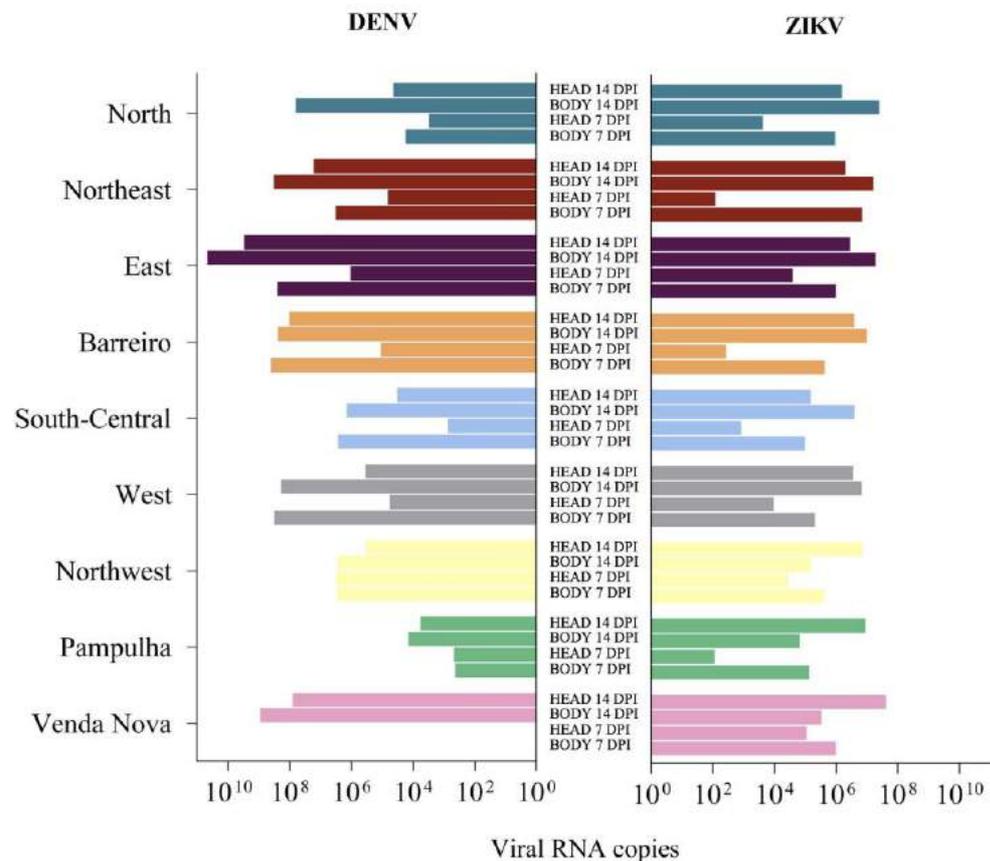


**Fig 4. ZIKV viral load per body and head/salivary gland (SG) of *Ae. aegypti* at 7 and 14 days post-infection (dpi).** A: ZIKV viral load per body and head/SG at 7 dpi in *Ae. aegypti* females from each district of Belo Horizonte. Each dot represents a tested female. B: ZIKV viral load per body and head/SG at 14 dpi in *Ae. aegypti* females from each district of Belo Horizonte. Each dot represents a tested female. C-D: Representation of the previous data (A-B) in another layout model to highlight the differences in ZIKV viral load between 7 and 14 dpi in the body (C) and head/SG (D) of the *Ae. aegypti* mosquitoes from each of the nine populations of Belo Horizonte. Fully filled and half-filled squares represent viral load in the mosquito bodies at 7 and 14 dpi, respectively. Fully filled and half-filled circles represent viral load in the mosquito head/SG at 7 and 14 dpi, respectively. P values > 0.05 (not significant) are not represented. P values ≤ 0.05, ≤ 0.01, ≤ 0.001, ≤ 0.0001 are summarized with one, two, three, and four asterisks, respectively.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009839.g004>

$p = 0.4237$ ,  $p = 0.9115$ , respectively) (Fig 4C). In the mosquito head/SG, there was an increase in the number of ZIKV RNA copies in the populations from the Northern (\*\* $p = 0.0068$ ), Northeastern (\*\*\*\* $p < 0.0001$ ), Eastern (\*\* $p = 0.0021$ ), Barreiro (\*\*\*\* $p < 0.0001$ ), South Central (\* $p = 0.0125$ ), Western (\*\*\* $p = 0.0007$ ), Pampulha (\*\*\* $p = 0.001$ ), and Venda Nova (\*\*\*\* $p < 0.0001$ ) districts. No significant difference was detected for the Northwestern district ( $p = 0.2466$ ) (Fig 4D).

In general, considering all the results, there was no equivalence between the DENV and ZIKV viral loads of the different *Ae. aegypti* populations of Belo Horizonte (Fig 5). Analyzing the viral loads between DENV and ZIKV infections for each population separately, all of them differ in at least two of the four comparisons (body 7 dpi, head/SG 7 dpi, body 14 dpi, head/SG

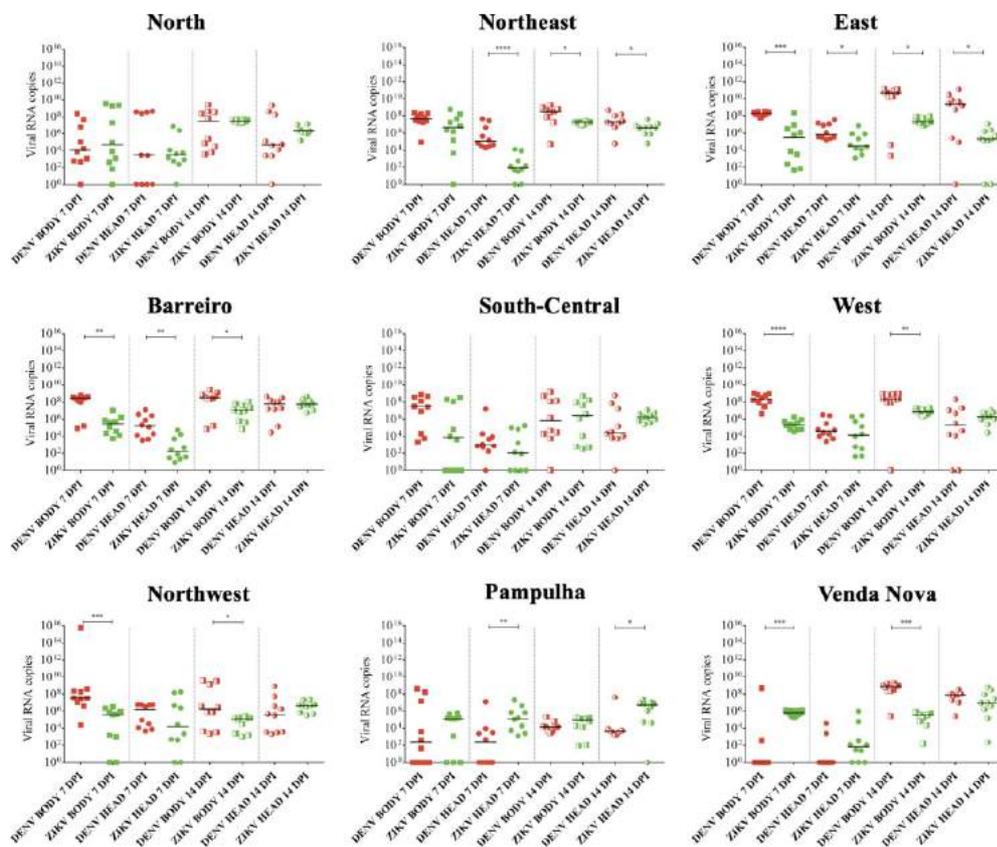


**Fig 5. Comparison of the pattern of viral load sets for each population, previously described in Figs 3 and 4, between DENV and ZIKV in the body and head/salivary gland (SG) at 7 and 14 days post-infection (dpi).** The bars represent the viral load medians, and were disposed in a model that highlight the specific patterns of each population.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009839.g005>

14 dpi). Except for Northern and South-Central populations, which did not vary in any comparison (Fig 6).

In relation to the viral load for the total population of Belo Horizonte, viral load for DENV was greater than that of ZIKV in the body for both 7 (\*\*\*\* $p < 0.0001$ ) and 14 dpi (\*\*\*\* $p < 0.0001$ ), and in the head/SG at 7 dpi (\* $p = 0.0117$ ). No difference was detected between DENV and ZIKV viral loads in the head/SG at 14 dpi ( $p = 0.8726$ ). The total DENV viral load was greater in the body than in the head/SG for both 7 (\*\*\*\* $p < 0.0001$ ) and 14 dpi (\*\*\* $p = 0.0004$ ). There was an increase in the total DENV viral load for both the body (\*\* $p = 0.0020$ ) and head/SG (\*\*\*\* $p < 0.0001$ ) from 7 to 14 dpi. The total ZIKV viral load was greater in the body than in the head/SG only at 7 dpi (\*\*\*\* $p < 0.0001$ ), and no differences were detected at 14 dpi ( $p = 0.8177$ ). There was an increase in the total DENV viral load for both the body (\*\*\*\* $p < 0.0001$ ) and head/SG (\*\*\*\* $p < 0.0001$ ) from 7 to 14 dpi (Fig 7). It was



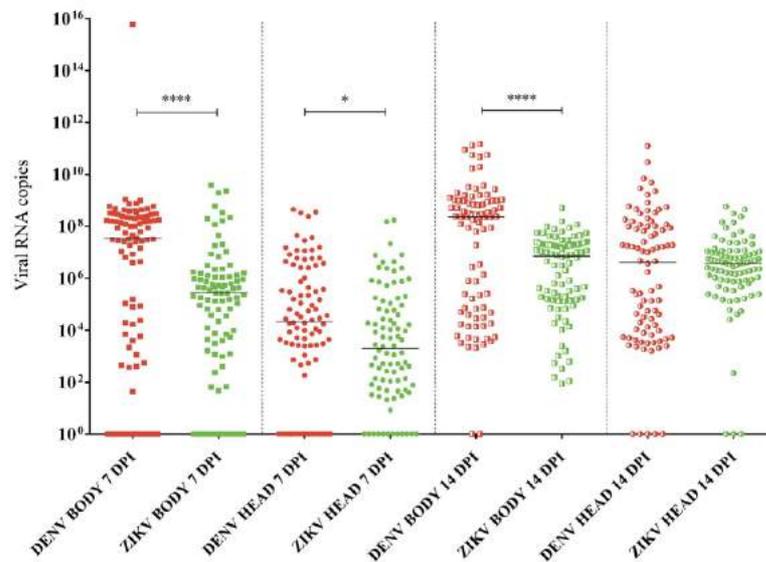
**Fig 6. Representation of DENV (red) and ZIKV (green) viral load comparisons for each of the nine *Ae. aegypti* populations of Belo Horizonte.** Fully filled and half-filled squares represent viral load in the mosquito bodies at 7 and 14 dpi, respectively. Fully filled and half-filled circles represent viral load in the mosquito head/SG at 7 and 14 dpi, respectively. P values > 0.05 (not significant) are not represented. P values  $\leq 0.05$ ,  $\leq 0.01$ ,  $\leq 0.001$ ,  $\leq 0.0001$  are summarized with one, two, three, and four asterisks, respectively. The p-values of the comparisons between body 7 dpi, head 7 dpi, body 14 dpi, head 14 dpi were, respectively: 0.7004, 0.9109, > 0.9999, 0.1419 (North); 0.0887, \*\*\*\* < 0.00001, \*0.0133, \*0.0349 (Northeast); \*\*\*0.0003, \*0.115, \*0.0232, \*0.0286 (East); \*\*0.0021, \*\*0.0011, \*0.0147, 0.7243 (Barreiro); 0.0703, 0.3484, 0.6706, 0.1419 (South-Central); \*\*\*\* < 0.00001, 0.3867, \*\*0.0015, 0.4237 (West); \*\*\*0.0003, 0.2399, \*0.0354, 0.1220 (Northwest); 0.7913, \*\*0.0065, 0.3493, \*0.0185 (Pampulha); 0.0008, 0.0734, \*\*\*0.0003, 0.2341 (Venda Nova).

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009839.g006>

not identified mosquito groups from geographically closer districts with similar IR, DIR, VC, and viral loads for the two arboviruses. Finally, as expected, there was no viral load detection in the negative controls, and all the positive controls showed viral detection (S2 Fig).

#### 4. Discussion

The susceptibility of *Ae. aegypti* populations from a long-standing Brazilian endemic city to DENV and ZIKV infection was evaluated at 7 and 14 days post-infection (dpi) in regards to the IR (infection rate), DIR (disseminated infection rate), and VC (vector competence). The



**Fig 7. DENV (red) and ZIKV (green) viral loads for the total *Ae. aegypti* population of Belo Horizonte.** The DENV total viral load in the body and head/salivary gland (SG) at 7 days post-infection (dpi) and in the body at 14 dpi is greater than the respective ZIKV total viral loads. At 14 dpi, the DENV total viral load in the head/SG is similar to that of ZIKV total viral load. Fully filled and half-filled squares represent viral load in the mosquito bodies at 7 and 14 dpi, respectively. Fully filled and half-filled circles represent viral load in the mosquito head/SG at 7 and 14 dpi, respectively. P values > 0.05 (not significant) are not represented. P values  $\leq 0.05$ ,  $\leq 0.01$ ,  $\leq 0.001$ ,  $\leq 0.0001$  are summarized with one, two, three, and four asterisks, respectively.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009839.g007>

IR indicates the virus' ability to establish an initial infection in the vector midgut. The DIR is related to the virus' ability to propagate and disseminate from the vector's midgut to its secondary organs, in this case, the salivary gland (SG). In turn, the VC is directly proportional to IR and DIR ( $VC = IR \times DIR$ ) and indicates the proportion of mosquitoes in which the viruses crossed the SG barriers, thus completing their life cycle and becoming able to infect humans [28,38,53,54]. The results showed inter-population variations of the *Ae. aegypti* in the studied city considering the two arbovirus infections by DENV and ZIKV. All the populations had a relative quantity of individual mosquitoes that could develop infections and become competent at transmitting the two viruses at both early and late infection phases. The details and significance of these results are discussed for each arbovirus separately. The importance of the findings is described in a general context in the last topic.

### DENV infection susceptibility among *Aedes aegypti* populations

The analyses of the DENV infection responses showed that the Northeastern, Barreiro, and Northwestern health districts had the most competent dengue vectors among all the nine populations since the VC and the other analyzed parameters (IR and DIR) were 100% at both early and late infections. Differently, the VC increased from early to late infections in the Northern, Pampulha, and Venda Nova populations. These greater VC in the late infections were due to the increase in IR and DIR in the Northern and Pampulha populations. This means that the infection starts to be detected late in some mosquitoes (IR increase), and the

viral dissemination to the heads occurs in more mosquitoes at the late infection phases. In contrast, in the Venda Nova district, the increase was only a reflection of IR increase (from 20 to 100%) during the post-infection period since the DIR was 100% in both phases of infection. This fact shows that the infection starts to be detected late in some mosquitoes. However, in both early and late infection phases, all infected mosquitoes were permissive to the viral dissemination to the head/SG. Finally, in the late infection, both Pampulha and Venda Nova districts' populations reach a maximum VC of 100% and are highly susceptible to and competent at transmitting DENV. In the South-Central population, the VC was the same (90%) in early and late infections, though the IR decreased and the DIR increased over time. It indicates that DENV reached the head/SG of more individuals in late infection, but some individuals managed to eliminate the infection, thus establishing a type of compensation that generated unaltered VC during the post-infection period. Surprisingly, the VC decreased from early to late infection in the Eastern and Western populations, an event that was unexpected considering that DENV proliferates within the infection period (EIP) in infected vectors. The declining VC is related to reduced DIRs in both populations and reduced IRs in the Western population. Considering that, in the Eastern and Western populations, the virus was detected in all vector head/SG in early infection (DIR of 100% in both populations), we can infer that the declining DIR occurred because intrinsic barriers avoid viral spread and establishment of DENV in the late infection. The decrease in IR in the Western population indicates that some individuals were able to eliminate the virus. Probably, there was a rapid DENV dissemination that caused a sudden burst of the immune response of the vectors, thus negatively affecting the late infection. It is not possible to compare our data to make broader inferences from other ones. This study is the first to analyze the vector competence of distinct mosquito populations from the same endemic city. Therefore, further studies of different *Ae. aegypti* populations would be essential to investigate if this variability in vector competence also occurs in different mosquito strains.

Considering the *Ae. aegypti* populations' susceptibility (permissiveness) to being infected by DENV and the viral dissemination in the mosquitoes' tissues, it is possible to classify them in the following 4 infection patterns: (a) highly permissive with high dissemination at both early and late infections. (b) less permissive with high dissemination at the early phase, but highly permissive with high dissemination at the late phases; (c) less permissive with lower dissemination at the early infection phase, but highly permissive with high dissemination at the late infection phase; and finally, (d) highly permissive with high dissemination at the early infection phase, but less permissive with low dissemination at the late infection phase. These distinct types of response to DENV infection demonstrate that *Ae. aegypti* populations have wide-ranging patterns for fighting against these arboviral infections.

Considering the DENV loads in the infected mosquitoes' tissues, the viral loads were similar or greater in the bodies compared to the head/SG. Thus, the number of DENV RNA copies in head/SG did not exceed the body's respective values in any of the mosquito populations, either in early or late infections. Possibly, the viral load is more extensive in the body than in the head/SG due to the ability of DENV to replicate and disseminate in the hemolymph, reproductive system, muscle, and fat body, beyond the midgut, with the total virus accumulation in these tissues being high enough not to overcome the viral load in the head/SG. In addition, it was noted that the differences in the quantity of DENV in the mosquitoes' bodies and head/SG in early infection decreased (Western) or ceased to exist (Northeastern, Eastern, Barreiro, South Central, and Northwestern) in late infections for most populations. In the Northeastern, Barreiro, and South-Central populations, the absence of differences between body and head/SG viral copy numbers in late infections could be attributed to the significant viral increase in the head/SG and no increase in the bodies. As Raquin and Lambrechts (2017) [55] have

shown, DENV accumulated in the SG in *Ae. aegypti* overtime after infection, and these results were expected in some populations. For the other populations, where the viral load differences between body and head/SG were not detected (Northern) or increased (Pampulha and Venda Nova) from early to late infections. This fact may be attributed to the intrinsic differences among the populations that, in turn, determine different responses to DENV infection. The implication of these different infection responses is discussed in detail further on.

### ZIKV infection susceptibility among *Aedes aegypti* populations

The analyses of ZIKV infection responses showed that the Eastern, Barreiro, Western, and Venda Nova districts had the most competent vectors among the nine populations. The VC and the related IR and DIR rates were 100% in these mosquito populations in early and late infections. On the other hand, the VC increased from early to late infections in the Northern, Northeastern, South-Central, Northwestern, and Pampulha populations. This VC increase was mainly related to the increase in IR over time. These populations have an IR lower than 100% in early infections but equal to 100% in late ones, indicating that some mosquitoes need more than 7 dpi to develop the ZIKV infection completely. DIR also increased from early to late infections for the Northeastern population, indicating some of their mosquitoes are permissive to viral dissemination only in late infections. In contrast, the DIR decreased from early to late infections in South-Central and Northwestern populations, which indicates that some of their mosquitoes have a stronger blockade of viral establishment in the SG in late infections. Although the DIR decreased in South-Central and Northwestern populations, the increase in the IR overcame that and ensured the VC increase.

It is possible to classify 3 infection patterns considering the susceptibility of the *Ae. aegypti* populations to ZIKV and the viral dissemination in the mosquitoes' tissues: (a) highly permissive with high dissemination at early and late infection phases; (b) less permissive with low dissemination at early infection, but high for both at late infection phases; and finally, (c) less permissive with low dissemination at early infection phases, but highly permissive with low dissemination at late infection phases. These different responses show that *Ae. aegypti* populations present a range of susceptibility patterns for fighting against ZIKV viral infections, although on a smaller scale than was seen for DENV.

For the viral load results, in early infections, the number of ZIKV RNA copies detected in the mosquito body was either similar or higher than in the head/SG when considering all populations. However, in late infections, three populations had higher viral levels in the head/SG than in the body, indicating that ZIKV reached the head/SG, replicated at high rates, and overcame the viral load in the body. From early to late infections, the amount of ZIKV increased in the body for four populations; however, it increased in the head/SG for all populations, except one. This fact demonstrates a strong tendency of ZIKV to colonize the SG during the infection process. Although the quantity of virus increased in the body over time after infection in some populations, indicating virus accumulation in the hemolymph and other body tissues, the increase in the head/SG was more representative and generalized, showing that the ZIKV accumulates markedly in the head/SG tissues over time.

### Differences between DENV and ZIKV infection patterns in *Ae. aegypti* and general conclusions

In the DENV infections, from early to late infections, the IR remained 100% in four populations, increased in three, and decreased in two of them. In contrast, for ZIKV infections, the IR was always 100% or increased in late infections. This fact indicates that ZIKV, once established in the body, remains after infection, but DENV can no longer be detected in the body

over time in some infected mosquitoes. Therefore, ZIKV seemed to be more difficult to be eliminated from the mosquito body than DENV overtime after infection. In addition, for both DENV and ZIKV infections, some populations (which were not the same for the two arboviruses) had low IR at the early phase and the maximum IR (100%) at the late phase. This fact indicates the presence of a strong midgut barrier against viral establishment until 7 dpi that was not efficient for long periods, with the viruses managing to replicate later and be detected. Regarding the DIR, for both DENV and ZIKV, there was no trend towards a rate increase in late infections. Since the EIP requires 7–14 days for DENV and 7–10 days for ZIKV at the temperature in which the mosquitoes were incubated in the present study (28°C) [12,36,49], an increased DIR at 14 dpi was expected for both arboviruses, which did not occur. Therefore, DENV and ZIKV may not reach the SG in some mosquitoes or can reach them but are eliminated during the post-infection period. In the last case, it could be that the mosquito's immune system managed to develop an efficient antiviral defense until 14 dpi, thus excluding the infection. Corroborating that cell events, such as apoptosis, phagocytosis, and autophagy, make significant contributions to the antiviral defense of dipteran insects like mosquitoes. This response occurs rapidly after infection, effectively reducing the duration of viral access to host factors that are crucial for replication [56].

Three DENV-challenged populations (33.3%) and five ZIKV-challenged populations (55.5%) were more competent at transmitting the viruses (higher VC) in late infections in detriment to early ones. Additionally, two populations were less competent in late infections than to early ones for DENV, while no decrease in competence was detected in ZIKV infections. This finding implies that the risk of ZIKV transmission from the mosquito to the vertebrate host tends to increase over time post-infection. However, the risk of DENV transmission can increase or decrease over time highly dependent on the assessed mosquito population. Interestingly, despite the strong differences seen for the infection responses among the populations, when the means of IR, DIR, and VC for the total population of the city are compared in sets, no difference is detected between DENV and ZIKV. This means that considering the city as a whole, it can be concluded that the competence of *Ae. aegypti* at transmitting DENV and ZIKV is similar, but through specific analysis of the populations, it is evident that the infections responses and VC values do not have equivalence between them. In a practical significance, the city is at the same risk to dengue and Zika outbreaks, but the human populations from each of the nine districts are subjected to different risks to acquire DENV or ZIKV. It demonstrates that the broader VC analysis may hide some important arboviral infection response characteristics noted in specific approaches.

In regards to the quantification of viral copies for both DENV and ZIKV, each tested population revealed that the viral load in the body remained high until 14 dpi, which indicates that despite the high viral spread to the head/SG, many viral particles remain in the other tissues of the body. Furthermore, the DENV viral load did not generally increase in the head/SG from early to late infections. Nevertheless, the ZIKV viral load of almost all mosquito populations (8 of the 9) increased in the head/SG. These results show that ZIKV strongly accumulates in SG tissue over time, but the DENV viral load does not have a pattern; and varies according to the different populations.

Considering the viral load comparisons between DENV and ZIKV infections for the total population of *Ae. aegypti*, the higher DENV viral load in the body and head/SG in early infections and in the body in late infections related to the respective ZIKV loads is not reflected in VC values. As previously discussed, the analysis of the VC rates of the total populations of *Ae. aegypti* revealed similar competencies for transmitting DENV or ZIKV. However, a higher viral load may confer an advantage to DENV through vertical transmission compared with ZIKV, since the viral permanence in high rates indicates larger viral dissemination to the

secondary organs of the body, such as the ovary. Both arboviruses are able to be transmitted to the offspring of *Ae. aegypti* through vertical transmission [57–59], however, as there are no studies comparing *Ae. aegypti* efficiency to vertically transmit DENV and ZIKV; therefore, no evidence was found to check that hypothesis.

Although there are some similarities in the general response patterns of DENV and ZIKV infections of the city mosquito populations when the susceptibility (permissivity) and the viral dissemination are considered; there was no equivalence between the two infections, neither in the analysis of the rate parameters nor in the analysis of the viral loads. Although two of the nine populations presented no difference between DENV and ZIKV loads, their IR, DIR, and VC rate sets varied. This fact shows that although DENV and ZIKV belong to the same viral family [3], the mosquito's susceptibility to DENV and its respective mechanisms to control the infection is not similar to those of ZIKV. The variability in the IR, DIR, and VC rate sets among the populations was greater for DENV than for ZIKV. Similarly, the range of the viral loads was greater for DENV than for ZIKV, and the comparisons among the populations for the same tissue simultaneously showed a greater variability for DENV. It is known that virus-vector interactions include both, general and virus-specific components [60,61]. This means that some infection responses could be similar for DENV and ZIKV, but, as the vectors have evolved antiviral mechanisms in response to infection that are virus-specific, the susceptibility of *Ae. aegypti* has become substantially distinct between DENV and ZIKV infections. In this way, comparative transcriptomic analysis of the midgut between DENV- and ZIKV-infected *Ae. aegypti* at 7dpi showed 61% of the genes (135 of 223) to be uniquely regulated by ZIKV infection, whereas 35% (79 of 223) were regulated by both viruses in the same direction, and 4% in the opposite direction [62]. Besides, differently of DENV and other flaviviruses, which generally replicate in the cell cytoplasm, ZIKV antigen already was detected in the mosquito cell nuclei [63,64]. It indicates differences in the molecular interactions between the vector and each of the two viruses. Therefore, characteristics, such as the pathogen-associated molecular patterns, pathogenesis, or affected tissues, may vary depending on the specific arbovirus type [60], which could explain the differences seen for infection responses between DENV and ZIKV. Finally, the large range of different responses to DENV infection compared to ZIKV infection possibly points to the existence of a wider genetic divergence of the *Ae. aegypti* populations in regards to the phenotypic characteristics that are DENV-specific.

Belo Horizonte is one of the most forested capitals in Brazil, having around 600 thousand urban trees [65]. The city has an average annual temperature of 21.1°C and humidity of 72.2%, with altitudes ranging from 650 m in the Northeast to about 1,150 m in the South. The central area has the densest human occupation with the tallest buildings. The Southern, Southeastern, and Northeastern districts have the largest concentrations of green areas, which have a lower thermal load, favoring cooler temperatures at night. The positive and negative effects produced by the urban environment characteristics, such as geographical relief, temperature, sunlight, rain, wind, green areas, water bodies, streets, concentrations of buildings, etc., categorize the city as having eight classes of urban microclimate [66]. This condition demonstrates that the nine districts of Belo Horizonte, where the *Ae. aegypti* mosquitoes were collected in the present study, have distinct natural environmental conditions [67], which may be related to the inter-population differences in the vector's infection responses that are phenotypically determined by variability in their physical barriers and/or their natural defense responses for confronting the arboviruses [68,69].

Differences in the environment influence population density, and the mosquito's contact with vertebrate hosts, its nutrition, breeding water quality, predation, and intraspecific competition in the larval stage, which may direct the mosquito natural selection in different ways (different selective pressures), causing the variability [32,69]. Variation in population genetic

parameters such as host costs of resistance, demographic population structure, pathogen virulence and transmissibility results in different types of selection, thus generating the pattern of genetic variation in vector susceptibility [70]. As a result, factors such as physical barriers efficiency and/or vector immunity vary and directly influence the vector's ability to become infected after a infective blood meal, thus affecting the VC rate [26,32,68]. Corroborating the present results, previous studies have shown that susceptibility to arboviral infections varies in different *Ae. aegypti* populations [28,38,52]. Numerous studies of phylogeographic analysis have revealed that this vector have a high genetic diversity [28,38–41,71].

Another factor that may influence the inter-population differences in the vector's infection responses is, to a lesser extent than genetic divergence, the presence of distinct microbial communities inside the insect's midguts [37,60]. It is known that the *Ae. aegypti* microbiota may be vertically transmitted to their offspring and, in our study, the mosquito eggs were collected from distinct points of the city, which probably led to distinct microbial exposition to the parental generation of the mosquitoes. The use of further generations (F3/F4) reared in the laboratory conditions probably decreased the natural microbial divergence among the mosquito populations. However, as the microbiota of the mosquito's midgut affects several mosquito traits, including development, nutrition, reproductive capacity, and VC [37,60,72], it is necessary to determine this possible interference in the infection response variability besides the genetic divergence.

Overall, our results demonstrated that all mosquito populations had individuals that were competent in transmitting DENV and ZIKV, which evidences a high potential for epidemic outbreaks in Belo Horizonte. There was considerable variability in the infection responses among the *Ae. aegypti* populations for both flaviviruses, which is probably a reflection of genetic differences between them. The VC increases or does not change in ZIKV infected mosquitoes over time after infection, but it increased, decreased, or remained unaltered in DENV infected mosquitoes. The viral load tended to persist in the body for both flaviviruses, even after a long post-infection period. The ZIKV showed a strong tendency to accumulate in the SG over the dpi in all populations, which did not occur for DENV. Finally, the infection patterns of the populations were not similar between DENV and ZIKV infections, indicating that, although both are flaviviruses, the mosquitoes orchestrate different defense mechanisms to fight them. The current lack of effective vaccines and treatments to dengue and Zika fever, and the mosquito resistance to population control strategies such as insecticides demonstrate the need for additional disease control strategies. The variability seen by our data points to the need to develop transmission-blocking strategies using broader approaches that work for a wide range of vectors. Since the understanding of the virus-vector interaction is critical for the epidemiological control and reduction of virus circulation, these findings should help to direct the development of control strategies to fight dengue and Zika outbreaks in endemic regions. Further studies could elucidate more details about the virus-vector interactions and the elements of these interactions that vary among genetically heterogeneous mosquito populations. A better understanding of the interrelationships of DENV and ZIKV with their vectors will provide a valuable perspective for developing effective approaches for controlling both viruses in the future.

### Supporting information

**S1 Fig.** Number of DENV (A) and ZIKV (B) RNA copies (viral load) per body and head/salivary gland (SG) of *Ae. aegypti* at 7 and 14 days post-infection (dpi). (TIF)

**S2 Fig.** Negative and positive controls to validate the qPCR experiments of DENV (A) and ZIKV (B) infections. The RNA copies of each virus is represented in the body and head/SG, at 7 and 14 dpi, in *A. aegypti* mosquitoes from each administrative district and PP colonized strain (one individual of each) for the negative controls; and only from PP colonized strain for the positive controls (ten individuals). (TIF)

### Acknowledgments

We are grateful to the Animal Facility at the René Rachou Institute for all the technical assistance provided.

### Author Contributions

**Conceptualization:** Raquel Soares Maia Godoy, Luiza dos Santos Felix, Alessandra da Silva Orfanó, Paula Monalisa Nogueira, Nágila Francinete Costa Secundino, Paulo Filemon Paolucci Pimenta.

**Data curation:** Raquel Soares Maia Godoy, Luiza dos Santos Felix, Alessandra da Silva Orfanó, Bárbara Aparecida Chaves, Paula Monalisa Nogueira, Breno dos Anjos Costa, Aline Silva Soares, Cinthia Catharina Azevedo Oliveira, Rafael Nacif-Pimenta, Ana Paula Duarte.

**Formal analysis:** Raquel Soares Maia Godoy.

**Funding acquisition:** Marcus Vinicius Guimarães de Lacerda, Wuelton Marcelo Monteiro, Nágila Francinete Costa Secundino, Paulo Filemon Paolucci Pimenta.

**Investigation:** Raquel Soares Maia Godoy, Luiza dos Santos Felix, Alessandra da Silva Orfanó, Bárbara Aparecida Chaves, Paula Monalisa Nogueira, Breno dos Anjos Costa, Aline Silva Soares, Cinthia Catharina Azevedo Oliveira, Rafael Nacif-Pimenta, Breno Mello Silva, Ana Paula Duarte.

**Methodology:** Raquel Soares Maia Godoy, Luiza dos Santos Felix, Paula Monalisa Nogueira, Rafael Nacif-Pimenta, Nágila Francinete Costa Secundino, Paulo Filemon Paolucci Pimenta.

**Project administration:** Nágila Francinete Costa Secundino, Paulo Filemon Paolucci Pimenta.

**Resources:** Marcus Vinicius Guimarães de Lacerda, Wuelton Marcelo Monteiro, Nágila Francinete Costa Secundino, Paulo Filemon Paolucci Pimenta.

**Supervision:** Nágila Francinete Costa Secundino, Paulo Filemon Paolucci Pimenta.

**Validation:** Raquel Soares Maia Godoy, Luiza dos Santos Felix, Alessandra da Silva Orfanó, Paula Monalisa Nogueira, Breno dos Anjos Costa, Rafael Nacif-Pimenta, Nágila Francinete Costa Secundino, Paulo Filemon Paolucci Pimenta.

**Visualization:** Raquel Soares Maia Godoy, Luiza dos Santos Felix.

**Writing – original draft:** Raquel Soares Maia Godoy, Luiza dos Santos Felix, Nágila Francinete Costa Secundino, Paulo Filemon Paolucci Pimenta.

**Writing – review & editing:** Raquel Soares Maia Godoy, Marcus Vinicius Guimarães de Lacerda, Wuelton Marcelo Monteiro, Nágila Francinete Costa Secundino, Paulo Filemon Paolucci Pimenta.

## References

1. ECDC Data. Updated January 2021. Accessible at: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/geographical-distribution-dengue-cases-reported-worldwide-2020>
2. WHO Data. Countries and territories with current or previous Zika virus transmission. Updated July 2019. Accessible at: <https://www.who.int/emergencies/diseases/zika/countries-with-zika-and-vectors-table.pdf>
3. Contigiani MS, Diaz LA, Spinsanti LI. Flavivirus. In: Marcondes CB, editor. *Arthropod Borne Diseases*, Springer International Publishing Switzerland; 2016, pp. 73–88. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161871> PMID: 27564679
4. Rezende HR, Romano CM, Claro IM, Santos CG, Cerdeira SE, Felix AC, et al. First report of *Aedes albopictus* infected by Dengue and Zika virus in a rural outbreak in Brazil. *PLoS One*. 2020 Mar 12; 15(3):e0229847. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0229847> PMID: 32163449
5. Shope RE, Meegan JM. Arboviruses. In: Evans AS, Kaslow RA, editors. *Viral Infections of Humans: Epidemiology and Control*. Boston, MA: Springer US; 1997. p. 151–183.
6. WHO Data. Dengue and severe dengue. Updated June 2020. Accessible at: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>
7. Wilson ME, Chen LH. Dengue in the Americas. *History of dengue in the Americas*. 2002; 26(1):44–61.
8. Guzman MG, Halstead SB, Artsob H, Buchy P, Farrar J, Gubler DJ, et al. Dengue: a continuing global threat. *Nat Rev Microbiol*. 2010; 8: S7–S16. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2460> PMID: 21079655
9. Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, et al. The global distribution and burden of dengue. *Nature*. 2013; 496: 504–507. <https://doi.org/10.1038/nature12060> PMID: 23563266
10. PAHO/WHO Data. Dengue cases [Cited 12 Apr 2021]. In: Pan American Health Organization/World Health Organization web site [Internet]. Available from: <https://www.paho.org/data/index.php/en/mnu-topics/indicadores-dengue-en/dengue-nacional-en/252-dengue-pais-ano-en.html>
11. Dick GWA, Kitchen SF, Haddock AJ. Zika virus. I. Isolations and serological specificity. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1952; 46: 509–520. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(52\)90042-4](https://doi.org/10.1016/0035-9203(52)90042-4) PMID: 12995440
12. Lanciotti RS, Kosoy OL, Laven JJ, Velez JO, Lambert AJ, Johnson AJ, et al. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. *Emerg Infect Dis*. 2008; 14: 1232–1239. <https://doi.org/10.3201/eid1408.080287> PMID: 18680646
13. Fauci AS, Morens DM. Zika Virus in the Americas—Yet Another Arbovirus Threat. *N Engl J Med*. 2016; 374: 601–604. <https://doi.org/10.1056/NEJMp1600297> PMID: 26761185
14. PAHO/WHO Data. Zika Cumulative Cases [Cited 12 Apr 2021]. In: Pan American Health Organization/World Health Organization web site [Internet]. Available from: [https://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&view=article&id=12390:zika-cumulative-cases&Itemid=42090&lang=en](https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=12390:zika-cumulative-cases&Itemid=42090&lang=en)
15. Chen R, Vasilakis N. Dengue—quo tu et quo vadis? *Viruses*. 2011; 3: 1562–1608. <https://doi.org/10.3390/v3091562> PMID: 21994796
16. Andrade EHP, Figueiredo LB, Vilela APP, Rosa JCC, Oliveira JG, Zibaoui HM, et al. Spatial-temporal co-circulation of dengue virus 1, 2, 3, and 4 associated with coinfection cases in a hyperendemic area of Brazil: a 4-week survey. 2016; 94: 1080–1084.
17. Shihada S, Emmerich P, Thomé-Bolduan C, Jansen S, Günther S, Frank C, et al. Genetic diversity and new lineages of dengue virus serotypes 3 and 4 in returning travelers, Germany, 2006–2015. *Emerg Infect Dis*. 2017; 23(2), 272–275. <https://doi.org/10.3201/eid2302.160751> PMID: 28096525
18. Campos GS, Pinho ACO, Brandão CJF, Bandeira AC, Sardi SI. Dengue virus 4 (DENV-4) re-emerges after 30 years in Brazil: cocirculation of DENV-2, DENV-3, and DENV-4 in Bahia. *Jpn J Infect Dis*. 2015; 68: 45–49. <https://doi.org/10.7883/yoken.JJID.2014.063> PMID: 25420650
19. Lindenbach BD, Thiel HJ, Rice CM. Flaviviridae: the viruses and their replication. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Lippincott-Raven Publishers*, Philadelphia; 2006. pp. 1101–1133.
20. Eiras AE, Pires SF, Staunton KM, Paixão KS, Resende MC, Silva HA, et al. A high-risk Zika and dengue transmission hub: virus detections in mosquitoes at a Brazilian university campus. *Parasit Vectors*. 2018 Jun 22; 11(1):359. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2883-8> PMID: 29929561
21. WHO Data. Zika epidemiology update. 2019 Jul 2 [Cited 2020 Oct 18]. In: World Health Organization web site [Internet]. Available from: <https://www.who.int/emergencies/diseases/zika/epidemiology-update/en/>
22. WHO Data. Dengue and severe dengue. 2020 Jun 23 [Cited 2020 Sep 22]. In: World Health Organization web site [Internet]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>

23. Kraemer MU, Sinka ME, Duda KA, Mylne AQ, Shearer FM, Barker CM, et al. The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*. *eLife*. 2015; 4: e08347. <https://doi.org/10.7554/eLife.08347> PMID: 26126267
24. Cirimotich CM, Ramirez JL, Dimopoulos G. Native microbiota shape insect vector competence for human pathogens. *Cell host & microbe*. 2011; 10(4): 307–310. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2011.09.006> PMID: 22018231
25. Dennison NJ, Jupatanakul N, Dimopoulos G. The mosquito microbiota influences vector competence for human pathogens. *Curr Opin Insect Sci*. 2014; 3: 6–13. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2014.07.004> PMID: 25584199
26. Villegas LEM, Campolina TB, Barnabe NR, Orfano AS, Chaves BA, Norris DE, et al. Zika virus infection modulates the bacterial diversity associated with *Aedes aegypti* as revealed by metagenomic analysis. *PLoS One*. 2018; 13: e0190352. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190352> PMID: 29293631
27. Gloria-Soria A, Armstrong PM, Powell JR, Turner PE. Infection rate of *Aedes aegypti* mosquitoes with dengue virus depends on the interaction between temperature and mosquito genotype. *Proc Biol Sci*. 2017; 284: 201711506. <https://doi.org/10.1098/rspb.2017.1506> PMID: 28978730
28. Gonçalves CM, Melo FF, Bezerra JMT, Chaves BA, Silva BM, Silva LD, et al. Distinct variation in vector competence among nine field populations of *Aedes aegypti* from a Brazilian dengue-endemic risk city. *Parasit Vectors*. 2014; 7: 320. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-320> PMID: 25015526
29. Houk EJ, Hardy JL. Vector competence of mosquitoes for arboviruses. California: University of California Berkeley; 1988.
30. Agarwal A, Parida M, Dash PK. Impact of transmission cycles and vector competence on global expansion and emergence of arboviruses. *Rev. Med. Virol*. 2017; 27: e1941. <https://doi.org/10.1002/rmv.1941> PMID: 28857363
31. Black WC 4th, Bennett KE, Gorrochotegui-Escalante N, Barillas-Mury C V, Fernandez-Salas I, de Lourdes Munoz M, et al. *Flavivirus* susceptibility in *Aedes aegypti*. *Arch Med Res*. 2002; 33: 379–388. [https://doi.org/10.1016/s0188-4409\(02\)00373-9](https://doi.org/10.1016/s0188-4409(02)00373-9) PMID: 1234528
32. Hardy JL, Houk EJ, Kramer LD, Reeves WC. Intrinsic factors affecting vector competence of mosquitoes for arboviruses. *Annu Rev Entomol*. 1963; 28: 229–262. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.28.010183.001305> PMID: 6131642
33. Carrington LB, Armijos MV, Lambrechts L, Scott TW. Fluctuations at a low mean temperature accelerate dengue virus transmission by *Aedes aegypti*. *PLOS Negl Trop Dis*. 2013; 7(4): e2190. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002190> PMID: 23638208
34. Lambrechts L, Paaijmans KP, Fansiri T, Carrington LB, Kramer LD, Thomas MB, et al. Impact of daily temperature fluctuations on dengue virus transmission by *Aedes aegypti*. *PNAS*. 2011; 108(18) 7460–7465. <https://doi.org/10.1073/pnas.1101377108> PMID: 21502510
35. Liu Z, Zhang Z, Lai Z, Zhou T, Jia Z, Gu J, Wu K, Chen XG. Temperature increase enhances *Aedes albopictus* competence to transmit dengue virus. *Front Microbiol*. 2017; 8:2337. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02337> PMID: 29250045
36. Winokur OC, Main BJ, Nicholson J, Barker CM. Impact of temperature on the extrinsic incubation period of Zika virus in *Aedes aegypti*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2020; 14(3), e0008047. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008047> PMID: 32187187
37. Scolari F, Casiraghi M, Bonizzoni M. *Aedes* spp. and their microbiota: A Review. *Front Microbiol [Internet]*. 2019; 10:2036. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02036> PMID: 31551973
38. Bennett KE, Olson KE, Muñoz MDL, Fernandez-Salas I, Farfan-Ale JA, Higgs S, et al. Variation in vector competence for dengue 2 virus among 24 collections of *Aedes aegypti* from Mexico and the United States. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. 2002; 67:85–92. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2002.67.85> PMID: 12363070
39. Diallo M, Ba Y, Faye O, Soumare ML, Dia I, Sall AA. Vector competence of *Aedes aegypti* populations from Senegal for sylvatic and epidemic dengue 2 virus isolated in West Africa. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2008 May; 102(5):493–8. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2008.02.010> PMID: 18378270
40. Vazeille-falcoz M, Mousson L, Rodhain F, Chungue E, Failloux AB. Variation in oral susceptibility to dengue type 2 virus of populations of *Aedes aegypti* from the islands of Tahiti and Moorea, French Polynesia. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. 1999; 60:292–9. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1999.60.292> PMID: 10072154
41. Vega-Rúa A, Marconcini M, Madec Y, Manni M, Carrareto D, Gomulsky LM, et al. Vector competence of *Aedes albopictus* populations for chikungunya virus is shaped by their demographic history. *Commun Biol*. 2020; 3: 326. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-1046-6> PMID: 32581265

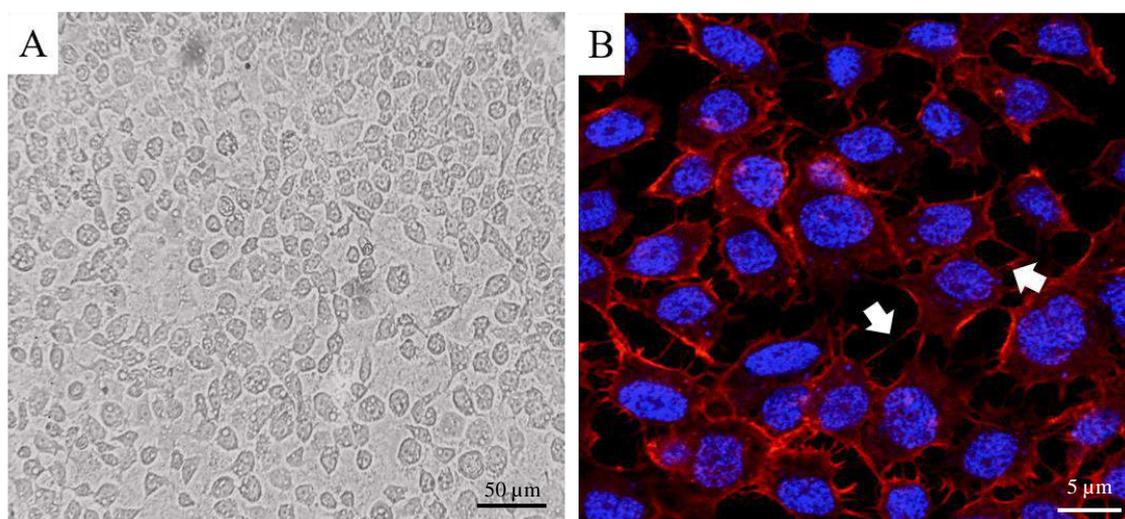
42. Prefeitura de Belo Horizonte: Dengue. 2020 [Cited Sep 2020]. In: Prefeitura de Belo Horizonte web site [Internet]. Available from: <https://prefeitura.pbh.gov.br/saude/informacoes/vigilancia/vigilancia-epidemiologica/doencas-transmissiveis/dengue>
43. Prefeitura de Belo Horizonte: Zika. 2020 [Cited Out 12]. In: Prefeitura de Belo Horizonte web site [Internet]. Available from: <https://prefeitura.pbh.gov.br/saude/informacoes/vigilancia/vigilancia-epidemiologica/doencas-transmissiveis/zika>
44. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística—IBGE. Belo Horizonte, Minas Gerais. 2019 [Cited 2020 Aug 21]. In: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística web site [Internet]. Available from: <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/mg/belo-horizonte/panorama>
45. Prefeitura de Belo Horizonte: Regionais de Belo Horizonte. 2020 [Cited Out 11]. In: Prefeitura de Belo Horizonte web site [Internet]. Available from: <https://prefeitura.pbh.gov.br/planejamento/modernizacao-da-gestao/centrais-de-atendimento/regionais>
46. Cunha MS, Esposito DLA, Rocco IM, Maeda AY, Vasami FGS, Nogueira JS, et al. First complete genome sequence of Zika virus (Flaviviridae, Flavivirus) from an autochthonous transmission in Brazil. *Genome Announc*. 2016; 4: e00032–16. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00032-16> PMID: 26941134
47. White LA. Susceptibility of *Aedes albopictus* C6/36 cells to viral infection. *J Clin Microbiol*. 1987; 25: 1221–1224. <https://doi.org/10.1128/jcm.25.7.1221-1224.1987> PMID: 3611315
48. LaBarre DD, Lowy RJ. Improvements in methods for calculating virus titer estimates from TCID50 and plaque assays. *J Virol Methods*. 2001; 96: 107–126. [https://doi.org/10.1016/s0166-0934\(01\)00316-0](https://doi.org/10.1016/s0166-0934(01)00316-0) PMID: 11445142
49. Secundino NFC, Chaves BA, Orfano AS, Silveira KRD, Rodrigues NB, Campolina TB, et al. Zika virus transmission to mouse ear by mosquito bite: a laboratory model that replicates the natural transmission process. *Parasites Vectors*. 2017; 10: 346. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2286-2> PMID: 28728607
50. Siler JF, Hall MW, Hitchens AP. Dengue: its history, epidemiology, mechanism of transmission, etiology, clinical manifestations, immunity, and prevention. Philippine Islands: Bureau of printing; 1926.
51. Schule PA. Dengue fever: transmission by *Aedes aegypti*. *Am J Trop Med Hyg*. 1928; 8: 203–213.
52. Roundy CM, Azar SR, Rossi SL, Huang JH, Leal G, Yun R, et al. Variation in *Aedes aegypti* mosquito competence for Zika virus transmission. *Emerg Infect Dis*. 2017; 23: 625–632. <https://doi.org/10.3201/eid2304.161484> PMID: 28287375
53. Morales-Vargas RE, Missé D, Chavez IF, Kittayapong P. Vector Competence for Dengue-2 Viruses Isolated from Patients with Different Disease Severity. *Pathogens*. 2020 Oct 21; 9(10):859. <https://doi.org/10.3390/pathogens9100859> PMID: 33096624
54. Pinheiro TM, Mota MTO, Watanabe ASA, Biselli-Périco JM, Drumond BP, Ribeiro MR, et al. Viral immunogenicity determines epidemiological fitness in a cohort of DENV-1 infection in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis*. 2018 May 29; 12(5):e0006525. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006525> PMID: 29813061
55. Raquin V, Lambrechts L. Dengue virus replicates and accumulates in *Aedes aegypti* salivary glands. *Virology*. 2017; 507: 75–81. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2017.04.009> PMID: 28431281
56. Liu B, Behura SK, Clem RJ, Schneemann A, Becnel J, Severson DW, et al. P53-mediated rapid induction of apoptosis conveys resistance to viral infection in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Pathog*. 2013; 9: e1003137. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003137> PMID: 23408884
57. Ciota AT, Bialosuknia SM, Ehrbar DJ, Kramer LD. Vertical transmission of Zika virus by *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* mosquitoes. *Emerg Infect Dis*. 2017; 23(5): 880–882. <https://doi.org/10.3201/eid2305.162041> PMID: 28277199
58. Ferreira-de-Lima VH, Lima-Camara TN. Natural vertical transmission of dengue virus in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*: a systematic review. *Parasites Vectors*. 2018; 11: 77. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2643-9> PMID: 29391071
59. Thangamani S, Huang J, Hart CE, Guzman H, Tesh RB. Vertical transmission of Zika virus in *Aedes aegypti* mosquitoes. 2016; 95(5):1169–73. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0448> PMID: 27573623
60. Palmer WH, Varghese FS, van Rij RP. Natural variation in resistance to virus infection in dipteran insects. *Viruses*. 2018; 10(3), 118. <https://doi.org/10.3390/v10030118> PMID: 29522475
61. Yasunaga A, Hanna SL, Li J, Cho H, Rose PP, Spiridigliozzi A, et al. Genome-wide RNAi screen identifies broadly-acting host factors that inhibit arbovirus infection. *PLoS Pathog*. 2014; 10:e1003914. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003914> PMID: 24550726
62. Angleró-Rodríguez YI, MacLeod HJ, Kang S, Carlson JS, Jupatanakul N, Dimopoulos G. *Aedes aegypti* molecular responses to Zika virus: modulation of infection by the Toll and Jak/Stat immune pathways and virus host factors. *Front Microbiol*. 2017 Oct 23; 8:2050. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02050> PMID: 29109710

63. Buckley A, Gould EA. 1988. Detection of virus-specific antigen in the nuclei or nucleoli of cells infected with Zika or Langkat virus. *J. Gen. Virol.* 69, 1913–1920. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-69-8-1913> PMID: 2841406
64. Suwanmanee S, Lupiertop N. Dengue and Zika viruses: lessons learned from the similarities between these *Aedes* mosquito-vectored arboviruses. *J Microbiol.* 2017 Feb; 55(2):81–89. <https://doi.org/10.1007/s12275-017-6494-4> PMID: 28120186
65. Braga RM, Souza MM, Braga FA, Venturin N. Post-pruning growth of some afforestation species in the metropolitan region of Belo Horizonte, Minas Gerais state, Brazil. *Revista Árvore.* 2020; 44, e4411.
66. Ferreira DG, Assis ES, Katzschner L. Construção de um mapa climático analítico para a cidade de Belo Horizonte, Brasil. *Revista Brasileira de Gestão Urbana.* 2017; 9(1), 255–270.
67. Assis WL. The natural climates of the city Belo Horizonte–MG, Brazil. 2012;115–35.
68. Franz AWE, Kantor AM, Passarelli AL, Clem RJ. Tissue barriers to arbovirus infection in mosquitoes. *Viruses.* 2015; 7: 3741–3767. <https://doi.org/10.3390/v7072795> PMID: 26184281
69. Kramer LD, Ciota AT. Dissecting vectorial capacity for mosquito-borne viruses. *Curr Opin Virol.* 2015; 15: 112–118. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2015.10.003> PMID: 26569343
70. Anderson RM, May RM. Coevolution of Hosts and Parasites. *Parasitology* 1982, 85, 411–426. <https://doi.org/10.1017/s0031182000055360> PMID: 6755367
71. Lv R, Zhu C, Wang C, Ai Li, Lv H, Zhang B, et al. Genetic diversity and population structure of *Aedes aegypti* after massive vector control for dengue fever prevention in Yunnan border areas. *Sci Rep.* 2020; 10, 12731. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69668-7> PMID: 32728176
72. Van Tol S, Dimopoulos G. Influences of the mosquito microbiota on vector competence. *Adv. Insect Physiol.* 2016; 51, 243–291.

#### 4.1 Imunomarcação de células infectadas por DENV e ZIKV

O processo de infecção por DENV e ZIKV das culturas de células C6/36 foi observado e caracterizado através da análise em microscopia confocal. A linhagem das células C6/36 é oriunda de larvas do mosquito *Aedes albopictus*. Elas formam uma monocamada que se adere às superfícies aonde são cultivadas, emitem diversos prolongamentos (filopódios) assumindo um aspecto estrelado, e apresentam um núcleo proeminente arredondado ou ovalado e com nucléolo evidente (Fotomicrografia 1).

**Fotomicrografia 1:** Células C6/36 não infectadas – (A) visão da monocamada celular por microscopia de luz de campo claro. (B) detalhes dos filopódios (setas) e dos núcleos celulares (azul) em microscopia confocal; vermelho: filamentos de actina.



**Fonte:** A autora (2022).

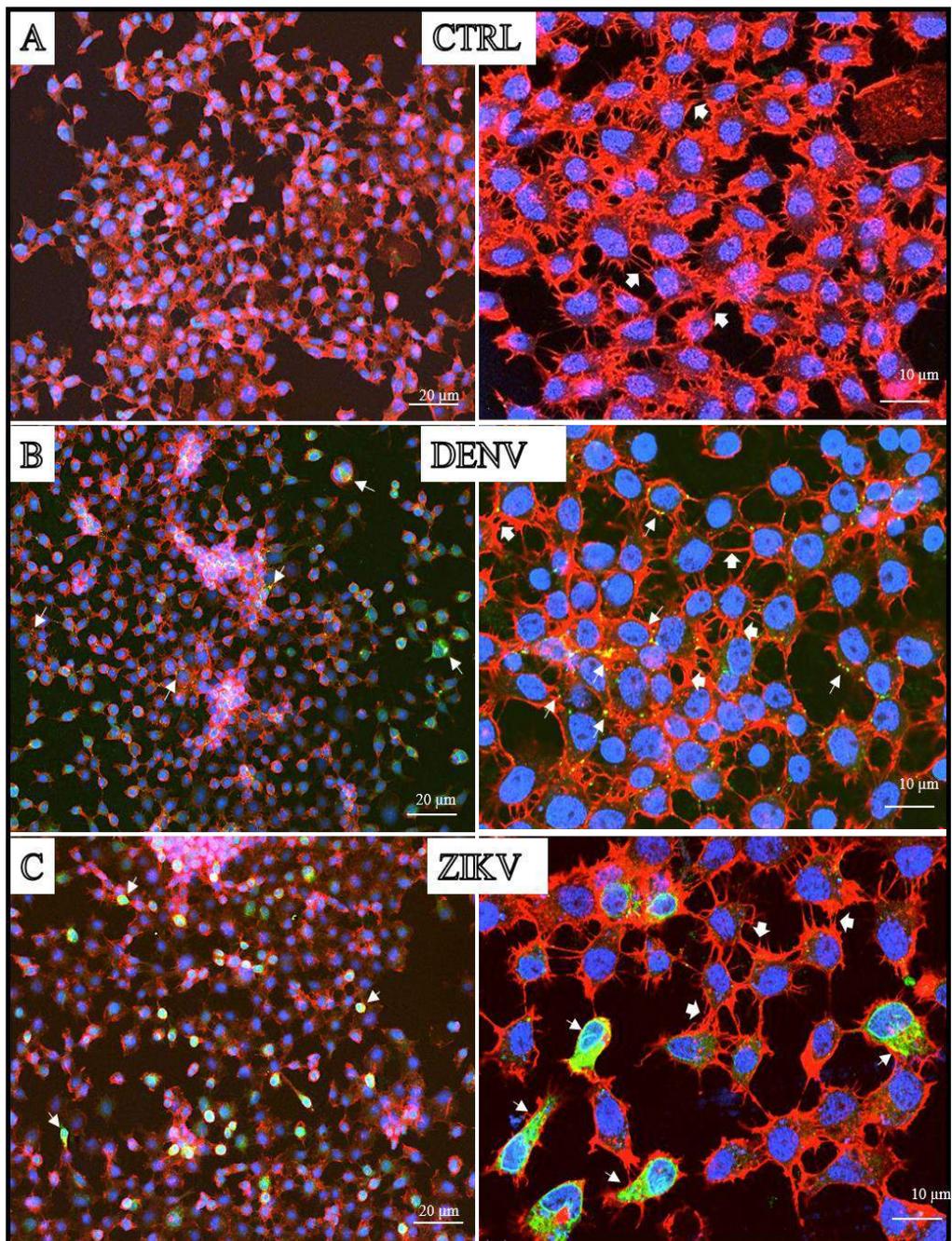
Conforme esperado, as características morfológicas das células C6/36 não-infectadas seguiu o mesmo padrão em todas as replicatas. Após infectarmos essas células, tanto DENV quanto ZIKV foram detectados no citoplasma desde o período inicial de 24h pós-infecção estando nos tempos tardios presentes no citoplasma celular.

As características morfológicas das células infectadas pelos dois vírus serão descritas separadamente para cada um dos tempos pós-infecção e sempre comparadas com os controles, células não infectadas:

*1º dia pós-infecção* – A monocamada apresentou distribuição homogênea para as infecções com ambos os vírus. Para DENV, quase todas as células infectaram-se, e os vírus foram observados aderidos à membrana plasmática, e em regiões pontuais do

citoplasma celular próximas à superfície celular. Em contraste, para ZIKV, os vírus ficaram restritos a poucas células, onde distribuíram-se em forma de rede pelo citoplasma e acumularam-se principalmente ao redor do núcleo. Não foram observadas alterações drásticas e estruturais nas células infectadas em relação às do experimento controle (Fotomicrografia 2).

**Fotomicrografia 2:** Imunomarcação de células C6/36 no 1º dia pós-infecção – (A) células não infectadas. (B) células infectadas por DENV. (C) células infectadas por ZIKV. Setas finas: células infectadas; setas cheias: filopódios; verde: vírus; azul: núcleos; vermelho: filamentos de actina.

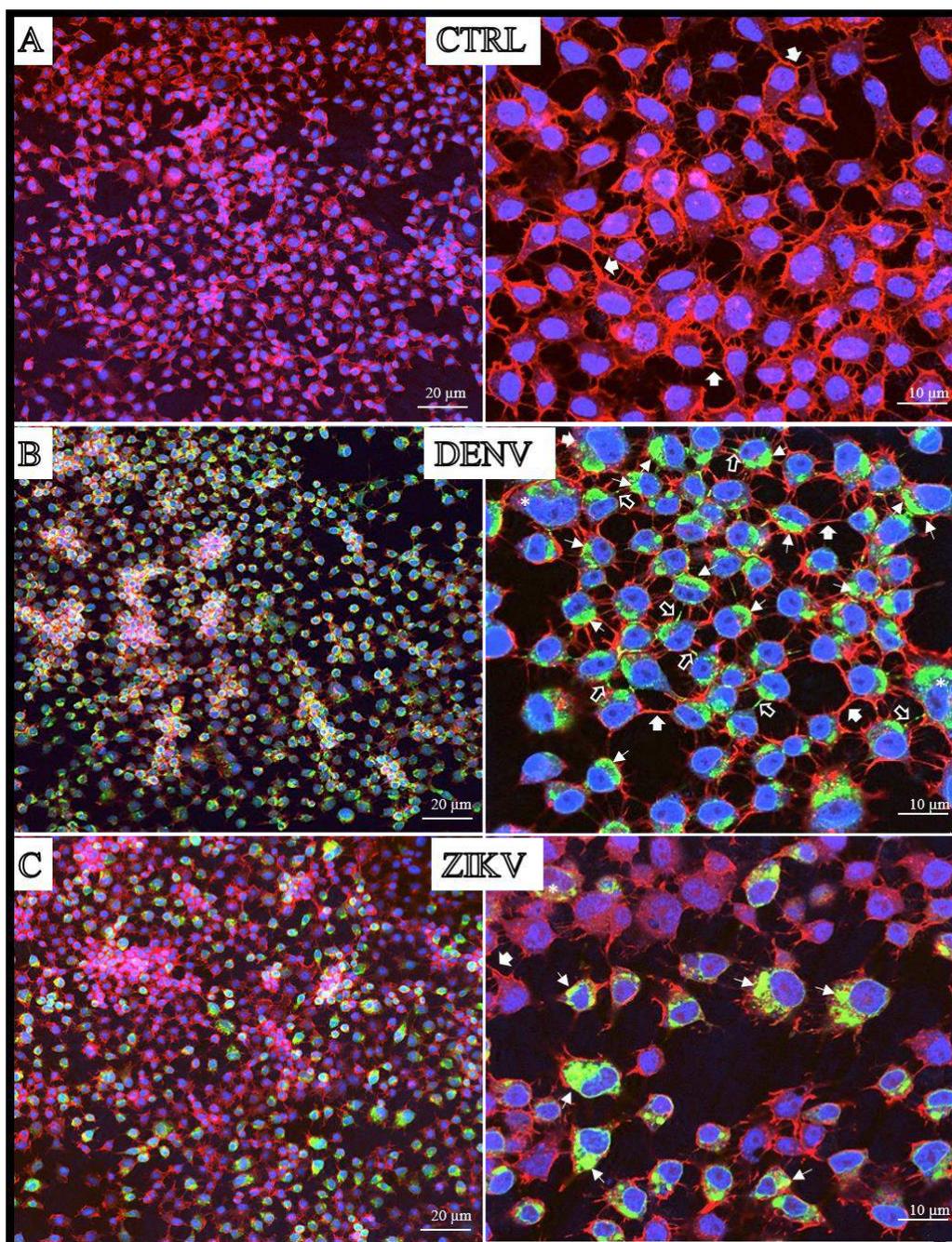


**Fonte:** A autora (2022).

*2º dia pós-infecção* – Houve um aumento da quantidade de células infectadas para ambas as infecções em relação ao período anterior. Nas células infectadas com DENV, as partículas virais passaram a distribuir-se na região perinuclear e nos filopódios. Visualmente, todas as células se apresentaram infectadas. Algumas células multinucleadas e de tamanho destacado em relação à maioria das células da monocamada foram detectadas. Para as células infectadas por ZIKV, a marcação viral foi mais intensa

em relação ao 1º dia pós infecção, porém a distribuição dos vírus no citoplasma foi similar (Fotomicrografia 3).

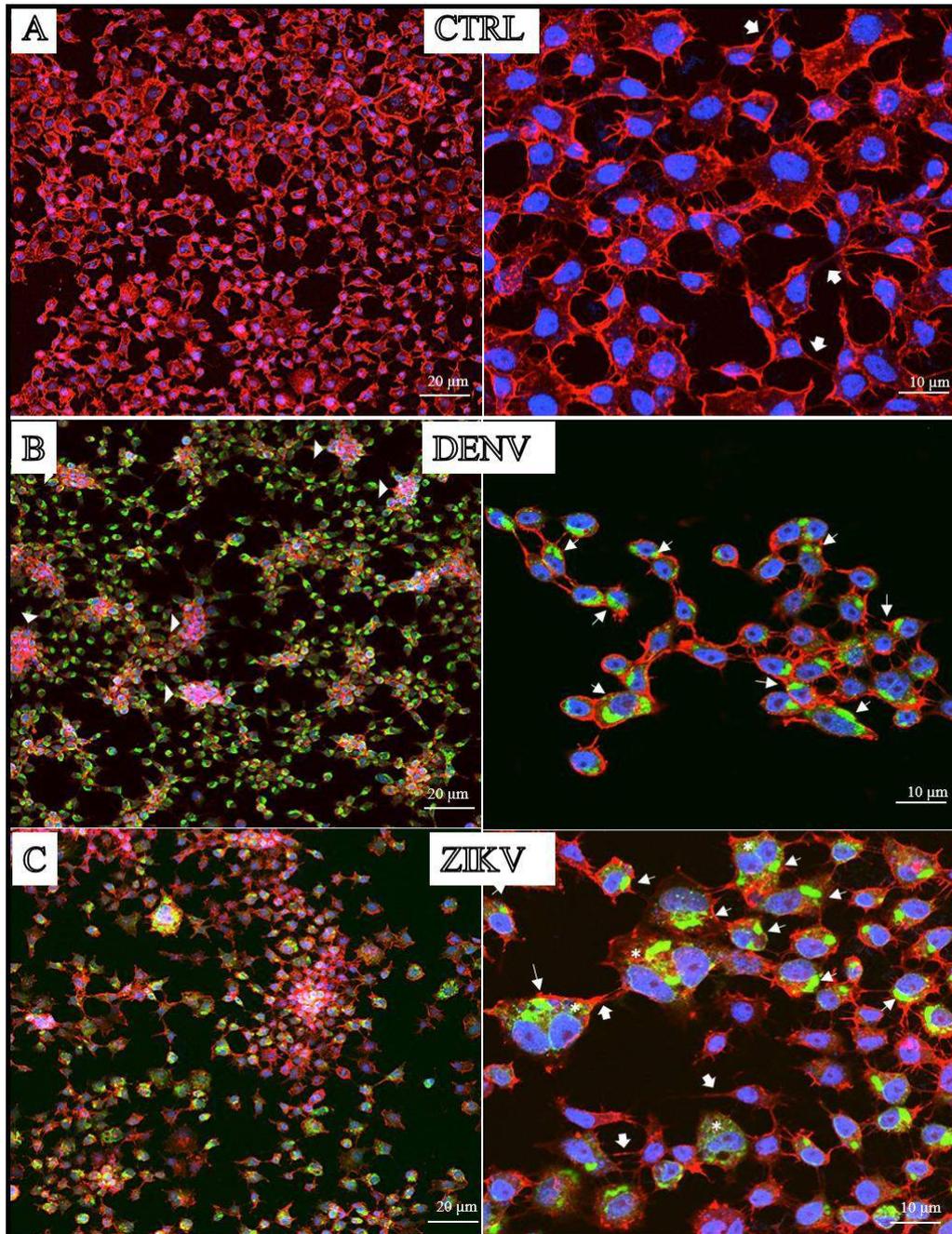
**Fotomicrografia 3:** Imunomarcação de células C6/36 no 2º dia pós-infecção – (A) células não infectadas; (B) células infectadas por DENV; (C) células infectadas por ZIKV. Setas finas: vírus no citoplasma celular; setas cheias pretas: vírus nos filopódios; asteriscos: células multinucleadas; setas cheias brancas: filopódios; verde: vírus; azul: núcleos; vermelho: filamentos de actina.



Fonte: A autora (2022).

*3º dia pós-infecção* – Para DENV, foram detectados agrupamentos celulares ao longo da monocamada. As células reduziram as projeções citoplasmáticas, podendo ser atribuído um aspecto mais arredondado a elas. As partículas de DENV concentraram-se principalmente na região perinuclear. Na infecção pelo ZIKV, foram detectadas inúmeras células infectadas de tamanho destacado e multinucleadas exibindo projeções celulares (Fotomicrografia 4).

**Fotomicrografia 4:** Imunomarcacão de células C6/36 no 3º dia pós-infecção – (A) células não infectadas; (B) células infectadas por DENV; (C) células infectadas por ZIKV. Setas finas: vírus no citoplasma celular; asteriscos: células multinucleadas; setas cheias brancas: filopódios; verde: vírus; azul: núcleos; vermelho: filamentos de actina.

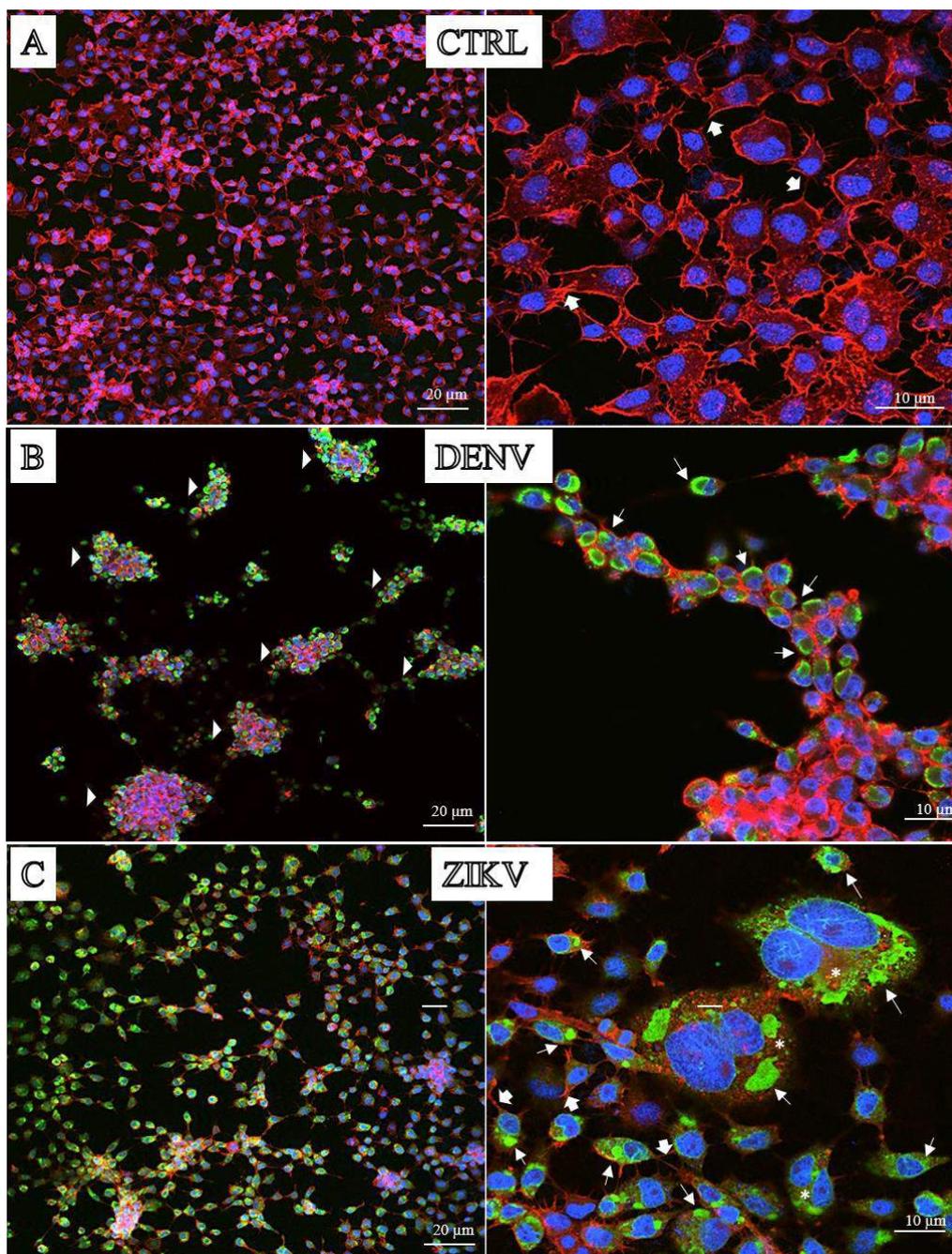


**Fonte:** A autora (2022).

*4º dia pós-infecção* – Houve um pico de alterações morfológicas causadas pela infecção por DENV. A monocamada sofreu perda significativa da confluência, com presença de agrupamentos celulares bem definidos, redução de projeções celulares e células soltas no sobrenadante celular. As partículas virais concentraram-se próximas à membrana celular. Na infecção por ZIKV, células multinucleadas de tamanho destacado foram vistas espalhadas pela monocamada. A monocamada apresentou aspecto predominantemente homogêneo, com células distribuídas uniformemente. As partículas de ZIKV

concentraram-se na região citoplasmática, no interior de estruturas similares a sacos (Fotomicrografia 5).

**Fotomicrografia 5:** Imunomarcação de células C6/36 no 4º dia pós-infecção – (A) células não infectadas; (B) células infectadas por DENV; (C) células infectadas por ZIKV. Setas finas: vírus no citoplasma celular; cabeças de seta: agrupamentos celulares; asteriscos: células multinucleadas; setas cheias brancas: filopódios; verde: vírus; azul: núcleos; vermelho: filamentos de actina.

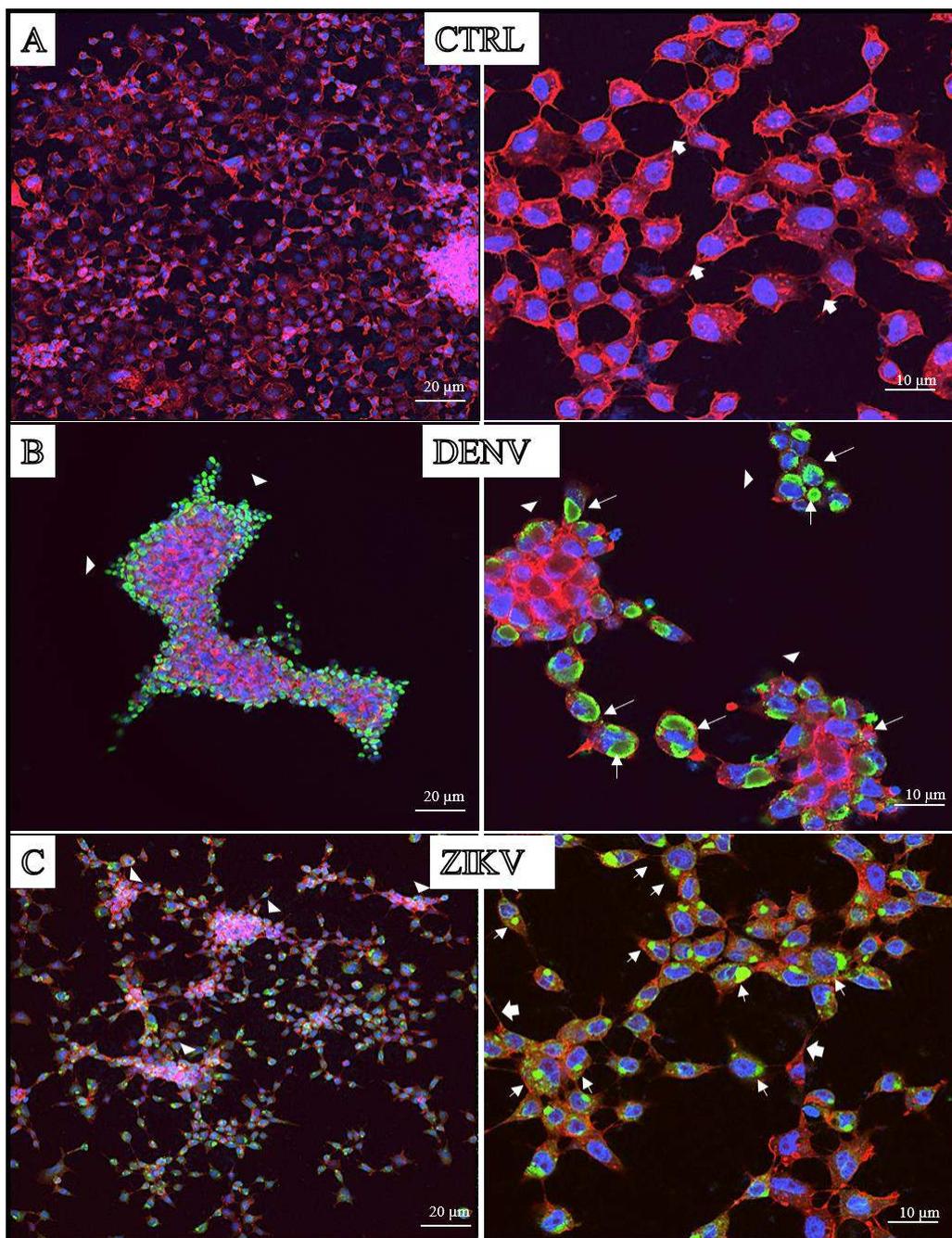


Fonte: A autora (2022).

*5º dia pós-infecção* – Para a infecção com DENV, foi observado o aumento do número de células desaderidas. As células remanescentes apresentaram-se intensamente agrupadas, com aspecto arredondado, e escassas projeções citoplasmáticas. Os vírus foram observados espalhados por quase toda a extensão da área citoplasmática. Para ZIKV, iniciou-se a formação de agrupamentos celulares. As partículas de ZIKV apresentaram distribuição similar em relação aos demais períodos pós-infecção (Fotomicrografia 6).

**Fotomicrografia 6:** Imunomarcção de células C6/36 no 5º pós-infecção – (A) células não infectadas; (B) células infectadas por DENV; (C) células infectadas por ZIKV. Setas finas: vírus no citoplasma celular; cabeças de seta: agrupamentos celulares; setas cheias

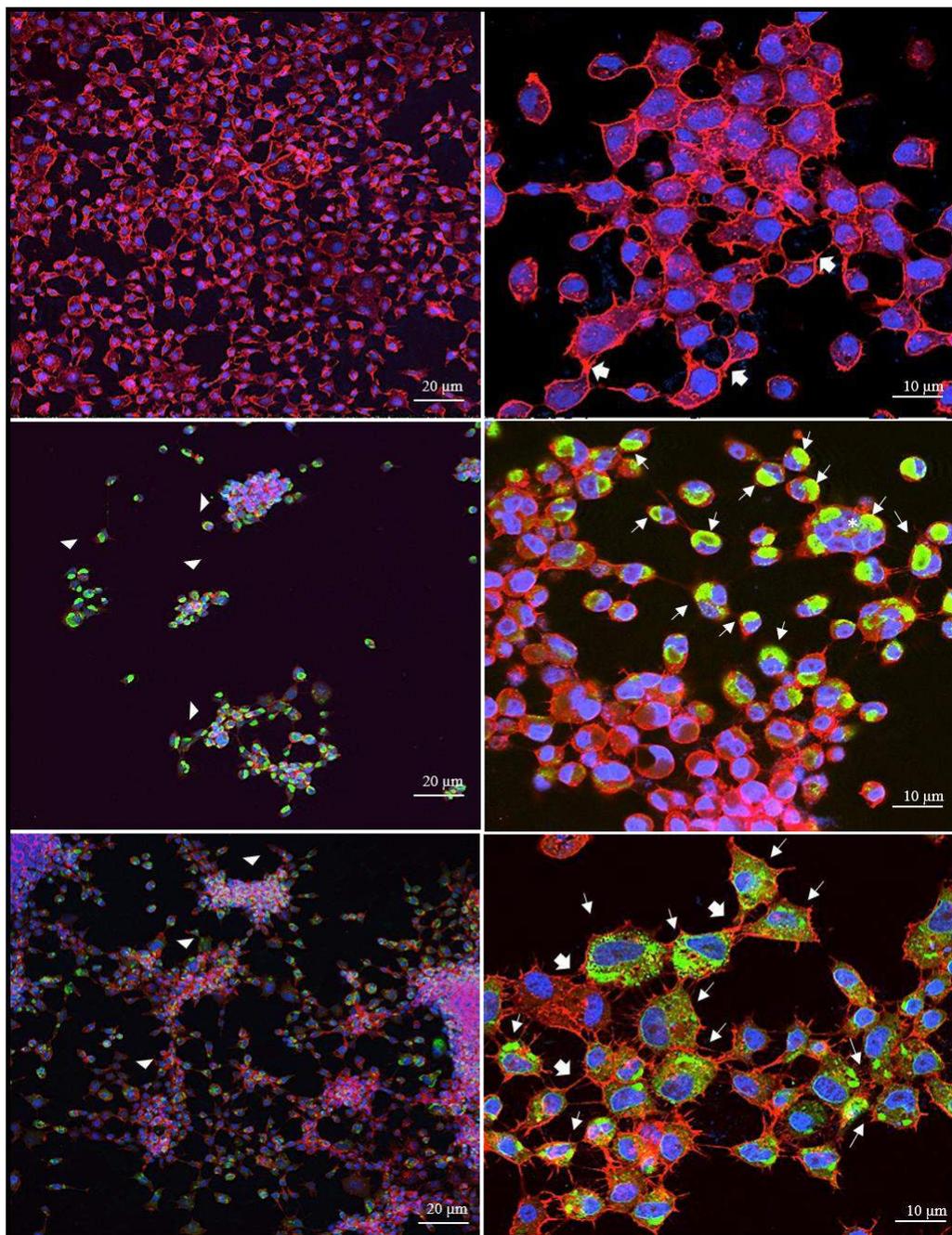
brancas: filopódios; verde: vírus; azul: núcleos; vermelho: filamentos de actina.



**Fonte:** A autora (2022).

*6º dia pós-infecção* – Na infecção por DENV, houve uma intensa perturbação da monocamada celular, onde poucas células foram encontradas aderidas. Estas são arredondadas, multinucleadas e agrupadas. Partículas virais concentraram-se no citoplasma celular. Para ZIKV, os vírus distribuíram-se ao longo de todo citoplasma celular. Agrupamentos celulares pouco delimitados, e células grandes com projeções citoplasmáticas também foram observados (Fotomicrografia 7).

**Fotomicrografia 7:** Imunomarcação de células C6/36 no 6º dia pós-infecção – (A) células não infectadas; (B) células infectadas por DENV; (C) células infectadas por ZIKV. Setas finas: vírus no citoplasma celular; cabeças de seta: agrupamentos celulares; asteriscos: células multinucleadas; setas cheias brancas: filopódios; verde: vírus; azul: núcleos; vermelho: filamentos de actina.



**Fonte:** A autora (2022).

## DISCUSSÃO

A linhagem C6/36 (ATCC CRL-1660) oriundas de larvas de *A. albopictus*, utilizada no presente estudo, é a mais usada em pesquisas sobre a biologia e virologia de insetos. Devido a sua alta permissividade à infecção por arbovírus e fácil manutenção, ela é muitas vezes escolhida para experimentos que necessitam da replicação viral para posterior infecção de mosquitos (WALKER et al., 2014). Nós utilizamos as células C6/36 neste estudo com um propósito diferente, buscando por um modelo *in vitro* que pudesse evidenciar particularidades das infecções causadas por DENV e ZIKV. A uniformidade comportamental das células C6/36 vista durante o cultivo celular foi importante para garantir maior confiabilidade aos nossos resultados.

As diferenças observadas entre DENV e ZIKV quanto ao padrão de distribuição viral pelo citoplasma celular e as alterações morfológicas geradas nas células da linhagem C6/36 de 24h a 144h - de 1 a 6 dias pós-infecção sugerem que, mesmo sendo estruturalmente similares, esses vírus podem apresentar diferenças relacionadas ao recrutamento de moléculas da células hospedeira para seguir com a replicação, ou desencadear distintas respostas celulares, como estresse oxidativo, resposta a proteína mal enovelada e apoptose. Indicativos destes achados, estudos prévios mostraram que DENV e ZIKV produzem efeitos diferentes nas células que infectam (BRAULT et al., 2016; MINER e DIAMOND, 2017). O padrão de infecção e disseminação no corpo do vetor também difere entre DENV e ZIKV (CHAVES et al., 2018; RODRIGUES et al., 2021), sugerindo que o tropismo, os efeitos metabólicos da infecção, e as respostas antivirais desencadeadas pelo DENV tenham uma variação considerável em relação aos do ZIKV. Adicionalmente, como o DENV foi detectado na maioria das células desde o primeiro dia pós infecção, enquanto ZIKV infectou apenas poucas células nesse mesmo período, é possível inferir que o tempo necessário para a invasão celular difere entre os vírus. Isso indica que as células C6/36 são mais resistentes à infecção pelo ZIKV do que pelo DENV nos períodos iniciais de contato com o vírus.

Não podemos afirmar que a distribuição viral e/ou as modificações estruturais oriundas das infecções para DENV e ZIKV seguirão o mesmo padrão em linhagens celulares diferentes da C6/36. Diversas linhagens celulares de insetos, tais como a Aag2 (originária de larvas de *A. aegypti*) além da C6/36 (originária de larvas de *A. albopictus*), são utilizadas para o isolamento, detecção e propagação de diversos arbovírus (WALKER et al., 2014). Porém, a origem das células hospedeiras influenciam a eficiência de

replicação dos arbovírus em culturas de células (GUERRERO; BELLO, 2019), pois os vírus possuem tropismos por diferentes tecidos e encontram diferentes resistências à invasão e replicação viral (DIAMOND, 2017). Além disso, diversos fatores como a cepa e o sorotipo do vírus, e a afinidade viral aos receptores de membrana também tem potencial de interferir nos efeitos das infecções.

As células C6/36 apresentaram partículas virais de DENV e ZIKV no citoplasma desde o primeiro dia pós-infecção, assim como demonstrado por Offerdahl et al., (2017), Barreto-Vieira et al., (2017) e Junjohn et al., (2014). Isso indica que, em menos de 24h, os vírus ligam-se aos receptores de membrana, as partículas virais penetram nas células por endocitose mediada por clatrina (MOSSO et al., 2008), e o ambiente ácido das vesículas endocíticas leva à fusão entre as membranas, liberando o material genético no citoplasma, próximo ao RE, onde ocorrerá a replicação e montagem de novas partículas virais (MOSSO et al., 2008).

A presença de partículas virais em estruturas em forma de sacos no citoplasma em alguns períodos pós-infecção; nos filopódios das células e conectadas à membrana celular em outros, indica que etapas específicas do ciclo viral podem predominar em determinados períodos. Durante a infecção, proteínas virais modificam a membrana do RE, formando vesículas conectadas ao citosol (MOSSO et al., 2008; WELSCH et al., 2009). As partículas virais acumulam-se nas cisternas do RE e são transportadas em vesículas secretoras para o complexo de Golgi (MOSSO et al., 2008; WELSCH et al., 2009). Neste estudo, observamos um aumento do número de células positivas para a infecção, com intensa marcação de partículas virais em ambiente citoplasmático, possivelmente em regiões do complexo de replicação viral (RE + aparelho de Golgi); e partículas virais na superfície das células e filopódios, momento que provavelmente antecede a saída dos vírus das células hospedeiras em direção ao meio externo. Estes resultados corroboram os dados a respeito do ciclo de vida dos arbovírus, e indicam um aumento na replicação e disseminação viral.

De acordo com Zhang e colaboradores (2016), os filopódios são essenciais para infecção inicial e disseminação da infecção para células adjacentes, além de serem extremamente importantes para a migração e comunicação celular. A presença de partículas de DENV nos filopódios celulares pode ser associada à utilização dessas estruturas como pontes de conexão e disseminação de partículas virais para células

vizinhas, maximizando, assim, o processo de infecção, conforme descrito na literatura (CORREA; GÓMEZ, 2010).

Os flavivírus interagem diretamente com o citoesqueleto para realizar processos como entrada, transporte entre vesículas, montagem de novas partículas virais e egresso celular. Como a estruturação do citoesqueleto é o principal fator que define a morfologia das células, isso justifica a redução dos filopódios e o arredondamento das células infectadas por DENV em alguns períodos pós-infecção. Arredondamento celular também foi observado como efeito citopático após a infecção viral em outros estudos (FIGUEIREDO, 1989; WELSCH et al., 2009; BARRETO-VEIRA et al., 2017; GUERRERO e BELLO, 2019; CHENG et al., 2021). Os filamentos de actina são de extrema importância para a infecção, pois influenciam a distribuição de receptores de membrana responsáveis pela adesão viral inicial (WALSH e NAGHAVI, 2019). Estudos prévios mostraram que a perturbação do citoesqueleto de actina reduz a entrada de partículas de DENV-2 nas células e inibe a montagem e maturação da progênie viral (ZHANG et al., 2019; OROZCO-GARCÍA, TRUJILLO-CORREA, GALLEGO-GÓMEZ, 2016), reforçando a importância da interação dos flavivírus com os componentes do citoesqueleto durante o processo de replicação.

Os agrupamentos celulares vistos com frequência nas infecções por DENV provavelmente são reflexo de eventos de morte celular e aderência de membranas causadas pela invasão viral. Geralmente, o efeito citopático em C6/36 inicia-se com a citólise de algumas células e evolui gradualmente, levando ao aparecimento de grupos celulares e de grandes massas sinciciais (FIGUEIREDO, 1990). Similarmente, Summers e colaboradores (1989) e Randolph e Stollar (1990), observaram formação inicial de agrupamentos celulares após a infecção por DENV, ambos em resposta à replicação viral ativa. Entretanto, em contraste às células infectadas pelo DENV, tal efeito não foi observado para a infecção por ZIKV.

As células gigantes binucleadas observadas nas monocamadas de C6/36 infectadas por DENV e ZIKV podem corresponder a sincícios. Um dos efeitos citopáticos causados pela infecção viral é a formação de sincícios, também chamados de células gigantes multinucleadas ou policariocitos (FIGUEIREDO, 1990). O sincício é formado pela fusão celular. A fusão entre células infectadas possui diversos níveis de intensidade e pode ocorrer por 2 maneiras: a primeira, requer a replicação viral, seguida pela síntese e expressão extracelular de proteínas de atividade fusogênica (SUMMERS et al., 1989).

O segundo tipo de fusão ocorre logo após a adsorção viral às células hospedeiras, e está relacionada a presença da proteína viral fusogênica na superfície celular (BRATT; GALLAHER, 1969; SUMMERS et al., 1989). Quando estas proteínas se ligam à receptores de membrana de células vizinhas, ocorre a fusão celular, resultando na formação do sincício. De acordo com Figueiredo (1989) e Teramoto e colaboradores (2019), os sincícios são comumente observados em linhagens celulares infectadas pelo DENV. Portanto, as células grandes e multinucleadas vistas nas infecções por DENV e ZIKV provavelmente são resultado de fusões entre células infectadas, muito comuns em infecções por flavivírus (ABRAO; DA FONSECA, 2016).

Para DENV, no quarto dia após infecção os efeitos citopáticos são mais perceptíveis. Observamos destruição celular com permanência de apenas alguns grupos celulares bem definidos. Esse efeito é esperado para a infecção por DENV, visto que a formação de agrupamentos celulares pode ser detectada em 48h após a infecção e tendem a intensificarem-se nas fases mais adiantadas da infecção (SUMMERS et al., 1989; FIGUEIREDO, 1990; ABRAO; DA FONSECA, 2016). No entanto, em relação a infecção por ZIKV, o único efeito citopático evidente é a presença de células grandes e multinucleadas, indício de que, mesmo em intensidade menor do que a observada durante a infecção por DENV, ocorre a fusão entre células infectadas. Não observamos a destruição da monocamada, nem a presença de massas celulares definidas. Estudos ainda são necessários para investigar o papel e a modulação dos diversos processos celulares em resposta à diferentes agentes infecciosos, e seu impacto no perfil da infecção.

Em relação a infecção por DENV, no quinto dia pós infecção observamos extensa destruição da monocamada, com a presença de uma grande massa celular. Assim como observado no quarto dia de infecção, as células possuem pouco ou nenhuma projeção de membrana, e, apesar da grande quantidade de células mortas, as restantes suportam a replicação viral. Esses resultados são consistentes com outros trabalhos que indicam que em cinco dias após a infecção, a mortalidade celular e os efeitos citopáticos em células C6/36 infectadas por DENV aumentam consideravelmente (QUINTERO-GIL et al., 2018). Para a infecção por ZIKV, observamos a formação inicial de grupos celulares. Apesar disso, não notamos perturbação da confluência da monocamada celular, muito menos a presença de células soltas. Com isso supomos que, apesar de aparecer em período de infecção tardio e em diferente nível de intensidade, a infecção por ZIKV pode levar ao aparecimento de efeitos citopáticos em células C6/36.

## 5. CONCLUSÕES

Nossos resultados demonstraram que todas as populações de mosquitos apresentaram indivíduos competentes para a transmissão de DENV e ZIKV, o que evidencia um alto potencial de surtos epidêmicos na cidade de Belo Horizonte. Houve considerável variabilidade nas respostas à infecção entre os *A. aegypti* para ambos os flavivírus, o que provavelmente é um reflexo das diferenças genéticas entre eles. A CV aumenta ou não muda em mosquitos infectados com ZIKV ao longo do tempo após a infecção, mas aumentou, diminuiu ou permaneceu inalterada em DENV mosquitos infectados. A carga viral tendeu a persistir no corpo para ambos os flavivírus, mesmo após um longo período pós-infecção. O ZIKV mostrou uma forte tendência de acumular-se na GS ao longo do tempo pós-infecção em todas as populações, o que não ocorreu para DENV. Por fim, os padrões de infecção das populações não foram semelhantes entre as infecções por DENV e ZIKV, indicando que, embora ambos sejam flavivírus, os mosquitos orquestram diferentes mecanismos de defesa para combatê-los.

Com relação aos experimentos utilizando a linhagem de células de mosquitos C6/36, nossos resultados mostram diferenças nos padrões de infecção de células para a infecção por DENV e ZIKV. Isso reforça que esses vírus possuem diferenças importantes durante o estabelecimento da infecção e processo de replicação, o que pode ter relação com as diferenças encontradas nos padrões de infecção vistos nas análises de CV e carga viral de diferentes populações de *A. aegypti*. No período mais adiantado da infecção por DENV, observamos a intensificação dos efeitos citopáticos, com redução dos filamentos de actina, formação de grupos celulares, e destruição da monocamada. Para a infecção por ZIKV, notamos a presença de inúmeras células multinucleadas, entretanto, não houve destruição da monocamada. Com isso, constatamos que os efeitos citopáticos diferem entre DENV e ZIKV, e variam com o tempo pós-infecção. Contudo, estudos complementares ainda são necessários a fim de investigar o que está por trás dessas diferenças e como elas podem influenciar na carga viral e eficiência da infecção.

A atual falta de vacinas e tratamentos eficazes para a dengue e a febre Zika, e a resistência do mosquito às estratégias de controle populacional, como os inseticidas, demonstram a necessidade de abordagens adicionais de controle de doenças. A variabilidade observada pelos nossos dados aponta para a necessidade de desenvolver estratégias de bloqueio de transmissão utilizando mecanismos que funcionem para uma

ampla variedade de vetores. Uma vez que a compreensão da interação vírus-vetor é fundamental para o controle epidemiológico e redução da circulação do vírus, esses achados servem de base para direcionar o desenvolvimento de estratégias de controle para combater os surtos de dengue e Zika em regiões endêmicas. Estudos futuros poderiam elucidar mais detalhes sobre as interações vírus-vetor e os elementos dessas interações que variam entre populações de mosquitos geneticamente heterogêneas. Uma melhor compreensão das inter-relações do DENV e ZIKV com seus vetores fornecem uma perspectiva valiosa para o desenvolvimento de abordagens eficazes visando o controle de ambos os vírus no futuro.

## REFERÊNCIAS

- ABRAO, Emiliania Pereira; DA FONSECA, Benedito Antônio Lopes. Infection of Mosquito Cells (C6/36) by Dengue-2 Virus Interferes with Subsequent Infection by Yellow Fever Virus. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 16, n. 2, p. 124–130, 2016.
- AZAR, Sasha R. et al. Differential vector competency of *Aedes albopictus* populations from the Americas for Zika virus. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 97, n. 2, p. 330-339, 2017.
- BARRETO-VIEIRA, Debora Ferreira; JÁCOME, Fernanda Cunha; DA SILVA, Marcos Alexandre Nunes; *et al.* Structural investigation of C6/36 and Vero cell cultures infected with a Brazilian Zika virus. **PLOS ONE**, v. 12, n. 9, p. e0184397, 2017.
- BRATT, Michael A.; GALLAHER, William R. Preliminary Analysis of the Requirements for Fusion from Within and Fusion from Without by Newcastle Disease Virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 64, n. 2, p. 536–543, 1969.
- BEATY, B. et al. Novel Strategies to Control *Aedes aegypti* and Dengue. In: **Vector Biology, Ecology and Control**. p. 99–111.
- BENNETT, Kristine E.; OLSON, Ken E.; MUÑOZ, Maria de Lourdes; *et al.* Variation in vector competence for dengue 2 virus among 24 collections of *Aedes aegypti* from Mexico and the United States. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 67, n. 1, p. 85–92, 2002.
- BESERRA, E. B. et al. Ciclo de vida de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera, Culicidae) em águas com diferentes características. **Iheringia. Série Zoologia**, v. 99, n. 3, p. 281–285, set. 2009.
- BLACK, W. C. et al. Flavivirus Susceptibility in *Aedes aegypti*. **Archives of Medical Research**, v. 33, n. 4, p. 379–388, 1 jul. 2002.
- BOLOGNESI, R. **Síntese, degradação e funções da membrana peritrófica dos insetos**. Universidade de São Paulo, 5 abr. 2005.
- BOYER, Sébastien; CALVEZ, Elodie; CHOUIN-CARNEIRO, Thais; *et al.* An overview of mosquito vectors of Zika virus. **Microbes and Infection**, 2018. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S128645791830039X>>.
- BRAULT, Jean-Baptiste *et al.* Comparative analysis between flaviviruses reveals specific neural stem cell tropism for Zika virus in the mouse developing neocortex. **EBioMedicine**, v. 10, p. 71-76, 2016.
- CARNEIRO L. A.M., TRAVASSOS L. H. Autophagy and viral diseases transmitted by *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. **Microbes and Infection**, v. 18, n. 3, p. 169-171, 2016.

CHAVES, Barbara Aparecida; ORFANO, Alessandra Silva; NOGUEIRA, Paula Monalisa; *et al.* Coinfection with Zika Virus (ZIKV) and Dengue Virus Results in Preferential ZIKV Transmission by Vector Bite to Vertebrate Host. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 218, n. 4, p. 563–571, 2018.

CDC. *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* Mosquito Life Cycles - CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/mosquitoes/about/life-cycles/aedes.html>>. Acesso em: 22 jun. 2021.

CDC. **Dengue** - CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/dengue/index.html>>. Acesso em: 12 jan. 2020.

CDC. **Guillain-Barré Syndrome** - CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/campylobacter/guillain-barre.html>>. Acesso em: 12 jan. 2020.

CDC. **Zika Vírus** - CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/zika/index.html>>. Acesso em: 12 jan. 2020.

CHENG, Chih-Chieh; SOFIYATUN, Eny; CHEN, Wei-June; *et al.* Life as a Vector of Dengue Virus: The Antioxidant Strategy of Mosquito Cells to Survive Viral Infection. **Antioxidants**, v. 10, n. 3, p. 395, 2021.

CHENG, G. *et al.* Mosquito Defense Strategies against Viral Infection. **Trends in Parasitology**, v. 32, n. 3, p. 177–186, mar. 2016.

CONWAY, M. J.; COLPITTS, T. M.; FIKRIG, E. Role of the Vector in Arbovirus Transmission. **Annual Review of Virology**, v. 1, n. 1, p. 71–88, 2014.

CORREA, Andrea Trujillo; GÓMEZ, Juan Gallego. Estrategias virales para el transporte intracelular del virus dengue. **Hechos Microbiológicos**, v. 1, n. 1, p. 103–104, 2010.

DONG, S. *et al.* Chikungunya virus dissemination from the midgut of *Aedes aegypti* is associated with temporal basal lamina degradation during bloodmeal digestion. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 9, 29 set. 2017

DUFFY, Mark R.; CHEN, Tai-Ho; HANCOCK, W. Thane; *et al.* Zika Virus Outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. **New England Journal of Medicine**, v. 360, n. 24, p. 2536–2543, 2009.

FAYE, Oumar; FREIRE, Caio C. M.; IAMARINO, Atila; *et al.* Molecular Evolution of Zika Virus during Its Emergence in the 20th Century. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 1, p. e2636, 2014.

FERREIRA-DE-BRITO, Anielly *et al.* First detection of natural infection of *Aedes aegypti* with Zika virus in Brazil and throughout South America. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 111, n. 10, p. 655–658, 2016.

FIOCRUZ. **Como é o ciclo de vida do mosquito “*Aedes aegypti*”?** Fiocruz. Disponível em: <<https://portal.fiocruz.br/pergunta/como-e-o-ciclo-de-vida-do-mosquito-aedes-aegypti>>. Acesso em: 22 jun. 2021.

FIGUEIREDO, Luiz Tadeu Moraes. Uso de células de *Aedes albopictus* C6/36 na propagação e classificação de arbovírus das famílias Togaviridae, Flaviviridae, Bunyaviridae e Rhabdoviridae. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 23, n. 1, p. 13-18, 1990.

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

GLORIA-SORIA, A.; ARMSTRONG, P. M.; POWELL, J. R.; *et al.* Infection rate of *Aedes aegypti* mosquitoes with dengue virus depends on the interaction between temperature and mosquito genotype. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 284, n. 1864, p. 20171506, 2017.

GONÇALVES, Caroline M.; MELO, Fabrício F.; BEZERRA, Juliana M. T.; *et al.* Distinct variation in vector competence among nine field populations of *Aedes aegypti* from a Brazilian dengue-endemic risk city. **Parasites & Vectors**, v. 7, p. 320, 2014.

GUERBOIS, Mathilde; FERNANDEZ-SALAS, Ildefonso; AZAR, Sasha R.; *et al.* Outbreak of Zika Virus Infection, Chiapas State, Mexico, 2015, and First Confirmed Transmission by *Aedes aegypti* Mosquitoes in the Americas. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 214, n. 9, p. 1349–1356, 2016.

GUERRERO, Nidya Alexandra Segura; BELLO, Felio Jesús. Comparative assessment of the replication efficiency of dengue, yellow fever, and chikungunya arboviruses in some insect and mammalian cell lines. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 52, p. e20180511, 2019.

GUZMAN, Maria G.; GUBLER, Duane J.; IZQUIERDO, Alienys; *et al.* Dengue infection. **Nature Reviews. Disease Primers**, v. 2, p. 16055, 2016.

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

HASE, T.; SUMMERS, P. L.; ECKELS, K. H. Flavivirus entry into cultured mosquito cells and human peripheral blood monocytes. **Archives of Virology**, v. 104, n. 1–2, p. 129–143, 1989.

IOC. Instituto Oswaldo Cruz. **Dengue: vírus e vetor**. Disponível em: <<http://www.ioc.fiocruz.br/dengue/textos/sobreovirus.html>>. Acesso em: 12 jan. 2020.

JOBLING, Boris et al. **Anatomical drawings of biting flies**. British Museum (Natural History), 1987.

JUNJHON, Jiraphan; PENNINGTON, Janice; EDWARDS, Thomas; *et al.* Ultrastructural Characterization and Three-Dimensional Architecture of Replication Sites in Dengue Virus-Infected Mosquito Cells. **Journal of virology**, v. 88, 2014.

KRAMER, L. D.; CIOTA, A. T. Dissecting vectorial capacity for mosquito-borne viruses. **Current Opinion in Virology**, v. 15, p. 112–118, dez. 2015.

KUNO, Goro; CHANG, Gwong-Jen J.; TSUCHIYA, K. Richard; *et al.* Phylogeny of the Genus *Flavivirus*. **Journal of Virology**, v. 72, n. 1, p. 73–83, 1998.

LEQUIME, S.; LAMBRECHTS, L. Vertical transmission of arboviruses in mosquitoes: A historical perspective. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 28, p. 681–690, dez. 2014.

LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M. Flaviviridae: The Viruses and Their Replication. *Fields Virology*, p. 1101–1151, 2007.

MARCONDES, Carlos Brisola. **Entomologia Médica e Veterinária**. 1ª. Ed. São Paulo; Atheneu, 2001. 432 p.

MINER, Jonathan J.; DIAMOND, Michael S. Zika virus pathogenesis and tissue tropism. **Cell host & microbe**, v. 21, n. 2, p. 134–142, 2017.

MOLYNEUX, David. Neglected tropical diseases. **Community Eye Health**, v. 26, n. 82, p. 21–24, 2013.

MONTEIRO, Mariana Raquel; KANDRATAVICIUS, Ludmyla; LEITE, João Pereira. O papel das proteínas do citoesqueleto na fisiologia celular normal e em condições patológicas. **Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology**, v. 17, p. 17–23, 2011.

MOSSO, Clemente *et al.* Endocytic pathway followed by dengue virus to infect the mosquito cell line C6/36 HT. **Virology**, v. 378, n. 1, p. 193–199, 2008.

OFFERDAHL, Danielle K.; DORWARD, David W.; HANSEN, Bryan T.; *et al.* Cytoarchitecture of Zika virus infection in human neuroblastoma and *Aedes albopictus* cell lines. **Virology**, v. 501, p. 54–62, 2017.

OROZCO-GARCÍA, Elizabeth; TRUJILLO-CORREA, Andrea; GALLEGO-GÓMEZ, Juan Carlos. Cell Biology of Virus Infection. The Role of Cytoskeletal Dynamics Integrity in the Effectiveness of Dengue Virus Infection. **Cell Biol.-New Insights**, 2016.

PAHO/WHO. **Zika Cumulative Cases**. Pan American Health Organization / World Health Organization. Disponível em: <[https://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content%26view%3Darticle%26id%3D12390:zika-cumulative-cases%26Itemid%3D42090%26lang%3Den](https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content%26view%3Darticle%26id%3D12390:zika-cumulative-cases%26Itemid%3D42090%26lang%3Den)>. Acesso em: 3 nov. 2019.

PAHO/WHO. **Data - Dengue cases** | PAHO/WHO. Pan American Health Organization / World Health Organization. Disponível em: <<http://www.paho.org/data/index.php/en/mnu-topics/indicadores-dengue-en/dengue-nacional-en/252-dengue-pais-ano-en.html>>. Acesso em: 3 nov. 2019.

PERRONE, J. B.; DEMAIO, J.; SPIELMAN, A. Regions of mosquito salivary glands distinguished by surface lectin-binding characteristics. **Insect biochemistry**, v. 16, n. 2, p. 313-318, 1986.

PIERSON, Theodore C.; DIAMOND, Michael S. Degrees of maturity: the complex structure and biology of flaviviruses. **Current Opinion in Virology**, v. 2, n. 2, p. 168–175, 2012.

PIERSON, Theodore C.; KIELIAN, Margaret. Flaviviruses: Braking the entering. **Current opinion in virology**, v. 3, n. 1, p. 3–12, 2013.

QUINTERO-GIL, Diana Carolina; URIBE-YEPES, Alexander; OSPINA, Marta; et al. Differences in the replicative capacities of clinical isolates of dengue virus in C6/36 cells and in urban populations of *Aedes aegypti* from Colombia, South America. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 22, n. 4, p. 257–272, 2018.

RANDOLPH, Valerie B.; STOLLAR, Victor YR 1990. Low pH-induced Cell Fusion in Flavivirus-infected *Aedes Albopictus* Cell Cultures. **Journal of General Virology**, v. 71, n. 8, p. 1845–1850.

RODRIGUES, Nilton Barnabé; GODOY, Raquel Soares Maia; ORFANO, Alessandra Silva; et al. Brazilian *Aedes aegypti* as a Competent Vector for Multiple Complex Arboviral Coinfections. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 224, n. 1, p. 101–108, 2021.

ROSSIGNOL, Evan D.; PETERS, Kristen N.; CONNOR, John H.; et al. Zika virus induced cellular remodelling. **Cellular Microbiology**, v. 19, n. 8, p. e12740, 2017.

SILVA, Caroline Simões da et al. **Desenvolvimento e caracterização de linhagem celular expressando estavelmente um replicon repórter do vírus Zika**. 2019. Tese de Doutorado.

SHOPE, Robert E.; MEEGAN, James M. Arboviruses. In: **Viral Infections of Humans**. Springer, Boston, MA, 1997. p. 151-183.

SMARTT, Chelsea T.; STENN, Tanise M. S.; CHEN, Tse-Yu; et al. Evidence of Zika Virus RNA Fragments in *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) Field-Collected Eggs From Camaçari, Bahia, Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 54, n. 4, p. 1085–1087, 2017.

SNODGRASS, Robert E. et al. anatomical life of the mosquito. **Smithsonian miscellaneous collections; v. 139, no. 8**, 1959.

SUMMERS, Peter L.; COHEN, Wendy Houston; RUIZ, Maria M.; et al. Flaviviruses can mediate fusion from without in *Aedes albopictus* mosquito cell cultures. **Virus Research**, v. 12, n. 4, p. 383–392, 1989.

TAUIL, Pedro Luiz. Urbanização e ecologia do dengue. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.17, supl.p.S99-S102, 2001. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102311X2001000700018&](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102311X2001000700018&)

Ing=en&nrm=iso>. Acesso em: 12 jan. 2020. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-311X2001000700018>.

TAVEIRA, L.A., FONTES, L.R., NATAL, D. **Manual de diretrizes e procedimentos no controle do Aedes aegypti**. Ribeirão Preto: Prefeitura Municipal de Ribeirão Preto, 2001.

TERAMOTO, Tadahisa; HUANG, Xin; ARMBRUSTER, Peter A.; et al. Infection of *Aedes albopictus* Mosquito C6/36 Cells with the wMelpop Strain of Wolbachia Modulates Dengue Virus-Induced Host Cellular Transcripts and Induces Critical Sequence Alterations in the Dengue Viral Genome. **Journal of Virology**, v. 93, n. 15, p. e00581-19, 2019.

UNC School of Medicine. UNC researchers discover how body temperature wrecks potential dengue, Zika vaccine. Disponível em: <<https://news.unchealthcare.org/2018/05/unc-researchers-discover-how-body-temperature-wrecks-potential-dengue-zika-vaccine/>>. Acesso em: 3 agost. 2021.

VEGA-RÚA, A. et al. Chikungunya virus replication in salivary glands of the mosquito aedes albopictus. **Viruses**, v. 7, n. 11, p. 5902–5907, 2015.

VILLEGAS, Luis E. M.; CAMPOLINA, Thais B.; BARNABE, Nilton R.; et al. Zika virus infection modulates the bacterial diversity associated with *Aedes aegypti* as revealed by metagenomic analysis. **PLOS ONE**, v. 13, n. 1, p. e0190352, 2018.

VIRAL ZONE. Zika Virus. Disponível em: <[https://viralzone.expasy.org/6756?outline=all\\_by\\_species](https://viralzone.expasy.org/6756?outline=all_by_species)>. Acesso em: 3 agost. 2021.

WALKER, Thomas; JEFFRIES, Claire L; MANSFIELD, Karen L; et al. Mosquito cell lines: history, isolation, availability and application to assess the threat of arboviral transmission in the United Kingdom. **Parasites & Vectors**, v. 7, p. 382, 2014.

WALSH, Derek; NAGHAVI, Mojgan H. Exploitation of Cytoskeletal Networks during Early Viral Infection. **Trends in Microbiology**, v. 27, n. 1, p. 39–50, 2019.

WEAVER, S. C. et al. Zika virus: History, emergence, biology, and prospects for control. **Antiviral Research**, v. 130, p. 69–80, 2016.

WELSCH, Sonja; MILLER, Sven; ROMERO-BREY, Ines; 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, 2009.

WHO. **Dengue**. Disponível em: <<https://www.who.int/denguecontrol/en/>>. Acesso em: 3 nov. 2021.

WHO. **Zika epidemiology update**. WHO. Disponível em: <<http://www.who.int/emergencies/diseases/zika/epidemiology-update/en/>>. Acesso em: 12 jan. 2021

WHO. **Dengue and severe dengue.** WHO Disponível em: <<https://www.who.int/westernpacific/health-topics/dengue-and-severe-dengue>>. Acesso em: 12 jan. 2021.

WONG, Pei-Sze Jeslyn; LI, Mei-zhi Irene; CHONG, Chee-Seng; *et al.* *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse): A Potential Vector of Zika Virus in Singapore. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 8, p. e2348, 2013.

ZARA, A. L. DE S. A. et al. *Aedes aegypti* control strategies: a review. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 25, n. 2, p. 391–404, jun. 2016.

ZHANG, Jing; WU, Na; GAO, Na; et al. Small G Rac1 is involved in replication cycle of dengue serotype 2 virus in EAhy926 cells via the regulation of actin cytoskeleton. **Science China Life Sciences**, v. 59, n. 5, p. 487–494, 2016.

ZHANG, Yue; GAO, Wei; LI, Jian; *et al.* The Role of Host Cytoskeleton in Flavivirus Infection. **Virologica Sinica**, v. 34, n. 1, p. 30–41, 2019.

