

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

ELLEN CAROLINE NOBRE SANTOS

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL DA PROTEÍNA LOQS2 EM *Aedes aegypti* FRENTE A ARBOVÍRUS SOB CONDIÇÕES REPRESENTATIVAS DE POPULAÇÕES NATURAIS BRASILEIRAS

Belo Horizonte

2025

ELLEN CAROLINE NOBRE SANTOS

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL DA PROTEÍNA LOQS2 EM *Aedes aegypti* FRENTE A ARBOVÍRUS SOB CONDIÇÕES REPRESENTATIVAS DE POPULAÇÕES NATURAIS BRASILEIRAS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Ciências.

Orientadores: Dr. Álvaro Gil Araújo
Ferreira/Dr. João Trindade Marques

Coorientadora: Dra. Flávia Viana Ferreira

Belo Horizonte

2025

043

Santos, Ellen Caroline Nobre.

Avaliação da atividade antiviral da proteína Loqs2 em *Aedes aegypti* frente a arbovírus sob condições representativas de populações naturais brasileiras [manuscrito] / Ellen Caroline Nobre Santos. – 2025.

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

Orientadores: Dr. Álvaro Gil Araújo Ferreira; Dr. João Trindade Marques.

Coorientadora: Dra. Flávia Viana Ferreira.

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

1. Bioquímica e imunologia. 2. Infecções por Arbovírus. 3. *Aedes*. 4. Invertebrados. 5. Sistema Imunitário. I. Ferreira, Álvaro Gil Araújo. II. Marques, João Trindade. III. Ferreira, Flávia Viana. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. V. Título.

CDU: 577.1



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



ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO DE ELLEN CAROLINE NOBRE SANTOS. Aos dezesseis dias do mês de maio de 2025 às 14:30 horas, reuniu-se de forma “on line” utilizando a plataforma “Zoom”, no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da tese de Doutorado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "Avaliação da atividade Antiviral da Proteína Loqs2 em *Aedes Aegypti* frente a Arbovírus sob condições representativas de Populações Naturais Brasileiras", requisito final para a obtenção do grau de Doutor em Ciências: Imunologia. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Álvaro Gil Araujo Ferreira, da Universidade Federal de Minas Gerais, 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 do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dr. Helton da Costa Santiago (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dra. Rafaela Vieira Bruno (Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz-RJ), aprovada; Dr. Maurício Sant’Anna (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dra. Poliana da Silva Lemos (Universidade de São Paulo), aprovada; Dra. Flávia Viana Ferreira - Coorientadora (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Álvaro Gil Araujo Ferreira - Orientador (Centro de pesquisa René Rachou/ FIOCRUZ), aprovada. Pelas indicações a candidata foi considerada:

☒ **APROVADA**

☐ **REPROVADA**

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 16 de maio de 2025.

Documento assinado digitalmente
gov.br HELTON DA COSTA SANTIAGO
Data: 26/05/2025 13:10:56-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr. Helton da Costa Santiago (UFMG)

Documento assinado digitalmente
gov.br RAFAELA VIEIRA BRUNO
Data: 19/05/2025 16:17:13-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dra. Rafaela Vieira Bruno (Fiocruz-RJ)

Documento assinado digitalmente
gov.br MAURICIO ROBERTO VIANA SANT ANNA
Data: 23/05/2025 16:32:23-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr. Maurício Sant’Anna (UFMG)

Documento assinado digitalmente
gov.br POLIANA DA SILVA LEMOS
Data: 19/05/2025 21:11:56-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dra. Poliana da Silva Lemos (USP)

Documento assinado digitalmente
gov.br FLAVIA VIANA FERREIRA
Data: 28/05/2025 12:53:37-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dra. Flávia Viana Ferreira - Coorientadora (UFMG)

Dr. Álvaro Gil Araujo Ferreira - Orientador (Fiocruz-MG)

Documento assinado digitalmente
gov.br ALVARO GIL ARAUJO FERREIRA
Data: 29/05/2025 12:09:44-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

*Dedico este trabalho à minha base, minha
fortaleza: minha mãe, Gilvane, e meu pai,
Antônio Marcos. Pelo amor incansável, pela fé
que nunca vacilou, e por nunca permitirem
que eu desistisse. Vocês acreditaram em mim
mesmo quando eu duvidei, sustentaram meus
sonhos com coragem e me ensinaram, com o
exemplo, que a educação é um caminho de
transformação. Esta conquista é nossa.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, pela incompreensível e generosa graça que me sustentou e me permitiu chegar até aqui.

Aos meus orientadores, expresso minha mais profunda gratidão. Ao Prof. Dr. João Trindade Marques, por abrir as portas do laboratório e confiar este trabalho em minhas mãos, mesmo em um momento de transição e encerramento do grupo no Brasil. Ao Dr. Álvaro Gil Ferreira, meu agradecimento imenso por aceitar me orientar na metade do doutorado, por acolher meu projeto em seu laboratório, permitir minha participação em outros estudos e guiar cada etapa com dedicação.

Agradeço à minha coorientadora, Flavia Viana Ferreira, por seus conselhos, instruções e recomendações essenciais ao desenvolvimento deste trabalho.

Aos membros do Laboratório de RNAi, deixo meu reconhecimento especial. Ao João Paulo Almeida, pelo auxílio na análise dos dados de sequenciamento; ao Isaque Faria, por me ensinar com paciência desde a extração de RNA até as análises, sempre com sugestões valiosas; e ao Yaovi Mathias Todjro, pelas contribuições durante os experimentos, apoio logístico e ajuda com o transporte de materiais entre a Fiocruz e a UFMG. À Manuela Viana Rennó, agradeço pela amizade e pelo suporte essencial no início deste trabalho. Também estendo meus agradecimentos aos ex-membros do laboratório, especialmente ao Ezequiel Salvador, pelas contribuições iniciais.

Sou grata aos membros do Laboratório Mosquitos Vetores: Silvana Mendonça, Livia Baldon, Maria Eduarda Rodrigues, Rafaela Moreira, Amanda Freitas e Viviane Souza, pela ajuda fundamental nos últimos meses. Agradeço também aos ex-membros Bruno Marçal e Mariana Alves Lima, pelo apoio imprescindível.

Ao programa World Mosquito Program, agradeço à equipe pelo suporte, em especial a Bianca Silva, Erica Milena e Thiago Nunes. Aos colegas do grupo Mosquito Immune Responses, meu reconhecimento a Carlos Estevez-Castro, Roenick Olmo e Antinea Barbarit pela contribuição no desenvolvimento deste projeto.

À equipe da Rede de Plataformas Tecnológicas da Fiocruz, em especial Viviane Cristina e Emanuele Guimarães, agradeço o suporte na plataforma de PCR.

Aos colegas e ex-colegas do Laboratório de Neurobioquímica, agradeço o companheirismo e pelas boas risadas ao longo desses anos — momentos que tornaram essa jornada mais leve.

Aos amigos que construí em Belo Horizonte — Manuela Viana, Emanuele Guimarães, Juliana Brandi, Flávia Viana e Toniana Carvalho — obrigada por cada conversa, gesto e presença. Suas amizades foram fundamentais para que este trabalho fosse concluído.

À minha família, meu pilar. À minha avó Nonata Muniz e à minha tia Josiane Silva, por sempre acreditarem em mim com amor e orgulho. Aos meus pais, Gilvane e Antônio Marcos, por me sustentarem com amor, fé e confiança, mesmo diante da distância e da saudade. Vocês foram, e sempre serão, meu porto seguro. Ao meu irmão, Marcos Diego, pelo apoio incansável — especialmente nas horas em que o computador decidia falhar no momento mais inoportuno.

Cada palavra de incentivo, cada ajuda silenciosa ou gesto de apoio fizeram diferença – meu sincero obrigada a todos que estiveram comigo, mesmo sem saber o quanto foram importantes

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

RESUMO

As arboviroses representam um desafio crescente à saúde pública no Brasil, especialmente diante da circulação simultânea e recorrente de vírus como dengue (DENV), Zika (ZIKV) e chikungunya (CHIKV). Diante das limitações das estratégias tradicionais de controle vetorial, abordagens inovadoras têm explorado a modificação genética de *Aedes aegypti*, exigindo um entendimento aprofundado de seus mecanismos de defesa antiviral. A proteína Loqs2, exclusiva do gênero *Aedes* e naturalmente ausente no intestino médio, foi identificada como um potencial componente da resposta antiviral. Estudos anteriores do nosso grupo mostraram que sua expressão ectópica no intestino de mosquitos transgênicos reduz significativamente a replicação e disseminação do DENV, sugerindo que Loqs2 atua como um regulador antiviral intestinal. No entanto, esses dados estavam restritos a DENV e a linhagens laboratoriais. Nesta tese, avaliamos a atividade antiviral de Loqs2 frente a três arbovírus: ZIKV, CHIKV e Mayaro vírus (MAYV). Os resultados revelaram efeito antiviral específico contra ZIKV, sem impacto significativo sobre os *Alphavirus* testados. Para investigar sua aplicabilidade em contextos de campo, testamos a eficácia de Loqs2 em mosquitos com fundo genético de populações brasileiras. Diferentemente da linhagem laboratorial de Bangkok, os mosquitos de campo não apresentaram efeito antiviral contra ZIKV, o que pode ser atribuído à variabilidade genética ou à presença de vírus específicos de insetos (ISVs). A análise de pequenos RNAs revelou infecção natural pelo Phasi Charoen-like virus (PCLV) nas linhagens de campo. No entanto, a eliminação desse ISV em linhagens derivadas não restaurou a atividade antiviral de Loqs2, indicando o envolvimento de fatores genéticos intrínsecos. Adicionalmente, observamos uma redução significativa da expressão do gene *Argonaute-2* (*AGO2*) nas carcaças de mosquitos transgênicos, sugerindo que a interação de Loqs2 com a via de RNA de interferência (RNAi) pode ser modulada pelo contexto genético e viroma. Esses achados reforçam a necessidade de validar intervenções genéticas em populações naturais, considerando sua diversidade biológica. Estratégias baseadas em manipulação genética só serão eficazes e sustentáveis se forem testadas em condições que reflitam a realidade ecológica dos vetores em áreas endêmicas.

Palavras-chaves: Infecções por arbovírus; *Aedes aegypti*; Sistema imune dos invertebrados.

ABSTRACT

Arboviruses represent a growing public health challenge in Brazil, particularly due to the simultaneous and recurrent circulation of viruses such as dengue (DENV), Zika (ZIKV), and Chikungunya (CHIKV). Given the limitations of traditional vector control strategies, innovative approaches have focused on the genetic modification of *Aedes aegypti*, requiring a deeper understanding of its antiviral immune mechanisms. The protein Loqs2, exclusive to the *Aedes* genus and naturally absent in the midgut, was identified as a potential component of the antiviral response. Previous studies from our group demonstrated that ectopic expression of Loqs2 in the midgut of transgenic mosquitoes significantly reduced DENV replication and dissemination, suggesting that Loqs2 functions as a key antiviral regulator in this tissue. However, those findings were limited to DENV and laboratory strains. In this thesis, we evaluated the antiviral activity of Loqs2 against three arboviruses: ZIKV, CHIKV, and Mayaro virus (MAYV). The results revealed a specific antiviral effect against ZIKV, with no significant impact on the *Alphaviruses* tested. To assess its applicability under field-like conditions, we tested Loqs2 efficacy in mosquitoes with a genetic background representative of Brazilian natural populations. Unlike the Bangkok laboratory strain, field-derived mosquitoes did not exhibit an antiviral response to ZIKV, which may be due to genetic variability or the presence of insect-specific viruses (ISVs). Small RNA sequencing identified natural infection with Phasi Charoen-like virus (PCLV) in the field populations. However, elimination of this ISV from derived lines did not restore Loqs2-mediated antiviral activity, indicating that intrinsic genetic factors may modulate the immune response. Additionally, we observed a significant reduction in the expression of *Argonaute-2* (*AGO2*) in the carcasses of *Loqs2*-expressing mosquitoes, suggesting that Loqs2's interaction with the RNA interference (RNAi) pathway may vary depending on the genetic and viromic context. Collectively, these findings highlight the importance of validating genetically based vector control strategies in natural mosquito populations. Such approaches will only be effective and sustainable if they are tested under ecological conditions that reflect the biological reality of vectors in endemic regions.

Keywords: Arbovirus infections; *Aedes aegypti*; Insect immunity.

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1	Catalog Arbovirus 19
Figura 2	Representação do gênero <i>Orthoflavivirus</i> 21
Figura 3	Ciclo de replicação dos <i>Orthoflavivirus</i> em células hospedeiras 22
Figura 4	Dados de casos prováveis de ZIKV no Brasil 25
Figura 5	Representação do gênero <i>Alphavirus</i> 27
Figura 6	Ciclo de replicação dos <i>Alphavirus</i> em células hospedeiras 28
Figura 7	Casos prováveis de Chikungunya no Brasil 31
Figura 8	Ciclo de vida de <i>Ae. aegypti</i> 34
Figura 9	Rota de infecção por arbovírus em <i>Ae. aegypti</i> 36
Figura 10	Ativação das vias de sinalização imunes e da via RNAi em <i>Ae. aegypti</i> 39
Figura 11	Via de RNAi em insetos 45
Figura 12	Mecanismo antiviral da via siRNA em <i>Ae. aegypti</i> 49
Figura 13	Método de Fay-Morlan para a separação de pupas de <i>Ae. aegypti</i> 60
Figura 14	Esquema do processo de retrocruzamento entre mosquitos selvagens e transgênicos de <i>Ae. aegypti</i> 61
Figura 15	Efeito antiviral de Loqs2 no intestino de <i>Ae. Aegypti</i> durante a infecção por ZIKV..... 70
Figura 16	Efeito antiviral de Loqs2 na carcaça de <i>Ae. aegypti</i> durante a infecção por ZIKV..... 71
Figura 17	Efeito antiviral de Loqs2 no intestino de <i>Ae. aegypti</i> durante a infecção por CHIKV..... 73
Figura 18	Efeito antiviral de Loqs2 na carcaça de <i>Ae. aegypti</i> durante a infecção por CHIKV..... 74
Figura 19	Efeito antiviral de Loqs2 na infecção por CHIKV no intestino de <i>Ae. aegypti</i> aos 3 e 6 dpi..... 76
Figura 20	Efeito antiviral de Loqs2 durante a infecção por CHIKV na carcaça de <i>Ae. aegypti</i> aos 3 e 6 dpi..... 77
Figura 21	Efeito antiviral de Loqs2 na infecção por MAYV no intestino de <i>Ae. aegypti</i> 79
Figura 22	Efeito antiviral de Loqs2 na infecção por MAYV na carcaça de <i>Ae. aegypti</i> 80
Figura 23	Efeito antiviral de Loqs2 no intestino na infecção por ZIKV em <i>Ae. aegypti</i> com fundo genético de campo 83
Figura 24	Efeito antiviral de Loqs2 na carcaça na infecção por ZIKV em <i>Ae. aegypti</i> com fundo genético de campo 84
Figura 25	Perfis de pequenos RNAs derivados de ISVs em <i>Ae. aegypti</i> de Belo Horizonte 87
Figura 26	Deteção de ISVs e separação dos mosquitos retrocruzados de acordo com perfil viral 88
Figura 27	Expressão de Loqs2 em mosquitos Cp.:Loqs2 retrocruzados analisado por Western Blot 89
Figura 28	Avaliação do efeito da presença de PCLV sobre a infecção por ZIKV no intestino em linhagens transgênicas Cp.:Loqs2 com fundo genético de campo 91
Figura 29	Avaliação do efeito da presença de PCLV sobre a infecção por ZIKV na carcaça em linhagens transgênicas Cp.:Loqs2 com fundo genético de campo 92
Figura 30	Expressão relativa de <i>AGO2</i> em linhagens de <i>Ae. aegypti</i> durante a infecção por ZIKV 93

Figura 31	Expressão relativa de <i>R2D2</i> em linhagens de <i>Ae. aegypti</i> durante a infecção por ZIKV	94
Figura 32	Expressão relativa de <i>Loqs</i> em linhagens de <i>Ae. aegypti</i> durante a infecção por ZIKV	95
Figura 33	Expressão relativa de <i>AAEL022113</i> em linhagens de <i>Ae. aegypti</i> durante a infecção por ZIKV	96
Figura 34	Expressão relativa de <i>Dip1</i> em linhagens de <i>Ae. aegypti</i> durante a infecção por ZIKV	96
Figura 35	Expressão relativa de <i>AAEL004859</i> em linhagens de <i>Ae. aegypti</i> durante a infecção por ZIKV	97
Figura 36	Expressão relativa de <i>AAEL004699</i> em linhagens de <i>Ae. aegypti</i> durante a infecção por ZIKV	98
Figura 37	Expressão relativa de <i>Dicer-2</i> em linhagens de <i>Ae. aegypti</i> durante a infecção por ZIKV	98

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1 Primers utilizados nas reações de qPCR para os diferentes alvos investigados.	68
Tabela 2 Resumo dos contigs virais e não virais obtidos após o sequenciamento de pequenos RNAs	75

LISTA DE ABREVIATURAS

>	Maior que
5'-cap	<i>cap</i> na extremidade 5' do RNA
<i>Ae. aegypti</i>	<i>Aedes aegypti</i>
AGO1	Argonauta 1
AGO2	Argonauta 2
AGO3	Argonauta 3
AMPs	Peptídeos antimicrobianos
BCA	Ensaio de ácido bicinconínico
BH	Cidade de Belo Horizonte
C	Proteína capsídeo de Flaviviridae
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
cDNA	DNA complementar
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CEUA	Comitê de Ética no Uso Animal
CFAV	Cell-fusing agent virus
CHIKV	Vírus Chikungunya
CM	Membranas convolutas
CMC	Carboximetilcelulose
CO ₂	Dióxido de carbono
CP	Proteína capsídeo dos <i>Alphavirus</i>
CVP	Vacúolos citoplasmáticos do tipo I
Cx	<i>Culex</i>
DAP-PGN	Peptidoglicano contendo ácido diaminopimélico
DENV	Vírus da dengue
Dip1	Disco Interacting Protein 1
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
Dome	Receptor Domoless
dpi	Dias pós-infecção
dsRBD	Domínio de dupla fita de RNA
dsRNA	RNA de dupla fita
E	Proteína envelope dos <i>Orthoflavivirus</i>
E1-3	Proteína envelope dos <i>Alphavirus</i>
ECSA	Genótipo África Oriental/Central/Sul do vírus Chikungunya
eIF4F	Fator de Iniciação Eucariótico 4F (Eukaryotic initiation fator 4F)
EMC	Complexo de membrana do RE

EVEs	Elementos virais endógenos
FADD	FAS-associated death domain
FBS	Soro bovino fetal
G1	Primeira geração
G10	Décima geração
GFP	Green fluorescent protein
GNBP1	Proteína de ligação a gram-negativos 1
gRNA	RNA genômico
Hop	Hopscotch
HTV	Humaita-Tubiaca virus
IKK	Inibidor do NF- κ B
IMD	Immune Deficiency
IRESs	Internal ribosome-entry sites
ISV	Vírus específicos de insetos (Insect specific vírus)
JAK-STAT	Janus quinase transdutor de sinal e ativador de transcrição
JEV	Vírus da encefalite japonesa
JNK	c-Jun N-terminal kinase
L15	Leibovitz's L15 Medium
Loqs	Loquacious
LTV	Lactea totivirus
M	Proteína Membrana dos <i>Orthoflavivirus</i>
MAYV	Mayaro virus
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
MID	Domínio Middle
miRNA	MicroRNA
mL	Mililitro
mRNA	RNA mensageiro
NaCl	Cloreto de sódio
NF- κ B	Fator nuclear kappa-B
Nº	Número
nr	Proteínas
NS	Proteínas não estruturais dos <i>Orthoflavivirus</i>
nsP	Proteínas não estruturais dos <i>Alphavirus</i>
nt	Nucleotídeos
ORF	Open Reading Frame
P1234	Poliproteína precursora dos <i>Alphavirus</i>
p62	Poliproteína precursora de E2 e E3

PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
PAZ	Piwi, Argonauta e Zeille
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PCLV	Phasi Charoen-like virus
PCR	Reação em cadeia da polimerase (Polymerase Chain Reaction)
PCV	Palm Creek vírus
PFU	Plaque forming units
PGRP	Proteínas de reconhecimento de peptidoglicano
PGRP-LC	Receptor transmembrana do peptidoglicano
PIAS	Inibidor de STAT ativado
piRNA	p-element induced wimpy testis interagindo com RNA
Piwi	p-element induced wimpy testis
prM	Proteína pré-membrana dos <i>Orthoflavivirus</i>
PRRs	Receptores de reconhecimento de padrões moleculares
PVDF	Difluoreto de polivinilideno
qPCR	Real Time PCR
RdRp	RNA polimerase dependente de RNA
RE	Retículo endoplasmático
Rel1	Relish1
Rel2	Relish2
RISC	RNA-induced silencing complex
RNA-	Fita negativa de RNA
RNA+	Fita positiva de RNA
RNAi	RNA de interferência
RT	Transcriptase reversa
RT-	Transcriptase reversa negativa
SCZ	Síndrome Congênita do Zika
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SDS-PAGE	Dodecil Sulfato de Sódio-Polioacrilamida
sfRNA	Small flavivirus RNA
SFV	Semliki Forest vírus
sgRNA	RNA subgenômico
SINV	Vírus Sindbis
siRNA	Pequenos RNAs interferentes
SOCS	Supressor de sinalização de citocinas
SRP	Partículas de reconhecimento de sinal
TBST	Tris (hidroximetil)aminometano (Tris), cloreto de sódio (NaCl) e Tween-20

TF	Transframe
TPM	Transcritos por milhão
TRAF	Receptor de fator de necrose tumoral
Tris-HCl	Cloridrato de Tris(hidroximetil)aminometano
Upd	Unpaired
USUV	Usutu virus
UTR	Regiões não traduzida (Untranslated regions)
VP	Pacotes de vesículas
WNV	Vírus do Nilo Ocidental
YFV	Vírus da febre amarela
ZIKV	Vírus da Zika

SUMÁRIO

	Pág.
1 INTRODUÇÃO.....	18
1.1 ARBOVÍRUS	18
1.2 <i>Flaviviridae</i>	20
1.2.1 Zika Virus	23
1.3 <i>TOGAVIRIDAE</i>	26
1.3.1 Chikungunya virus.....	30
1.3.2 Mayaro virus	32
1.4 <i>Aedes aegypti</i> COMO VETOR DE ARBOVIROSES: CICLO BIOLÓGICO E INFEÇÃO VIRAL	33
1.4.1 Ciclo biológico de <i>Ae. aegypti</i>	34
1.4.2 Infecção viral	35
1.5 MECANISMOS IMUNOLÓGICOS ANTIVIRAIS EM <i>Ae. aegypti</i>	37
1.5.1 Via Toll.....	39
1.5.2 Via IMD	40
1.5.3 JAK/STAT.....	42
1.5.4 Via RNA de interferência	43
1.5.4.1 piRNA	45
1.5.4.2 miRNA.....	47
1.5.4.3 siRNA	48
1.5.5 A função antiviral de Loqs2 em <i>Ae. aegypti</i>	49
1.6 MODULAÇÃO DA RESPOSTA ANTIVIRAL EM <i>Ae. aegypti</i> POR VÍRUS ESPECÍFICOS DE INSETOS (ISVs)	51
2 JUSTIFICATIVA	55
3 OBJETIVOS	57
3.1 OBJETIVO GERAL	57
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	57
4 MATERIAIS E MÉTODOS	58
4.1 PRODUÇÃO VIRAL	58
4.1.1. Cultura celular e infecção viral	58
4.1.2 Ensaio de titulação viral	58
4.2 MANUTENÇÃO E GERAÇÃO DAS LINHAGENS DE <i>Ae. aegypti</i>	59
4.2.1 Cruzamento de mosquitos selvagens com mosquitos transgênicos- retrocruzados	59
4.3 INFEÇÃO DE <i>Ae. aegypti</i> POR MEIO DA ALIMENTAÇÃO SANGUÍNEA ..	61
4.3.1 Infecção de <i>Ae. aegypti</i> utilizando camundongos AG129	61
4.3.2 Infecção de <i>Ae. aegypti</i> utilizando alimentação artificial	62
4.4 EXTRAÇÃO DE RNA	62
4.5 QUANTIFICAÇÃO RELATIVA DE RNAs VIRAIS PELA TÉCNICA DE TRANSCRIÇÃO REVERSA SEGUIDA DE PCR QUANTITATIVO (RT-qPCR)	63
4.5.1 Reação em cadeia da polimerase	63
4.5.2 Desenho dos iniciadores	63
4.5.3 PCR em tempo real (qPCR)	64

4.6 ANÁLISE DO VIROMA DE <i>Ae. aegypti</i> COLETADOS EM BELO HORIZONTE UTILIZANDO BIBLIOTECAS DE PEQUENOS RNAs	65
4.6.1 Construção de bibliotecas de pequenos RNAs	65
4.6.2 Metagenômica baseada em pequenos RNAs para identificação viral	66
4.7 WESTERN BLOT	67
5 RESULTADOS	69
5.1 ATIVIDADE ANTIVIRAL DE LOQS2 NA INFECÇÃO POR <i>ORTHOFILAVIRUS</i> EM <i>Ae. aegypti</i>	69
5.1.1 Atividade antiviral de Loqs2 na infecção por ZIKV	69
5.2 ATIVIDADE ANTIVIRAL DE LOQS2 NA INFECÇÃO POR <i>ALPHAVIRUS</i> EM <i>Ae. aegypti</i>	71
5.2.1 Atividade antiviral de Loqs2 na infecção por Chikungunya vírus	72
5.2.2 Atividade antiviral de Loqs2 na infecção por Mayaro vírus	77
5.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL DE LOQS2 EM POPULAÇÕES DE <i>Ae. aegypti</i> COM FUNDO GENÉTICO DE POPULAÇÕES DE CAMPO BRASILEIRAS.....	81
5.3.1 Geração de linhagens de mosquitos transgênicos com fundo genético de populações de campo brasileiras com expressão de Loqs2 no intestino médio	81
5.3.2 Avaliação da atividade antiviral de Loqs2 em mosquitos com fundo genético de campo	82
5.3.3 Caracterização dos vírus específicos de insetos (ISVs) das linhagens transgênicas (Cp.:Loqs2 com fundo genético)	84
5.4.4 Geração de linhagens transgênicas Cp.:Loqs2 com fundo genético de campo, com e sem a presença de PCLV	87
5.4.5 Avaliação do efeito da presença de PCLV sobre a infecção por ZIKV em linhagens transgênicas Cp.:Loqs2 com fundo genético de campo	89
5.4.6 Avaliação da expressão de genes associados a Loqs2 em <i>Ae. aegypti</i>	92
6 DISCUSSÃO	100
6.1 ATIVIDADE ANTIVIRAL DE LOQS2 CONTRA ZIKV, CHIKV E MAYV EM <i>Ae. aegypti</i>	100
6.2 ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIVIRAL DE LOQS2 CONTRA ZIKV EM <i>Ae. aegypti</i> DE FUNDO GENÉTICO DE CAMPO	103
7 CONCLUSÃO	108
PESPECTIVAS	109
REFERÊNCIAS	110
ANEXO A – Tabelas suplementares	147
ANEXO B - Prevalência de infecção por HTV na carcaça dos grupos experimentais aos 4 e 8 dpi	148
ANEXO C – Carga viral de PCLV em linhagens de <i>Ae. aegypti</i> durante a infecção por ZIKV	149

1 INTRODUÇÃO

1.1 ARBOVÍRUS

Arbovírus são vírus transmitidos por artrópodes, como mosquitos, flebotomíneos e carrapatos, capazes de causar infecções em humanos e outros vertebrados (Davis; Beckham; Tyler, 2008; Gubler, 2006). Os arbovírus representam uma das principais ameaças emergentes à saúde pública global, especialmente em regiões tropicais e subtropicais (World Health Organization, 2024). No Brasil, a circulação simultânea de diversos arbovírus, aliada à ampla distribuição de vetores competentes, tem contribuído para a ocorrência recorrente de epidemias com alto impacto social e econômico (Gomes; de Jesus; Quaresma, 2023; Thompson; and Constenla, 2020). Doenças como dengue, Zika, chikungunya e febre amarela têm afetado milhões de pessoas nas últimas décadas, sobrecarregando o sistema de saúde e evidenciando a necessidade urgente de estratégias mais eficazes de vigilância, prevenção e controle (Lim *et al.*, 2025). A complexidade ecológica e genética desses vírus, somada à diversidade dos vetores envolvidos, reforça a importância de estudos que investiguem os mecanismos moleculares de infecção e disseminação nos hospedeiros vetoriais (Ciota; Kramer, 2010; Kean *et al.*, 2015).

A maioria dos arbovírus possui genomas de RNA e pertence às famílias *Togaviridae*, *Flaviviridae*, *Bunyaviridae*, *Reoviridae* e *Rhabdoviridae*. As elevadas taxas de mutações em seus genomas contribuem significativamente para a adaptação dos vírus a diferentes hospedeiros e ambientes, facilitando sua perpetuação e disseminação (Figueiredo, 2007; Hanley; Weaver, 2008). Com o objetivo de organizar o conhecimento sobre esses vírus, o CDC (Centers for Disease Control and Prevention) mantém o Arbovirus Catalog, um banco de dados que originalmente lista 537 vírus, dos quais 113 são classificados como arbovírus, 389 como possíveis ou prováveis arbovírus, e 35 como não ou provavelmente não arbovírus (Figura 1. A) (CDC Division of Vector-Borne Diseases (DVBD), [s. d.]). Contudo, uma revisão recente realizada por nosso grupo identificou 535 vírus, sendo 135 classificados como arbovírus, 362 como possíveis ou prováveis arbovírus, e 38 como não ou provavelmente não arbovírus, evidenciando a continua atualização do conhecimento sobre esses patógenos (Figura 1.B) (dados não publicados).

Entre os arbovírus catalogados, a maioria é transmitida por mosquitos pertencentes às subfamílias *Culicinae* e *Anophelinae* (Figura 1.C), com destaque para os gêneros *Aedes* e *Culex* (Figura 1.D), que desempenham um papel central na transmissão de arboviroses de relevância médica. A ampla distribuição geográfica desses vetores, aliada à sua elevada capacidade de

adaptação a ambientes urbanos, tem favorecido a disseminação de diversas doenças, como dengue, chikungunya, febre amarela e Zika (Consoli; Oliveira, 1994). Neste contexto, o presente estudo concentra-se na análise de arbovírus das famílias *Flaviviridae* e *Togaviridae*, que incluem os principais vírus de impacto epidemiológico na América do Sul, em especial aqueles transmitidos por *Aedes aegypti* (Higuera; Ramírez, 2019). A compreensão aprofundada desses vírus e de seus vetores é fundamental para o desenvolvimento de estratégias eficazes de vigilância, prevenção e controle, visando à mitigação dos impactos das arboviroses na saúde pública

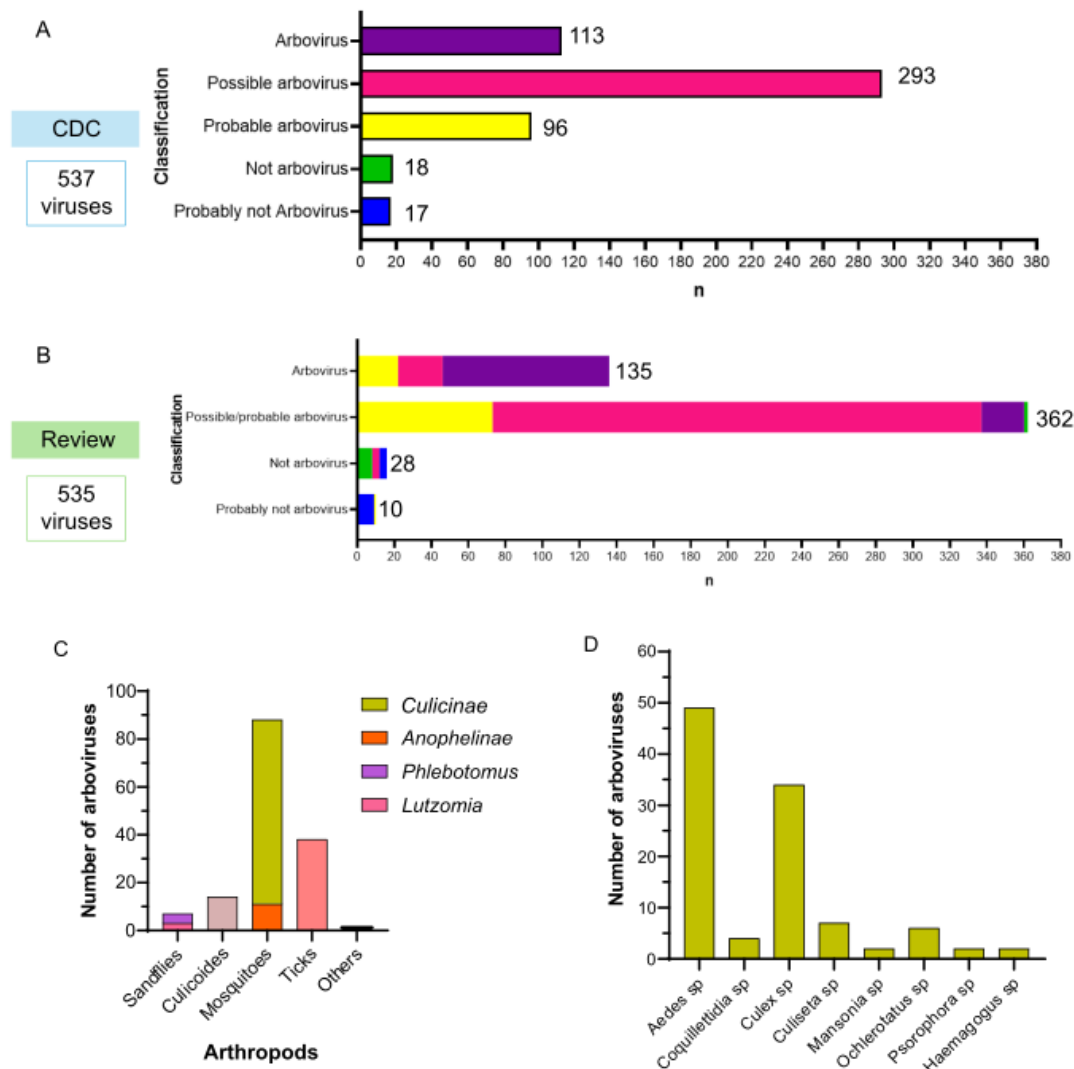


Figura 1. Catalog Arbovirus. A, visão geral dos vírus listados pelo CDC, organizados por suas respectivas classificações. B, revisão das classificações dos 535 vírus incluídos no catálogo. C, número de arbovírus classificados de acordo com os principais grupos de artrópodes vetores: mosquito-palha (sandflies – famílias *Phlebotomus* e *Lutzomyia*), *Culicoides*, mosquitos (subfamílias *Anophelinae* e *Culicinae*) e carrapatos (ticks). D, número de arbovírus transmitidos por diferentes gêneros de acordo com o gênero da subfamília *Culicinae*, com destaque para os gêneros *Aedes* e *Culex*. Fonte de dados: (CDC Division of Vector-Borne Diseases (DVBD), [s. d.]

1.2 FLAVIVIRIDAE

A família *Flaviviridae* é caracterizada por possuir um genoma composto por RNA de fita simples de sentido positivo, com tamanho aproximado entre 8,9 e 13 kb. Esse genoma contém uma única *open reading frame* (ORF) longa, flanqueada por regiões não codificadoras nas extremidades 5' e 3' (*untranslated regions* – UTRs). Essas regiões formam estruturas secundárias essenciais para os processos de replicação e tradução viral (Neufeldt *et al.*, 2018; Simmonds *et al.*, 2017).

A família é composta por quatro gêneros: *Orthoflavivirus*, *Pestivirus*, *Hepacivirus* e *Pegivirus* (Simmonds *et al.*, 2017). Dentre esses, o gênero *Orthoflavivirus* inclui a maioria dos arbovírus de importância médica, sendo classificado em dois principais grupos: os vírus transmitidos por mosquitos e os vírus transmitidos por carrapatos. Enquanto os vírus transmitidos por carrapatos formam um grupo monofilético, os transmitidos por mosquitos apresentam maior diversidade, abrangendo o vírus da dengue (DENV), o vírus da febre amarela (YFV), o vírus da encefalite japonesa (JEV) e o vírus da Zika (ZIKV) (Bamford *et al.*, 2022; Chambers *et al.*, 1990; Holbrook, 2017; Simmonds *et al.*, 2017).

Entretanto, nem todos os vírus da família *Flaviviridae* são transmitidos a vertebrados por esses ciclos vetoriais. Alguns exibem especificidade de hospedeiro, infectando exclusivamente vertebrados ou insetos, sem capacidade de transmissão entre diferentes grupos taxonômicos (Blitvich; Firth, 2015; Holbrook, 2017). A seguir, o foco será direcionado a gênero *Orthoflavivirus*, com ênfase no ZIKV.

Orthoflavivirus são vírus icosaédricos com cerca de 50 nm de diâmetro (Figura 2.A). Seu genoma contém uma única ORF, traduzida em uma poliproteína que é clivada em três proteínas estruturais (C, prM/M e E) e sete proteínas não estruturais (NS1 a NS5) (Figura 2.B). As regiões 5'UTR e 3'UTR contêm estruturas secundárias cruciais para a regulação da replicação e tradução viral. A 3'UTR é responsável pela produção de sfRNA (*small flavivirus RNA*), implicado na evasão da resposta imune (sfRNA – *small flavivirus RNA*) (Best, 2016; Kuhn *et al.*, 2002; Rey; Stiasny; Heinz, 2017; Santos *et al.*, 2019; Williams; MacKenzie; Bingham, 2019).

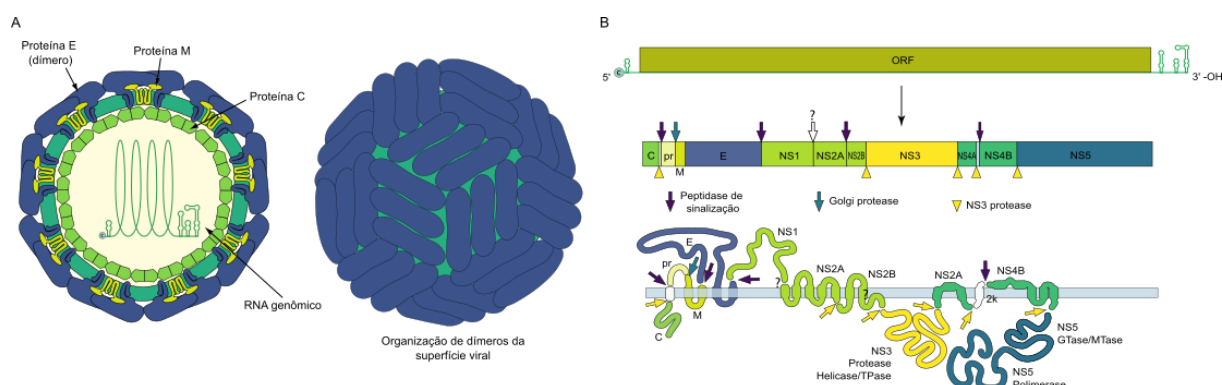


Figura 2. Representação do gênero *Orthoflavivirus*. A, Representação esquemática da estrutura do vírion, destacando os componentes externos e internos. B, Organização do código genético do *Orthoflavivirus*, mostrando a ORF (Open Reading Frame) que codifica uma única poliproteína. Após clivagem, a poliproteína gera três proteínas estruturais (E, prM/M e C) e sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5), que são inseridas na membrana do retículo endoplasmático (RE). C, proteína do Capsídeo; E, proteína do envelope; prM, pré-membrana; M, membrana. Fonte: ViralZone, [s. d.] com adaptações.

A estrutura viral inclui uma camada externa, uma bicamada lipídica e um nucleocapsídeo que abriga o RNA viral. A proteína E, presente na superfície dos vírions maduros, forma homodímeros ancorados na proteína M, organizados em estruturas chamadas “jangadas” (rafts) com padrão de “espinha de peixe” (herringbone), essenciais para fusão com a célula hospedeira. Essa proteína é composta por três domínios: I (central), II (envolvido na fusão viral) e III (sítio de ligação ao receptor). Alterações conformacionais nesses domínios, induzidas pelo pH, permitem a entrada viral nas células (Allison *et al.*, 2001; Kuhn *et al.*, 2002; Rey *et al.*, 1995; van Leur *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2004).

Diversas moléculas dos mosquitos são potenciais receptores para *Orthoflavivirus*, incluindo as glicoproteínas 40/45 kDa, proteínas R67, R80, HSP70, HSP90 e proibitina (Kuadkitkan *et al.*, 2010; Lourdes Muñoz *et al.*, 1998; Mercado-Curiel *et al.*, 2006; Salas-Benito; del Angel, 1997; Vega-Almeida *et al.*, 2013). Após internalização, o pH ácido do endossomo promove a reorganização da proteína E em trímeros, expondo o *fusion loop*, que facilita a fusão entre as membranas viral e endossomal e libera o nucleocapsídeo no citosol (Acosta; Castilla; Damonte, 2008; Chu; Ng, 2004; Modis *et al.*, 2003; Pierson; Kielian, 2013; Schaar *et al.*, 2008; Smit *et al.*, 2011).

Uma vez no citosol, o capsídeo é desmontado e o RNA viral é liberado (Figura 3). Esse RNA apresenta uma *cap* do tipo I na extremidade 5' e estruturas que favorecem a circularização do genoma, permitindo sua tradução no retículo endoplasmático (RE) (Garcia-Blanco *et al.*, 2016). Alterações nas membranas do RE geram compartimentos como vesículas (VPs) e membranas convolutas (CMs), que compõem o complexo de replicação (Grief *et al.*, 1997; Mackenzie; Jones; Young, 1996; Welsch *et al.*, 2009). A proteína NS1 localiza-se no lúmen do

RE, enquanto as proteínas NS2A-2B, NS4A-4B são inseridas na membrana do RE. Por outro lado, as proteínas NS3 e NS5, que são solúveis, são recrutadas para o compartimento do complexo de replicação, desempenhando um papel essencial na replicação eficiente do vírus (Ci; Shi, 2021; Fishburn *et al.*, 2022; Li *et al.*, 2015; Li, Yan *et al.*, 2016; Miller *et al.*, 2007; Xie *et al.*, 2013).

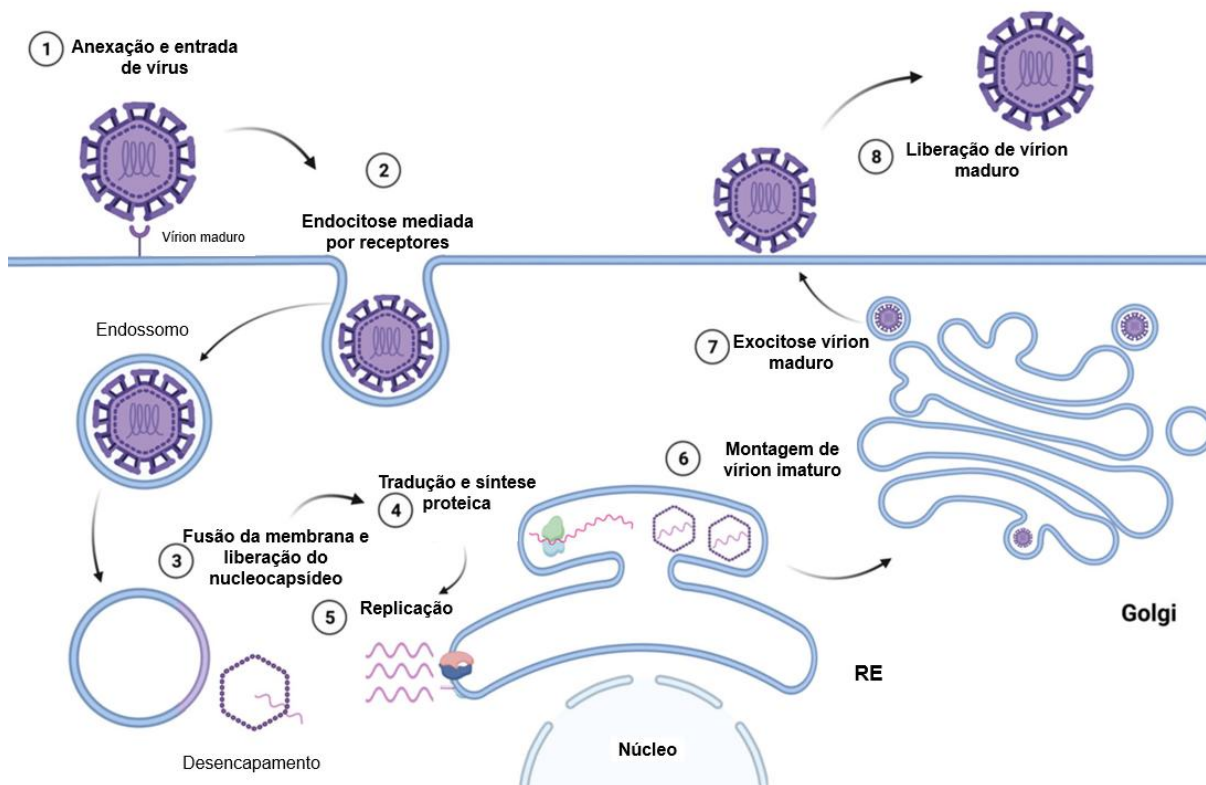


Figura 3. Ciclo de replicação dos *Orthoflavivirus* em células hospedeiras. O vírus inicia sua infecção através da interação entre a proteína E e receptores celulares na superfície celular (1), seguida por internalização via endocitose mediada por clatrina (2). No interior do endossomo, o ambiente ácido induz mudanças conformacionais na proteína E que promovem a fusão viral com a membrana endossomal, liberando o nucleocapsídeo no citoplasma (3). Após a desmontagem do nucleocapsídeo, o RNA viral é liberado e serve como molde para tradução de uma poliproteína estrutural e não estrutural (4) e para replicação. As proteínas não estruturais se organizam em um complexo de replicação associado a membrana do RE (5), permitindo a síntese de novos RNAs. Paralelamente, o RNA viral recém-sintetizado e as proteínas estruturais (prM e E) são encapsulados no lúmen do RE, formando vírions imaturos (6). Essas partículas são transportadas para a rede de trans-Golgi, onde o ambiente ácido desencadeia o processamento proteolítico da prM em M pela furina, resultando em vírion maduros que são liberados da célula por exocitose (7), prontos para infectar outras células (8). Fonte: Gomes da Silva *et al.* (2023) com adaptações.

A fita positiva de RNA (RNA⁺) é então copiada em fita complementar de sentido negativo (RNA⁻) pela NS5, uma RNA polimerase dependente de RNA (RdRp). O RNA⁻ serve de molde para a síntese de novas fitas RNA⁺. Durante esse processo, as estruturas de fita dupla (dsRNA), formadas como intermediários da replicação, são desenroladas pela helicase NS3, com auxílio de NS2B e NS4B. O RNA⁺ recém-sintetizado é capeado e metilado pelas

atividades de NS3 e NS5, possibilitando sua tradução ou empacotamento (Diosa-Toro *et al.*, 2020; Duan *et al.*, 2019; Filomatori *et al.*, 2006; Garcia-Blanco *et al.*, 2016; Junjhon *et al.*, 2014; Klema; Padmanabhan; Choi, 2015; Reid *et al.*, 2018; Umareddy *et al.*, 2006; van den Elsen; Quek; Luo, 2021; Zhao *et al.*, 2015; Zou *et al.*, 2015). Paralelamente, a degradação parcial da 3'UTR pela exonucleases XRN1 ou Pacman gera o sfRNA, essencial para a evasão imune (Besson *et al.*, 2024; Jones; Zabolotskaya; Newbury, 2012; Pijlman *et al.*, 2008; Reid *et al.*, 2018).

A tradução do RNA viral é iniciada após o reconhecimento do códon AUG, mediado por estruturas secundárias como *hairpins* na 5'UTR, facilitando a montagem do ribossomo funcional 80S. A poliproteína resultante é clivada por proteases virais e celulares, gerando os componentes necessários para o ciclo viral (Chambers *et al.*, 1990; Clyde; Barrera; Harris, 2008; Clyde; Harris, 2006; Garcia-Blanco *et al.*, 2016).

A montagem de novos vírions ocorre no lúmen do RE, onde se formam partículas imaturas contendo RNA+, proteína C, prM e E. Essas partículas, com cerca de 600 Å de diâmetro, apresentam 60 picos triméricos de prM-E (Diosa-Toro *et al.*, 2020; Duan *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2008; Morita; Suzuki, 2021; Tan *et al.*, 2020; Yu *et al.*, 2008). Durante a passagem pelo Golgi, a proteína prM é clivada pela furina do hospedeiro, liberando a porção “pr” e convertendo o vírion em sua forma madura, pronta para ser liberada por exocitose (Elshuber *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2008; Mukhopadhyay; Kuhn; Rossmann, 2005; Renner *et al.*, 2021; Sirohi; Kuhn, 2017; Yu *et al.*, 2009, 2008). Essa maturação é essencial para a infectividade viral e disseminação.

1.2.1 Zika Virus

O vírus Zika (ZIKV) representa um dos mais significativos desafios de saúde pública das últimas décadas, especialmente devido à sua rápida disseminação global e às graves complicações associadas, como a microcefalia em recém-nascidos (Plourde; Bloch, 2016; Santos *et al.*, 2019). Relatado pela primeira vez em 1952, após o seu isolamento em um macaco rhesus na floresta Zika, em Uganda, em 1947, o vírus foi subsequentemente identificado em mosquitos *Aedes africanus* na mesma região (Dick; Kitchen; Haddow, 1952). O primeiro caso humano de infecção por ZIKV foi diagnosticado em 1954, na Nigéria (MacNamara, 1954), e, desde então, o vírus foi identificado de forma esporádica em regiões da África e da Ásia (Plourde; Bloch, 2016; Santos *et al.*, 2019).

Em 2007, foi registrado o primeiro surto documentado de ZIKV fora da África e da Ásia, na ilha de Yap, nos Estados Federados da Micronésia. Durante esse episódio, os pacientes apresentaram sinais clínicos como exantema, conjuntivite, febre, artralgia e artrite. Testes laboratoriais confirmaram a infecção por ZIKV em diversos indivíduos, e estimativas indicaram que cerca de 75% da população local havia sido infectada (Duffy *et al.*, 2009). Nos anos subsequentes, o ZIKV ampliou sua distribuição geográfica. Em 2010, novos casos foram registrados no Camboja (Heang *et al.*, 2012), e em 2013 ocorreu um surto de grandes proporções na Polinésia Francesa, onde, pela primeira vez, a infecção foi associada a manifestações neurológicas, como a síndrome de Guillain-Barré (Cao-Lormeau *et al.*, 2014; Oehler *et al.*, 2014). Posteriormente, o vírus foi detectado na Nova Caledônia (Dupont-Rouzeyrol *et al.*, 2015), na Ilha da Páscoa (Tognarelli *et al.*, 2016) e nas Ilhas Cook (Roth *et al.*, 2014).

A introdução do ZIKV nas Américas ocorreu a partir de 2015, com surtos de grande magnitude (Fauci; Morens, 2016). No Brasil, os primeiros casos foram identificados na região Nordeste, nos estados do Rio Grande do Norte e da Bahia. Análises moleculares revelaram que a linhagem viral era de origem asiática e apresentava elevada similaridade com a cepa isolada na Polinésia Francesa (Campos; Bandeira; Sardi, 2015; Zanluca *et al.*, 2015). Esse achado representou um alerta epidemiológico, pois coincidia com a co-circulação de outros arbovírus no país, como DENV e o vírus chikungunya (CHIKV), já endêmicos na região. A sobreposição desses vírus aumentou a complexidade do diagnóstico clínico e laboratorial, além de impor desafios adicionais ao sistema de saúde pública, exigindo estratégias integradas de vigilância e controle (Campos; Bandeira; Sardi, 2015).

Estudos indicam que, até 30 de janeiro de 2016, aproximadamente 30 mil casos de infecções por ZIKV haviam sido notificados no Brasil, com o pico epidêmico registrado em julho de 2015. O estado da Bahia concentrou o maior número de casos (Faria *et al.*, 2016). Atualmente, o ZIKV está presente em todos os estados brasileiros (Figura 4). Informes epidemiológicos recentes apontam um aumento no número de casos prováveis em 2024, sobretudo no primeiro trimestre do ano (Figura 4.A). A análise espacial revela maior incidência nas regiões Norte e Nordeste, com destaque para os estados do Amapá e Rio Grande do Norte (BRASIL. Ministério da Saúde, 2025).

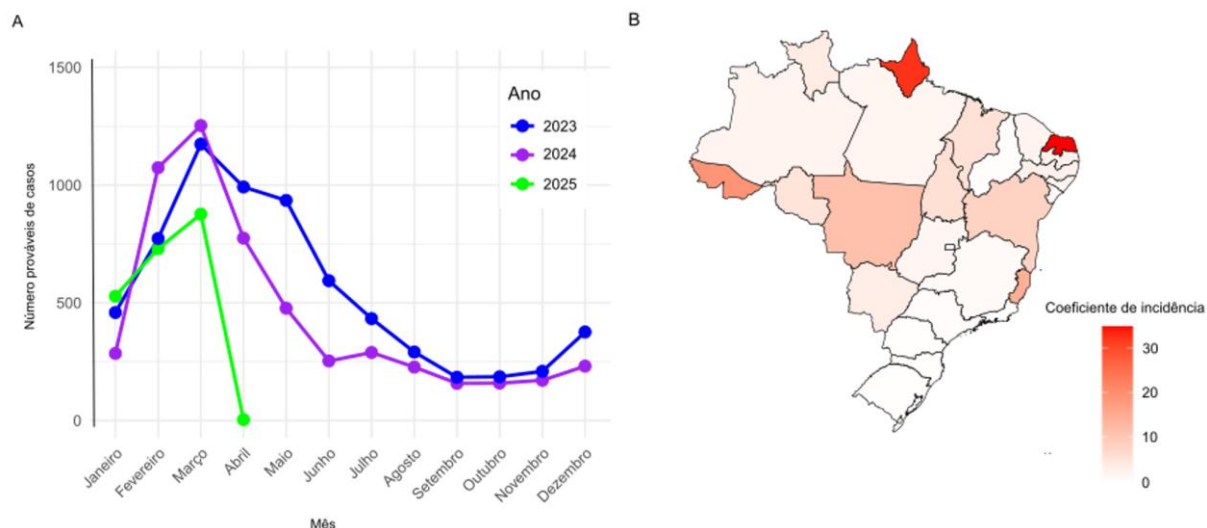


Figura 4. Dados de casos prováveis de Zika vírus no Brasil. A, representa a distribuição mensal dos casos prováveis entre 2023 e 2025 (dados até a 15ª semana epidemiológica). B, ilustra o coeficiente de incidência por 100 mil habitantes em 2024 no Brasil, destacando os estados mais afetados. Fonte: dados adaptados do Ministério da Saúde, 2025

Além dos desafios para o sistema de saúde, a circulação do ZIKV no Brasil trouxe consequências graves para a saúde pública, como o aumento significativo de casos de microcefalia. Com a identificação de ZIKV circulando no Brasil em 2015, observou-se um crescimento significativo no número de recém-nascidos com essa malformação congênita, especialmente em regiões com maior incidência de infecção pelo vírus. A associação entre a infecção por ZIKV e microcefalia foi fortemente evidenciada quando o vírus foi detectado em tecidos neuronais de crianças afetadas. Essa descoberta reforçou a hipótese de que o ZIKV possui neurotropismo, ou seja, a capacidade de infectar e danificar células do sistema nervoso, levando a complicações graves no desenvolvimento fetal, principalmente quando a mãe é infectada durante os primeiros meses de gestação (Araújo *et al.*, 2018; Martines, 2016; Mlakar *et al.*, 2016; Schuler-Faccini, 2016).

Essa associação entre ZIKV e a microcefalia ganhou destaque com os dados epidemiológicos divulgados pelo Ministério da Saúde. Entre 2015 e 2023, foram notificados 22.251 casos suspeitos de síndrome congênita associada à infecção pelo ZIKV (SCZ), dos quais 3.742 foram confirmados. Esse fato é alarmante, pois revela que a SCZ ainda é um problema recorrente. Somente em 2023, 1.035 casos suspeitos foram notificados, dos quais seis foram confirmados (BRASIL. Ministério da Saúde, 2024b). No entanto, esses números podem representar apenas a ponta do iceberg, uma vez que a subnotificação e as limitações diagnósticas permanecem como desafios significativos para a detecção precisa dos casos.

Além dos desafios epidemiológicos, a desigualdade social emerge como um fator agravante. A maioria dos casos de SCZ está intimamente relacionada a condições sociodemográficas desfavoráveis, afetando as populações periféricas. Estudos demonstram que, na maioria dos casos da síndrome congênita do ZIKV, as mães viviam em condições de pobreza ou baixo da linha da pobreza (Araújo *et al.*, 2018; Souza *et al.*, 2018). Frequentemente, essas populações não têm acesso adequado à assistência médica e vivem em condições que favorecem a proliferação do vetor, como falta de saneamento básico e o acúmulo de água parada (Alirol *et al.*, 2011).

Do ponto de vista biológico, sabe-se hoje que o ZIKV possui capacidade de infectar células progenitoras neuronais, essenciais para neurodesenvolvimento embrionário. Além disso, a infecção induz o aumento da ativação da caspase-3, resultando na desregulação do ciclo celular e culminando em morte celular (Li, Cui *et al.*, 2016; Tang *et al.*, 2016). Outro fator que contribuiu para ocorrência de SCZ foi a presença de mutações no genoma viral. Estudos sugerem que a mutação de serina para asparagina na posição 139 (S139N) pode estar diretamente relacionada a SCZ (Yuan *et al.*, 2017).

Diante desse cenário, é essencial fortalecer os sistemas de vigilância em saúde, com foco na detecção precoce de casos e no monitoramento da circulação do vírus. Além disso, é crucial investir em pesquisas que aprofundem o entendimento dos mecanismos moleculares e epidemiológicos do ZIKV, bem como suas interações com o hospedeiro e o vetor. Paralelamente, é necessário implementar políticas públicas que abordem as desigualdades socioeconômicas, garantindo acesso a saneamento básico, educação em saúde e assistência médica, e que intensifiquem o controle do vetor, por meio de estratégias integradas de combate ao *Aedes aegypti*. Essas ações são fundamentais para reduzir a transmissão de arbovírus no país, diminuindo o número de casos de infecção por ZIKV e SCZ.

1.3 TOGAVIRIDAE

A família *Togaviridae* é caracterizada por vírus envelopados, cujo material genético consiste em uma fita simples de RNA de polaridade positiva. Esses vírus apresentam simetria icosaédrica (geometria $T=4$) e uma estrutura organizada por um nucleocapsídeo proteico, uma bicamada lipídica derivada da membrana celular do hospedeiro e um de glicoproteínas superficiais (Figura 5.A). Embora seja uma família pequena, com apenas um gênero

(*Alphavirus*), inclui espécies de grande relevância médica, como CHIKV e Mayaro vírus (MAYV) (Chen *et al.*, 2018; Hernandez; Brown; Paredes, 2014; Strauss; Strauss, 1994).

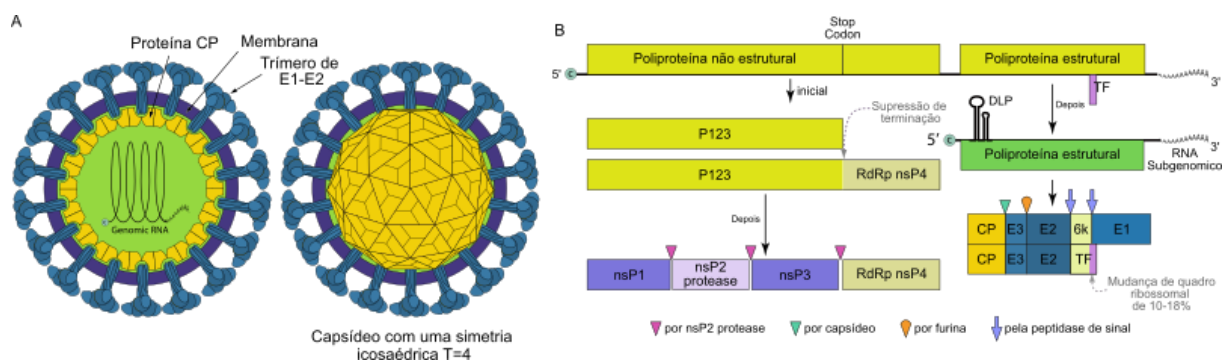


Figura 5. Representação do gênero *Alphavirus*. A, Representação esquemática da estrutura do vírion, destacando a membrana lipídica com as glicoproteínas E1 e E2, além do CP contendo o RNA genômico de polaridade positiva. B, Organização genômica do *Alphavirus*, composta por duas ORFs (Open Reading Frame). A primeira ORF codifica a poliproteína não estrutural (P123 e nsP4), que é processada em nsP1, nsP2, nsP3 e nsP4, responsáveis pela replicação do RNA viral. A segunda ORF, codifica a poliproteína estrutural que, após clivagem, origina as proteínas CP, E3, E2, 6k, E1 e TF. Fonte: ViralZone [s. d.] com adaptações.

O genoma viral é organizado em duas ORFs. A primeira, localizada na região 5' próxima ao *cap* viral, codifica quatro proteínas não estruturais (nsP1-nsP4) envolvidas na replicação e transcrição viral. A segunda ORF codifica as proteínas estruturais: capsídeo (CP), E3, E2, 6k, *transframe* (TF) e E1 (Figura 5.B) (Button *et al.*, 2020; Hernandez; Brown; Paredes, 2014). Dentre essas, apenas a CP, a bicamada lipídica derivada do hospedeiro e os complexos triméricos de glicoproteínas E1-E2, incorporadas nessa bicamada, são necessários para a infectividade (Figura 5.A) (Button *et al.*, 2020; Hasan *et al.*, 2018; Paredes *et al.*, 1993; Zhang *et al.*, 2002).

As proteínas E1 e E2 formam um heterodímero estável na superfície viral, desempenhando funções essenciais para a entrada do vírus na célula hospedeira. A proteína E2 é responsável pela interação inicial com os receptores celulares, enquanto a E1 atua posteriormente promovendo a fusão de membranas. Estruturalmente, E1 possui três ectodomínios (I-III), com o domínio II mediando a fusão. A E2 contém cinco domínios (A-D e o conector de fita β); o domínio A é o principal sítio de ligação aos receptores celulares, enquanto o domínio B protege o loop de fusão de E1 e auxilia na interação com o hospedeiro (Hasan *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2010; Strauss; Strauss, 1994; Sun *et al.*, 2013; Voss *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2002).

Após a ligação de E2 aos receptores celulares, o vírus é internalizado por endocitose mediada por clatrina (Figura 6) (Bernard *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2013). A vesícula revestida por clatrina se funde aos endossomos, onde o pH ácido induz mudanças estruturais no complexo

E1-E2, preparando o vírus para a fusão com a membrana endossomal (De Caluwé; Ariën; Bartholomeeusen, 2021; Van Duijl-Richter *et al.*, 2015). O ambiente ácido desestabiliza o heterodímero E1-E2, expondo o loop de fusão da E1, que se insere na membrana do endossomo. Essa inserção é dependente da presença de colesterol, pois facilita interações hidrofóbicas críticas (Cao; Zhang, 2013; Gibbons *et al.*, 2004; Justman; Klimjack; Kielian, 1993; Li *et al.*, 2010; Margaret Kielian; Ari Helenius, 1985; Spyr; Käsermann; Kempf, 1995; Van Duijl-Richter *et al.*, 2015; Voss *et al.*, 2010; Wahlberg *et al.*, 1992; Wahlberg; Garoff, 1992).

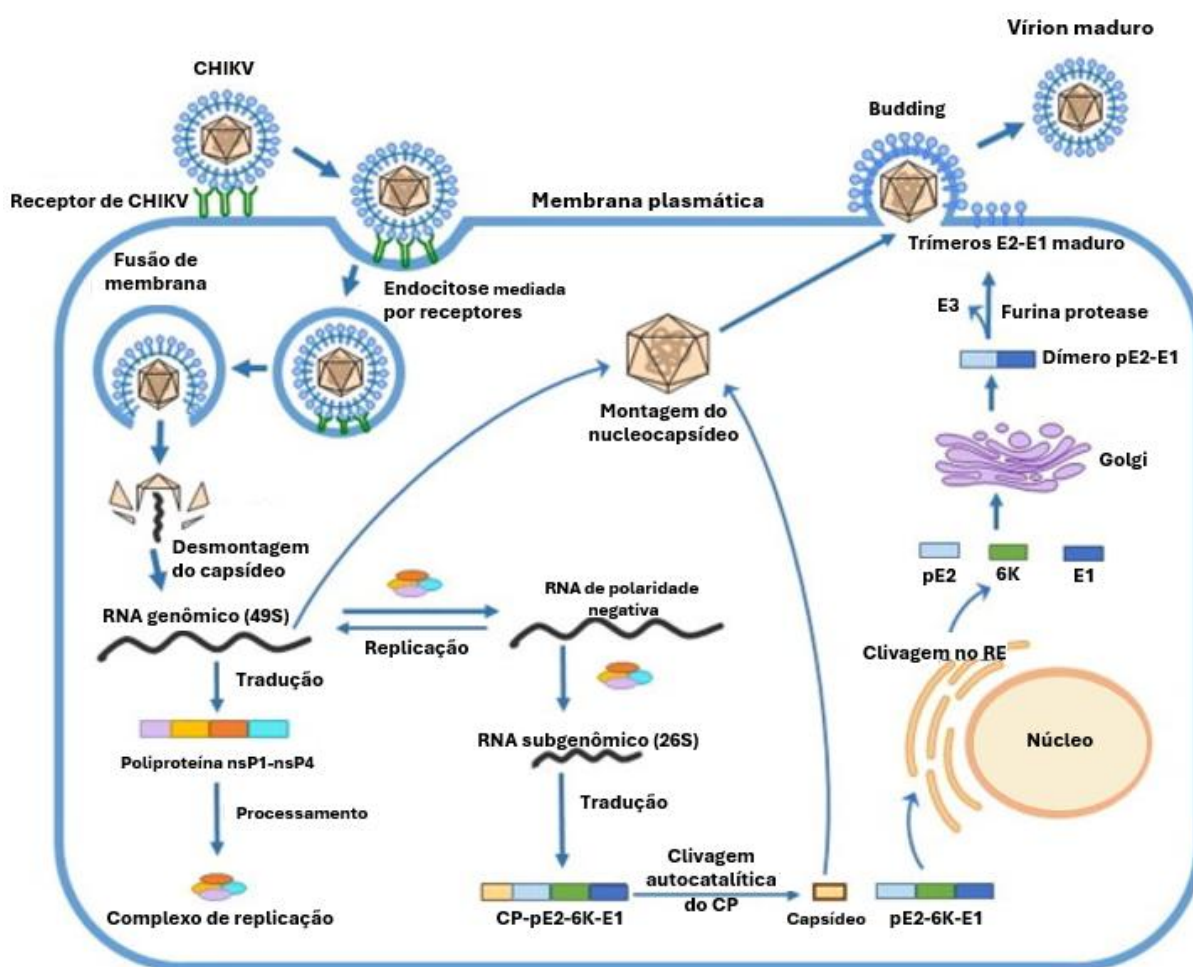


Figura 6. Ciclo de replicação dos *Alphavirus* em células hospedeiras. O vírus, representado por CHIKV, é internalizado via endocitose mediada por clatrina após a interação da proteína E2 com receptores celulares. No endossomo, o pH ácido desencadeia a fusão do envelope viral com membrana endossomal, liberando o nucleocapsídeo (CP) no citoplasma. Após a desmontagem do CP, o RNA genômico (49S) é traduzido em poliproteínas não estruturais (P1234), que são processadas em nsP1-nsP4 para formar o complexo de replicação viral. Este complexo sintetiza RNA de polaridade negativa (RNA-), que serve como molde para produção de novos gRNA e sgRNA (26S). O sgRNA é traduzido em poliproteína estrutural (CP-p62-6K-E1), onde a clivagem autocatalítica do CP expõe um peptídeo de sinal que direciona o restante da poliproteína (p62-6K-E1) para o retículo endoplasmático (RE). No RE, a peptidase de sinal processa a poliproteína em p62, 6K e E1. Os heterodímeros p62-E1 são transportados para o complexo de Golgi, onde a furina cliva p62 nas subunidades E2 e E3. Finalmente, os componentes estruturais são direcionados para a membrana plasmática, onde ocorre a montagem dos vírions maduros e sua liberação por brotamento (budding). Fonte: Abdelnabi; Neyts; Delang (2015) com adaptações.

Na etapa final, E1 sofre trimerização, mediada pelas interações entre seus domínios I e II, promovendo a formação de poros na membrana endossomal (Kielian, 2006; Lanzrein; Weingart; Kempf, 1993; Martín; Sosa; Kielian, 2008; Spyr; Käsermann; Kempf, 1995; Wahlberg *et al.*, 1992; Wahlberg; Garoff, 1992). Através desses poros, o nucleocapsídeo é liberado no citoplasma da célula. Após a liberação, o nucleocapsídeo é desmontado, liberando o RNA viral, que será traduzido e replicado para dar continuidade ao ciclo de infecção (Jose; Snyder; Kuhn, 2009; Kim; Diamond, 2023; Leung; Ng; Chu, 2011).

O RNA genômico dos *Alphavirus* possui aproximadamente 11,8 kb, polaridade positiva e características estruturais semelhantes às de RNAs mensageiros (mRNA) eucarióticos, como a presença de uma *cap* 5' (N7-metilguanosina) e uma cauda poliadenilada 3', elementos essenciais para o reconhecimento pela maquinaria de tradução do hospedeiro. O genoma codifica duas ORFs traduzidas em momentos distintos da infecção: o RNA genômico (gRNA), traduzido logo após a entrada viral, e o RNA subgenômico (sgRNA), expresso posteriormente. A tradução do gRNA origina uma poliproteína (P123 ou P1234), processada pela protease viral nsP2 em quatro proteínas não estruturais: nsP1, nsP2, nsP3 e nsP4. A nsP1 é ancorada à membrana do RE e atua na formação da *cap* do RNA viral. A nsP2 possui múltiplas atividades enzimáticas, incluindo helicase, NTPase, RNA-trifosfatase e protease. A nsP3 é um cofator essencial da replicação e a nsP4 atua como RNA polimerase dependente de RNA (RdRp), sendo expressa por meio de *readthrough* de um códon de parada (UGA) entre os genes nsP3 e nsP4, processo regulado por elementos na sequência 3' adjacente (Carrasco; Sanz; González-Almela, 2018; Gorchakov *et al.*, 2008; Jose; Snyder; Kuhn, 2009; Lemm *et al.*, 1994; Li; Rice, 1993; Shin *et al.*, 2012; Shirako; Strauss, 1994, 1990; Silva; Dermody, 2017; Solignat *et al.*, 2009; Tan *et al.*, 2022; Toribio *et al.*, 2018).

O sgRNA é sintetizado a partir do RNA- por reconhecimento de um promotor interno e apresenta sequência idêntica à porção 3' do gRNA. Sua tradução resulta na produção de uma poliproteína precursora das proteínas estruturais: capsídeo (CP), p62 (precursora de E2 e E3), 6K, E1 e a proteína TF. A CP é traduzida no citosol, sofre clivagem autocatalítica e direciona o ribossomo para o RE por meio de um peptídeo sinal. No RE, a tradução prossegue com a glicosilação de p62 e clivagens da poliproteína por peptidases de sinal, gerando p62, 6K e E1 (Brown; Wan; Kielian, 2018; Kääriäinen; Ahola, 2002; Melancon; Garoff, 1987; Nicola; Chen; Helenius, 1999; Ou *et al.*, 1982; Sanz *et al.*, 2003). A p62 e E1 formam um heterodímero que segue para o complexo de Golgi, onde p62 é processada pela furina em E2 e E3. A E3 é geralmente liberada, enquanto E2 permanece no vírion maduro (de Curtis; Simons, 1988; Green

et al., 1981; Lobigs; Zhao; Garoff, 1990; Martín; Liu; Kielian, 2009; Rayner; Dryga; Kamrud, 2002; Sariola; Saraste; Kuismanen, 1995; Wahlberg; Boere; Garoff, 1989; Zhang *et al.*, 2003).

A proteína 6K, apesar de não integrar o vírion maduro, participa da montagem viral e apresenta duas isoformas: 6K e 4K (ou TF). Ambas compartilham sequências de aminoácidos semelhantes, mas diferem em seu grau de acilação por ácidos graxos. A isoforma TF é gerada por frameshift ribossomal -1 e acredita-se que esteja envolvida na estabilidade do vírion (Chung; Firth; Atkins, 2010; Firth *et al.*, 2008; Gaedigk-Nitschko; Schlesinger, 1990; Lusa; Garoff; Liuestrom, 1991; Welch; Sefton, 1979, 1980; Yao; Strauss; Strauss, 1996).

A proteína CP encapsida seletivamente o gRNA por meio de interações com regiões específicas do genoma. O nucleocapsídeo formado migra para a membrana plasmática, onde se associa às glicoproteínas E2-E1 ancoradas na membrana, promovendo a montagem e liberação do vírion por brotamento (budding), completando o ciclo de replicação viral (Acheson; Tamm, 1967; Frolova; Frolov; Schlesinger, 1997; Geigenmüller-Gnirke; Nitschko; Schlesinger, 1993; Söderlund, 1973; Suomalainen; Liljeström; Garoff, 1992; Ulmanen; Söderlund; Kääriäinen, 1976; Weiss *et al.*, 1989; Weiss; Geigenmüller-Gnirke; Schlesinger, 1994; White; Thomson; Dimmock, 1998).

1.3.1 *Chikungunya virus*

O vírus chikungunya (CHIKV) foi isolado pela primeira vez 1953, durante uma epidemia ocorrida em Newala, distrito de Mtwara, na Tanzânia. O vírus foi identificado simultaneamente em amostras de soro humano e em mosquitos *Ae. aegypti*, marcando o primeiro registro deste arbovírus (Ross, 1956). Essa descoberta foi motivada pelas manifestações clínicas em pacientes que apresentavam febre aguda, artralgia intensa, erupção cutâneas e um período sintomático de aproximadamente sete dias, além de episódios de artralgia persistentes por meses. Após esse primeiro isolamento, surtos esporádicos foram relatados na Ásia e África, com o vírus sendo transmitidos por mosquitos do gênero *Aedes* (Diallo *et al.*, 1999; Hammon; Rundnick; Sather, 1960; Morrison, 2014; Schuffenecker *et al.*, 2006; Wahid *et al.*, 2017a).

Desde os anos 2000, casos autóctones de CHIKV têm sido reportados na Europa, onde circula um de seus vetores, o *Ae. albopictus* (Angelini *et al.*, 2007; Delisle *et al.*, 2015; Grandadam *et al.*, 2011; Liumbruno *et al.*, 2008). Já nas Américas, a detecção dos primeiros casos autóctones ocorreu em 2013, em São Martinho (Cassadou *et al.*, 2014), seguida pela disseminação do vírus para outros países do continente (Leparc-Goffart *et al.*, 2014; Pan

American Health Organization, [s. d.]; Wahid *et al.*, 2017b). Em 2023, observou-se um aumento no número de casos prováveis e de óbitos associadas à infecção por CHIKV em todo o continente, o que levou a Organização Pan-Americana de Saúde a emitir um alerta epidemiológico (Pan American Health Organization, 2023).

No Brasil, os primeiros casos autóctones de CHIKV foram reportados nos estados do Amapá e da Bahia, no segundo semestre de 2014. Desde então, o vírus tornou-se endêmico no país, com registros em todos os estados brasileiros (Almeida *et al.*, 2023; BRASIL. Ministério da Saúde, [s. d.]). De acordo com o Ministério da Saúde, entre 2014 e 2023, o Brasil contabilizou cerca de 1 milhão de casos prováveis da doença (BRASIL. Ministério da Saúde, 2024c).

Em 2024, observou-se um aumento expressivo no número de casos prováveis de arboviroses, incluindo o CHIKV, principalmente entre os meses de janeiro e maio. Nesse ano o Brasil registrou 265.545 casos prováveis de infecção por CHIKV (Figura 7.A). Uma das justificativas para esse aumento envolve anomalias nos padrões de temperatura e precipitação associadas ao fenômeno El niño (BRASIL. Ministério da Saúde, 2024a, 2025). No entanto, em 2025, até 15ª semana epidemiológica, observou-se uma redução considerável nos casos prováveis de CHIKV em nível nacional. Contudo, estados como Mato Grosso e Mato Grosso do Sul apresentaram um aumento exacerbado no coeficiente de incidência, com 824,4 e 232,2 casos por 100 mil habitantes, respectivamente, em comparação com o restante do país (Figura 7.B) (BRASIL. Ministério da Saúde, 2025).

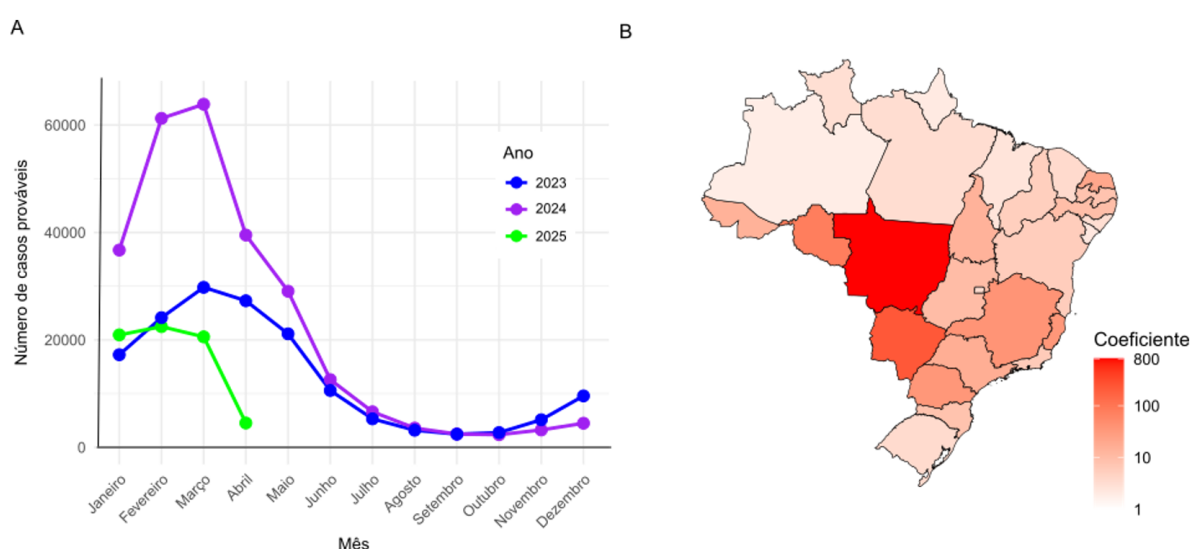


Figura 7. Casos prováveis de Chikungunya no Brasil. A, distribuição mensal dos casos prováveis entre 2023 e 2025. B, o coeficiente de incidência por 100 mil habitantes em 2025, destacando os estados mais afetados. Os

dados do ano de 2025 correspondem às notificações registradas até 15ª semana epidemiológica. Fonte: dados adaptados do Ministério da Saúde (2025).

Entre as linhagens de CHIKV existentes, a que circula no Brasil pertence ao genótipo África Oriental/Central/Sul (ECSA), detectado pela primeira vez durante a introdução do vírus no território nacional. Essa descoberta foi considerada uma surpresa, uma vez que os primeiros casos autóctones nas Américas estavam associadas à linhagem asiática (Charlys da Costa *et al.*, 2017; Cunha *et al.*, 2017; Fritsch *et al.*, 2022; Leparç-Goffart *et al.*, 2014; Nunes *et al.*, 2015; Rodrigues Faria *et al.*, 2016; Xavier *et al.*, 2021, 2023). A linhagem ECSA está associada ao desenvolvimento de manifestações clínicas graves, como artrite e reumatismo crônico após a infecção por CHIKV, afetando significativamente as atividades diárias dos pacientes, com disfunções de mobilidade e, em alguns casos, evolução para complicações neurológicas e óbito (de Lima *et al.*, 2021; Hayd *et al.*, 2020; Lázari *et al.*, 2023; Souza *et al.*, 2024).

Os vetores *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* apresentam competência vetorial para transmitir a linhagem ECSA para hospedeiros vertebrados, o que agrava ainda mais a situação, pois esses mosquitos estão amplamente distribuídos por todo o território brasileiro. Além disso, esses mosquitos são responsáveis pela transmissão de DENV e ZIKV, favorecendo a ocorrência de infecção concomitantes por CHIKV, o que pode dificultar o diagnóstico clínico e agravar os desfechos dos pacientes (Almeida-Souza *et al.*, 2024; Cardoso *et al.*, 2017; Costa-da-Silva *et al.*, 2017; de França Cirilo *et al.*, 2023; Rocha *et al.*, 2023; Santos *et al.*, 2022; Tsetsarkin; Chen; Weaver, 2016; Variza *et al.*, 2022; Vega-Rúa *et al.*, 2014).

1.3.2 Mayaro virus

A Febre do Mayaro, causada pelo *Alphavirus mayaro* (MAYV), historicamente apresenta baixa incidência e está associada ao ciclo de transmissão silvestre, envolvendo primatas não humanos e mosquitos do gênero *Haemagogus*. No entanto, nas últimas décadas, relatos de casos em áreas periurbanas e urbanas sugerem uma possível expansão do ciclo de transmissão. Estudos indicam que o *Ae. aegypti*, amplamente distribuído em ambientes urbanos, possui competência vetorial para o MAYV, o que levanta preocupações sobre o seu potencial de emergência como arbovirose urbana (Abad-Franch *et al.*, 2012; BRASIL. Ministério da Saúde, [s. d.]; Hoch *et al.*, 1981; Long *et al.*, 2011a; Mackay; Arden, 2016; Mota *et al.*, 2015; Pereira *et al.*, 2020; Rufino *et al.*, 2022; Serra *et al.*, 2016).

O MAYV foi isolado pela primeira vez em 1954, durante um surto em Trinidad, a partir de amostras de sangue de pacientes que apresentavam febre aguda (Anderson *et al.*, 1957). No ano

seguinte, foi identificado no Brasil, em trabalhadores rurais no Pará (Casals; Whitman, 1957; Causey; Maroja, 1957), consolidando seu padrão inicial de transmissão ocupacional em áreas florestais. Desde então, a circulação de MAYV permaneceu restrita à América Central e do Sul, com casos esporádicos, sendo a maioria deles reportados no Brasil (Ganjian; Riviere-Cinnamond, 2020; Rufino *et al.*, 2022).

As análises filogenéticas das linhagens de MAYV demonstram que este grupo é monofilético com três genótipos principais, definidos com base nas sequências gênicas dos segmentos E2 e E1. O genótipo D compreende linhagens amplamente distribuída na América do Sul e Trinidad. Já o genótipo L foi identificado somente no Brasil e Haiti (Auguste *et al.*, 2015; Lednicky *et al.*, 2016; Perez-Restrepo *et al.*, 2024; Powers *et al.*, 2006). O genótipo N, por sua vez, foi detectado exclusivamente no Peru (Auguste *et al.*, 2015).

No Brasil, os estudos iniciais indicavam que o genótipo D circulavam predominantemente na região Norte (Azevedo *et al.*, 2009; Forato *et al.*, 2024; Pimentel *et al.*, 2024; Terzian *et al.*, 2015), enquanto o genótipo L era mais frequente entre as regiões Norte e Centro-Oeste (Serra *et al.*, 2016; Vieira *et al.*, 2015). Entretanto, a recente detecção do genótipo D em Goiânia entre 2017 e 2018, indica uma possível expansão geográfica desse genótipo para a região central do país, alterando o panorama epidemiológico anteriormente estabelecido (de Paula Silveira-Lacerda *et al.*, 2021).

Apesar de febre do Mayaro integrar a Lista Nacional de Notificações Compulsórias de Doenças desde 2017 (Portaria nº 4, de 28 de setembro de 2017 (BRASIL, 2017)), persistem lacunas significativas nos sistemas de informação do Ministério da Saúde quanto a dados epidemiológicos atualizados, o que representa um desafio para a vigilância epidemiológica. Esta situação é particularmente preocupante considerando as evidências de circulação em áreas urbanas, sua ocorrência concomitante com outras arboviroses, e o aumento da detecção em novos casos em cidades brasileiras, fatores que ressaltam a necessidade de fortalecer os sistemas de monitoramento para uma adequada preparação frente a possíveis surtos (Finn *et al.*, 2017; Forato *et al.*, 2024; Lima *et al.*, 2021; Lorenz; Chiaravalloti-Neto, 2024; Zuchi *et al.*, 2014).

1.4 *Aedes aegypti* COMO VETOR DE ARBOVIROSES: CICLO BIOLÓGICO E INFECÇÃO VIRAL

Ae. aegypti é o vetor das principais arboviroses disseminada no mundo, como dengue, Zika, chikungunya e febre amarela (Souza-Neto; Powell; Bonizzoni, 2019). O mosquito possui uma distribuição cosmopolita, situado em regiões tropicais e subtropicais (Black *et al.*, 2002).

Desenvolvendo-se em ambientes urbanos, principalmente em reservatórios artificiais domiciliares, onde encontram-se as formas imaturas da espécie (Black *et al.*, 2002; Forattini; Brito, 2003).

1.4.1 Ciclo biológico de *Ae. aegypti*

O ciclo biológico de *Ae. aegypti* é considerado como holometábolo, ou seja, seu desenvolvimento ocorre em quatro fases distintas: ovo, larva, pupa e mosquito adulto (Figura 8) (Consoli; Oliveira, 1994; Matthews, 2019). As fêmeas depositam seus ovos nas paredes dos recipientes contendo água. Os ovos apresentam o formato elíptico, inicialmente de coloração pálida, que se tornam enegrecidos poucos minutos depois (Consoli; Oliveira, 1994; Forattini; Brito, 2003). Após completar o seu processo embrionário, ovos podem eclodir ao entrar em contato com água, liberando as larvas (Consoli; Oliveira, 1994). Entretanto, pode permanecer adormecido por meses, chamado de diapausa facultativa (Consoli; Oliveira, 1994; Matthews, 2019).

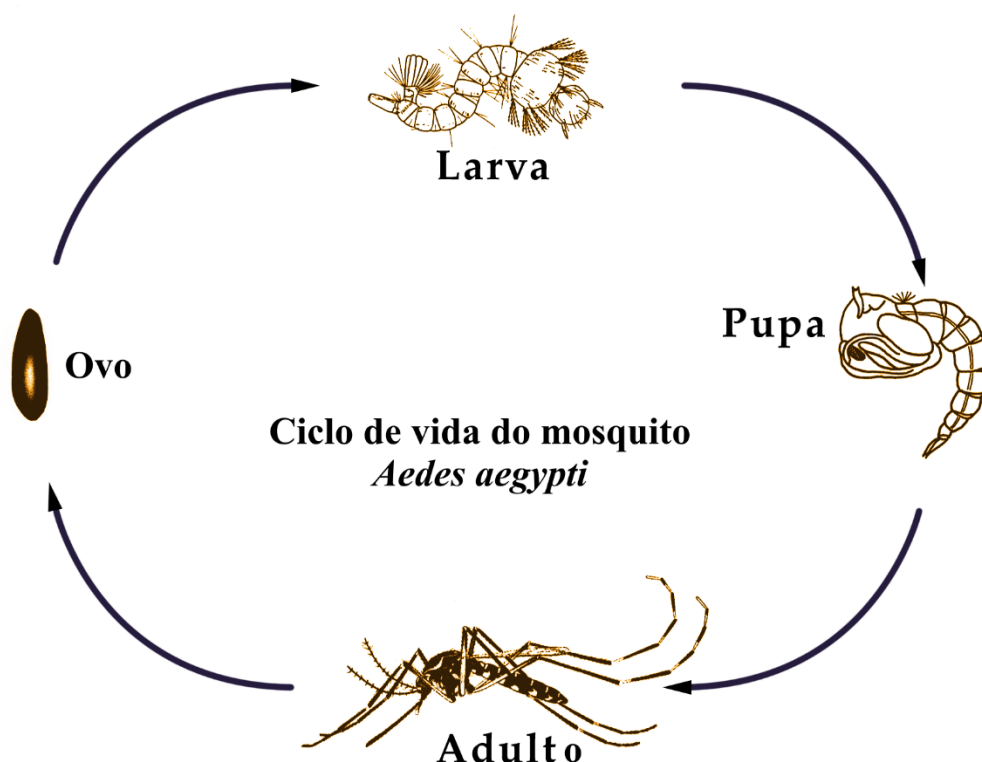


Figura 8. Ciclo de vida de *Aedes aegypti*. Representação ilustrada das fases de desenvolvimento do *Aedes aegypti*: ovos, larva (estágios L1 a L4), pupa e mosquito adulto (macho e fêmea). Fonte: adaptado de CDC e Pratt (1966).

As larvas possuem quatro estágios evolutivos e vivem em ambientes aquáticos, sendo o último estágio mais prolongado (Carvalho; Moreira, 2017; Consoli; Oliveira, 1994). É a única fase imatura em que ocorre alimentação e crescimento no ciclo biológico. A sua alimentação

não é seletiva, consistindo em materiais orgânicos e sedimentos presente no reservatório de água. O desenvolvimento larvário é influenciado pela temperatura, alimento disponível e densidade populacional, podendo completar os estágios em quatro a cinco dias em condições favoráveis. Durante essa fase, as larvas apresentam um aparelho bucal mastigador, os apêndices locomotores estão ausentes e o sexo ainda é indefinido (Carvalho; Moreira, 2017; Consoli; Oliveira, 1994)

A fase de pupa é considerada uma fase intermediária, marcando a transição do quarto estágio larval para a vida adulta. Nesse período, não há alimentação, mas ocorrem transformações internas essenciais, resultando no desenvolvimento do mosquito adulto (Carvalho; Moreira, 2017; Consoli; Oliveira, 1994).

Os adultos emergem lentamente sobre a superfície da água e, após alguns minutos, conseguem voar a curtas distâncias (Carvalho; Moreira, 2017; Foster; Walker, 2019). Nos primeiros dias, alimentam-se de açúcares, através de néctares de plantas e mel, como fonte de energia para estimular a maturação sexual e realizar atividades, como voar, acasalar e encontrar sangue (Foster; Walker, 2019). Os carboidrato permanecem como a principal fonte de alimentação durante toda a fase adulta (Consoli; Oliveira, 1994; Foster; Walker, 2019). As fêmeas, além da ingerirem açúcares, alimentam-se de sangue para possibilitar a maturação ovariana e desenvolvimentos dos ovos (Carvalho; Moreira, 2017; Consoli; Oliveira, 1994). Durante a ingestão de sangue, podem transmitir arbovírus para os seres humanos, quando previamente infectado (Matthews, 2019).

1.4.2 Infecção viral

O ciclo de infecção e transmissão de arbovírus por mosquitos hematófagos, como *Ae. aegypti*, é um processo complexo que envolve múltiplas etapas celulares, teciduais e imunológicas, influenciadas tanto pelas características do vírus quanto pelas do vetor. A infecção tem início quando a fêmea do mosquito realiza um repasto sanguíneo em um hospedeiro virêmico, adquirindo o vírus durante a ingestão do sangue (Agarwal; Parida; Dash, 2017; Beerntsen; James; Christensen, 2000; Black *et al.*, 2002; Hardy *et al.*, 1983; Wang *et al.*, 2018a).

No intestino médio do mosquito, o vírus entra em contato com as células epiteliais e se liga a receptores específicos na superfície celular. A entrada viral ocorre principalmente por endocitose mediada por clatrina, sendo seguida pela liberação do genoma viral no citoplasma, onde ocorre a replicação e montagem de novos vírions (Black *et al.*, 2002; Cui *et al.*, 2019; da

Encarnação Sá-Guimarães *et al.*, 2021). Essa etapa intestinal representa a primeira barreira antiviral, frequentemente modulada por fatores como a microbiota, o pH do lúmen, a atividade de enzimas digestivas e a resposta imune local (Dong *et al.*, 2017; Kantor *et al.*, 2024; Molina-Cruz *et al.*, 2005; Okuda *et al.*, 2002; Talyuli *et al.*, 2023).

Após essa fase inicial, os vírions recém-formados podem atravessar a barreira basal do epitélio intestinal e alcançar a hemolinfa, um processo essencial para que o vírus se dissemine sistemicamente (Figura 9). Essa disseminação depende da integridade e permeabilidade da lâmina basal, além da habilidade do vírus de evadir mecanismos de defesa mediados por hemócitos e moléculas antimicrobianas circulantes (Ayers *et al.*, 2021; Dong *et al.*, 2016, 2017; Leite *et al.*, 2021). Uma vez na hemolinfa, o vírus pode atingir e infectar outros tecidos-alvo, como o corpo gorduroso, sistema nervoso, ovários e, principalmente, as glândulas salivares (Azar; Weaver, 2019; Kramer; Ciota, 2015).

A infecção das glândulas salivares é a etapa final e decisiva do ciclo de transmissão. Os vírions devem cruzar mais uma barreira basal para alcançar as células acinares das glândulas, onde se replicam e são secretados na saliva. A partir daí, o mosquito torna-se competente para transmitir o vírus a um novo hospedeiro durante o próximo repasto sanguíneo, completando o ciclo de transmissão (Azar; Weaver, 2019; Castillo-Méndez; Valverde-Garduño, 2020).

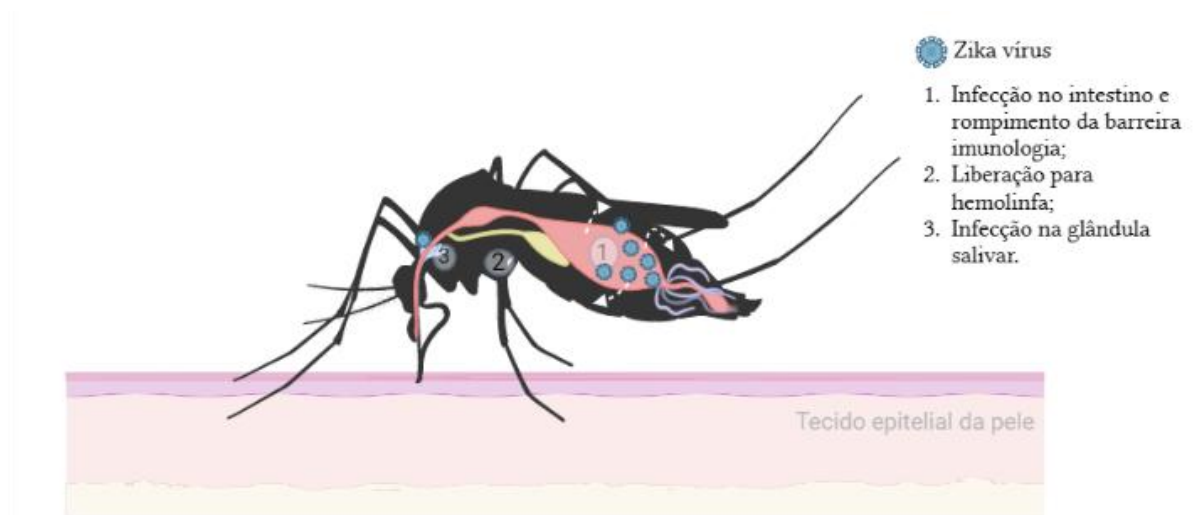


Figura 9. Rota de infecção por arbovírus em *Ae. aegypti*. 1, após a fêmea de *Ae. aegypti* se alimentar de um indivíduo infectado, o sangue contendo o arbovírus atinge o lúmen do intestino, onde o vírus pode ser internalizado por endocitose, infectando as células epiteliais e rompendo a primeira imunológica. 2, a infecção do epitélio intestinal resulta na liberação do vírus na hemolinfa, permitindo sua disseminação sistêmica. 3, ao atingir e infectar as glândulas salivares, o vírus torna-se capaz de ser transmitido a um novo hospedeiro durante um repasto sanguíneo. Fonte: elaborado pela autora (2025) utilizando a plataforma BioRender (<https://www.biorender.com>).

A eficiência com que um mosquito completa todas essas etapas, da aquisição à transmissão viral, define o conceito de competência vetorial. Essa competência é uma propriedade intrínseca do vetor e representa sua capacidade biológica de se infectar com um

determinado arbovírus, sustentar a replicação viral e, por fim, transmitir o patógeno a novos hospedeiros. Ela é influenciada por fatores genéticos do mosquito, presença de vírus específicos de insetos, microbiota, expressão de receptores virais, ativação de vias imunológicas (como Toll, IMD e JAK/STAT) e integridade de barreiras epiteliais e basais (Beerntsen *et al.*, 1995; Behura; Severson, 2012; Bosio; Beaty; Black, 1998; Bosio *et al.*, 2000; Chen, Tse-Yu *et al.*, 2024; Conway; Colpitts; Fikrig, 2014; Kantor *et al.*, 2024; Lounibos; Kramer, 2016; Sim; Jupatanakul; Dimopoulos, 2014; Souza-Neto; Powell; Bonizzoni, 2019; Tabachnick *et al.*, 1985).

Contudo, embora essencial, a competência vetorial por si só não determina o risco real de transmissão em campo. Para isso, é necessário considerar o conceito mais abrangente de capacidade vetorial, que incorpora a competência vetorial a outros parâmetros ecológicos e populacionais. A capacidade vetorial é definida como a estimativa do número de novas infecções que uma população de mosquitos pode gerar em uma população humana totalmente suscetível, por unidade de tempo. Ela é influenciada por diversos fatores, como: i) densidade populacional de mosquitos; ii) frequência de picadas em humanos (taxa de contato vetor-hospedeiro); iii) longevidade do vetor (que determina se ele sobreviverá tempo suficiente para transmitir o vírus após o período de incubação), iv) período de incubação extrínseca (tempo necessário para que o vírus se torne transmissível após a infecção do mosquito), v) e, claro, a própria competência vetorial (Cansado-Utrilla *et al.*, 2021; Miller *et al.*, 1989; Souza-Neto; Powell; Bonizzoni, 2019).

Esses parâmetros são combinados em modelos matemáticos que ajudam a estimar o potencial de disseminação de arboviroses como DENV, ZIKV e CHIKV, em diferentes cenários ecológicos e geográficos (Birley; Charlwood, 1986; Eder *et al.*, 2018; Holmes, 2023). Assim, enquanto a competência vetorial expressa a capacidade biológica do vetor, a capacidade vetorial quantifica o impacto epidemiológico dessa competência no ambiente natural.

Compreender em profundidade essas duas dimensões é essencial para interpretar a dinâmica de transmissão de arboviroses e desenvolver estratégias eficazes de vigilância e controle vetorial. O estudo integrado desses fatores permite identificar populações de mosquitos com maior risco de transmissão, bem como prever surtos com base em variáveis ambientais, genéticas e virais.

1.5 MECANISMOS IMUNOLÓGICOS ANTIVIRAIS EM *Ae. aegypti*

A descoberta de similaridades imunológicas entre invertebrados, vertebrados e plantas, particularmente nos receptores das vias de Toll/interleucina-1 e nos mecanismos de sinalização da resposta imune inata, revelou uma notável conservação evolutiva destes sistemas imunes de defesa. Embora os invertebrados careçam de um sistema imune adaptativo, eles desenvolveram um sofisticado arsenal de mecanismos inatos que garantem sua sobrevivência através de múltiplas estratégias de defesa. Estes incluem sistemas de RNA de interferência (RNAi) para resposta antiviral, receptores de reconhecimento de padrões moleculares para detecção de patógenos (PRRs), peptídeos antimicrobianos (AMPs) como defesa humoral, respostas celulares como mediada por hemócitos e produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, e ativação da via melanização como barreira bioquímica (Beck; Habicht, 1996; Ghosh *et al.*, 2011; Loker *et al.*, 2004; Rowley; Powell, 2007; Wang *et al.*, 2018b).

Nos mosquitos vetores, como *Ae. aegypti*, esses mecanismos são particularmente relevantes. A exposição a patógenos que penetram através do intestino ou cutícula/exoesqueleto desencadeia respostas imunológicas coordenadas. Como nos vertebrados, o reconhecimento de agentes estranhos ativa cascatas de sinalização, incluindo as vias Janus quinase transdutor de sinal e ativador de transcrição (JAK-STAT), Toll e Immune Deficiency (IMD), que induzem a expressão de proteínas efectoras contra diversos patógenos (Figura 10). Dentre estas, o RNAi destaca-se como um dos mecanismos antivirais mais eficientes em artrópodes (Castillo-Méndez; Valverde-Garduño, 2020; Hillyer, 2016; Rowley; Powell, 2007; Sim; Dimopoulos, 2010; Wang *et al.*, 2018b).

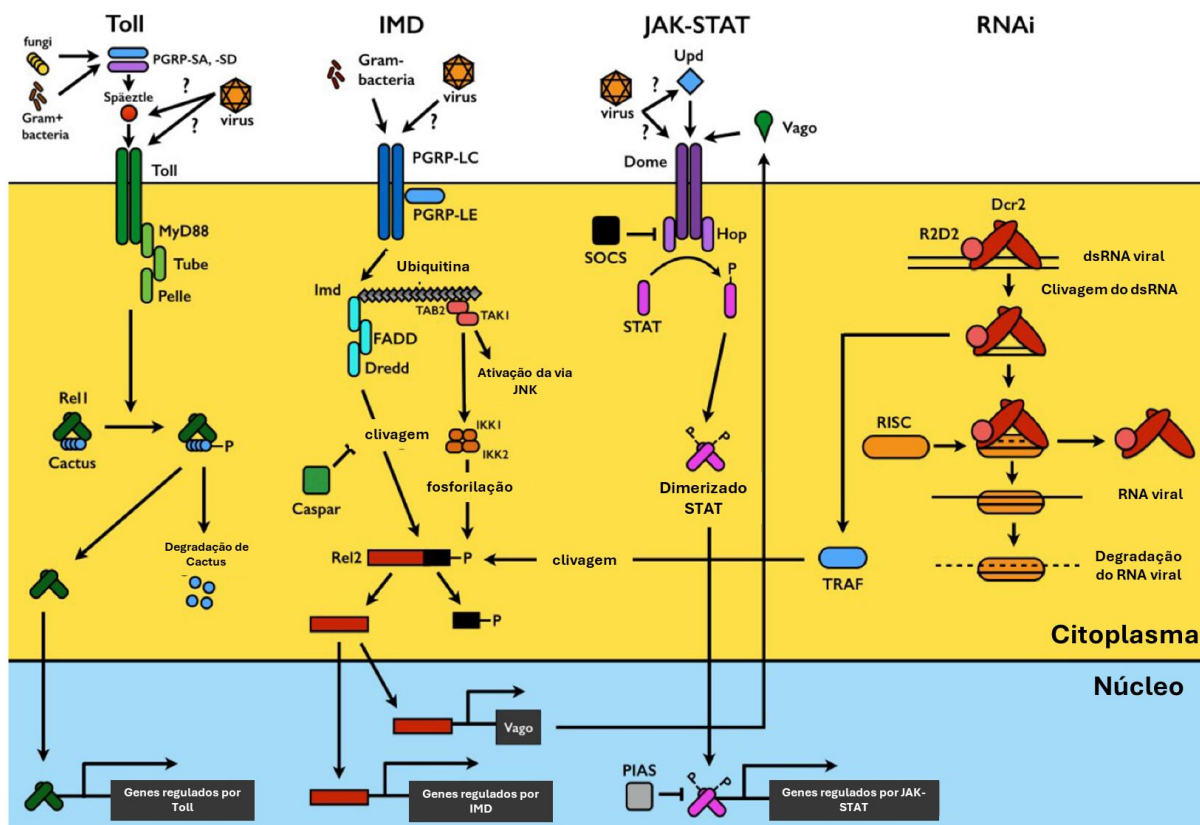


Figura 10. Ativação das vias de sinalização imunes e da via RNAi em *Ae. aegypti*. Ilustração mostra a ativação das vias Toll, IMD e JAK-STAT e RNAi. A via Toll é ativada quando receptores do tipo PPR, como PGRP-SA e PGRP-SD, reconhecem PAMPs de bactérias gram-positivas e fungos, levando à clivagem da pro-proteína Spätzle. A forma ativa de Spätzle se liga ao receptor Toll, desencadeando uma cascata de sinalização mediada pelas proteínas adaptadoras MyD88, Tube e Pelle. Essa cascata culmina na fosforilação de Cactus, permitindo que o fator de transcrição Rel1 transloque para o núcleo e ative a expressão de AMPs. A via IMD, por sua vez, é ativada por PAMPs de bactérias gram-negativas, iniciando uma cascata de sinalização com as proteínas adaptadoras IMD, FADD e DREDD, além do complexo IKK, resultando na clivagem e translocação nuclear de Rel2. A via JAK/STAT é ativada em respostas a infecções virais, começando com a ligação do ligante Upd ao receptor Dome, o que ativa a quinase Hop e leva à fosforilação e translocação do fator de transcrição STAT. Além disso, a proteína Vago, cuja produção é induzida por Dicer-2 (via RNAi) e mediada por Rel2 (via IMD), também pode ativar a via JAK/STAT quando secretada durante infecções virais. Fonte: adaptado de Sim, Jupatanakul e Dimopoulos (2014).

1.5.1 Via Toll

A via Toll foi inicialmente caracterizada em *Drosophila melanogaster*, demonstrando seu papel fundamental na defesa contra infecções por fungos e bactérias gram-positivas. Diferentemente dos vertebrados, cujos receptores Toll-like apresentam alta especificidade, em insetos um mesmo receptor Toll pode participar de múltiplas respostas imunes, tanto antifúngicas quanto antibacterianas (Lemaitre *et al.*, 1996; Rutschmann; Kilinc; Ferrandon, 2002). Estudos recentes revelaram que os insetos, incluindo *Ae. aegypti*, possuem múltiplos receptores Toll (Toll1A, Toll1B, Toll5A, Toll5B e Toll4), resultantes de eventos de duplicação gênica. Os padrões de expressão desses receptores variam conforme o tecido, estágio de desenvolvimento e o tipo de infecção. Evidências indicam que Toll5, Toll1A e Toll5B são

expressos no corpo gorduroso durante infecções fúngicas, enquanto Toll5A também apresenta forte expressão em tecidos ovarianos, e Toll4 é expresso especificamente nos ovários (Luna *et al.*, 2003; Saucereau *et al.*, 2022; Shin; Bian; Raikhel, 2006).

O mecanismo de ativação da via Toll inicia-se com o reconhecimento do antígeno por proteínas solúveis. No caso de bactérias gram-positivas, esse reconhecimento é mediado pelas PGRP-SA, PGRP-SD (proteínas de reconhecimento de peptidoglicano), em associação com a proteína de ligação a gram-negativos 1 (GNBP1). Juntas, essas moléculas induzem a clivagem da pró-proteína Spätzle (Bischoff *et al.*, 2004; Bolling *et al.*, 2015; Gobert *et al.*, 2003; Michel *et al.*, 2001; Pili-Floury *et al.*, 2004; Sanders *et al.*, 2005; Saucereau *et al.*, 2022). Essa clivagem, dependente de uma cascata proteolítica, resulta na forma ativa de Spätzle, capaz de se ligar com alta afinidade aos receptores de Toll (Hashimoto; Hudson; Anderson, 1988; Hoffmann, 2003; Weber *et al.*, 2003).

A sinalização intracelular subsequente é mediada por um complexo de proteínas adaptadoras, que inclui MyD88, Tube e Pelle. Essa sinalização culmina na fosforilação e degradação proteassomal de Cactus, o inibidor citoplasmático da via NF- κ B (fator nuclear kappa-B). Com a degradação de Cactus, o fator de transcrição Relish1 (Rel1) é liberado e translocado ao núcleo, onde ativa a expressão de genes efetores da resposta imune, como peptídeos antimicrobianos defensina e cecropina (Bian *et al.*, 2005; Ferreira *et al.*, 2023; Horng; Medzhitov, 2001; Letsou *et al.*, 1991; Luplertlop *et al.*, 2011; Shin *et al.*, 2005; Shin; Bian; Raikhel, 2006; Xi; Ramirez; Dimopoulos, 2008a).

Em *Ae. aegypti*, estudos têm demonstrado que a via Toll não atua somente durante infecções bacterianas e fúngicas, mas também contra infecções virais. Evidências sugerem que via Toll é ativada durante infecção inicial por DENV no intestino, tecido gorduroso, glândula salivar e carcaça, contribuindo para o controle da infecção (Luplertlop *et al.*, 2011; Ramirez; Dimopoulos, 2010; Xi; Ramirez; Dimopoulos, 2008a). Além de DENV, também há indícios de que a via Toll atue contra a infecção por ZIKV no mosquito (Angleró-Rodríguez, Yessenina I. *et al.*, 2017). Avanços recentes mostraram que, assim como em vertebrados, a via Toll pode reconhecer dsRNA nos endossomos das células de *Ae. aegypti* por meio do receptor Toll6 (Angleró-Rodríguez *et al.*, 2021).

1.5.2 Via IMD

A via IMD (Immune Deficiency) foi inicialmente identificada em *Drosophila melanogaster* durante estudos sobre a resposta imune a bactérias gram-negativas. Pesquisadores

observaram que moscas com mutações recessivas no gene *imd* apresentavam uma deficiência na produção de peptídeos antimicrobianos e uma significativa redução na sobrevivência quando infectadas (Lemaitre *et al.*, 1995). Em mosquitos, como *Ae. aegypti* e *Anopheles*, essa via mostrou-se crucial não apenas contra bactérias gram-negativas, mas também na defesa contra infecções fúngicas e parasitárias, como *Plasmodium* spp. (Meister *et al.*, 2005; Ramirez *et al.*, 2019; Shin *et al.*, 2002, 2003).

O mecanismo de ativação da via IMD inicia-se com o reconhecimento do peptidoglicano contendo ácido diaminopimérico (DAP-PGN), características de bactérias gram-negativas, pelo receptor transmembrana do peptidoglicano (PGRP-LC). Essa interação desencadeia uma cascata de sinalização que envolve o recrutamento de várias proteínas adaptadoras, incluindo a própria proteína IMD, FADD (FAS-associated death domain), a caspase DREDD e o complexo IKK (inibidor do NF- κ B). Um passo crucial nessa cascata é a fosforilação de Relish2 (Rel2) pelo complexo IKK, que modifica a estrutura da proteína, expondo sítios de clivagem específicos para a ação da caspase DREDD. Após a clivagem, o domínio N-terminal da Rel2 é liberado e translocado para o núcleo, onde ativa a transcrição de genes efetores da resposta imune, incluindo diversos peptídeos antimicrobianos como cecropina e defensina (Cooper; Chamberlain; Lowenberger, 2009; Ertürk-Hasdemir *et al.*, 2009; Ramirez *et al.*, 2019; Shin *et al.*, 2002, 2003; Silverman *et al.*, 2000; Stöven *et al.*, 2003).

Além desse eixo principal de ativação, a via IMD estabelece conexões moleculares com outras rotas de sinalização celular. Particularmente relevante é sua capacidade de ativar a via JNK (c-Jun N-terminal kinase) através da quinase TAK1, um componente compartilhado entre as vias. Essa ramificação da sinalização está envolvida na modulação de processos de apoptose celular, expandindo o espectro de respostas imunológicas pela via IMD (Chen; White; Cobb, 2002; Chowdhury *et al.*, 2020; Sluss *et al.*, 1996; Takatsu *et al.*, 2000).

A regulação da via é garantida por múltiplos mecanismos supressores. A proteína Caspar atua como um potente regulador negativo, inibindo a clivagem de Rel2 pela caspase DREDD e, consequentemente, impedindo sua translocação nuclear. Durante infecções bacterianas, a atividade de Caspar é temporariamente suprimida, permitindo uma resposta imune proporcional à infecção (Garver; Dong; Dimopoulos, 2009; Kim *et al.*, 2006). Outro importante mecanismo regulatório envolve a proteína PGRP-LB, que hidrolisa o peptidoglicano bacteriano, reduzindo assim a ativação do receptor PGRP-LC e modulando negativamente a intensidade da resposta imune. Este sofisticado sistema de retroalimentação negativa é essencial para prevenir respostas imunológicas excessivas que podem levar a danos teciduais, além de

manter a homeostase com a microbiota comensal (Gendrin *et al.*, 2017; Zaidman-Rémy *et al.*, 2006).

Ainda não há muitos estudos demonstrando a atuação da via IMD durante infecções virais em *Ae. aegypti*. No entanto, estudos já observaram que essa via pode atuar no controle da infecção por DENV, especialmente na glândula salivar (Chowdhury *et al.*, 2020). De forma semelhante, Sim e colaboradores (2013) observaram um aumento da carga viral de DENV-2 no intestino médio de uma linhagem de *Ae. aegypti* após o silenciamento da proteína adaptadora IMD. Esses resultados reforçam a importância das vias de sinalização imune frente às infecções virais, já que essa linhagem era originalmente resistente à infecção por DENV (Sim *et al.*, 2013).

Outro estudo revelou que a expressão da proteína Rel2 aumenta no intestino após a ingestão de sangue, sendo esse aumento dependente da microbiota intestinal. Essa ativação impacta diretamente a replicação do vírus Sindbis (SINV) (Barletta *et al.*, 2017). Adicionalmente, uma pesquisa demonstrou que, em células de *Ae. albopictus*, a ativação prévia da via IMD por bactéria inativadas, reduziu significativamente a replicação de Semliki Forest vírus (SFV) (Fragkoudis *et al.*, 2008). Esses estudos demonstram que múltiplos componentes da via IMD são essenciais para o controle de infecções virais em mosquitos.

1.5.3 JAK/STAT

A via JAK/STAT foi inicialmente descrita em células humanas como um importante mecanismo de transdução de sinais, envolvendo proteínas citoplasmáticas que respondem ao interferon- α (Darnell; Kerr; Stark, 1994; Fu *et al.*, 1992; Schindler *et al.*, 1992). Sua caracterização em insetos ocorreu posteriormente, com a identificação do fator de transcrição STAT em *Anopheles gambiae*, revelando seu papel crucial no sistema imune desses organismos (Barillas-Mury *et al.*, 1999). Tanto em mamíferos quanto em insetos, essa via demonstrou ser fundamental na resposta a infecções virais (Dostert *et al.*, 2005; Dupuis *et al.*, 2003; Shuai; Liu, 2003).

Em mosquitos, o mecanismo de ativação da via JAK/STAT inicia-se com a interação do ligante extracelular Unpaired (Upd) com o receptor Domeless (Dome). Essa interação desencadeia a dimerização do receptor e ativa a quinase associada JAK, Hopscotch (Hop), por meio de autofosforilação. A Hop ativada promove a fosforilação de resíduos de tirosina na porção citoplasmática do Dome, criando sítios de ancoragem para o fator de transcrição STAT. Uma vez ligado e também fosforilado, o STAT dimeriza-se e se transloca para o núcleo, onde

reconhece sequências regulatórias específicas no DNA, ativando assim a transcrição de genes envolvidos na resposta imune (Arbouzova; Zeidler, 2006; Bang, 2019; Jupatanakul *et al.*, 2017; Kisseleva *et al.*, 2002).

A atividade da via JAK/STAT é rigorosamente controlada por mecanismos reguladores negativos. O supressor de sinalização de citocinas (SOCS) atua como um pseudosubstrato, inibindo a atividade da quinase JAK e, consequentemente, reduzindo a fosforilação de STAT. Em paralelo, o inibidor de STAT ativado (PIAS) bloqueia diretamente a ação do fator de transcrição (Arbouzova; Zeidler, 2006; Shuai; Liu, 2003; Souza-Neto; Sim; Dimopoulos, 2009; Starr *et al.*, 1997).

Um achado relevante que evidencia a interação entre diferentes vias de sinalização foi a identificação da proteína Vago, cuja produção é induzida durante infecções virais e desempenha papel essencial no controle da carga viral no corpo gorduroso de *D. melanogaster* (Deddouche *et al.*, 2008; Dostert *et al.*, 2005). A expressão de Vago depende da proteína Dicer-2, um componente essencial da via RNAi que atua como sensor da presença viral. Em resposta à detecção do RNA viral, Dicer-2 sinaliza por meio da proteína adaptadora TRAF (homólogo ao receptor de fator de necrose tumoral), levando à ativação de Rel2, o principal fator de transcrição da via IMD, como observado em *Culex quinquefasciatus* infectados com DENV e WNV (Paradkar *et al.*, 2014). Uma vez secretada, a proteína Vago atua como citocina, promovendo a ativação da via JAK/STAT durante a infecção por WNV (Paradkar *et al.*, 2012), evidenciando a integração funcional entre as vias RNAi, IMD e JAK/STAT na resposta antiviral.

Em *Ae. aegypti*, a via JAK/STAT demonstra um papel importante no controle de infecção virais. Estudos demonstraram sua efetividade contra DENV no intestino e glândula salivar, embora não apresente o mesmo efeito frente ao ZIKV e CHIKV (Jupatanakul *et al.*, 2017). Curiosamente, a ativação da via através do silenciamento de PIAS, levou à supressão de ZIKV e DENV no intestino do mosquito (Angleró-Rodríguez, Yessenina I. *et al.*, 2017; Souza-Neto; Sim; Dimopoulos, 2009). Por outro lado, o silenciamento dos componentes Dome e Hop resultou no aumento da carga viral de DENV (Sim *et al.*, 2013; Souza-Neto; Sim; Dimopoulos, 2009), reforçando a importância desta via na defesa antiviral. Contudo, em células de *Ae. aegypti* infectadas com CHIKV, a modulação da via JAK/STAT não mostrou efeitos significativos na replicação viral (McFarlane *et al.*, 2014).

1.5.4 Via RNA de interferência

A via de RNA de interferência (RNAi) é um mecanismo conservado entre os eucariotos, no qual moléculas de dsRNA induzem a inativação de sequências gênicas complementares (Cerutti; Casas-Mollano, 2006). Essa via foi caracterizada pela primeira vez no nematoide *Caenorhabditis elegans*, durante investigações sobre os efeitos do RNA exógeno sobre mecanismos endógenos. Os pesquisadores observaram que a introdução de dsRNA correspondente a genes específicos resultava na supressão de sua expressão (Fire *et al.*, 1998).

Essa descoberta teve um impacto revolucionário, pois o uso de dsRNA passou a permitir a caracterização funcional de genes em diversos mecanismos, além de contribuir para o entendimento do papel antiviral da via RNAi, já descrito em plantas (Agrawal *et al.*, 2003; Ding, 2010; Kennerdell; Carthew, 1998; Zhu; Palli, 2020). A importância desse achado culminou na concessão do Prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina em 2006 (The Nobel Prize, 2006).

Atualmente, sabe-se que, além de atuar na regulação da expressão gênica, o RNAi exerce papel antiviral essencial em artrópodes (Sharp, 1999; Tabara *et al.*, 1999). Três principais vias de RNAi foram caracterizadas até o momento: microRNA (miRNA), *p-element induced wimpy testis* (Piwi) interagindo com RNA (piRNA) e pequenos RNAs interferentes (siRNA) (Figura 11) (Aguiar; Olmo; Marques, 2016). Apesar de distintas, essas vias compartilham componentes moleculares comuns, como ribonucleoproteínas da família Argonauta, que interagem com pequenos fragmentos de RNA (entre 19 e 35 nt), guiando o silenciamento gênico (Wilson; Doudna, 2013).

As proteínas Argonauta representam elementos-chave na maquinaria de RNAi e são classificadas em duas subfamílias: Ago, expressa principalmente em células somáticas, e Piwi, especializada em células germinativas. Estas proteínas apresentam uma organização estrutural altamente conservada, composta por quatro domínios funcionais: N-terminal, PAZ (Piwi, Argonauta e Zeille), MID (Middle) e Piwi (Aravin; Hannon; Brennecke, 2007; Cerutti; Mian; Bateman, 2000; Joshua-Tor, 2006; Swarts *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2020).

O domínio N-terminal atua no desenrolamento do dsRNA, enquanto o domínio PAZ é responsável pelo reconhecimento e ligação aos ácidos nucleicos (Kwak; Tomari, 2012; Lingel *et al.*, 2003, 2004). O domínio MID serve como uma bolsa de ligação para o reconhecimento da extremidade 5' da fita guia (Boland *et al.*, 2011; Ma *et al.*, 2005; Meister, 2013). Já o domínio Piwi possui uma estrutura terciária semelhante à da enzima RNase H, conferindo atividade catalítica à proteína, o que permite a clivagem do RNA alvo, atividade conhecida como “slicer” (Song *et al.*, 2004). Essa arquitetura modular permite que as proteínas Argonauta reconheçam

sequências-alvo com alta especificidade e mediam de forma eficiente o silenciamento gênico, tornando-se centrais na resposta antiviral mediada por RNAi.

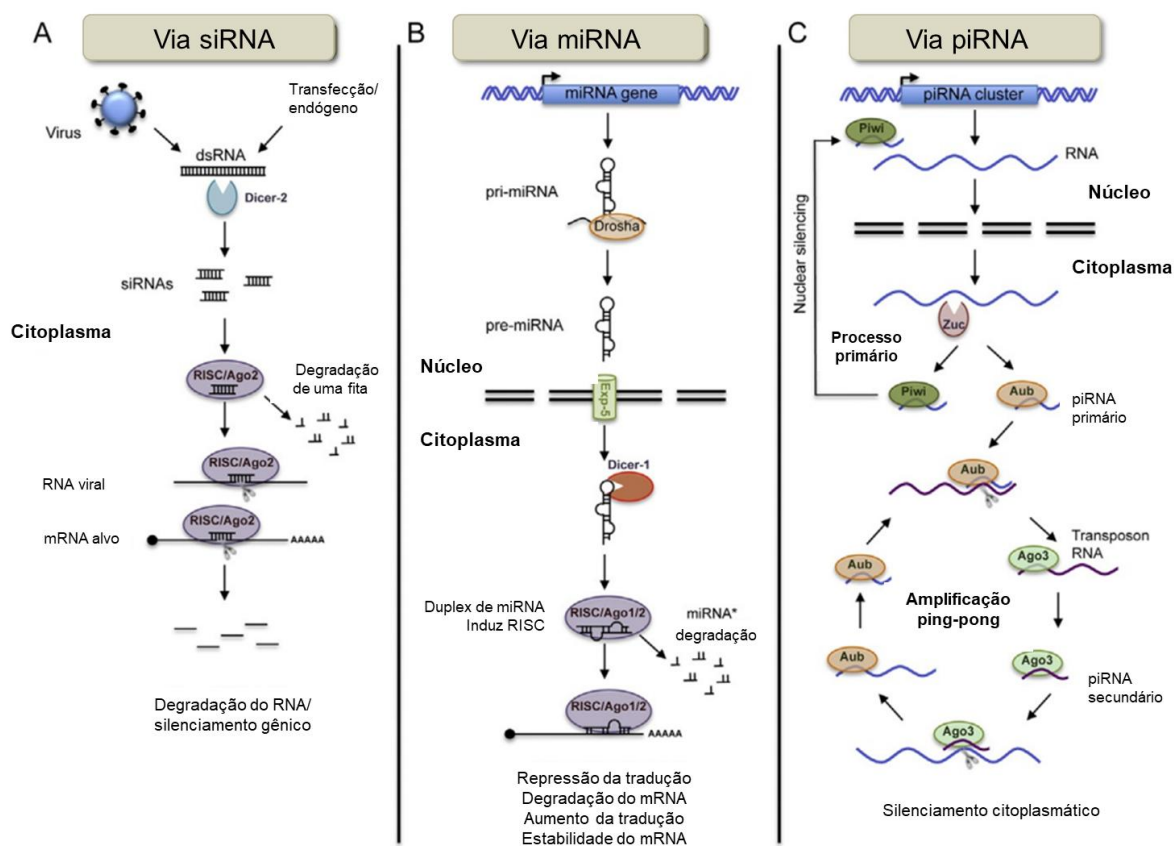


Figura 11. Via de RNAi em insetos. **A.** A via de siRNA é uma das principais vias envolvidas no controle de infecções virais em *Ae. aegypti*. Para compreender melhor esse mecanismo, recomenda-se a leitura completa do tópico 1.5.3, onde essa via é descrita em mais detalhes. **B.** A via de miRNA é iniciada no núcleo, durante a transcrição pela polimerase II, que gera os pri-miRNAs, caracterizados por estruturas em hairpin. Esses pri-miRNAs são clivados pela endonuclease Drosha e seu cofator Pasha, originando os pré-miRNAs, moléculas de dsRNA com cerca de 70 nt. Após exportação para o citoplasma, os pré-miRNAs são processados pela Dicer-1, formando duplexos de RNA com 19 a 22 nt. Um dos filamentos é então carregado na proteína AGO1, onde atuará como guia para o silenciamento gênico de mRNAs-alvo. **C.** Na via piRNA, os RNAs são transcritos a partir de clusters genômicos, que frequentemente incluem elementos transponíveis, como os EVEs. Esses RNAs são processados no citoplasma pela endonuclease Zucchini, gerando fragmentos de RNA com 24 a 35 nt, geralmente enriquecidos em uracila na extremidade 5', chamados de piRNAs. Em seguida, esses piRNAs se associam à proteína Aubergine (Aub), atuando como RNAs guias para a clivagem dos transcritos de transposons. Em resposta, a AGO3 cliva os RNAs complementares, promovendo a amplificação do silenciamento por meio do ciclo ping-pong. Fonte: adaptado de Hussain, Etebari e Asgari (2016).

1.5.4.1 piRNA

A via de piRNA representa o mecanismo mais complexo entre as vias de RNAi, consistindo em pequenos RNAs de fita simples de 24 a 35 nt que se associam às proteínas da subfamília Piwi da família Argonauta. Ao contrário, de outras vias de RNAi, os piRNA desempenha um papel crucial na defesa do genoma, atuando principalmente no silenciamento de elementos transponíveis (transposons) em células germinativas. Essa função é essencial para

manter a estabilidade genômica e garantir o desenvolvimento de células germinativas nos ovários e testículos (Hirakata; Siomi, 2016; Wu *et al.*, 2010).

Em *Ae. aegypti*, essa via apresenta complexidade adicional devido à presença de elementos virais endógenos (EVES), que são sequências virais ancestrais que foram integradas ao genoma do mosquito ao longo da evolução. Esses EVES, de origem tanto retroviral quanto não-retroviral, podem servir como templates para a produção de piRNAs (Aguiar *et al.*, 2020; Holmes, 2011; Suzuki *et al.*, 2020; Whitfield *et al.*, 2017). Notavelmente, esses piRNAs derivados de EVES têm o potencial de conferir proteção antiviral, funcionando como uma forma de “memória imunológica” genômica, na qual as infecções virais passadas deixam assinaturas no DNA que podem ser recrutadas durante infecções futuras, ampliando a resposta imune (Aguiar *et al.*, 2015; Brennecke *et al.*, 2007; de Almeida *et al.*, 2021; Joosten *et al.*, 2021a).

A biogênese dos piRNAs está bem caracterizada em *Drosophila* e ocorrer através de duas vias principais. Na via primária, longos transcritos de clusters genômicos, que frequentemente contêm remanescentes de EVES, são processados pela endonuclease Zucchini, gerando piRNAs com extremidade 5' enriquecida em uracila (Aguiar *et al.*, 2020; Brennecke *et al.*, 2007; Gunawardane *et al.*, 2007; Nishimasu *et al.*, 2012; Olivieri *et al.*, 2010; Saito *et al.*, 2010). Já no ciclo ping-pong, a via secundária, os piRNAs recém-gerados associam-se às proteínas Aubergine e Piwi, guiando a clivagem dos transcritos de transposons. Subsequentemente, a proteína Argonauto 3 (AGO3) cliva os RNAs complementares, gerando novos piRNAs e amplificando o silenciamento (Iwasaki; Siomi; Siomi, 2015; Lewis; Salmela; Obbard, 2016; Olivieri *et al.*, 2010).

Em *Ae. aegypti*, a via piRNA apresenta particularidade. Enquanto *Drosophila* possui apenas três proteínas Piwi (AGO3, Aubergine e Piwi), o genoma do mosquito codifica ortólogo a AGO3 e Piwi1-7, com padrões de expressão tecidos específicos, como a Piwi3 em ovários e Piwi7, estágios embrionários iniciais (Akbari *et al.*, 2013; Iwasaki; Siomi; Siomi, 2015; Joosten *et al.*, 2021b; Miesen; Girardi; van Rij, 2015; Varjak; Leggewie; Schnettler, 2018). Além que, estudos recentes revelam interações cruzadas entre componentes da via piRNA e outras vias de RNAi. Durante infecção pelo SFV, por exemplo, a proteína Piwi4 de *Ae. aegypti* interage não apenas com elementos da via piRNA (Ago3, Piwi5 e Piwi6), mas também com componentes da via siRNA (AGO2 e Dicer-2), embora sua atividade antiviral seja independente desta última (Varjak *et al.*, 2017).

Embora tradicionalmente associada a células germinativas, evidências crescentes sugerem que a via de piRNA também pode desempenhar um papel durante infecção viral. Em *D. melanogaster*, piRNA virais foram detectados em células somáticas dos ovários em resposta

a infecção (Wu *et al.*, 2010). No entanto, outros estudos atribuem a produção de piRNAs em tecidos somáticos principalmente à regulação de transposons (Lewis *et al.*, 2018). Adicionalmente, dados contraditórios foram reportados por Petit e colaboradores (2016), que não observaram a produção de piRNAs virais em *D. melanogaster* infectadas. Além disso, mutantes deficientes em componentes dessa via não apresentaram diferenças fenotípicas em comparação com linhagens selvagens durante infecções virais (Petit *et al.*, 2016).

Em *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*, perfis de piRNA foram identificados em tecidos somáticos após a infecção com CHIKV, SINV e La Crosse (LACV), sugerindo a existência de um mecanismo piRNA antiviral não-canônico em mosquitos. Esses achados expandiram significativamente o entendimento sobre o escopo funcional dessa via em artrópodes (Morazzani *et al.*, 2012; Vodovar *et al.*, 2012). Entretanto, ainda não há um consenso sobre a atuação da via piRNA contra infecções virais nos mosquitos. Por exemplo, um estudo em *Cx. pipiens* infectados, não foram detectados piRNAs para o vírus Usutu (USUV), embora tenham sido observadas para o vírus do Nilo Ocidental (WNV) (Fros *et al.*, 2015).

1.5.4.2 miRNA

Os miRNAs são pequenas RNAs não codificantes de aproximadamente 19 a 22 nt que desempenham um papel crucial na regulação pós-transcricional da expressão gênica. Esses pequenos RNAs atuam através do silenciamento de mRNAs-alvos, seja por clivagem direta do transcrito ou por inibição da tradução, controlando assim finamente os níveis de proteínas celulares (Krol; Loedige; Filipowicz, 2010; Lu; Rothenberg, 2018).

O processo de biogênese dos miRNAs inicia-se no núcleo celular, onde a RNA polimerase III transcreve os precursores primários (pri-miRNAs), que contêm características estrutural em hairpin (Yates; Norbury; Gilbert, 2013). Esses pri-miRNAs podem se originar de genes de miRNA ou de mirtrons, íntrons que, após o splicing, adquirem estruturas semelhantes à miRNA. Os pri-miRNAs são então processados pelo complexo proteico formado por Drosha e seu cofator Pasha, que realiza a clivagem gerando os precursores intermediários (pré-miRNA) de aproximadamente 70 nt (Cai; Hagedorn; Cullen, 2004; Denli *et al.*, 2004; Gregory *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2002, 2003; Yen *et al.*, 2019).

Após a exportação para o citoplasma, os pré-miRNA sofrem um novo processamento pela enzima Dicer-1, em associação com proteínas de ligação a dsRNA (dsRBD), resultando em pequenos duplexos de RNA de 19 a 22 nt (Kim; Han; Siomi, 2009; Yates; Norbury; Gilbert, 2013). Finalmente, uma das fitas deste duplex é incorporada à proteína Argonauta 1 (AGO1),

formando o complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC), onde atuará como guia para a identificação e silenciamento dos mRNAs alvo (Kim; Han; Siomi, 2009; Yates; Norbury; Gilbert, 2013).

Curiosamente, estudos em mosquitos demonstraram que essa via também participa na modulação da replicação viral em *Ae. aegypti*. As análises de bioinformática indicam interações de miRNA com RNAs virais, tais como DENV, ZIKV e CHIKV (Yen *et al.*, 2019). Esses achados tornam-se ainda mais relevante ao observar que a infecção por DENV modula a expressão de miRNAs específicos, além de promover o surgimento de isoformas de miRNAs (isomiR), provavelmente em resposta à infecção (Campbell *et al.*, 2014; Etebari *et al.*, 2015). Modulações semelhantes foram observadas durante a infecção por ZIKV, sugerindo que essas alterações podem influenciar diretamente a competência vetorial do mosquito (Saldaña *et al.*, 2017).

1.5.4.3 siRNA

A via siRNA constitui o principal mecanismo de defesa antiviral em *Ae. aegypti*, atuando através de pequenos dsRNAs que direcionam o silenciamento específico de RNAs virais e endógenos (Bronkhorst; Van Rij, 2014; Cullen, 2002). Esse processo inicia-se quando a enzima Dicer-2, em conjunto com cofatores dsRBD, reconhece e cliva dsRNAs virais formados durante a replicação, ou ainda dsRNAs endógenos, produzindo fragmentos de 21-22 nt. Esses fragmentos de siRNA são então incorporados à proteína Argonauta 2 (AGO2), formando o complexo RISC. Durante a montagem do RISC, apenas uma das fitas do siRNA é retida como fita-guia, enquanto a fita complementar é degradada, processo este facilitado pela ausência das estruturas de proteção 5'cap e cauda poli-A nas extremidades do siRNA. O complexo RISC maduro utiliza essa fita-guia para reconhecer transcritos com sequências complementar, promovendo a clivagem dos RNAs virais e consequentemente inibindo da síntese proteica viral, como ilustrado na figura 12. Esta via representa um sistema de imunidade antiviral altamente conservado e eficaz, capaz de neutralizar uma ampla variedade de arbovírus que infectam os mosquitos (Elbashir; Lendeckel; Tuschl, 2001; Elbashir *et al.*, 2001; Hammond *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2003; Tomari; Du; Zamore, 2007; Wilson; Doudna, 2013).

Entre os componentes-chave desta via, destacam-se os cofatores que modulam a atividade do siRNA. Uma dessas proteínas é Loquacious (Loqs), cuja atuação específica em *Ae. aegypti* tem sido foco de estudos recentes, revelando sua importância na montagem eficiente do complexo de processamento de siRNAs.

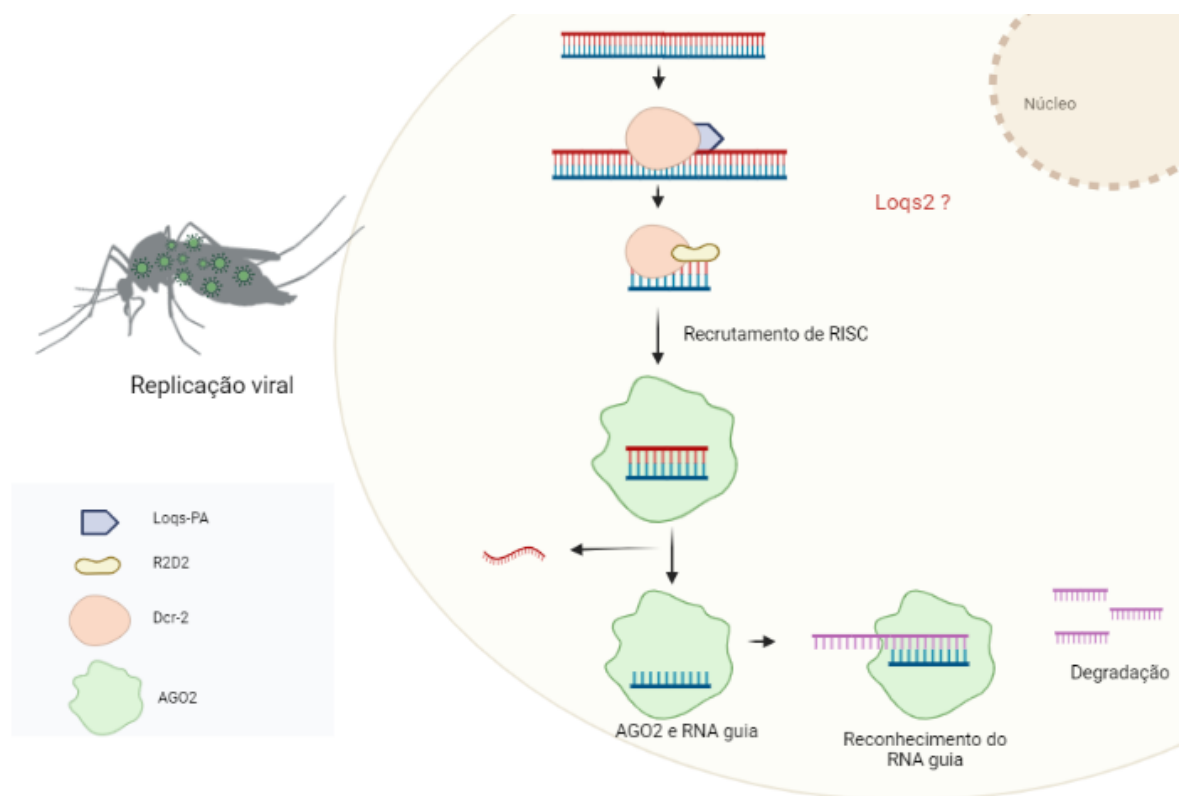


Figura 12. Mecanismo antiviral da via siRNA em *Ae. aegypti*. Durante a infecção viral, a enzima Dicer-2 (Dcr-2) em associação com seu cofator Loqs-PA reconhece e cliva os dsRNAs virais formados durante a replicação, gerando pequenos RNAs interferentes (siRNAs) de 21 nt. Estes siRNAs são carregados na proteína AGO2 através da ação do complexo Dicer-2/R2D2, formando o complexo RISC. No RISC maduro, a AGO2 seleciona e mantém uma das fitas do siRNA como molécula guia, enquanto a fita complementar é degradada. De forma que esse complexo cliva especificamente os RNAs virais que apresentam complementaridade com siRNA guia, efetivamente silenciando a expressão de proteínas virais e inibindo a replicação do vírus. Fonte: elaborado pela autora (2025) utilizando a plataforma BioRender (<https://www.biorender.com>).

1.5.5 A função antiviral de Loqs2 em *Ae. aegypti*

A regulação das vias de RNAi em *Ae. aegypti* depende criticamente de cofatores contendo domínios de ligação a dsRNA (dsRBD), sendo a proteína Loqs um dos principais elementos envolvidos. Originalmente caracterizada em *D. melanogaster*, Loqs apresenta quatro isoformas (Loqs-PB, Loqs-PA, Loqs-PC e Loqs-PD) com funções distintas. Enquanto Loqs-PB (com três dsRBD) é essencial para a via de miRNA através da interação com Dicer-1, Loqs-PD (com dois dsRBD) atua na via de siRNA endógeno e exógeno associado a Dicer-2. As isoformas Loqs-PC e Loqs-PA apresentam funções menos definidas, sendo que Loqs-PA demonstra fraca interação com Dicer-1 (Förstemann *et al.*, 2005; Marques *et al.*, 2010; Miyoshi *et al.*, 2010; Park *et al.*, 2007; Tants *et al.*, 2017; Zhou *et al.*, 2009).

Em *Ae. aegypti*, ocorreu uma simplificação evolutiva deste sistema, com a perda da isoforma Loqs-PD. Nesta espécie, a Loqs-PA assume um papel central e multifuncional, atuando não apenas como antagonista de Loqs-PB na biogênese de miRNAs, mas também

participando ativamente das vias de siRNA endógeno e exógeno através da interação com Dicer-2 e R2D2 (Figura 12). Loqs-PB, por sua vez, mantém sua função na via de miRNA, enquanto Loqs-PC apresenta padrão de expressão similar ao observado de *Drosophila*, com baixa expressão e aumento modesto após a alimentação sanguínea (Dong *et al.*, 2022; Haac *et al.*, 2015).

Apesar do avanço no conhecimento, a ativação da via de siRNA em *Ae. aegypti* durante infecções por arbovírus ainda é pouco compreendida. Em estudo anterior conduzido por nosso grupo, observou-se que apenas mosquitos com alta carga viral de DENV após a alimentação com sangue infectado produziram siRNAs específicos para o vírus (Olmo *et al.*, 2018). Em contraste, mosquitos não infectados ou com baixa carga viral não apresentaram produção detectável desses pequenos RNAs, sugerindo que a via siRNA não atua como principal mecanismo antiviral no intestino durante infecções naturais por DENV.

Ainda nesse estudo, ao injetar o vírus diretamente na hemolinfa, induzindo uma infecção sistêmica. Observou-se, então, a produção de siRNAs desde o primeiro dia de infecção, indicando que a via de siRNA pode ser ativada de forma mais eficiente durante infecções sistêmicas. Curiosamente, mesmo com a presença das principais proteínas do RNAi no intestino (AGO2, R2D2, Dicer-2 e Loqs-PA), o silenciamento de AGO2 não alterou significativamente a carga viral, sugerindo que a eficácia antiviral da via siRNA pode variar entre diferentes tecidos.

Ao analisar o genoma de *Ae. aegypti* em busca de proteínas contendo dsRBD, nosso grupo identificou um gene não caracterizado (AAEL013721), nomeado de *Loqs2*, um provável parálogo de *Loqs* exclusivo de *Aedes*. Esta proteína apresenta expressão restrita a embriões precoces, ovários e testículos, estando ausente no intestino, o que pode explicar, em parte, a maior susceptibilidade desse tecido à infecção viral. Análises genômicas sugerem que *Loqs2* originou-se de duas duplicações independentes de *Loqs*, pois as características dos seus dois domínios dsRBD são similares ao primeiro domínio de *Loqs*. Além disso, *Loqs2* aparenta estar localizado predominantemente no núcleo celular, diferentemente de *Loqs* e R2D2, que se localizam no citoplasma. Com essas características, a evolução de *Loqs2* conferiu uma neofuncionalização, impulsionada por seleção positiva (Estevez-Castro *et al.*, 2024; Olmo *et al.*, 2018).

Para investigar sua função, foi construído uma linhagem transgênica de mosquitos expressando *Loqs2* no intestino. Os resultados demonstraram que *Loqs2* exerce ação antiviral, reduzindo significativamente a carga viral de DENV nesse tecido e limitando a sua

disseminação sistêmica. Além disso, Loqs2 interage com cofatores da via siRNA, como Loqs e R2D2, reforçando sua atuação nesse mecanismo antiviral (Olmo *et al.*, 2018).

Para elucidar os mecanismos moleculares à atividade antiviral de Loqs2, realizou uma análise do interactoma em mosquitos transgênicos que expressam essa proteína no intestino. Os resultados indicaram interações robustas com seis proteínas principais: Loqs, AAEL022113, Dip1 (Disco Interacting Protein 1), AAEL004859 (mle), AAEL004699 e Dicer-2 (Babarit, 2023). Essas descobertas complementam e expandem esses achados anteriores (Olmo *et al.*, 2018), já que haviam identificado a capacidade de Loqs2 em interagir com componentes centrais da via RNAi.

Dentre as proteínas identificadas, destacam-se AAEL004859 e AAEL004699, ambas contendo domínios dsRBD e validadas como participantes ativas na resposta antiviral em células de *Ae. aegypti* (Machado *et al.*, 2022; Varjak *et al.*, 2020). A proteína Dip1, que também possui domínios dsRBD, apresentou atividade antiviral demonstrada em células de *Drosophila* contra o *Drosophila C* vírus (DeSousa *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2015). Já a proteína AAEL022113, ainda não caracterizada, apresenta domínios de ligação com RNA, e nossos estudos demonstraram que seu silenciamento resulta em aumento da carga viral de ZIKV no intestino em quatro dias após a infecção, indicando seu papel antiviral no início da infecção (Babarit, 2023).

No entanto, a atividade antiviral de Loqs2 parece ser restrita ao intestino quando expressa nesse tecido. Em experimentos de *knockout* de *Loqs2* em *Ae. aegypti*, não foram observadas diferenças significativas na carga viral ou na prevalência da infecção por ZIKV e SINV. Mas sugere que Loqs2 pode estar envolvida em processos específicos como ovogênese e espermatogênese no mosquito (Babarit, 2023; Castro, 2024).

A identificação e a caracterização de cofatores antivirais como Loqs2 reforçam a importância dos mecanismos intrínsecos na determinação da competência vetorial de *Ae. aegypti*. Nesse contexto, a seguir, abordaremos um dos principais fatores que modulam a susceptibilidade do mosquito à infecção por arbovírus: a microbiota.

1.6 MODULAÇÃO DA RESPOSTA ANTIVIRAL EM *Ae. aegypti* POR VÍRUS ESPECÍFICOS DE INSETOS (ISVs)

A microbiota é composta por todos os microrganismos associados a um organismo, podendo ser encontrada em diferentes tecidos. Esses microrganismos não se restringem apenas às bactérias, mas incluem também protozoários, fungos, nematoides e até mesmo os vírus,

embora, por serem acelulares, não são considerados organismos vivos (Stilling; Dinan; Cryan, 2014). A interação entre a microbiota e o hospedeiro pode influenciar diversos aspectos biológicos, de forma positiva ou negativa, como o desenvolvimento, a fisiologia, a imunidade e até mesmo a transmissão de patógenos (Guégan *et al.*, 2018; Lewis; Lizé, 2015; Mancini *et al.*, 2018; Strand, 2018).

Com os mosquitos, não é diferente. Estudos demonstram que a sua microbiota pode influenciar diretamente o desenvolvimento desses insetos. Por exemplo, a depleção da microbiota de *Cx. pipiens* impediu a manifestação de fenótipos típicos da diapausa, como o aumento da reserva lipídica, do tamanho corporal e da longevidade (Didion *et al.*, 2021). De maneira semelhante, foi demonstrado que larvas axênicas, ou seja, livre de qualquer bactéria, de *Ae. aegypti* e *Anopheles gambiae* não completam o desenvolvimento (Coon *et al.*, 2014).

Além do desenvolvimento, a interação entre microbiota e hospedeiro também pode modular a susceptibilidade dos mosquitos às infecções por patógenos, como *Plasmodium spp.* em *Anopheles spp.* Essa modulação pode ocorrer por meio da produção de metabólitos que impactam diretamente a sobrevivência do patógeno, ou pela estimulação de vias imunes do hospedeiro (Pike *et al.*, 2017; Romoli; Gendrin, 2018). Um exemplo notável é o fungo *Talaromyces*, associado a microbiota intestinal de *Ae. aegypti*, que aumenta a susceptibilidade à infecção por DENV, bem como em *Anopheles* frente ao *Plasmodium*, possivelmente pela secreção de metabólitos que inibem a ação da tripsina na digestão do sangue (Angleró-Rodríguez, Yesseinia I *et al.*, 2017). Outro exemplo é a bactéria *Serratia marcescens*, que secreta a proteína Enhancin, capaz de degradar mucinas associadas ao epitélio intestinal, facilitando a disseminação de DENV em *Ae. aegypti* (Wu *et al.*, 2019).

Por outro lado, há evidências que a microbiota também pode conferir resistência à infecção por arbovírus. Um estudo recente demonstrou que *Rosenbergiella* sp, presente em *Ae. albopictus* e *Ae. aegypti*, secreta glicose desidrogenase, uma enzima que acidifica o lúmen intestinal, inativando o vírion de ZIKV e DENV (Zhang *et al.*, 2024).

Além da microbiota nativa, a introdução de microrganismos simbiotes também pode modular a susceptibilidade dos mosquitos a infecções virais. Um exemplo amplamente estudado é a *Wolbachia pipientis*. Quando introduzida em *Ae. aegypti*, originalmente isolada de *D. melanogaster*, *Wolbachia* confere resistência a diversos arbovírus, incluindo DENV, ZIKV, CHIKV e MAYV. Os mecanismos propostos para essa proteção é multifatorial, incluindo a estimulação do sistema imune, a indução de espécies reativas de oxigênio e competição por recursos essenciais, como lipídios, colesterol e aminoácidos, limitando a replicação viral (Aliota *et al.*, 2016; Bian *et al.*, 2010; Boehm *et al.*, 2023; Caragata *et al.*, 2014;

Dutra *et al.*, 2016; Geoghegan *et al.*, 2017; Koh *et al.*, 2020; Moreira *et al.*, 2009; Pan *et al.*, 2012; Pereira *et al.*, 2018).

Além das bactérias e fungos, os vírus específicos de insetos (ISV) emergiram como componentes fundamentais da microbiota de mosquitos, estabelecendo complexas interações que modulam significativamente a competência vetorial (Bolling *et al.*, 2015). Esses vírus, caracterizados por sua capacidade de replicação exclusiva em células de insetos, representam uma parcela considerável da diversidade viral identificada em estudos metagenômicos de populações naturais de mosquitos, frequentemente superando em abundância os próprios arbovírus. Esses vírus pertencem predominantemente a famílias de vírus de RNA, como *Flaviviridae*, *Peribunyaviridae* e *Togaviridae*, embora a maioria ainda aguarde uma classificação taxonômica precisa (de Almeida *et al.*, 2021; Moonen *et al.*, 2023).

Diversos estudos têm demonstrado o papel modulador dos ISVs na infecção por arbovírus. Em células de *Ae. albopictus*, a infecção previa com o Palm Creek vírus (PCV) mostrou capaz de reduzir a replicação tanto do WNV quanto do vírus de encefalite de Murray Valley (Hobson-Peters *et al.*, 2013). Padrão semelhante foi observado em *Cx. pipiens* infectado com *Culex flavivirus*, onde se registrou não apenas diminuição da carga viral de WNV, mas também uma redução na disseminação do arbovírus (Bolling *et al.*, 2012). Esses fenômenos têm sido atribuídos principalmente ao mecanismo de exclusão por superinfecção, particularmente evidente em linhagens celulares deficientes no sistema imune, como C6/36, que apresentam menor eficiência de infecção por vírus taxonomicamente relacionados. Alternativamente, a ativação do sistema imune ou a competição por fatores celulares essenciais também podem contribuir para essa supressão no mosquito-vetor (Bolling *et al.*, 2012; Brackney *et al.*, 2010; Hobson-Peters *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2005).

No caso específico de *Ae. aegypti*, as evidências apontam para um cenário complexo de interações. A infecção com o Cell-Fusing Agent virus (CFAV) demonstrou capacidade de suprimir a replicação tanto do DENV quanto do ZIKV, embora os mecanismos moleculares permaneçam poucos compreendidos (Baidaliuk *et al.*, 2019). Resultados igualmente relevantes foram obtidos com Nhumirim virus, cuja a inoculação em mosquitos resultou em redução significativa da infecção por ZIKV, embora não por CHIKV, com consequente diminuição da detecção viral na saliva, sugerindo um efeito inibitório sobre a transmissão, provavelmente mediado por exclusão competitiva (Romo *et al.*, 2018). Contudo, a infecção previa com PCV mostrou-se menos eficaz, com impacto limitado na infecção por infecção por ZIKV ou CHIKV, exceto por uma discreta redução da infecção por ZIKV observada especificamente na cabeça dos mosquitos (Koh *et al.*, 2021).

Investigações recentes conduzidas por nosso grupo revelaram um fenômeno particularmente intrigante: *Ae. aegypti* naturalmente infectados com Humaita-Tubiacanga vírus (HTV) e Phasi Charoen-like vírus (PCLV) apresentaram aceleração na disseminação de DENV e ZIKV quando comparados aos mosquitos livres desses ISVs. Esse efeito depende necessariamente da coinfeção por ambos ISVs e está associado ao bloqueio da regulação negativa da histona H4 (Olmo *et al.*, 2023). A relevância epidemiológica desse achado torna-se particularmente evidente quando analisa prevalência desses vírus no campo. No mesmo estudo, foi observado que a população de *Ae. aegypti* em Caratinga (Minas Gerais) apresentava altas taxas de infecções: 65% para HTV e 85% PCLV. Local onde possui alta incidência de DENV e ZIKV (Olmo *et al.*, 2023).

Do ponto de vista viral, esses ISVs apresentam características distintas. O PCLV, classificado como vírus de RNA de polaridade negativa da família *Phenuiviridae* (gênero *Phasivirus*), possui genoma tripartido, composto por três segmentos de RNA: L (large), M (medium) e S (small) (Aguiar *et al.*, 2015; Sasaya *et al.*, 2023). Em contraste, o HTV, que permanece sem classificação taxonômica definitiva, apresenta RNA de polaridade positiva com duas proteínas identificadas: o capsídeo e RdRp (Almeida, 2023).

Em relação às repostas antivirais do *Ae. aegypti*, ambos os vírus induzem a produção de siRNAs. Entretanto, apenas o PCLV estimula a produção de piRNAs, um padrão compatível com seu tropismo pelos ovários, onde a via piRNA é particularmente ativada (Aguiar *et al.*, 2015). De fato, no estudo de Olmo e colaboradores (2023), a infecção natural de HTV foi detectada principalmente nas glândulas salivares e carcaça, mas não nos ovários nem no intestino. Em contraste, o PCLV foi amplamente detectado em todos os tecidos analisados, incluindo ovários, intestino, glândulas salivares e carcaça (Olmo *et al.*, 2023). No entanto, dados recentes do nosso grupo revelaram a presença de HTV em intestinos e órgãos reprodutivos na população de *Ae. aegypti* de Araraquara (São Paulo), ainda que com baixa carga viral (Rodrigues, 2024).

2 JUSTIFICATIVA

O controle das arboviroses no Brasil enfrenta desafios cada vez mais complexos diante do atual cenário epidemiológico. Em 2024, foi registrado um aumento expressivo de casos de DENV, ZIKV e CHIKV (BRASIL. Ministério da Saúde, 2025), refletindo a expansão geográfica e a persistência do vetor *Ae. aegypti*, favorecida por fatores como urbanização desordenada e mudanças climáticas. As estratégias convencionais de controle, centradas no uso de inseticidas químicos, vêm apresentando eficácia decrescente em virtude do aumento da resistência nas populações de mosquitos e dos impactos negativos ao meio ambiente.

Embora medidas alternativas, como a introdução da vacina Qdenga no calendário nacional e a liberação de mosquitos infectados com *Wolbachia*, representem avanços importantes, essas abordagens ainda apresentam limitações substanciais. Entre elas destacam-se a baixa cobertura vacinal (Alves, 2025; Preto *et al.*, 2021), a proteção incompleta frente a diferentes sorotipos virais (Biswal *et al.*, 2019; Tricou *et al.*, 2024) e a variabilidade na estabilidade e disseminação da *Wolbachia* em populações naturais (Dorigatti *et al.*, 2018). Nesse contexto, torna-se urgente investir em estratégias complementares, baseadas no aprofundamento do conhecimento sobre a biologia do vetor.

A via de RNA de interferência (RNAi) é considerada a principal linha de defesa antiviral nos insetos, sendo fundamental para o controle da infecção por diversos arbovírus. A recente identificação da proteína Loqs2, um parálogo específico do gênero *Aedes* e ausente do intestino médio em condições naturais, trouxe novas perspectivas sobre a imunidade antiviral em mosquitos. Estudos prévios demonstraram que sua expressão ectópica nesse tecido confere proteção contra o DENV, suprimindo sua replicação e disseminação sistêmica (Olmo *et al.*, 2018). Além disso, *Loqs2* apresenta expressão regulada de forma tecido-específica, com características evolutivamente conservadas no gênero *Aedes* (Estevez-Castro *et al.*, 2024), o que a torna um alvo molecular atrativo para aplicações biotecnológicas.

Apesar de seu potencial, lacunas importantes ainda persistem. Sua eficácia contra arbovírus emergentes de grande relevância regional, como CHIKV e MAYV, permanece pouco explorada. Além disso, é essencial avaliar sua atividade antiviral em mosquitos com fundo genético de populações naturais, que apresentam maior diversidade genética, microbiota complexa e, potencialmente, maior variabilidade na resposta imune antiviral.

Um aspecto frequentemente negligenciado, mas de impacto crescente, é a presença de vírus específicos de insetos (ISVs) co-infectando populações selvagens. Estudos recentes apontam que ISVs como PCLV e HTV podem interferir diretamente na dinâmica de infecção

por DENV e ZIKV, inclusive modulando positivamente sua replicação (Olmo *et al.*, 2023). Essas interações, que envolvem mecanismos da via RNAi, podem alterar significativamente a eficácia de proteínas antivirais como Loqs2 em ambientes naturais.

Dessa forma, esta pesquisa propõe-se a investigar o espectro antiviral de Loqs2 frente a ZIKV, CHIKV e MAYV, sua eficácia em *Ae. aegypti* com fundo genético de campo e sua interação com ISVs naturalmente presentes. Os resultados desta tese poderão fornecer bases científicas sólidas para avaliar o potencial de Loqs2 como ferramenta biotecnológica no controle de arbovírus, contribuindo para o desenvolvimento de estratégias integradas e mais sustentáveis no enfrentamento das arboviroses.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o papel da proteína Loqs2 na resposta antiviral de *Ae. aegypti* frente à infecção por Zika vírus (ZIKV), Chikungunya vírus (CHIKV) e Mayaro vírus (MAYV), integrando análises funcionais, moleculares e populacionais.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Investigar e caracterizar a atividade antiviral da proteína Loqs2, quando expressa ectopicamente no intestino de *Ae. aegypti*, durante a infecção por vírus da família *Togaviridae* (CHIKV e MAYV) e *Flaviviridae* (ZIKV), em linhagens laboratoriais
- b) Avaliar a eficácia antiviral de Loqs2, expressa ectopicamente no intestino, frente à infecção por ZIKV em *Ae. aegypti* com fundo genético de campo, comparando a carga viral e o padrão de disseminação entre mosquitos com e sem expressão de Loqs2
- c) Analisar o impacto da presença de vírus específicos de insetos (ISVs) na atividade antiviral associada à expressão ectópica de Loqs2 no intestino de mosquitos de campo infectados por ZIKV.
- d) Investigar a expressão de genes que interagem com Loqs2 durante a resposta antiviral contra *Orthoflavivirus*, visando identificar interações funcionais e vias de sinalização envolvidas na modulação da competência vetorial.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 PRODUÇÃO VIRAL

4.1.1 Cultura celular e infecção viral

As linhagens celulares C6/36 (derivadas de larvas de *Ae. albopictus*) e VERO (epitélio renal de *Chlorocebus* sp.) foram cultivadas nos meios L15 (Leibovitz's L15 Medium - Life Technologies™ Ltd.) e DMEM-high (Dulbecco's Modified Eagle Medium - DMEM-High, Sigma-Aldrich), respectivamente. Os meios foram suplementados com 5% de soro bovino fetal (FBS, Sigma-Aldrich) e antibióticos (penicilina e estreptomicina, Sigma-Aldrich), e as células foram mantidas em confluência de 70% a 80%.

Para a infecção, as células foram lavadas com tampão fosfato-salino 1x (PBS 1x), tratadas com 0,5 mL de tripsina (Sigma-Aldrich) e incubadas por 4 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionado o meio de cultivo suplementado com FBS correspondente para inativação da tripsina. A contagem celular foi realizada em câmara de Neubauer utilizando um microscópio invertido Primo Vert Zeiss™, e as células foram ajustadas para 2×10^6 células por frasco de cultivo celular (frascos F25), permitindo o posterior ajuste do MOI (multiplicidade de infecção) de 0,01.

As células C6/36 foram infectadas com a cepa ZIKV (PE243/2015) (Donald *et al.*, 2016), enquanto as células VERO foram infectadas com as cepas CHIKV-ECSA (MK244647) (de Freitas *et al.*, 2024) ou MAYV (TRLV 4675) (Pereira *et al.*, 2018; Sucupira *et al.*, 2020). O meio de cultivo foi removido, e as células foram expostas ao vírus diluído em meio suplementado correspondente. A adsorção viral foi realizada por 1 hora a 28°C para C6/36 e 37°C para VERO, seguida de adição de meio e incubação por 3 a 7 dias nas respectivas temperaturas (28°C para C6/36 e 37°C para VERO), com observação diária do efeito citopático (CPE). Durante esse período, 1 mL do sobrenadante foi coletado e armazenado a -80°C.

Após esse período de incubação, o sobrenadante foi transferido para tubos de 50 mL e centrifugado a 1800 x g por 10 minutos a 4°C. Em seguida, o sobrenadante resultante foi alíquotado em tubos de 0,6 mL e armazenado a -80°C até sua utilização.

4.1.2 Ensaio de titulação viral

As amostras virais armazenadas a -80°C foram utilizadas para infectar células A549 (adenocarcinoma pulmonar humano) no caso do ZIKV, e células VERO, no caso do MAYV e

CHIKV. Ambas as linhagens foram cultivadas no meio DMEM suplementado com 5% de FBS e antibióticos. As células foram mantidas em incubadora a 37°C com 5% de CO₂ (dióxido de carbono) até atingirem aproximadamente 90% de confluência.

Após contagem, foram semeadas 2×10^5 células por poço em placas de seis poços e incubadas por 8 a 12 horas. As suspensões virais foram submetidas a diluições seriadas decimais (até 10^{-6}) em DMEM, e 500 µL de cada diluição foram adicionados aos respectivos poços. Um poço controle negativo recebeu apenas meio suplementado. A adsorção viral foi realizada por 60 minutos a 37°C com 5% de CO₂.

Em seguida, foi adicionado 3 a 4 mL de meio contendo carboximetilcelulose (CMC) para restrição da difusão viral. As placas foram incubadas por 4 dias, após os quais o meio foi descartado, e as células foram fixadas com formaldeído e coradas com violeta cristal. A formação de placas de lise viral (plaque forming units - PFU) foi observada para a determinação da titulação viral.

4.2 MANUTENÇÃO E GERAÇÃO DAS LINHAGENS DE *Aedes aegypti*

Os ovos de *A. aegypti*, provenientes de linhagem de referência (Bangkok; Olmo *et al.*, 2018) e população de campo (Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil) foram mantidos sob condições controladas de laboratório. Para a eclosão, os ovos foram imersos em recipientes contendo água filtrada, promovendo a liberação das larvas. Estas foram alimentadas diariamente com ração para peixes (TetraMin[®]) e mantidas a 28°C, com umidade de 70 a 80%, e fotoperíodo de 12h:12h (luz:escuro).

Após a emergência dos adultos, os mosquitos foram mantidos sob condições similares das larvas, sendo alimentadas com solução de açúcar a 10% ad libitum.

4.2.1 Cruzamento de mosquitos selvagens com mosquitos transgênicos- retrocruzamentos

Os ovos de *Ae. aegypti* provenientes de Belo Horizonte (Minas Gerais), e identificados morfológicamente, foram gentilmente cedidos pelo Laboratório Mosquitos Vetores, Fiocruz Minas. Paralelamente, os ovos de mosquitos transgênicos expressando o gene Loqs2 (Cp.:Loqs2, linhagem Bangkok) no intestino, mantidos em laboratório, também foram utilizados. Ambos os grupos de ovos foram individualmente eclodidos em recipientes contendo água filtrada, sendo as larvas alimentadas com ração TetraMin[®] até atingirem o estágio de pupa.

Na fase de pupa, realizou a separação sexual por meio do método de Fay-Morlan (Fay; Morlan, 1959), conforme ilustrado na Figura 13. As pupas fêmeas de Belo Horizonte foram transferidas para gaiolas específicas para completarem o desenvolvimento e para monitoramento da presença indesejada de machos. Por sua vez, os machos da linhagem transgênica passaram por triagem adicional sob estereomicroscópio Nikon SMZ18, com o objetivo de selecionar apenas aqueles que expressavam o gene repórter GFP (*green fluorescent protein*), indicativo da presença do transgene Loqs2 no intestino.

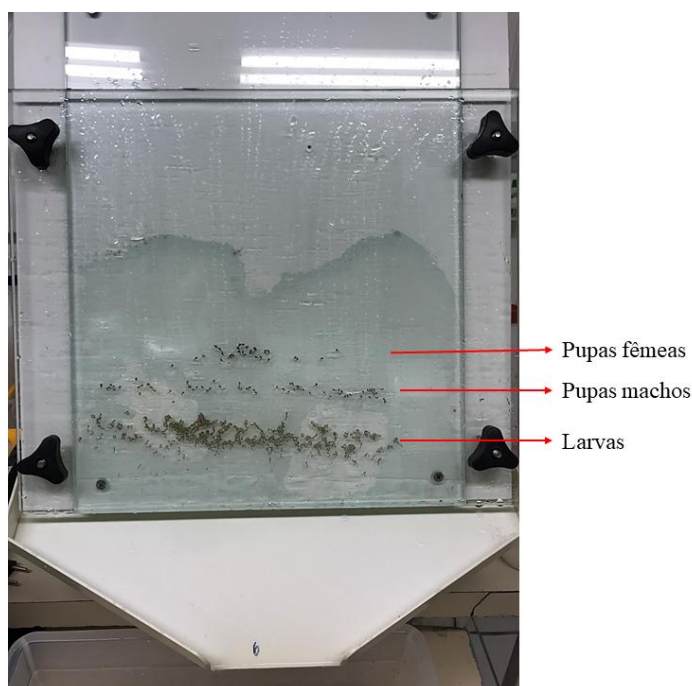


Figura 13. Método de Fay-Morlan para a separação de pupas de *Ae. aegypti*. A separação sexual é baseada no dimorfismo de tamanho entre as pupas: pupas fêmeas, maiores, ficam retidas no dispositivo, enquanto as pupas machos, menores, atravessam o vidro de separação.

Os machos positivos foram transferidos para gaiolas separadas, onde permaneceram por três dias para completar o desenvolvimento e monitoramento. Após esse período, as fêmeas selvagens virgens foram colocadas junto aos machos transgênicos em uma única gaiola contendo solução de sacarose a 10% para o cruzamento.

Para viabilizar a postura de ovos, as fêmeas foram alimentadas por 1 hora, no máximo, em um camundongo da linhagem Swiss anestesiado com uma combinação de cetamina e xilazina (80/8 mg/kg). Todos os procedimentos envolvendo o uso de animais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Fiocruz Minas, sob o protocolo LW-16/21). Três dias após a alimentação, foi colocado um copo de 50 mL contendo papel filtro e 25 mL de água para a oviposição.

As gerações seguintes foram mantidas em condições ambientais controladas em uma temperatura de 28°C, umidade de 70-80% e fotoperíodo de 12h:12h (luz:escuro). O procedimento de retrocruzamento foi repetido até a décima geração (Figura 14).

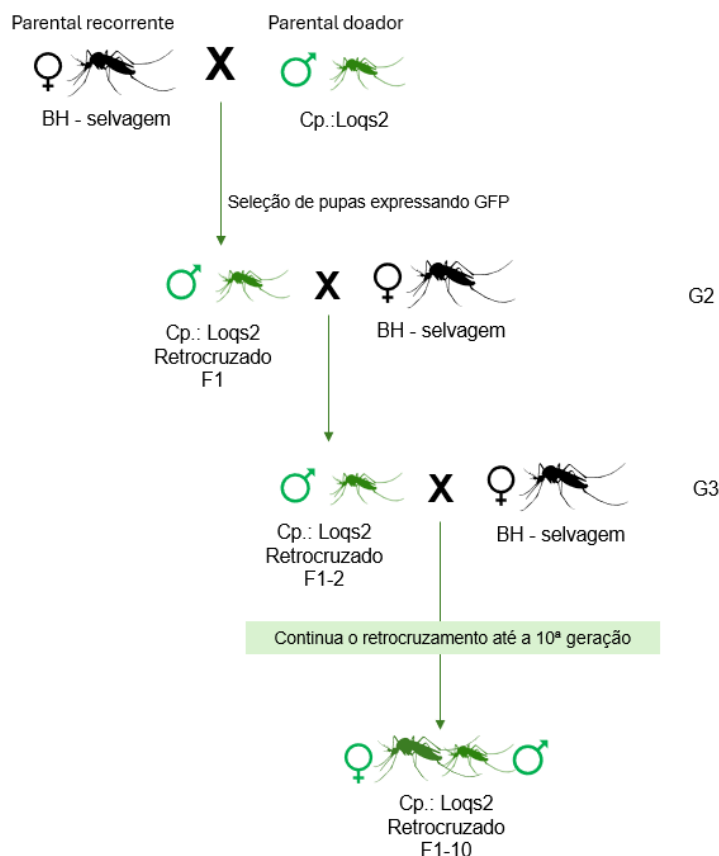


Figura 14. Esquema do processo de retrocruzamento entre mosquitos selvagens e transgênicos de *Ae. aegypti*. O cruzamento inicial foi realizado entre fêmeas virgens selvagens da linhagem de Belo Horizonte (BH-selvagem) e machos transgênicos expressando Loqs2 no intestino (Cp.:Loqs2). Após o primeiro retrocruzamento, pupas machos foram selecionadas com base na expressão do gene repórter GFP. Esses machos Cp.:Loqs2 retrocruzados (F1) foram cruzados novamente com fêmeas BH-selvagem por sucessivas gerações (até a décima geração – F1-10), mantendo-se a seleção por GFP a cada ciclo. O objetivo foi a introdução do transgene Loqs2 em um fundo genético de campo.

4.3 INFECÇÃO DE *Ae. aegypti* POR MEIO DA ALIMENTAÇÃO SANGUÍNEA

4.3.1. Infecção de *Ae. aegypti* utilizando camundongos AG129

Os mosquitos fêmeas adultos, com idade de aproximadamente de 5 a 7 dias, foram infectados com o ZIKV ou CHIKV por meio da alimentação em um camundongo AG129 previamente infectado, seguido o método descrito por Baldon *et al.* (2022). O camundongo, com idade entre 3 e 4 semanas, foi inoculado intraperitoneal com uma suspensão viral contendo 10^5 PFU/mL, três dias antes da infecção dos mosquitos. Antes da exposição, o animal foi

anestesiado com cetamina e xilazina (80/8 mg/kg), conforme protocolo aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA - LW-26/20).

Após a alimentação, as fêmeas ingurgitadas foram anestesiadas com CO₂, selecionadas e mantidas para posterior análise em dois pontos temporais: quatro e oitos dias pós-infecção (dpi). Nessas datas, os mosquitos foram dissecados para separação do intestino e da carcaça (restante do corpo). Os tecidos foram armazenados individualmente em tubos de 1,5 mL contendo 200 µL de TRIzol (Invitrogen™) e esferas de vidros, para extração de RNA.

4.3.2 Infecção de *Ae. Aegypti* utilizando alimentação artificial

As fêmeas adultas de *Ae. aegypti*, com idade de 5 a 7 dias, foram submetidas à infecção oral por meio de uma alimentação artificial com membrana, conforme descrito por de Mendonça *et al.* (2025). Essa alimentação foi realizada utilizando sangue humano total (Comitê de Ética em Pesquisa – termo de cooperação técnica 20/2021 – Hemominas), no qual os vírus CHIKV ou MAYV foram diluídos até uma concentração final entre 10⁴ e 10⁶ PFU/mL.

O sangue infectado foi oferecido às fêmeas em um sistema de alimentação artificial composto por um reservatório de vidro revestido com membrana de intestino de porco, acoplado a um banho-maria 37°C, por 1 hora. Após o período de alimentação, os mosquitos foram anestesiados com CO₂, e apenas as fêmeas completamente ingurgitadas foram selecionadas. Estas foram mantidas em gaiolas para posterior análise nos dias 4 e 8 dpi, seguido os mesmos procedimentos descritos na seção 3.3.1.

4.4 EXTRAÇÃO DE RNA

Todos os instrumentos utilizados foram previamente esterilizados por autoclavação ou tratados com inibidor de RNase (RNaseZap, Ambion®). Os tecidos, coletados individualmente conforme descrito anteriormente, foram homogeneizados com 200 µL de TRIzol® Reagent (Invitrogen™) utilizando o equipamento Mini-BeadBeater-96 (Biospec©) por 1,5 minutos.

Após a homogeneização, as amostras foram incubadas por 10 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 40 µL de clorofórmio (Sigma®), com agitação vigorosa em vortex por 15 segundos. Após nova incubação de 10 minutos à temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 12.000g, a 4°C.

A fase aquosa foi cuidadosamente transferida para um novo tubo, onde foram adicionados 5 µg de glicogênio ultrapuro (Ambion®), seguido da adição de 100 µL de isopropanol (Sigma®). Após leve agitação em vortex, as amostras foram incubadas overnight a 20°C. No dia seguinte, foram centrifugadas por 10 minutos a 12.000g.

O sobrenadante foi descartado e, para lavagem do pellet, foram adicionados 1000 µL de etanol 75% v/v (Sigma®), preparado com água livre de nucleases (Nuclease-Free Water, Ambion®). Após nova agitação branda, as amostras foram novamente centrifugadas por 5 minutos a 7.500g. O etanol foi cuidadosamente descartado e os pellets foram secos invertendo os tubos sobre papel absorvente.

O RNA total foi ressuspensionado em 10 µL de água livre de nucleases (Ambion®), e as amostras foram armazenadas imediatamente a -80°C até o momento da utilização.

4.5 QUANTIFICAÇÃO RELATIVA DE RNAs VIRAIS PELA TÉCNICA DE TRANSCRIÇÃO REVERSA SEGUIDA DE PCR QUANTITATIVO (RT-qPCR)

4.5.1 Reação em cadeia da polimerase

A síntese da primeira fita do cDNA (DNA complementar) foi realizada utilizando a enzima Transcriptase Reversa M-MLV (Promega®), com tampão da enzima (50 mM Tris-HCl pH8,3; 75 mM KCl; 3 mM MgCl₂), 500 ng de RNA total, 15 mM de Random Primers, 625 µM de dNTPs, 0,01 M de DTT e água livre de RNase, totalizando um volume final de 20 µL.

Inicialmente, a desnaturação do RNA foi conduzida pela incubação da mistura RNA e random primers a 70°C por 10 minutos em termociclador, seguida de resfriamento imediato a 4°C. Posteriormente, foram adicionados o tampão da enzima, DTT (ditiotretitol) e 2 unidades da enzima transcriptase reversa. A reação foi então incubada a 42°C por 60 minutos, seguida de inativação da enzima a 72°C por 5 minutos. As amostras de cDNA foram armazenadas a -20°C até o momento do uso.

Controles negativos de transcrição reversa (RT-), sem adição da enzima, foram incluídos em todas as reações, a fim de verificar possível contaminação por DNA genômico, uma vez que não foi realizado tratamento com DNase nas amostras de RNA total.

4.5.2 Desenho dos iniciadores

O iniciadores utilizados neste estudo foram desenhados por meio do software Primer3Plus (Untergasser *et al.*, 2012), com modificações nos parâmetros padrão. Os critérios adotados incluíram: tamanho do amplicon entre 70 e 150 nucleotídeos, temperatura ideal de anelamento de 60°C, conteúdo GC em torno de 50% e no máximo de 3 bases seguidas repetidas.

4.5.3 PCR em tempo real (qPCR)

A análise da expressão gênica e quantificação relativa da carga viral foram realizadas por meio da técnica de PCR em tempo real (qPCR), utilizando o kit SYBR® GREEN PCR Master Mix (Applied® Biosystems), conforme as instruções do fabricante. As reações foram conduzidas no equipamento QuantStudio™ 12K Flex Real-Time PCR System (Applied® Biosystems).

As análises foram baseadas no método comparativo $2^{-\Delta C_t}$, utilizando o gene constitutivo RpL32 (*Ribosomal protein L32*) como controle endógeno para normalização da expressão gênica e da carga viral. Essa abordagem permite corrigir variações na quantidade de RNA entre as amostras, uma vez que não foi realizada a quantificação prévia do RNA antes da reação de RT-qPCR.

A eficiência dos diferentes pares de iniciadores foi previamente avaliada por meio de curvas padrão, obtidas a partir de diluições seriadas (10X) de amostras de cDNA. Todas as reações foram realizadas em triplicata, com concentração final dos primers de 50nM. Os valores de baseline e threshold foram ajustados individualmente para cada par de primers, conforme indicado na Tabela 1.

Tabela 1. Primers utilizados nas reações de qPCR para os diferentes alvos investigados

Alvo	Sequência (5' – 3')	Sequência (3' – 5')	Referência
RpL32	AGCCGCGTGTGTACTCTG	ACTTCTTCGTCCGCTTCTTG	(Olmo <i>et al.</i> , 2023)
GFP	CGACCACTACCAGCAGAACA	TCTCGTTGGGGTCTTTGC	(Babarit, 2023)
Loqs2	ACGTGAGTTGACCAATGCCA	CGAACAACCGCAAGCTAACC	(Babarit, 2023)
PCLV	AGACAAGAAGAGTTGAGTGTGCT	AGCAACGTAATTAGTCCCTCCA	(Olmo <i>et al.</i> , 2023)
HTV	TAGGTTACGGGCCAGATGGT	ATCCTCATAGGCGTCGGTGT	(Olmo <i>et al.</i> , 2023)
ZIKV	TCAAACAATGGCAGTCAGTG	GCTTGTTGAAGTGGTGGGAG	(Baldon <i>et al.</i> , 2022)
MAYV	GTGGTCGCACAGTGAATCTTTC	CAAATGTCCACCAGGCGAAG	(Long <i>et al.</i> , 2011b)
CHIKV	AAGCTYCGCGTCCTTTACCAA G	CCAAATTGTCCYGGTCTTCCT	(Baldon <i>et al.</i> , 2022)
AAEL004859	AATAGTTTCCGCGCGTTTGC	TCAAGAAGCCTCCGGTGAAA	Babarit, 2023)

Continuação da Tabela 1			
Dip1	CCCTGCGAGATCTGGTCATC	GAGCCGTTGTTGCCATTGTT	(Babarit, 2023)
AAEL022113	CCGAAAACCAGTCCTGTCGA	CACAGTGTGCGTTTCGGTTT	(Babarit, 2023)
AAEL004699	GTGTATTGAACGGCATCGCC	ATTGGGAACGAAGCCTCCAG	(Babarit, 2023)
AGO2	AGATTGACAAGCAGAAAATCCAC	CATTGGACGCATCAGCA	(Olmo <i>et al.</i> , 2018)
R2D2	GGGGAATTCACAAGACGAAG	GCGTCTTAATCATCTCGTTGC	
Dicer-2	GGGCGATGTGTTTCGAGAG	GGCAAAGTCGTTTCCAGAGT	
Loqs	GGACAAGGATGCCATGGGTA	GCCTTGATGTTCAACCCACC	
LTV	ATGGTCGTGATGTGTATGAG	TCTAGCGGGATATGCTGATA	(Olmo <i>et al.</i> , 2023)

Os testes estatísticos foram realizados com o apoio instrumental do *software* R (versão 4.3.3), utilizando *scripts* desenvolvidos para o processamentos dos dados e geração dos gráficos com o pacote ggplot2 (Valero-Mora, 2010; Wilkinson, 2005). Para a análise da carga viral, foram aplicados dois testes não paramétricos: o teste de U de Mann-Whitney, utilizando para comparação entre dois grupos independentes, e o teste de Kruskal-Wallis, aplicado quando mais de dois grupos foram comparados. Para a avaliação da prevalência de infecção, foi utilizou-se o teste exato de Fisher, apropriado para tabelas de contingências com frequências pequenas. Valores de p inferiores a 0,05 ($p < 0,05$) foram considerados estatisticamente significativos.

4.6 ANÁLISE DO VIROMA DE *Ae. aegypti* COLETADOS EM BELO HORIZONTE UTILIZANDO BIBLIÓTECAS DE PEQUENOS RNAs

4.6.1 Construção de bibliotecas de pequenos RNAs

Mosquitos adultos coletados na cidade de Belo Horizonte (Minas Gerais) foram cedidos pelo Laboratório Mosquitos Vetores, Fiocruz Minas. Para as análises, os mosquitos foram agrupados em pools contendo 24 indivíduos, totalizando quatro grupos: dois compostos por machos e dois por fêmeas. Em seguida, foi realizada a extração de RNA conforme descrito na seção 3.4. A qualidade do RNA obtido foi avaliada por meio do sistema 2100 Bioanalyzer system (Agilent).

Para a construção das bibliotecas e análises, seguimos o protocolo descrito por Almeida, (2023), Olmo *et al.* (2023). Os RNAs foram purificados por eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) em condições desnaturantes, e a região do gel contendo bandas

correspondentes a fragmentos com tamanhos entre 18 e 35 nucleotídeos foi excisada para posterior purificação.

As bibliotecas foram então preparadas utilizando o kit NEBNext Multiplex Small RNA Library Prep (New England BioLabs), seguindo as recomendações do fabricante, com uma modificação: a substituição do adaptador 5' por um análogo contendo seis nucleotídeos extras na extremidade 3', com o objetivo de melhorar a precisão identificação das sequências dos pequenos RNAs clonados. A preparação das bibliotecas foi realizada pelo Dr. Roenick Olmo (CNRS, Université de Strasbourg).

As bibliotecas foram sequenciadas pela plataforma GenomEast, membro do consórcio “France Genomique” (ANR-10-INBS-0009), em modo *single-end*, com 100 ciclos, no equipamento Illumina NextSeq 2000.

4.6.2 Metagenômica baseada em pequenos RNAs para identificação viral

As sequências brutas geradas foram avaliadas quanto à qualidade utilizando o *software* Fastqc (Andrews, 2010). Em seguida, as *reads* passaram por filtragem quanto à qualidade e remoção de adaptadores com o programa Trim Galore (Krueger, 2012). *Reads* com qualidade média inferior a Phread 20, contendo bases ambíguas ou com comprimento inferior a 15 nucleotídeos foram descartados.

As sequências processadas foram alinhadas contra o genoma de referência de *Ae. aegypti* (Refseq: GCA_002204515.1) (Matthews *et al.*, 2018), utilizando o *software* Bowtie (v. 1.2.3) (Langmead *et al.*, 2009). As sequências não mapeadas foram utilizadas para a montagem de *contigs*.

A montagem foi realizada com os *softwares* SPAdes (Bankevich *et al.*, 2012) e Velvet (Zerbino; Birney, 2008), considerando conjuntos de *reads* em três faixas de tamanho: 20-22 nt, 24-30 nt e 18-35 nt. Utilizou-se também o VelvetOptimiser (Zerbino, 2010) para ajuste do valor de k-mer (15), conforme descrito por Aguiar *et al.*, 2015. Os *contigs* gerados foram posteriormente combinados com o *software* CAP3 (Huang; Madan, 1999).

Os *contigs* montados foram classificados como virais, não virais e desconhecidos utilizando os programas BLASTn+ (Camacho *et al.*, 2009) e DIAMOND (Buchfink; Reuter; Drost, 2021) por meio de alinhamentos locais contra as bases de dados nt e nr (proteínas) do Genbank. Informações taxonômicas foram associados aos resultados com *scripts* do nosso grupo (https://github.com/JPbio/Metagenomics_dealing_with_blastn_diamond_results).

As *reads* processadas foram então realinhadas aos contigs classificados como virais por similaridade de sequência, utilizando Bowtie com os parâmetros -v 1 (permitindo um mismatch) e -k1 (melhor alinhamento por *read*), possibilitando a avaliação da cobertura dos contigs e dos perfis de tamanho dos pequenos RNAs.

Posteriormente, foi realizada uma busca direcionada para identificar a possível presença de arbovírus transmitidos por *Ae. aegypti* com baixa carga viral, que poderiam não ter sido montados por *de novo*. Para isso, foi criada uma referência com sequências representativas obtidas do Refseq NCBI para os seguintes vírus: DENV (NC_001477.1, NC_001474.2, NC_001475.2, NC_002640.1, NC_075403.1, NC_075435.1); ZIKV (NC_035889.1, NC_075414.1, NC_075423.1, NC_075429.1); CHIKV (NC_004162.2, NC_075020.1); YFV (NC_002031.1); Usutu vírus (NC_006551.1) e WNV (NC_001563.2, NC_009942.1).

Todas as etapas destas análises foram conduzidas em colaboração com o Dr. João Paulo Pereira de Almeida.

4.7 WESTERN BLOT

Os intestinos de *Ae. aegypti* foram dissecados em PBS 1X, imediatamente transferidos para tubos mantidos em gelo seco e armazenados a -80°C. Para lise dos tecidos, as amostras foram transferidas para o nitrogênio líquido e maceradas em homogeneizador de tecidos (Beadbeater, BioSpec) por três ciclos de congelamento e maceração por 45 segundos. As amostras foram lisadas em tampão NP-40 (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1% NP-40) suplementado com inibidores de protease e fosfatase (Sigma, 1,0 mM AEBSF, 10,0 µg/mL de leupeptina e aprotinina). Em seguida, os lisados foram homogeneizados com auxílio de seringas (agulha 29G-0.33 mm), incubados sob agitação no gelo por 30 minutos e centrifugados a 13000 x g por 15 minutos. Os sobrenadantes foram coletados e as proteínas totais quantificadas pelo método de BCA (Pierce BCA Protein Assays, Thermo Fisher Scientific), seguindo as recomendações do fabricante. Para cada extrato, 25 µg de proteínas totais foram diluídas em tampão contendo Laemmli buffer (concentração final: 32.9 mM Tris-HCl, pH 6.8, 1,05 % SDS, 13.15 % (w/v) glycerol, 0.01% bromophenol blue) e aquecidas a 95°C por 5 minutos.

As proteínas foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE). Brevemente, foram aplicados 25 µg de proteína total/amostra em um gel SDS-PAGE a 10% (eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio) para a separação das proteínas. Após a corrida, as proteínas foram transferidas para membranas de

PVDF (difluoreto de polivinilideno) utilizando transferência em tanque/úmida contendo Towbin buffer (25 mM TRIS, 192 mM glicina, 20% v/v metanol, 0,375% SDS, pH 8.3) a 25V/4°C/16 horas. A eficiência de transferência foi analisada por coloração de Ponceau e as membranas foram lavadas em TBST por 5 minutos, bloqueadas com solução de 10% de leite com baixo teor de lipídeos (desnatado) diluído em solução de tampão de TRIS-NaCl (TBS: 20 mM TRIS, 150 mM NaCl, pH 7.4) com 0,1% Tween 20 (TBST, Synth, T1028), por 1 hora à temperatura ambiente.

Para detecção de 3X-Flag:Loqs2, as membranas foram incubadas por 16 horas com anticorpo primário Anti-FLAG monoclonal (Sigma F3165, diluição 1/2000), diluído em TBST contendo 3% de leite desnatado (Molico, Nestlé), a 4°C sob agitação. No dia seguinte, o anticorpo primário foi removido, as membranas lavadas em TBST (3 ciclos de 10 minutos) e incubadas com anticorpo secundário Anti-camundongo conjugado com HRP (Millipore, diluição 1/5000), também diluído em TBST com 3% de leite desnatado, por 1 hora à temperatura ambiente sob agitação. Para detecção da proteína endógena histona H3, as membranas foram bloqueadas como descrito anteriormente e incubadas com o anti-H3 (Abcam, diluição 1/2000) em solução de anticorpo primário por 16 horas/4°C. Após a lavagem com TBST (3 ciclos de 10 minutos), as amostras foram incubadas com anticorpo secundário Anti-coelho conjugado com HRP (Bio-Rad, diluição 1/5000), também diluído em TBST com 3% de leite desnatado, por 1 hora à temperatura ambiente sob agitação. Posteriormente, as membranas foram lavadas com TBST e a detecção realizada com o reagente de detecção Amersham ECL Pirme, utilizando o sistema de quimioluminescência da plataforma Bio Rad ChemiDoc.

5 RESULTADOS

5.1 ATIVIDADE ANTIVIRAL DE LOQS2 NA INFECÇÃO POR *ORTHOFLAVIVIRUS* EM *Ae aegypti*

Estudos prévios realizados pelo nosso grupo demonstraram que Loqs2 possui uma atividade antiviral significativa na infecção por DENV em *Ae. aegypti*. No entanto, mais estudos com outros *Orthoflavivirus* serão necessários para se obter um entendimento mais amplo sobre o efeito de Loqs2 na infecção por flavivírus de forma geral. Para expandir o conhecimento sobre o papel de Loqs2, decidiu-se investigar sua atuação na infecção por ZIKV em *Ae. aegypti*, quando *Loqs2* é ectopicamente expresso no intestino médio.

5.1.1 Atividade antiviral de Loqs2 na infecção por ZIKV

Para avaliar a atividade antiviral de Loqs2 contra o ZIKV, utilizamos mosquitos transgênicos nos quais *Loqs2* foi ectopicamente expresso no intestino médio. O gene *Loqs2* foi integrado no genoma dos mosquitos sob o controle da região promotora do gene *carboxipeptidase* (*Cp*), que regula a expressão de *Loqs2* em resposta à alimentação com sangue. A linha transgênica resultante foi designada Cp.:Loqs2. Mosquitos transgênicos e selvagens, com idades entre 5 e 7 dias, foram expostos a camundongos AG129 virêmicos para ZIKV, permitindo a aquisição do vírus durante a alimentação. Após a exposição, a carga viral foi quantificada no intestino e na carcaça (restante do corpo) dos mosquitos em dois tempos distintos: 4 e 8 dias pós-infecção (dpi).

No intestino dos mosquitos, os resultados demonstraram uma redução significativa da carga viral nos mosquitos que expressam Loqs2 em comparação com os mosquitos selvagens, tanto aos 4 dpi ($p = 5,04 \times 10^{-05}$) quanto 8 dpi ($p = 0,03$), conforme análise pelo teste de U de Mann-Whitney (Figura 15.A-B). Além disso, o teste de Fisher revelou uma diminuição significativa no número de intestinos infectados com ZIKV nos mosquitos que expressam Loqs2 aos 4 dpi ($p = 0,0242$).

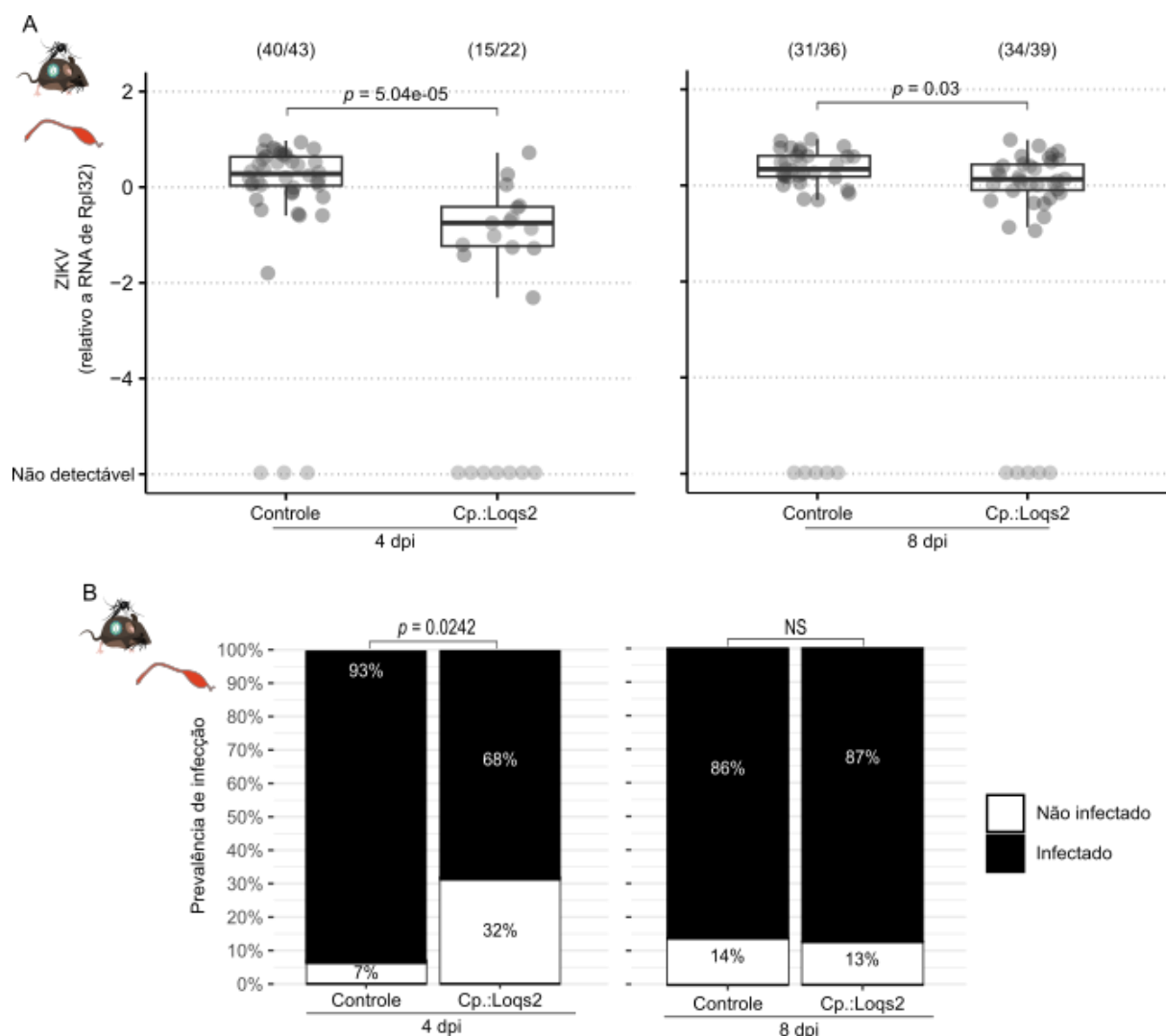


Figura 15. Efeito antiviral de Loqs2 no intestino de *Ae. Aegypti* durante a infecção por ZIKV. A. Carga viral de ZIKV no intestino de mosquitos que expressam Loqs2 (Cp.:Loqs2) em comparação com o controle (selvagem) nos tempos de 4 e 8 dpi. **B.** Prevalência de infecção por ZIKV nos intestinos avaliados em 4 e 8 dpi. Para as análises estatísticas, foi aplicado o teste de U de Mann-Whitney (A) e o teste de Fisher (B). Os valores de ΔCt foram submetidos à mediana para a construção dos gráficos. NS: não significativo (p -valor $> 0,05$).

No que se refere à carcaça, aos 4 dpi, observou-se uma tendência de redução no número de mosquitos infectados nos grupos que expressam Loqs2 no intestino, embora sem significância estatística ($p > 0,05$) (Figura 16.A). Aos 8 dpi, a carga viral de ZIKV foi significativamente menor nas carcaças dos mosquitos que expressam Loqs2 no intestino, em comparação com os controles selvagens ($p = 0,03$), conforme análise pelo teste de U de Mann-Whitney (Figura 16.B). Adicionalmente, o teste de Fisher indicou que não houve uma diminuição significativa no número de carcaças infectadas com ZIKV nos mosquitos que expressam Loqs2, tanto aos 4 dpi quanto 8 dpi. No geral, os resultados indicaram que, apesar da prevalência da infecção sistêmica por ZIKV não tenha apresentado redução significativa, Loqs2 foi capaz de reduzir a carga viral nos mosquitos que apresentaram infecção na carcaça.

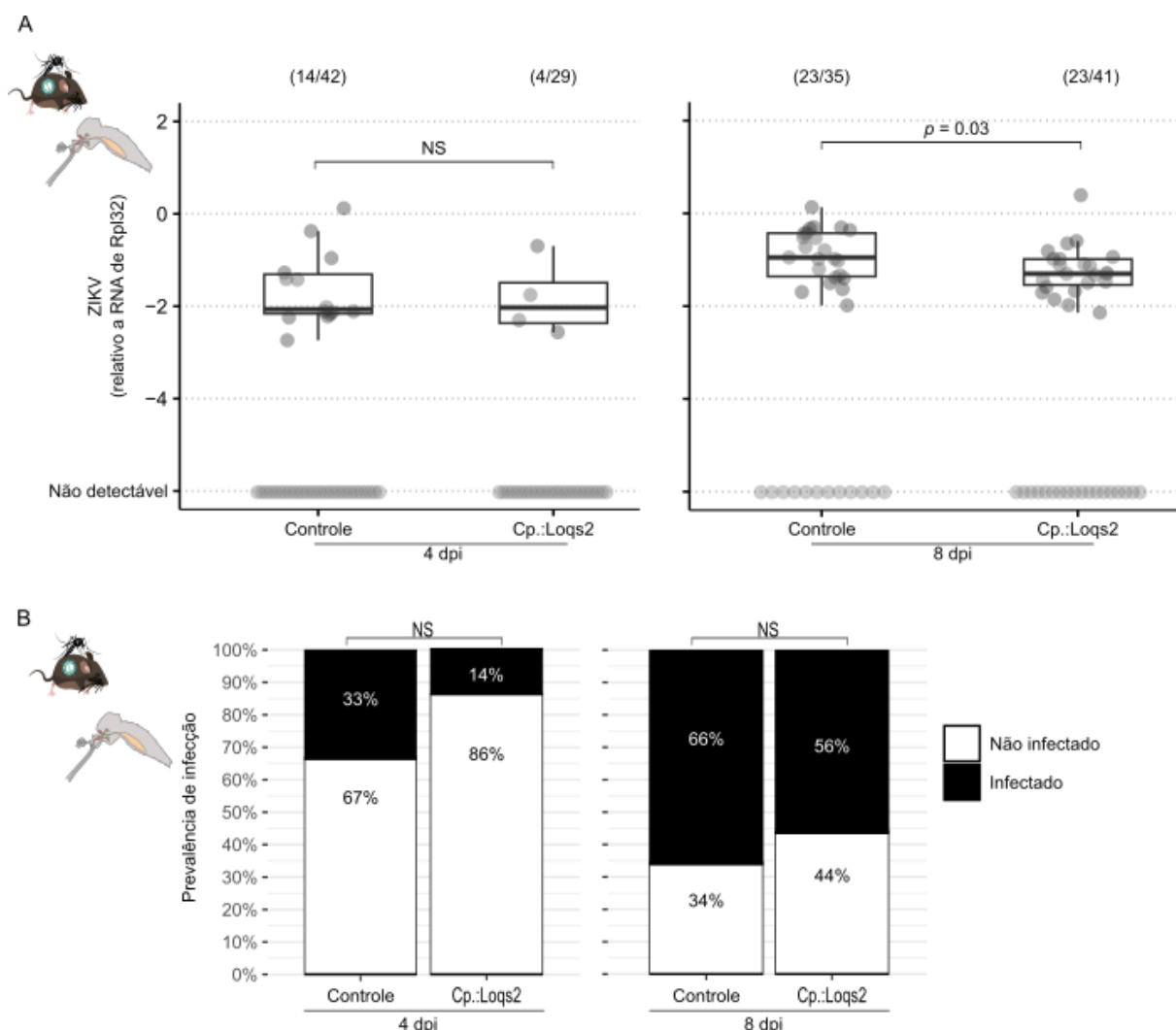


Figura 16. Efeito antiviral de Loqs2 na carcaça de *Ae. aegypti* durante a infecção por ZIKV. A. Carga viral de ZIKV na carcaça de mosquitos que expressam Loqs2 no intestino em comparação com o controle (selvagem) nos tempos de 4 e 8 dpi. B. Prevalência de infecção por ZIKV nas carcaças avaliados em 4 e 8 dpi. Para as análises estatísticas, foi aplicado o teste de U de Mann-Whitney (A) e o teste de Fisher (B). Os valores de ΔC_t foram submetidos à mediana para a construção dos gráficos. NS: não significativo (p -valor $> 0,05$).

5.2 ATIVIDADE ANTIVIRAL DE LOQS2 NA INFECÇÃO POR *ALPHAVIRUS* EM *Ae. aegypti*

Após demonstrar que a expressão ectópica de Loqs2 no intestino de *Ae. aegypti* confere proteção antiviral contra ZIKV, investigamos se esse efeito se estende a outros grupos virais de relevância médica. Para avaliar a amplitude da atividade antiviral de Loqs2, selecionamos dois *Alphavirus* distintos: CHIKV e MAYV. Essa escolha permitiu testar se a capacidade inibitória de Loqs2 é restrita aos *Orthoflavivirus* ou se representa um mecanismo de defesa mais amplo, capaz de interferir na replicação de vírus com diferentes estratégias replicativas e características estruturais. A inclusão desses dois *Alphavirus* também possibilitou avaliar se o efeito protetor

é consistente entre membros da mesma família, mas com particularidades evolutivas e patogênicas distintas.

5.2.1. Atividade antiviral de Loqs2 na infecção por Chikungunya vírus

Para avaliar a atividade antiviral de Loqs2 contra CHIKV, utilizamos a alimentação artificial em membrana. Isso foi necessário, uma vez que a infecção por CHIKV em camundongos AG129 ainda não está completamente padronizada em nosso laboratório, o que, em algumas ocasiões, resulta em uma morte rápida dos camundongos após a inoculação do vírus, dificultando a obtenção de sangue de camundongos virêmicos para alimentar os mosquitos.

Mosquitos transgênicos expressando Loqs2 no intestino e mosquitos selvagens foram expostos a sangue total humano contendo CHIKV, com uma titulação final de $3,5 \times 10^6$ PFU/mL. Os resultados demonstraram que todos os mosquitos apresentaram intestinos infectados com CHIKV aos 4 dpi (Figura 17.B). No entanto, observou-se uma redução significativa na carga viral nos intestinos dos mosquitos que expressam Loqs2, em comparação com os controles selvagens ($p = 0,03$), conforme análise pelo teste de U de Mann-Whitney (Figura 17.A). Esses resultados sugerem que, em tempos iniciais de infecção, Loqs2 é capaz de limitar a carga viral nos intestinos dos mosquitos. Contudo, aos 8 dpi, não foi observada atividade antiviral de Loqs2, indicando que o efeito é transiente e restrito ao início da infecção.

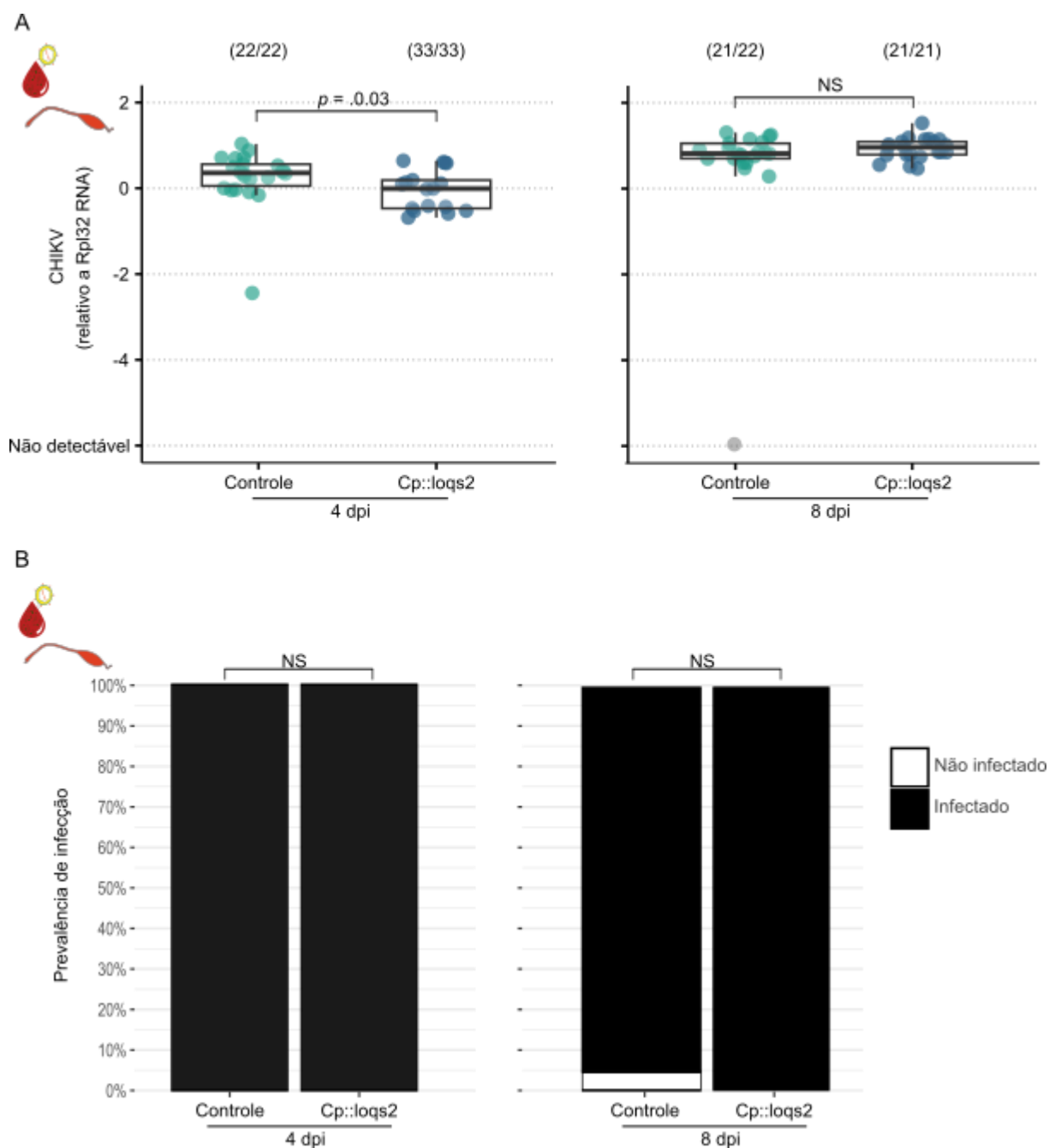


Figura 17. Efeito antiviral de Loqs2 no intestino de *Ae. aegypti* durante a infecção por CHIKV. A. Carga viral de CHIKV no intestino de mosquitos que expressam Loqs2 no intestino (Cp::Loqs2) em comparação com o controle (selvagem) nos tempos de 4 e 8 dpi. **B.** Prevalência de infecção por CHIKV nos intestinos avaliados em 4 e 8 dpi. Para as análises estatísticas, foi aplicado o teste de U de Mann-Whitney (A) e o teste de Fisher (B). Os valores de ΔC_t foram submetidos à mediana para a construção dos gráficos. NS: não significativo (p -valor $> 0,05$).

Quando analisamos a carcaça, observou-se que atividade antiviral de Loqs2 aos 4 dpi, com uma redução significativa da carga viral de CHIKV nos mosquitos que expressam Loqs2 no intestino em comparação com os controles selvagens, conforme análise pelo teste de U de Mann-Whitney ($p = 1,10 \times 10^{-03}$). No entanto, aos 8 dpi, houve um aumento significativo da carga viral nas carcaças do grupo que expressa Loqs2 em comparação com o grupo controle

(Figura 18.A). Além disso, todas as carcaças estavam infectadas com CHIKV nesse mesmo tempo.

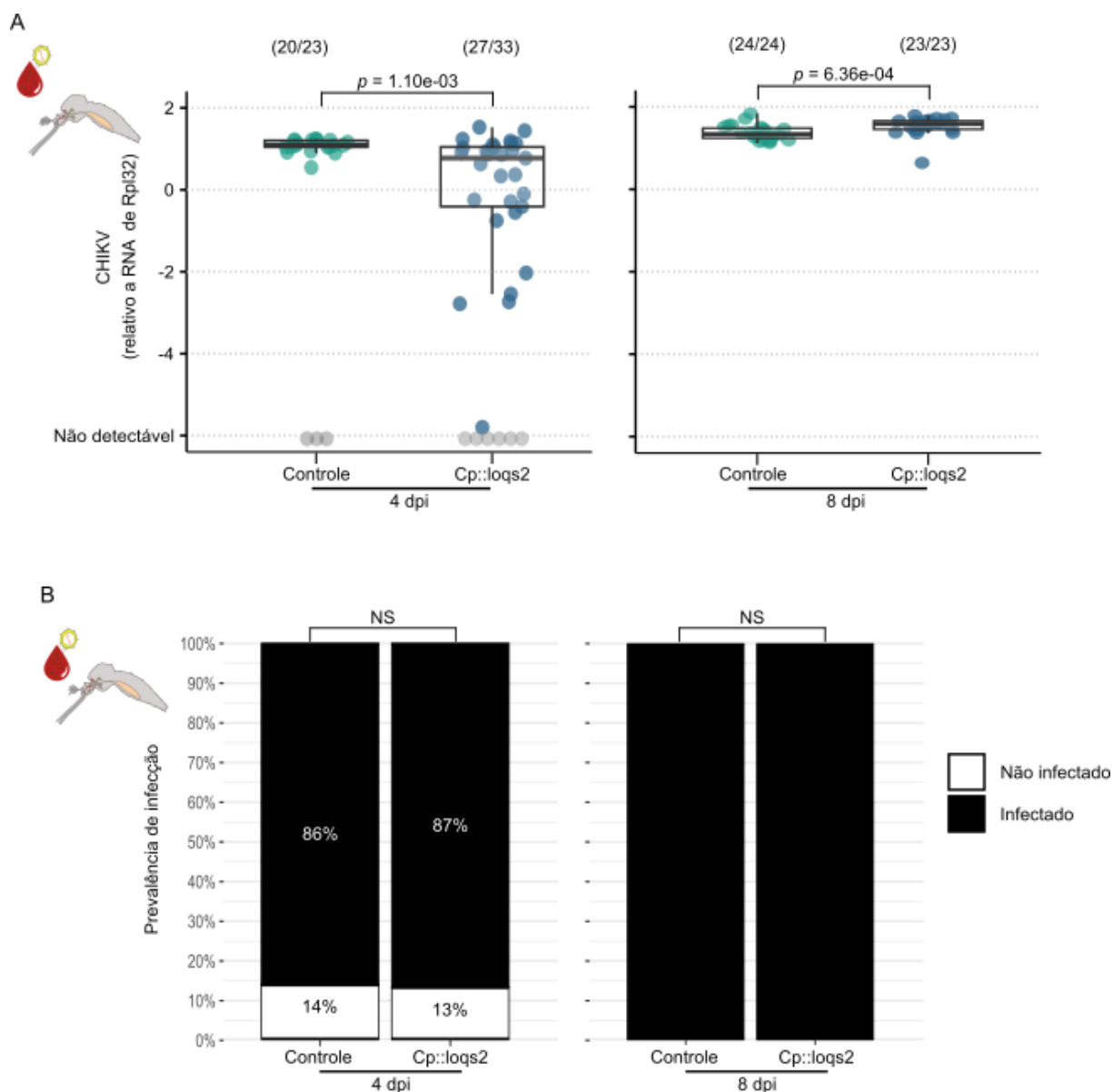


Figura 18. Efeito antiviral de Loqs2 na carcaça de *Ae. aegypti* durante a infecção por CHIKV. A. Carga viral de CHIKV na carcaça de mosquitos que expressam Loqs2 no intestino (Cp::Loqs2) em comparação com o controle (selvagem) nos tempos de 4 e 8 dpi. **B.** Prevalência de infecção por CHIKV nas carcaças avaliados em 4 e 8 dpi. Para as análises estatísticas, foi aplicado o teste de U de Mann-Whitney (A) e o teste de Fisher (B). Os valores de ΔC_t foram submetidos à mediana para a construção dos gráficos. NS: não significativo (p -valor > 0,05).

Os resultados, de um modo geral, demonstram que, em tempos iniciais de infecção, a expressão ectópica de Loqs2 no intestino é capaz de limitar a carga viral inicial nos mosquitos. Contudo, em tempos mais avançados da infecção, como observado aos 8 dpi, Loqs2 não consegue mais controlar a disseminação viral, resultando em um aumento significativo da carga viral nas carcaças dos mosquitos, especialmente no grupo que expressa Loqs2 no intestino.

Esses achados sugerem que o efeito antiviral de Loqs2 é transiente, restrito ao início da infecção, e não é suficiente para controlar a replicação viral em estágios mais avançados da infecção.

Esse resultado pode estar relacionado à saturação do sistema de defesa dos mosquitos, provocada pela alta titulação viral utilizada no experimento. A elevada carga viral inicial pode ter sobrecarregado o sistema imunológico do mosquito, resultando na perda de controle da replicação viral e, conseqüentemente, na disseminação desregulada do vírus nas carcaças. Desde o início das análises, aos 4 dpi, observou-se que todos os intestinos estavam infectados (Figura 17.B), o que reforça a hipótese de saturação. Para evitar esse problema, optou-se por avaliar a infecção por CHIKV em diferentes diluições e tempos (3 e 6 dpi), com o intuito de evitar a saturação e obter uma análise mais precisa da atividade antiviral de Loqs2.

Dessa forma, os mosquitos Cp.:Loqs2 e selvagens foram expostos a sangue total humano contendo CHIKV em diferentes titulações virais: $3,5 \times 10^6$ PFU/mL, 7×10^5 PFU/mL e 7×10^4 PFU/mL, respectivamente. As análises foram realizadas aos 3 e 6 dpi (Figura 19 e 20). No intestino dos mosquitos que expressam Loqs2, não foi observada atividade antiviral significativa na carga viral aos 3 e 6 dpi, independentemente da titulação utilizada (Figura 19.A). No entanto, ao avaliar a prevalência de infecção, observou-se uma tendência de redução no número de intestinos infectados aos 3 dpi na maior titulação ($3,5 \times 10^6$ PFU/mL) (Figura 19.B). Para a titulação intermediária (7×10^5 PFU/mL), observou-se uma tendência de aumento no número de intestinos infectados em 3 dpi, mas com uma tendência de redução aos 6 dpi (Figura 19.B). Já na menor titulação (7×10^4 PFU/mL), observou-se uma tendência de redução no número de intestinos infectados em comparação com os selvagens, com um efeito antiviral significativo de Loqs2 aos 6 dpi ($p = 0,0129$) (Figura 19.B).

Quanto à carcaça, observou-se uma tendência de diminuição da carga viral de CHIKV nas carcaças oriundas de intestinos que expressam Loqs2 nas titulações analisadas em 3 dpi (Figura 20.A). Essa tendência sugere que a expressão de Loqs2 pode estar associada a um controle inicial da infecção, possivelmente por meio da modulação da resposta imune inata do mosquito. No entanto, a ausência de significância estatística pode estar relacionada à variabilidade biológica ou ao tamanho amostral. Na menor titulação (7×10^4 PFU/mL), nenhuma infecção foi detectada nas carcaças provenientes de mosquitos que expressam Loqs2 no intestino aos 3 dpi, o que era esperado, uma vez que pode estar relacionando à menor carga viral adquirida. Esse resultado é consistente com o fato de que houve poucos intestinos infectados nesse grupo (Figura 19.B e Figura 20.B).

Enquanto à taxa de detecção viral, observou-se uma redução significativa no número de carcaças infectadas proveniente de mosquitos que expressam Loqs2 no intestino em 6 dpi na titulação 7×10^4 PFU/mL ($p = 0,0234$; Figura 21.B). Nas outras titulações ($3,5 \times 10^6$ PFU/mL e 7×10^5 PFU/mL), observou-se uma tendência de diminuição no número de carcaças infectadas nos tempos analisados, exceto na titulação mais alta ($3,5 \times 10^6$ PFU/mL) aos 6 dpi, onde não foi observada redução (Figura 21.B). Essa variação pode estar relacionada à capacidade do vírus de escapar do controle mediado por Loqs2 em cargas virais mais altas, onde a replicação viral é mais intensa e pode sobrecarregar o sistema de defesa do mosquito.

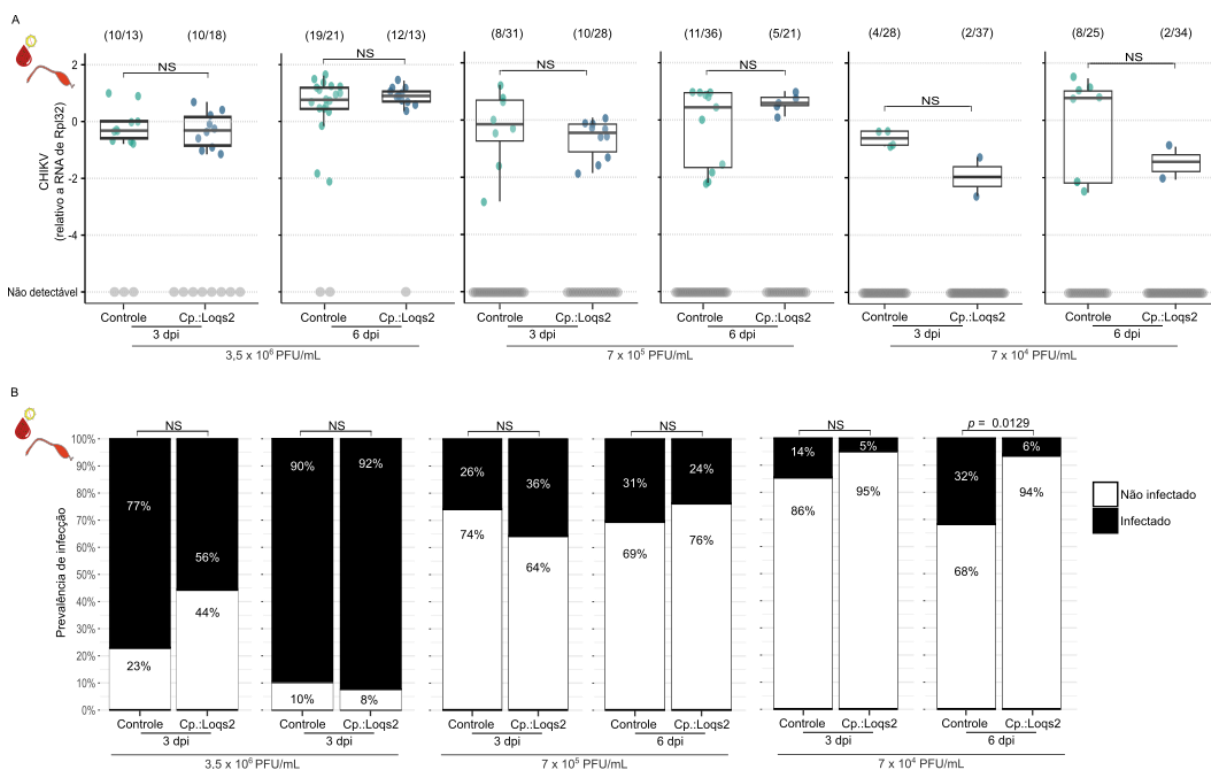


Figura 19. Efeito antiviral de Loqs2 na infecção por CHIKV no intestino de *Ae. aegypti* aos 3 e 6 dpi. A. Carga viral nos intestinos que expressam Loqs2 (Cp.:Loqs2) em comparação com o controle (selvagem) no tempo de 3 e 6 dpi na titulação viral $3,5 \times 10^6$ PFU/mL, 7×10^5 PFU/mL e 7×10^4 PFU/mL. **B.** Prevalência de infecção por CHIKV nos intestinos que expressam Loqs2 (Cp.:Loqs2) em comparação com o controle (selvagem) no tempo de 3 e 6 dpi na titulação viral $3,5 \times 10^6$ PFU/mL, 7×10^5 PFU/mL e 7×10^4 PFU/mL. Para as análises estatísticas, foi aplicado o teste de U de Mann-Whitney (A) e o teste de Fisher (B). Os valores de ΔCt foram submetidos à mediana para a construção dos gráficos. NS: não significativo (p -valor $> 0,05$).

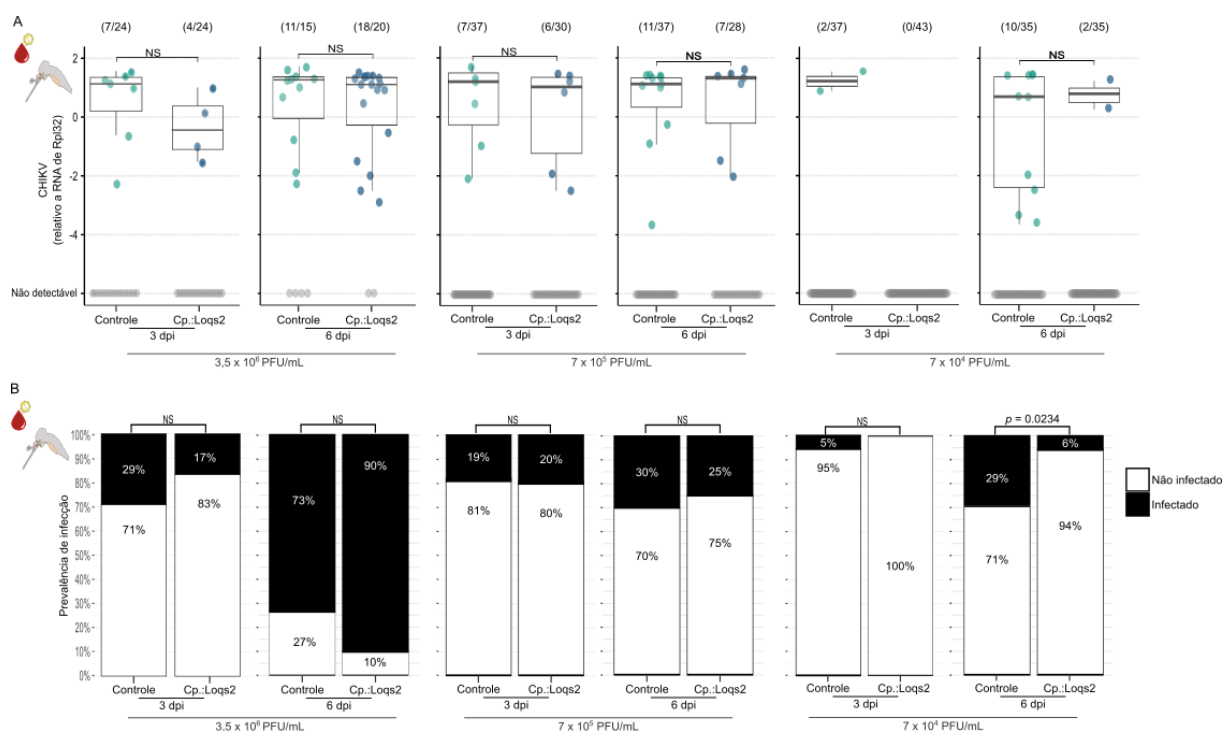


Figura 20. Efeito antiviral de Loqs2 durante a infecção por CHIKV na carcaça de *Ae. aegypti* aos 3 e 6 dpi. **A.** Carga viral das carcaças de mosquitos que expressam Loqs2 (Cp::Loqs2) no intestino em comparação com o controle (selvagem) no tempo de 3 e 6 dpi na titulação viral $3,5 \times 10^6$ PFU/mL, 7×10^5 PFU/mL e 7×10^4 PFU/mL. **B.** Prevalência de infecção por CHIKV nas carcaças provenientes de intestinos que expressam Loqs2 (Cp::Loqs2) em comparação com o controle (selvagem) no tempo de 3 e 6 dpi na titulação viral $3,5 \times 10^6$ PFU/mL, 7×10^5 PFU/mL e 7×10^4 PFU/mL. Para as análises estatísticas, foi aplicado o teste de U de Mann-Whitney (A) e o teste de Fisher (B). Os valores de ΔC_t foram submetidos à mediana para a construção dos gráficos. NS: não significativo (p -valor > 0,05).

5.2.2 Atividade antiviral de Loqs2 na infecção por Mayaro vírus

Após a análise da atividade antiviral de Loqs2 durante a infecção por CHIKV, expandimos nossas investigações para outro arbovírus da família *Togaviridae*, o MAYV, com o intuito de avaliar se o efeito antiviral de Loqs2 é consistente em diferentes membros dessa família viral. Para isso, utilizamos a mesma metodologia empregada nos experimentos com CHIKV, a fim de garantir a comparabilidade dos dados. Vale destacar que a avaliação da atividade de Loqs2 na infecção pelo MAYV se constitui como um estudo preliminar, realizado como experimento piloto, com um tamanho amostral limitado e ausência de réplicas experimentais. Esses fatores devem ser levados em consideração na interpretação dos resultados, uma vez que o tamanho amostral reduzido pode comprometer a robustez estatística e a generalização dos achados.

Os mosquitos *Ae. aegypti* foram alimentados com sangue total contendo MAYV em uma titulação final de $2,9 \times 10^6$ PFU/mL, sendo realizadas avaliações em dois esquemas temporais distintos: 3 e 6 dpi, seguidos de novas coletas aos 4 e 8 dpi. O uso de diferentes

pontos temporais visa avaliar a dinâmica de controle viral mediada por Loqs2 em momentos críticos da infecção, desde os estágios iniciais até os mais avançados.

Nos intestinos dos mosquitos, embora não tenha sido observada uma redução significativa da carga viral no grupo que expressa Loqs2 (Figura 21.A), verificou-se uma tendência consistente de diminuição da carga viral nos tempos analisados. Essa tendência sugere que, apesar da ausência de significância estatística, Loqs2 pode exercer algum efeito inibitório sobre a replicação do vírus, especialmente em estágios iniciais da infecção. No entanto, a prevalência de infecção foi maior no grupo de mosquitos que expressam Loqs2, com um aumento significativo no número de intestinos infectados, particularmente aos 4 dpi ($p = 0,0259$; Figura 21.B). Esses resultados indicam que, apesar de uma possível atividade antiviral, a expressão ectópica de Loqs2 no intestino pode não ser suficiente para controlar a infecção viral de maneira eficaz, possivelmente devido à saturação do sistema de defesa antiviral do mosquito ou à incapacidade do mecanismo de Loqs2 de gerenciar a carga viral em tempos mais avançados da infecção.

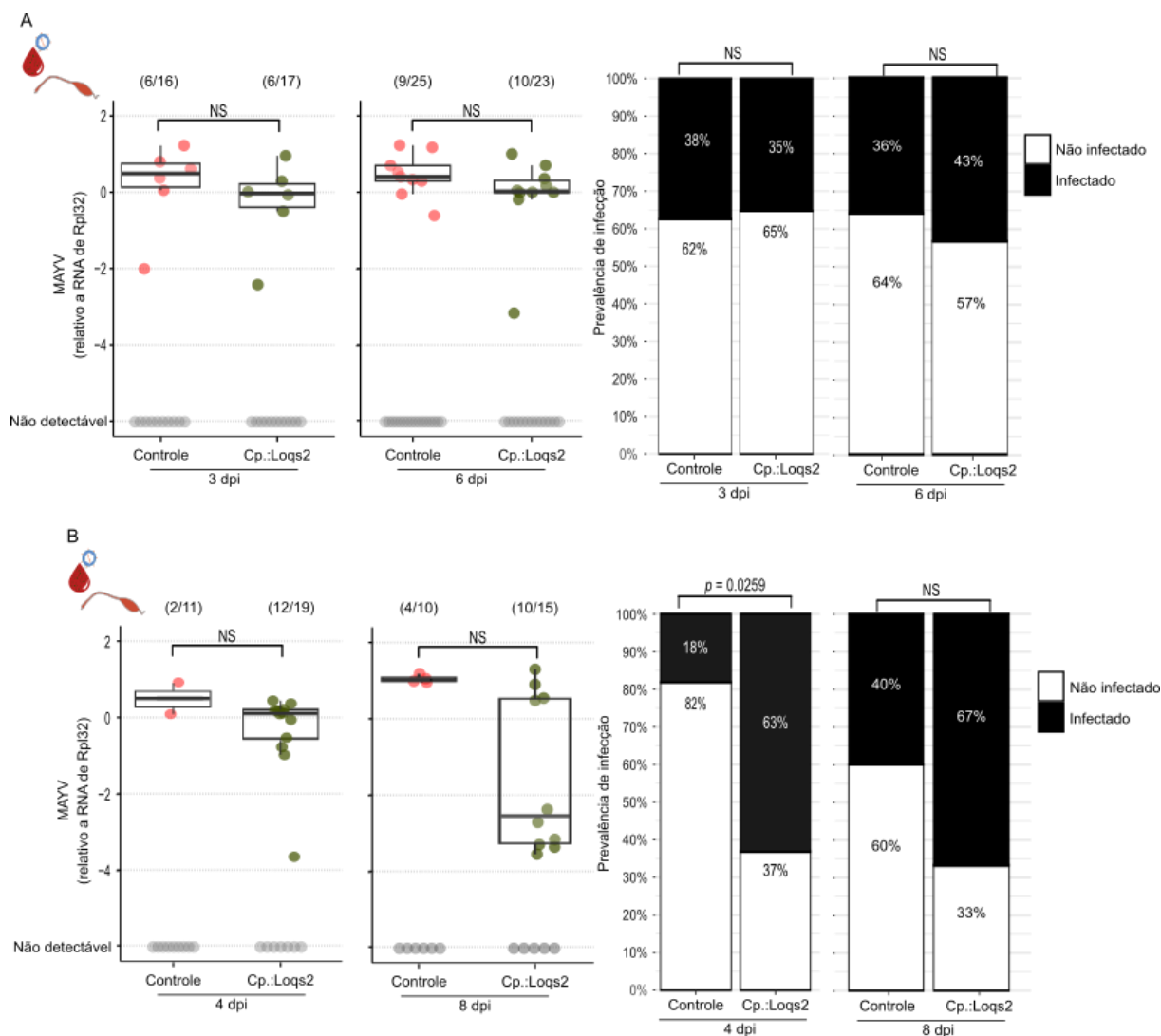


Figura 21. Efeito antiviral de Loqs2 na infecção por MAYV no intestino de *Ae. aegypti*. A. Carga viral e prevalência de infecção por MAYV nos intestinos que expressam Loqs2 (Cp::Loqs2) em comparação com o controle (selvagem) nos tempos de 3 e 6 dpi. B. Carga viral e prevalência de infecção por MAYV nos intestinos que expressam Loqs2 (Cp::Loqs2) em comparação com o controle (selvagem) nos tempos de 4 e 8 dpi. Para as análises estatísticas, foi aplicado o teste de U de Mann-Whitney (carga viral) e o teste de Fisher (prevalência de infecção). Os valores de ΔC_t foram submetidos à mediana para a construção dos gráficos. NS: não significativo (p -valor $> 0,05$).

Em relação à taxa de disseminação do MAYV do intestino para os tecidos restantes dos mosquitos (Figura 22.A), observamos que poucas carcaças apresentaram infecção detectável aos 3 e 4 dpi, tanto no grupo controle quanto no grupo Cp::Loqs2. No entanto, aos 6 dpi, observou-se uma tendência de aumento na carga viral nas carcaças dos mosquitos que expressam Loqs2 no intestino, acompanhada de uma tendência de diminuição no número de carcaças infectadas com MAYV (Figura 22.B). Esses resultados, aparentemente contraditórios, podem refletir variações biológicas associadas ao número reduzido de amostras analisadas neste estudo piloto, o que limita a robustez das conclusões. Além disso, os dados sugerem que a resposta do *Ae. aegypti* ao MAYV pode ser distinta daquela observada para o CHIKV, embora

estudos adicionais com maior poder estatístico sejam necessários para confirmar estas observações.

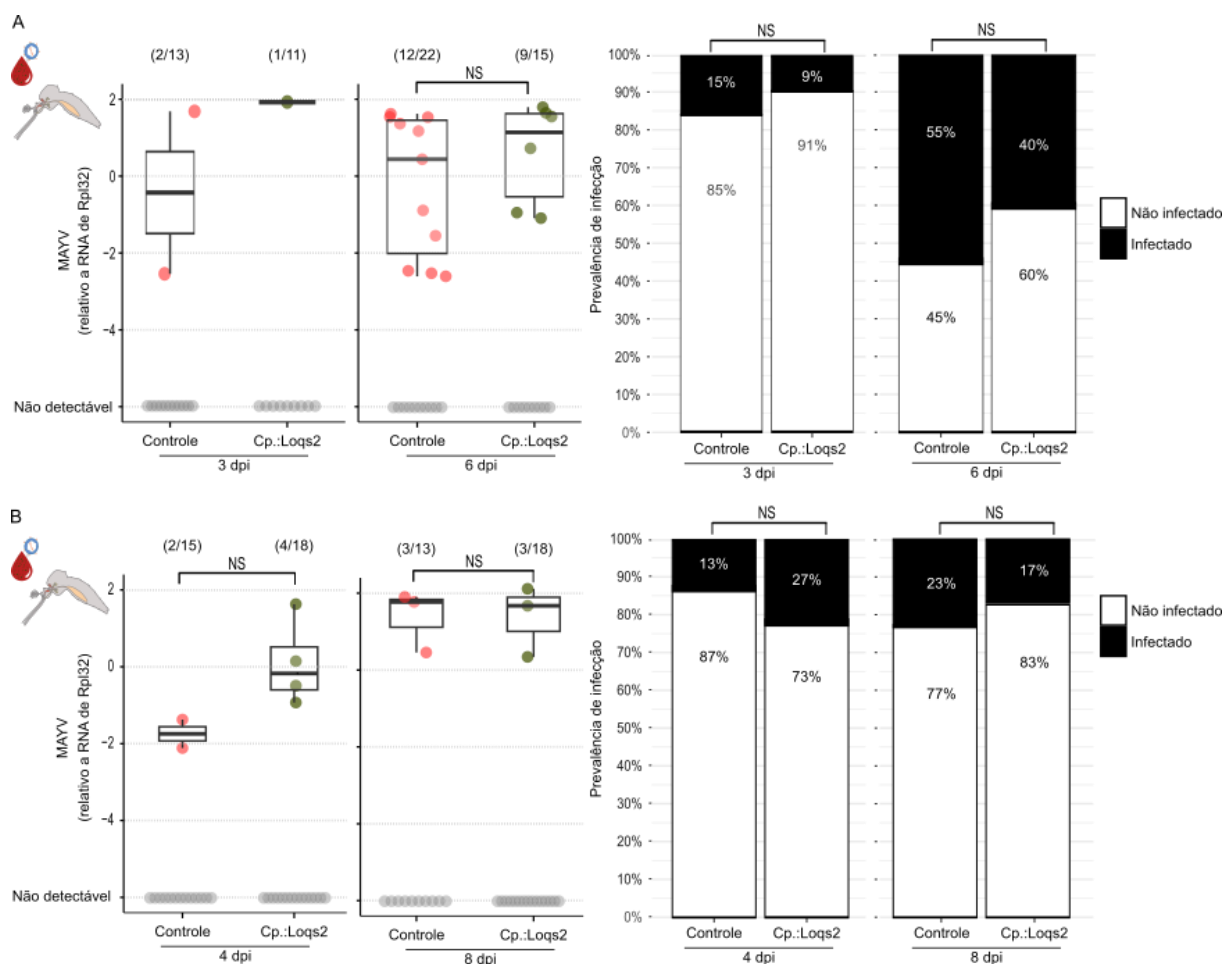


Figura 22. Efeito antiviral de Loqs2 na infecção por MAYV na carcaça de *Ae. aegypti*. A. Carga viral e prevalência de infecção por MAYV nas carcaças de mosquitos que expressam Loqs2 no intestino (Cp.:Loqs2) em comparação com o controle (selvagem) nos tempos de 3 e 6 dpi. B. Carga viral e prevalência de infecção por MAYV nas carcaças de mosquitos que expressam Loqs2 no intestino (Cp.:Loqs2) em comparação com o controle (selvagem) nos tempos de 4 e 8 dpi. Para as análises estatísticas, foi aplicado o teste de U de Mann-Whitney (carga viral) e o teste de Fisher (prevalência de infecção). Os valores de ΔC_t foram submetidos à mediana para a construção dos gráficos. NS: não significativo (p -valor > 0,05).

Embora esses resultados forneçam pistas interessantes, é importante ressaltar que estudos subsequentes, com um maior número de amostras e com maior poder estatístico, serão necessários para validar essas observações e para determinar se a expressão ectópica de Loqs2 pode de fato influenciar a disseminação do MAYV de forma diferente em comparação ao CHIKV. Esses estudos também deverão investigar mais profundamente os mecanismos subjacentes a essas diferenças, considerando a complexidade das interações entre o mosquito vetor, os arbovírus e os fatores de defesa antiviral mediada por Loqs2.

5.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL DE LOQS2 EM POPULAÇÕES DE *Ae. aegypti* COM FUNDO GENÉTICO DE POPULAÇÕES DE CAMPO BRASILEIRAS

Embora nossos estudos indiquem que a expressão ectópica de Loqs2 não apresente um efeito antiviral generalista, os resultados de forma consistente demonstram sua eficácia contra flavivírus. Neste estudo, mostramos sua eficácia contra o ZIKV, enquanto pesquisas anteriores realizadas pelo nosso grupo já evidenciaram sua ação contra o DENV (Olmo et al., 2018). No entanto, é importante destacar que esses experimentos foram realizados em mosquitos transgênicos com o fundo genético de uma linhagem de laboratório, a linhagem Bangkok, que está no laboratório há muitas gerações. Essa longa adaptação ao ambiente de laboratório pode ter levado à seleção de características que favorecem a sobrevivência nessas condições, além de acumular mutações devido à consanguinidade e à deriva genética associada ao pequeno número de indivíduos nas populações mantidas em laboratório. Além disso, a diminuição da exposição a patógenos, incluindo vírus, pode ter provocado mudanças na composição genética dessas populações em relação às populações de campo, como resultado do relaxamento na seleção natural.

5.3.1. Geração de linhagens de mosquitos transgênicos com fundo genético de populações de campo brasileiras com expressão de Loqs2 no intestino médio

Para responder de maneira mais robusta se a expressão ectópica de Loqs2 no intestino pode ser uma estratégia viável para reduzir a infecção e, consequentemente, a transmissão de arbovírus em condições naturais em território brasileiro, realizamos o retrocruzamento dos mosquitos transgênicos com fundo genético de Bangkok com mosquitos provenientes de populações de campo brasileiras. Nossas análises da atividade antiviral de Loqs2 contra CHIKV, MAYV e ZIKV demonstraram que, até o momento, sua ação parece ser específica para vírus do gênero *Orthoflavivirus*, como ZIKV e DENV, em *Ae. aegypti* com expressão de Loqs2 no intestino e fundo genético de Bangkok (Olmo et al., 2018). Com base nesses achados, decidimos expandir nossas investigações para avaliar a atividade de Loqs2 contra ZIKV em uma população geneticamente similar do Brasil. Essa escolha foi fundamentada por dados anteriores, que indicam variações na suscetibilidade à infecção por DENV e CHIKV entre populações de *Ae. aegypti* provenientes de diferentes cidades do Brasil (de Freitas *et al.*, 2024, 2025). Para isso, realizamos retrocruzamentos por 10 gerações entre a linhagem de *Ae. aegypti* que expressa Loqs2 no intestino e mosquitos de campo coletados em Belo Horizonte, Minas

Gerais. O objetivo foi obter uma linhagem com expressão intestinal de Loqs2, mas com um fundo genético de campo, permitindo assim uma avaliação mais abrangente da atividade.

5.3.2 Avaliação da atividade antiviral de Loqs2 em mosquitos com fundo genético de campo

Após obtenção da linhagem, realizamos a infecção com ZIKV em três grupos distintos: (1) mosquitos transgênicos (Cp.:Loqs2 retrocruzados), (2) controles retrocruzados (mosquitos de campo retrocruzados sem expressão de Loqs2 no intestino), e (3) controles selvagens (mosquitos de campo não retrocruzados sem expressão de Loqs2 no intestino). A infecção foi realizada meio da alimentação sanguínea em camundongo previamente infectado. Aos 4 e 8 dpi, os mosquitos foram dissecados para separação do intestino e carcaça, permitindo a quantificação da carga e determinação da taxa de infecção desses tecidos, com o objetivo de avaliar a atividade antiviral de Loqs2.

Os resultados demonstraram uma tendência de redução na carga viral nos intestinos dos mosquitos Cp.:Loqs2 retrocruzados em comparação com os controles aos 4 dpi, embora esta diferença não tenha alcançado significância estatística (Figura 23.A). Entretanto, essa tendência não foi mantida em 8 dpi, quando não observamos nenhuma redução da carga viral no grupo Cp.:Loqs2 retrocruzados. O mesmo padrão foi observado na prevalência de infecção, que não apresentou diferenças significativas entre os grupos experimentais em nenhum dos tempos analisados (Figura 23.B).

Quanto à carcaça, observamos baixa taxa de infecção aos 4 dpi em todos os grupos, especialmente o grupo Cp.:Loqs2 retrocruzados (Figura 24.B), embora essa diferença não tenha alcançado significância estatística. Aos 8 dpi, notou-se uma tendência de redução da carga viral nas carcaças dos mosquitos expressando Loqs2 no intestino quando comparado aos controles (Figura 24.A). No entanto, essa diminuição novamente não foi estatisticamente significativa.

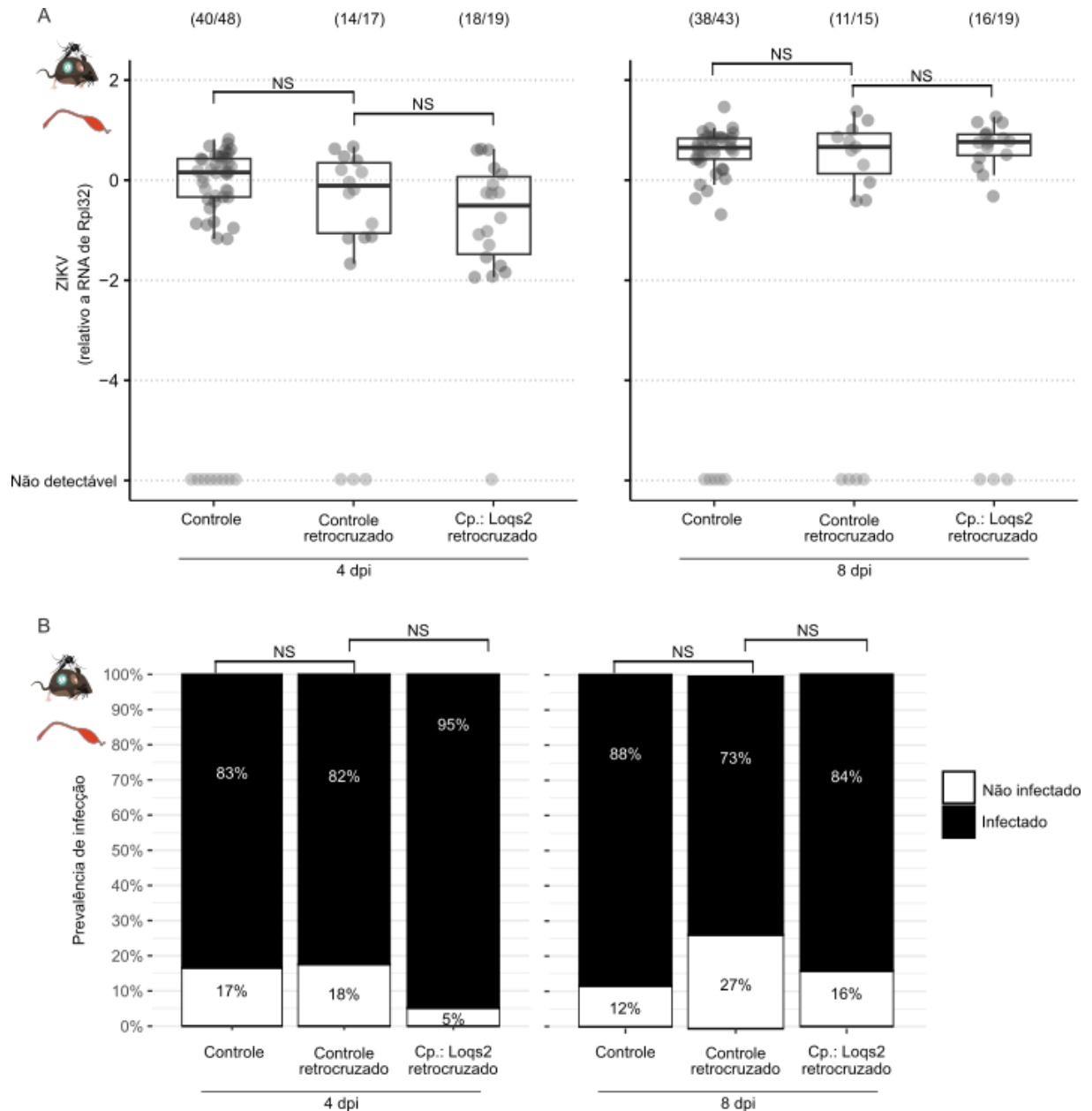


Figura 23. Efeito antiviral de Loqs2 no intestino na infecção por ZIKV em *Ae. aegypti* com fundo genético de campo. A. Carga viral relativa de ZIKV nos intestinos de mosquitos aos 4 e 8 dpi. Comparação entre: Cp.:Loqs2 retrocruzado (expressão de Loqs2 no intestino), controle retrocruzado (fundo genético similar sem expressão de Loqs2) e o controle (não retrocruzado). B. Prevalência de infecção no intestino por ZIKV nos grupos experimentais aos 4 e 8 dpi. Para as análises estatísticas, foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis (A) e o teste de Fisher (B). Os valores de ΔC_t foram submetidos à mediana para a construção dos gráficos. NS: não significativo (p -valor $> 0,05$).

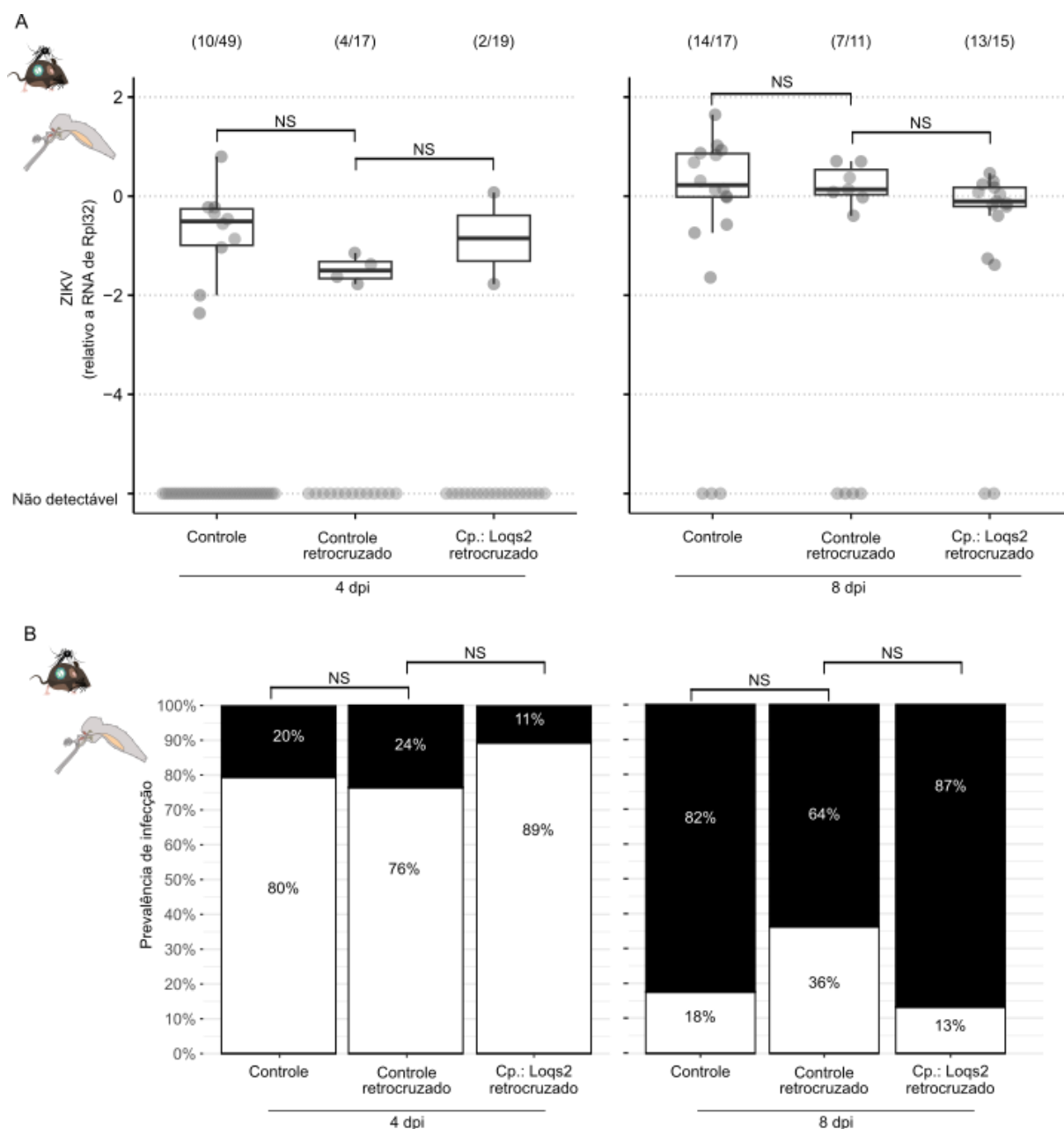


Figura 24. Efeito antiviral de Loqs2 na carga viral na infecção por ZIKV em *Ae. aegypti* com fundo genético de campo. A. Carga viral relativa de ZIKV na carcaça de mosquitos aos 4 e 8 dpi. Comparação entre: Cp.:Loqs2 retrocruzado (expressão de Loqs2 no intestino), controle retrocruzado (fundo genético similar sem expressão de Loqs2) e o controle (não retrocruzado). B. Prevalência de infecção no intestino por ZIKV nos grupos experimentais em 4 e 8 dpi. Para as análises estatísticas, foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis (A) e o teste de Fisher (B). Os valores de ΔC_t foram submetidos à mediana para a construção dos gráficos. NS: não significativo (p -valor $> 0,05$).

5.3.3. Caracterização dos vírus específicos de insetos (ISVs) das linhagens transgênicas (Cp.:Loqs2) com fundo genético de campo

Após avaliarmos a atividade antiviral de Loqs2 nos grupos retrocruzados, realizamos o sequenciamento de pequenos RNAs para detecção de vírus específicos de insetos (ISVs) nos mosquitos de campo. Esta análise é fundamental, uma vez que nosso grupo demonstrou que

determinados ISVs, como Phasi Charoen-like vírus (PCLV) e o Humaita-Tubiacanga (HTV), podem modular positivamente a replicação de ZIKV e DENV em *Ae. aegypti* (Olmo *et al.*, 2023). Com base nesses achados, levantamos a hipótese de que a presença de ISVs poderiam interferir na atividade antiviral de Loqs2, possivelmente reduzindo sua eficiência na inibição da replicação viral.

O sequenciamento de pequenos RNAs revelou a presença de três vírus específicos de insetos (ISVs) na população de mosquitos de Belo Horizonte: PCLV, HTV e Lactea totivirus (LTV) (Tabela 2; Figura 25; Tabelas Suplementares S1-S2).

Tabela 2. Resumo dos contigs virais e não virais obtidos após o sequenciamento de pequenos RNAs

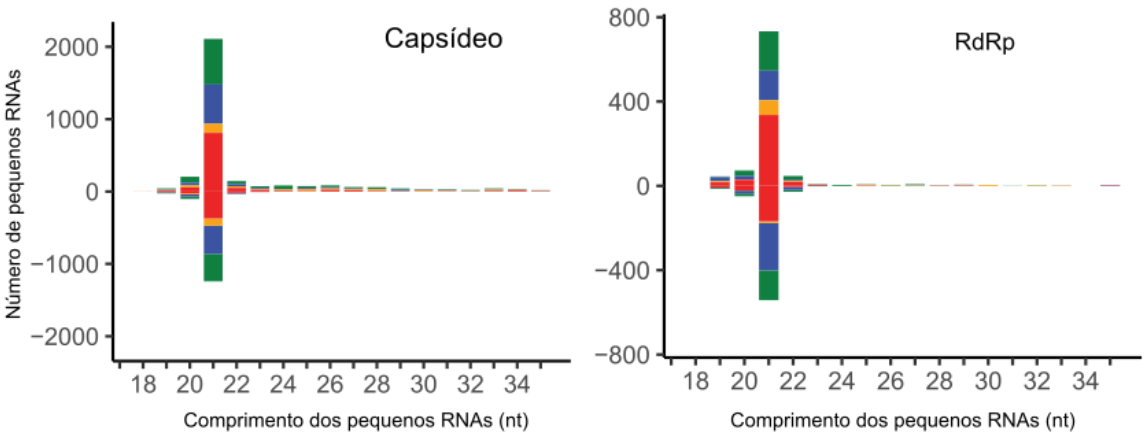
Bibliotecas	Descrição	Nº de mosquitos (pools)	Reads brutas	Reads filtradas	Contigs >200 nt	Nº de contigs virais	Nº de contigs não virais	Nº de contigs desconhecidos	Vírus replicantes*
SNBN688	Machos	24	17931389	12664504	195	37	121	37	28
SNBN689	Machos	24	24738145	16484966	356	52	223	81	28
SNBN690	Fêmeas	24	12697355	9002951	476	60	288	128	33
SNBN691	Fêmeas	24	16377442	13110622	882	93	519	270	45

*Curadoria realizada com o BLASTn+ e DIAMOND para identificação de vírus com base nos perfis de RNAs, indicando replicação viral ativa nos mosquitos.

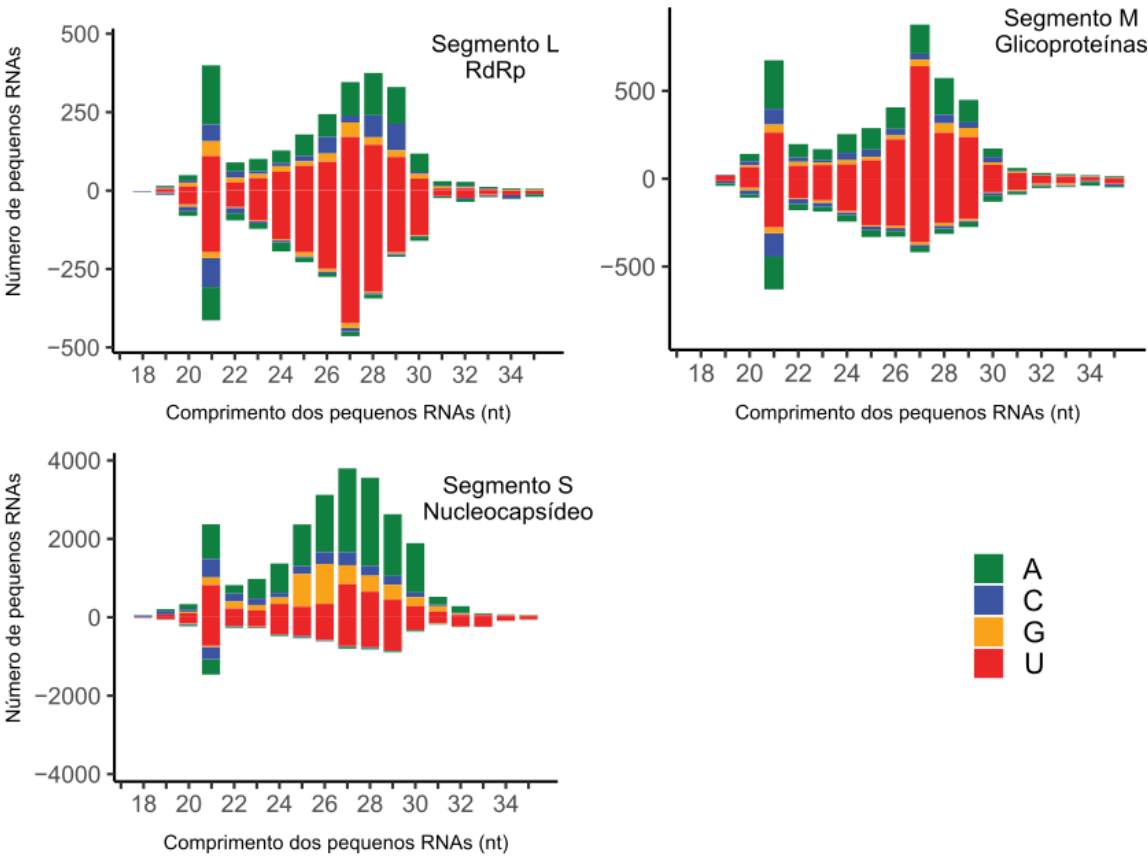
A detecção de pequenos RNAs de 21 nt, característicos de siRNAs, tanto para PCLV quanto para HTV, demonstra a ocorrência de replicação viral ativa e a ativação da via de RNA de interferência como mecanismo antiviral. Particularmente relevante foi a observação de que apenas o PCLV apresentou perfis característicos de piRNAs (24-29 nt), indicando um tropismo viral diferenciado e sugerindo uma interação específica com componentes da via Piwi do mosquito.

Em contraste, o LTV não apresentou um padrão definido de pequenos RNAs antivirais, o que dificultou sua caracterização por esta abordagem. Essa ausência de assinatura molecular sugere que o LTV possa estar presente em estágios não replicativos ou em carga viral abaixo do limite de detecção pelo método.

Humaita-Tubiacanga virus



Phasi Charoen-like virus



Lactea totivirus

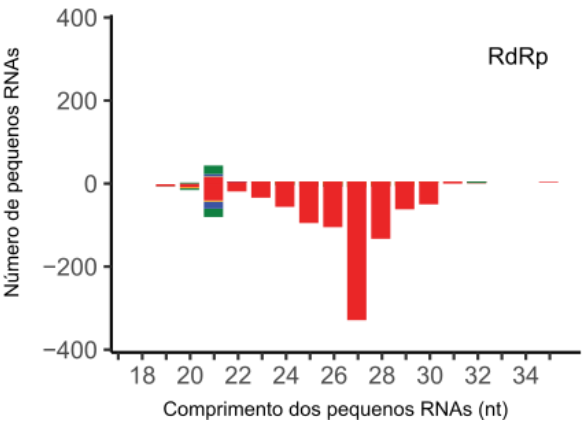


Figura 25. Perfis de pequenos RNAs derivados de ISVs em *Ae. aegypti* de Belo Horizonte. Gráficos representa a distribuição dos pequenos RNAs mapeados nos maiores contigs virais identificados. Os segmentos virais foram previamente anotados com base em similaridade por DIAMOND (busca contra proteínas virais) e BLASTn+ (busca contra genomas virais de nucleotídeos). O eixo x representa o comprimento nt dos pequenos RNAs, enquanto o eixo y indica a abundância do número de reads, sendo valores positivos referentes à fita senso e negativos à fita antisenso. As barras são empilhadas de acordo com o nucleotídeo da primeira base na extremidade 5': adenina (verde), citosina (azul), guanina (amarelo) e uracila (vermelho). Os dados foram obtidos por mapeamento de bibliotecas de pequenos RNAs contra os contigs virais montados.

5.4.4. Geração de linhagens transgênicas Cp:Loqs2 com fundo genético de campo, com e sem a presença de PCLV

Com base nos resultados obtidos no sequenciamento, utilizamos o método de linhagens de fêmeas isogênicas para estabelecer colônias de mosquitos com perfis virais distintos. Esse método envolve a criação de linhagens de mosquitos a partir de uma única fêmea fecundada, garantindo que todos os descendentes sejam geneticamente homogêneos e relacionados à fêmea fundadora. Para a implementação desse procedimento, os mosquitos retrocruzados foram alimentados por meio da exposição a um camundongo anestesiado. Após a alimentação, as fêmeas ingurgitadas foram individualmente colocadas em tubos Falcon de 50 mL, contendo água e papel filtro para oviposição. Após cinco dias, os mosquitos foram coletados para extração de RNA e análise por RT-qPCR, com o objetivo de detectar os vírus de interesse (ISVs) previamente identificados no sequenciamento, especificamente PCLV, HTV e LTV.

As análises revelaram a presença exclusiva de PCLV entre os ISVs investigados (Figura 26.C), enquanto HTV e LTV não foram detectados nos mosquitos retrocruzados (Figura 26.B). Após a confirmação da detecção dos ISVs, realizamos a separação física das progênes, distribuindo os ovos das fêmeas isogênicas em bacias de criação separadas de acordo com a condição viral de cada fêmea parental. Assim, estabelecemos duas linhagens distintas para a continuidade do estudo: uma com a presença de PCLV e outra sem a presença de PCLV. Este método permite avaliar com maior precisão os efeitos virais e genéticos sobre as populações de mosquitos, proporcionando uma plataforma robusta para o estudo das interações vírus-vetor em condições controladas e bem definidas.

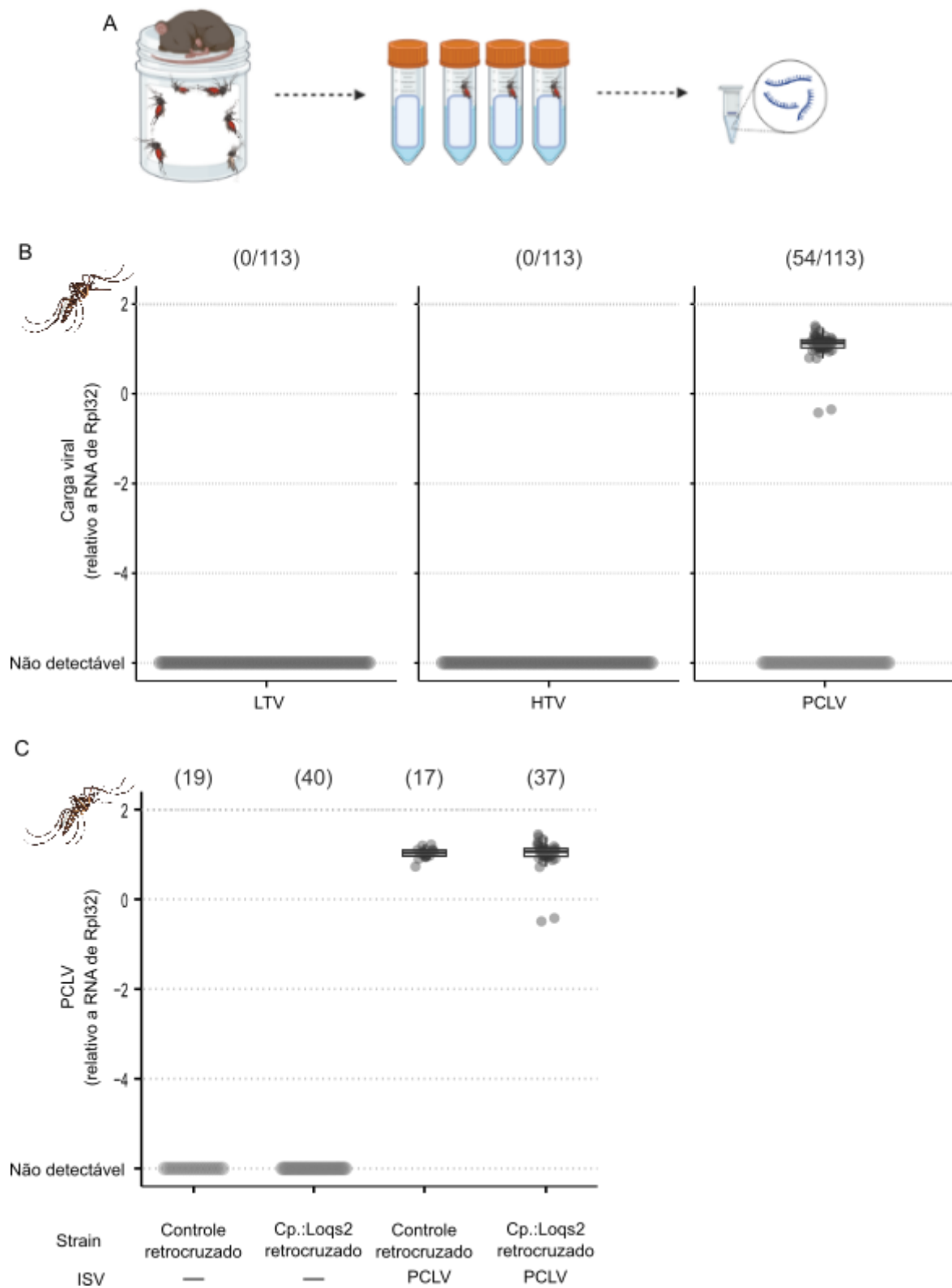


Figura 26. Detecção de ISVs e separação dos mosquitos retrocruzados de acordo com perfil viral. **A.** esquema ilustrativo do método de isofêmeas. **B.** Detecção e carga viral de *Lactea totivirus* (LTV), *Humaita-Tubiacanga* (HTV) e *Phasi Charoen-like vírus* (PCLV) nos mosquitos retrocruzados. **C.** Separação de linhagens com base na expressão de *Loqs2* no intestino e presença ou ausência de PCLV nos mosquitos retrocruzados. Os valores de ΔCt foram submetidos à mediana para a construção dos gráficos.

Após a separação da linhagem Cp.:Loqs2 retrocruzada de acordo com a presença de PCLV, realizamos a avaliação da expressão da proteína Loqs2 no intestino médio dos mosquitos. Embora o RT-qPCR tenha confirmado a presença do transgene, a validação definitiva das linhagens exigia a confirmação proteica por meio de Western Blot, uma técnica mais robusta para a detecção e quantificação da proteína de interesse. Esse passo foi essencial para garantir que a expressão do transgene fosse efetivamente traduzida em proteína funcional, algo crucial para a avaliação da atividade antiviral de Loqs2.

Os resultados obtidos por Western Blot demonstraram que tanto os mosquitos Cp.:Loqs2 com PCLV quanto os sem PCLV apresentaram a expressão de Loqs2 no intestino, corroborando a presença e a funcionalidade do transgene nesses grupos (Figura 27). A expressão da proteína foi comparada com os controles: as linhagens selvagens (negativo) e os mosquitos Cp.:Loqs2 com fundo genético de Bangkok (positivo), os quais serviram como referência para a validação da técnica e da expressão da proteína. Essa abordagem rigorosa garantiu que os mosquitos utilizados no estudo fossem adequadamente caracterizados e que a expressão de Loqs2 fosse consistente com o objetivo experimental de avaliar o efeito antiviral dessa proteína, considerando as condições de campo e as variantes genéticas introduzidas através do retrocruzamento. A confirmação proteica por Western Blot, aliada ao RT-qPCR, assegura que os resultados subsequentes sobre a atividade antiviral de Loqs2 sejam baseados em uma caracterização sólida das linhagens transgênicas utilizadas.

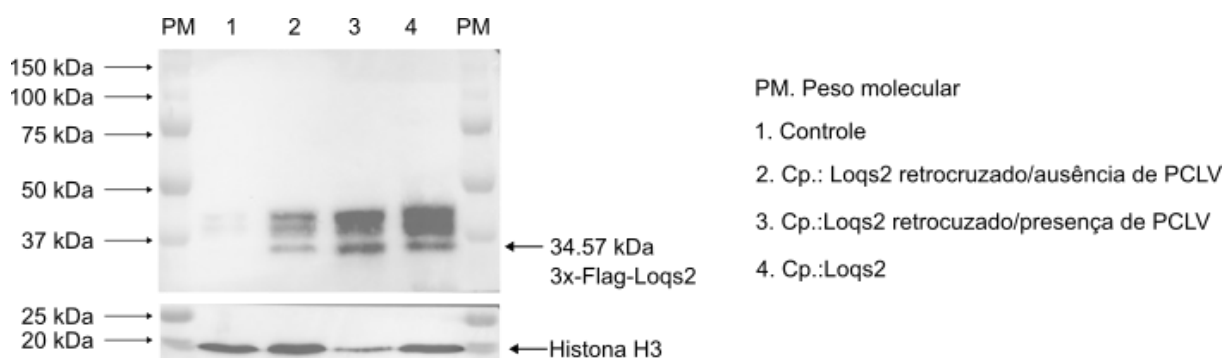


Figura 27. Expressão de Loqs2 em mosquitos Cp.:Loqs2 retrocruzados analisado por Western Blot. Imagem representativa do Western Blot mostrando a expressão de Loqs2 em: (1) controle negativo (linhagem selvagem, sem expressão de Loqs2), (2-3) Cp.:Loqs2 retrocruzado (ausência e presença de PCLV, respectivamente) e (4) controle positivo (linhagem Cp.:Loqs2 com fundo genético de Bangkok). Histona H3 foi utilizada como controle de carga proteica (20 kDa). O tamanho esperado para 3x-Flag-Loqs2 é de 34,57 kDa.

5.4.5. Avaliação do efeito da presença de PCLV sobre a infecção por ZIKV em linhagens transgênicas Cp.:Loqs2 com fundo genético de campo

Após a separação das linhagens Cp.:Loqs2 com base na presença de PCLV e a validação da expressão de Loqs2, avançamos para a análise de sua atividade antiviral contra o ZIKV. Para isso, os mosquitos das linhagens retrocruzadas e da linhagem com fundo genético de Bangkok foram alimentados com sangue de camundongo anestesiado previamente infectado com ZIKV. Após a alimentação, os mosquitos foram coletados aos 4 e 8 dpi, dissecados para separação do intestino e da carcaça, seguida de extração de RNA e análise da carga viral por RT-qPCR nos tempos determinados.

Os resultados indicaram que Loqs2 não demonstrou atividade antiviral nos mosquitos de campo, independentemente da presença de PCLV (Figuras 28 e 29). No intestino, a carga viral não foi reduzida nos mosquitos que expressam Loqs2 (Figura 28.A), e não houve efeito na prevalência da infecção (Figura 28.B). Contudo, ao comparar as linhagens que não expressam Loqs2 no intestino, observou-se uma resistência à infecção por ZIKV nas linhagens retrocruzadas em relação à linhagem de Bangkok, tanto na presença ($p = 0,0061$) quanto na ausência de PCLV ($p = 0,0141$) (Figura 28.B) aos 4 dpi. Esses achados sugerem que, embora a expressão de Loqs2 não tenha impacto direto na carga viral ou na prevalência da infecção, as linhagens retrocruzadas apresentaram uma resistência geral maior à infecção por ZIKV em comparação à linhagem de Bangkok, o que pode refletir variações genéticas associadas ao fundo genético de campo.

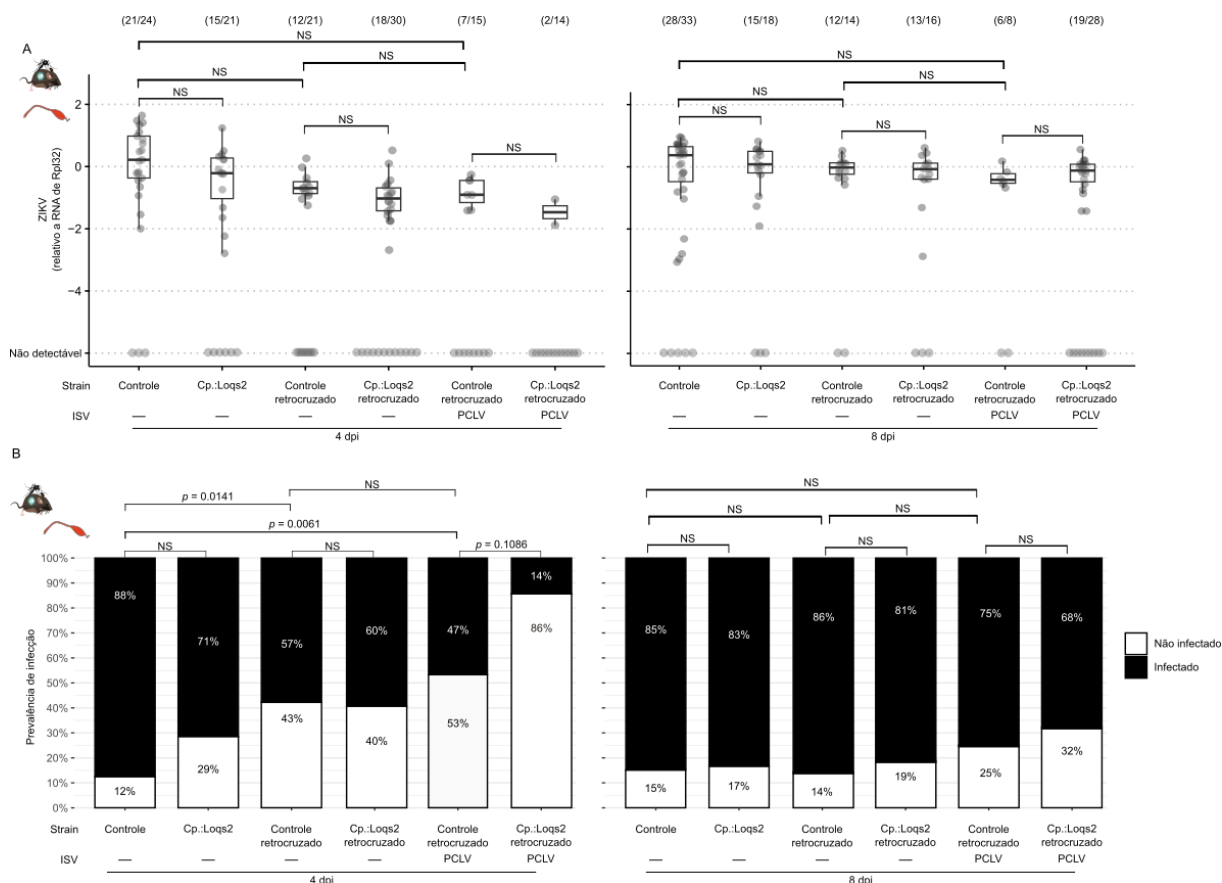


Figura 28. Avaliação do efeito da presença de PCLV sobre a infecção por ZIKV no intestino em linhagens transgênicas Cp:Loqs2 com fundo genético de campo. **A.** Análise da carga viral de ZIKV em diferentes linhagens: **i)** controle negativo - mosquitos selvagens que não expressa Loqs2 no intestino com fundo genético de Bangkok; **ii)** CP:Loqs2 (controle positivo) - linhagem com fundo genético de Bangkok e expressão de Loqs2 no intestino; **iii)** Controle retrocruzado - não expressa Loqs2 no intestino e não possui PCLV; **iv)** CP:Loqs2 retrocruzado - expressa Loqs2 no intestino e não possui PCLV; **v)** Controle retrocruzado - não expressa Loqs2 no intestino e possui PCLV; **vi)** CP:Loqs2 retrocruzado - expressa Loqs2 no intestino e possui PCLV. **B.** Prevalência da infecção por ZIKV nas diferentes linhagens analisadas. Para as análises estatísticas, foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis (A) e o teste de Fisher (B). Os valores de ΔC_t foram submetidos à mediana para a construção dos gráficos. NS: não significativo (p -valor $> 0,05$).

Nas análises das carcaças aos 4 dpi, observou-se uma taxa de infecção viral relativamente baixa, sem diferenças estatisticamente significativas entre os grupos experimentais (Figura 29.A). No entanto, aos 8 dpi, embora a expressão de Loqs2 não tenha impactado significativamente a taxa de infecção nas carcaças dos mosquitos retrocruzados, foi detectado um efeito antiviral na linhagem com fundo genético de Bangkok. Nessa linhagem, a expressão intestinal de Loqs2 esteve associada a uma redução significativa na proporção de carcaças infectadas, conforme evidenciado pelo teste exato de Fisher ($p = 0,0155$) (Figura 29.B), sugerindo um possível papel do Loqs2 na contenção da disseminação sistêmica do vírus ZIKV.

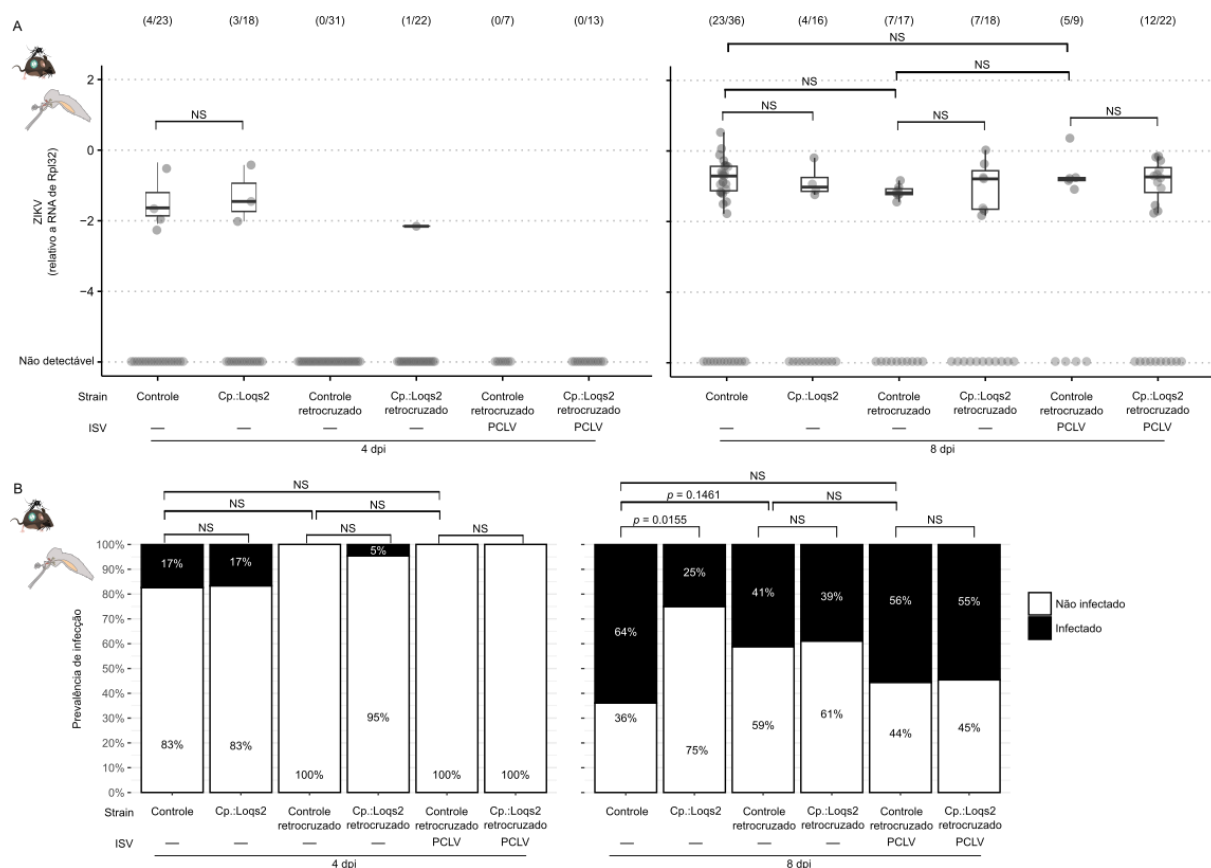


Figura 29. Avaliação do efeito da presença de PCLV sobre a infecção por ZIKV na carcaça em linhagens transgênicas Cp:Loqs2 com fundo genético de campo. **A.** Análise da carga viral de ZIKV em diferentes linhagens: **i)** controle negativo - mosquitos selvagens que não expressa Loqs2 no intestino com fundo genético de Bangkok; **ii)** CP:Loqs2 (controle positivo) - linhagem com fundo genético de Bangkok e expressão de Loqs2 no intestino; **iii)** Controle retrocruzado - não expressa Loqs2 no intestino e não possui PCLV; **iv)** CP:Loqs2 retrocruzado - expressa Loqs2 no intestino e não possui PCLV; **v)** Controle retrocruzado - não expressa Loqs2 no intestino e possui PCLV; **vi)** CP:Loqs2 retrocruzado - expressa Loqs2 no intestino e possui PCLV. **B.** Prevalência da infecção por ZIKV nas diferentes linhagens analisadas. Para as análises estatísticas, foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis (A) e o teste de Fisher (B). Os valores de ΔC_t foram submetidos à mediana para a construção dos gráficos. NS: não significativo (p -valor > 0,05).

5.4.6 Avaliação da expressão de genes associados a Loqs2 em *Ae. aegypti*

Diante da aparente ausência de atividade antiviral mediada por Loqs2 nas linhagens com fundo genético de campo, independentemente da presença de PCLV, direcionamos nossos esforços para elucidar potenciais processos genéticos e moleculares subjacentes às diferenças observadas em relação à linhagem com fundo genético de Bangkok. Para tal, realizamos uma análise da expressão de genes codificadores de proteínas previamente identificadas como interatoras de Loqs2 no proteoma da linhagem celular Aag2, conforme descrito por Olmo et al. (2018). A quantificação da expressão gênica foi conduzida por meio de RT-qPCR, utilizando amostras de intestinos e carcaças dos mesmos mosquitos analisados na seção anterior. Esta abordagem permitiu uma comparação direta dos perfis transcricionais entre as diferentes

linhagens durante a infecção pelo ZIKV, visando identificar possíveis moduladores da atividade antiviral associada a Loqs2.

Devido às limitações técnicas inerentes ao processamento das amostras, todas as análises de expressão gênica foram conduzidas exclusivamente no 8 dpi. Essa escolha temporal também possibilitou a focalização em um estágio mais avançado da infecção pelo ZIKV, no qual as respostas antivirais estão presumivelmente mais ativas.

Os dados obtidos evidenciaram perfis transcricionais distintos relacionados à via de RNAi entre a linhagem laboratorial Bangkok e as linhagens retrocruzadas com fundo genético de campo. No tecido intestinal, a linhagem Bangkok apresentou níveis de expressão significativamente mais elevados do gene *AGO2* em comparação aos mosquitos retrocruzados (Figura 30.A), indicando uma possível ativação mais robusta da resposta antiviral mediada por RNAi nessa linhagem.

Em contraste com os achados observados nos intestinos, nas carcaças dos mosquitos foi identificado um padrão inverso de expressão gênica: os mosquitos retrocruzados que expressavam Loqs2 especificamente no intestino apresentaram uma redução significativa na expressão de *AGO2* ($p = 0,02$) em relação ao respectivo grupo controle. Esse efeito foi observado em ambos os grupos analisados e foi particularmente mais pronunciado na ausência de PCLV (Figura 30.B), sugerindo uma possível modulação negativa da via de RNAi sistêmica associada à expressão intestinal de Loqs2.

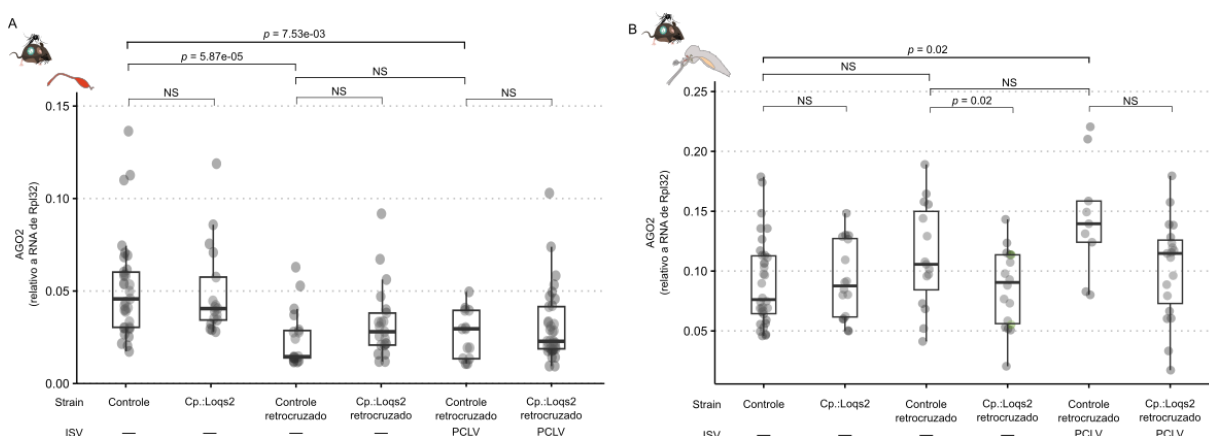


Figura 30. Expressão relativa de *AGO2* em linhagens de *Ae. aegypti* durante a infecção por ZIKV. Análise por RT-qPCR da expressão gênica de *AGO2* no intestino (A) e carcaça (B) de mosquitos de diferentes perfis genéticos e virais: i) controle negativo - mosquitos selvagens que não expressa Loqs2 no intestino com fundo genético de Bangkok; ii) CP.:Loqs2 (controle positivo) - linhagem com fundo genético de Bangkok e expressão de Loqs2 no intestino; iii) Controle retrocruzado - não expressa Loqs2 no intestino e não possui PCLV; iv) CP.:Loqs2 retrocruzado - expressa Loqs2 no intestino e não possui PCLV; v) Controle retrocruzado - não expressa Loqs2 no intestino e possui PCLV; vi) CP.:Loqs2 retrocruzado - expressa Loqs2 no intestino e possui PCLV. Para as análises estatísticas, foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis. Os valores de ΔC_t foram submetidos à mediana para a construção dos gráficos. NS: não significativo (p -valor $> 0,05$).

Também foi avaliada a expressão de outros genes da via de RNAi que interagem funcionalmente com *Loqs2*, como *R2D2*. No tecido intestinal, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na expressão de *R2D2* entre as populações analisadas (Figura 31.A). No entanto, na carcaça, identificaram-se diferenças significativas entre a linhagem Bangkok e as linhagens com fundo genético de campo, sendo esta última caracterizada por níveis mais elevados de expressão de *R2D2*, independentemente da presença de PCLV (Figura 31.B). Esses resultados sugerem uma possível regulação diferencial da via de RNAi sistêmica entre as linhagens analisadas.

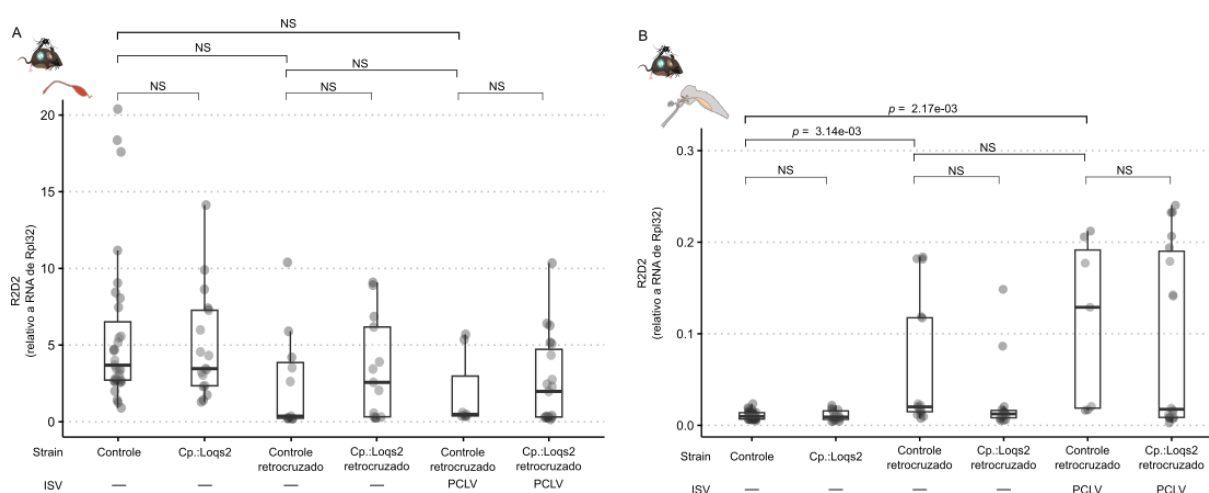


Figura 31. Expressão relativa de *R2D2* em linhagens de *Ae. aegypti* durante a infecção por ZIKV. Análise por RT-qPCR da expressão gênica de *R2D2* no intestino (A) e carcaça (B) de mosquitos de diferentes perfis genéticos e virais: **i)** controle negativo - mosquitos selvagens que não expressa *Loqs2* no intestino com fundo genético de Bangkok; **ii)** CP.:*Loqs2* (controle positivo) - linhagem com fundo genético de Bangkok e expressão de *Loqs2* no intestino; **iii)** Controle retrocruzado - não expressa *Loqs2* no intestino e não possui PCLV; **iv)** CP.:*Loqs2* retrocruzado - expressa *Loqs2* no intestino e não possui PCLV; **v)** Controle retrocruzado - não expressa *Loqs2* no intestino e possui PCLV; **vi)** CP.:*Loqs2* retrocruzado - expressa *Loqs2* no intestino e possui PCLV. Para as análises estatísticas, foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis. Os valores de ΔC_t foram submetidos à mediana para a construção dos gráficos. NS: não significativo (p -valor $> 0,05$).

Em relação à expressão gênica de *Loqs*, foram observadas diferenças significativas entre as linhagens analisadas. No intestino, não foram detectadas variações estatisticamente significativas na expressão de *Loqs* entre os grupos experimentais (Figura 32.A). Por outro lado, na carcaça, a expressão de *Loqs* foi significativamente maior nos mosquitos retrocruzados infectados com PCLV, em comparação à linhagem Bangkok (Figura 32.B). De forma não antecipada, em alguns intestinos analisados, a expressão de *Loqs* não foi detectada. Essa ausência pode ser atribuída à baixa expressão basal desse gene nesse tecido específico ou a limitações técnicas relacionadas à eficiência dos primers utilizados nas reações de RT-qPCR.

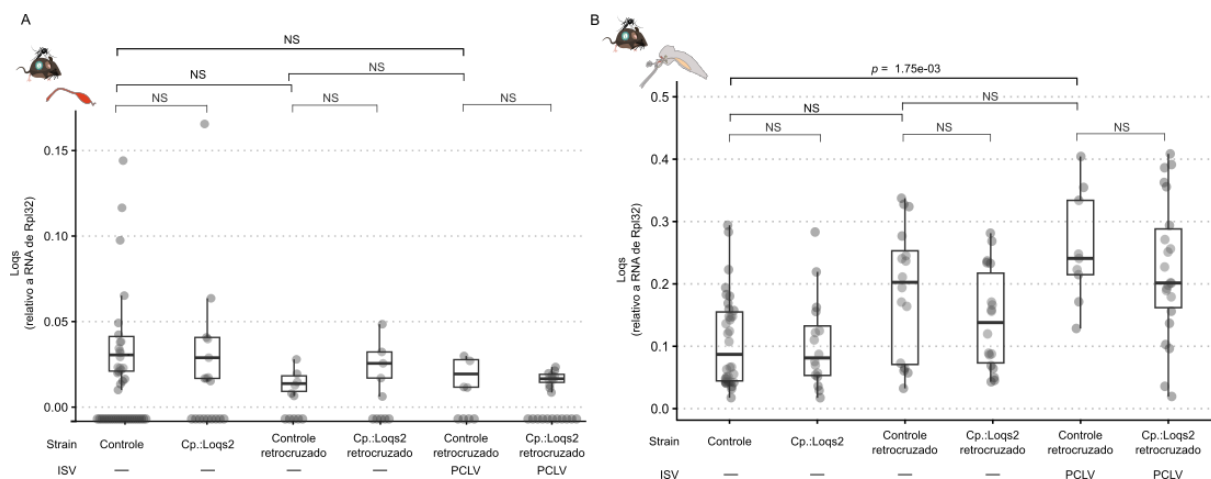


Figura 32. Expressão relativa de *Loqs* em linhagens de *Ae. aegypti* durante a infecção por ZIKV. Análise por RT-qPCR da expressão gênica de *Loqs* no intestino (A) e carcaça (B) de mosquitos de diferentes perfis genéticos e virais: **i)** controle negativo - mosquitos selvagens que não expressa *Loqs2* no intestino com fundo genético de Bangkok; **ii)** CP::*Loqs2* (controle positivo) - linhagem com fundo genético de Bangkok e expressão de *Loqs2* no intestino; **iii)** Controle retrocruzado - não expressa *Loqs2* no intestino e não possui PCLV; **iv)** CP::*Loqs2* retrocruzado - expressa *Loqs2* no intestino e não possui PCLV; **v)** Controle retrocruzado - não expressa *Loqs2* no intestino e possui PCLV; **vi)** CP::*Loqs2* retrocruzado - expressa *Loqs2* no intestino e possui PCLV. Para as análises estatísticas, foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis. Os valores de ΔC_t foram submetidos à mediana para a construção dos gráficos. NS: não significativo (p -valor > 0,05).

Com base nos nossos resultados anteriores, também investigamos a expressão de genes identificados como interatores de *Loqs2* no intestino de *Ae. aegypti*, conforme descrito por Antinea Babarit (2023). Entre os genes selecionados para análise estavam *AAEL022113*, *Dip1*, *AAEL04859 (mle)*, *Dicer-2* e *AAEL004699*. De modo semelhante ao observado para outros componentes do interactoma de *Loqs2* na linhagem celular Aag2, identificamos padrões diferenciais de expressão para o gene *AAEL022113* entre as linhagens analisadas. No intestino, não foram detectadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos (Figura 33.A). Contudo, nas carcaças, os mosquitos retrocruzados apresentaram níveis significativamente mais elevados de expressão desse gene em comparação à linhagem Bangkok, independentemente da presença de PCLV.

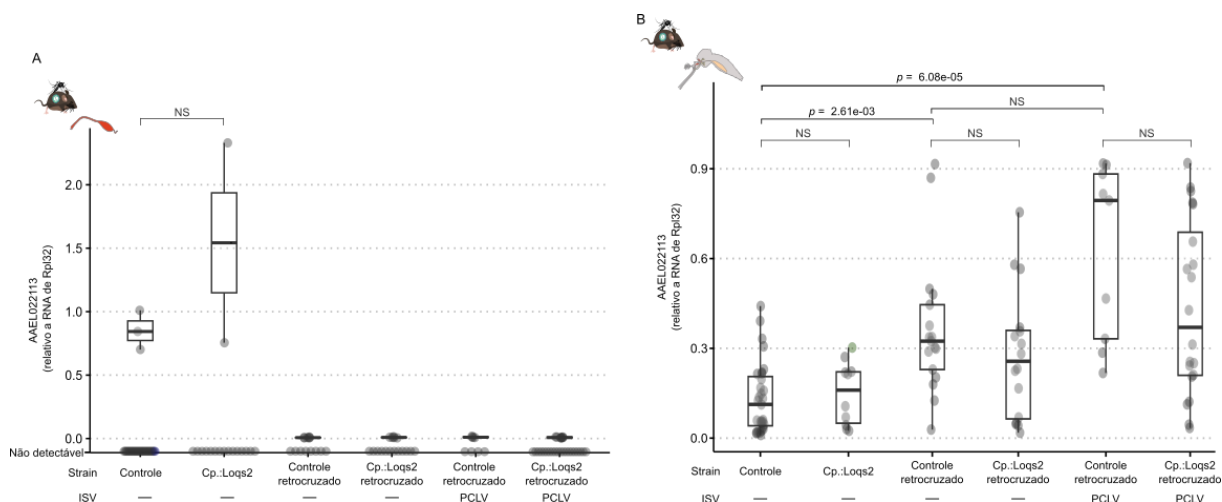


Figura 33. Expressão relativa de *AEEL022113* em linhagens de *Ae. aegypti* durante a infecção por ZIKV. Análise por RT-qPCR da expressão gênica de *AEEL022113* no intestino (A) e carcaça (B) de mosquitos de diferentes perfis genéticos e virais: i) controle negativo - mosquitos selvagens que não expressa Loqs2 no intestino com fundo genético de Bangkok; ii) CP::Loqs2 (controle positivo) - linhagem com fundo genético de Bangkok e expressão de Loqs2 no intestino; iii) Controle retrocruzado - não expressa Loqs2 no intestino e não possui PCLV; iv) CP::Loqs2 retrocruzado - expressa Loqs2 no intestino e não possui PCLV; v) Controle retrocruzado - não expressa Loqs2 no intestino e possui PCLV; vi) CP::Loqs2 retrocruzado - expressa Loqs2 no intestino e possui PCLV. Para as análises estatísticas, foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis. Os valores de ΔC_t foram submetidos à mediana para a construção dos gráficos. NS: não significativo (p -valor $> 0,05$).

Em relação ao gene *Dip1*, sua análise foi restrita ao tecido intestinal em decorrência de limitações técnicas que impossibilitaram a obtenção de dados confiáveis nas amostras de carcaça. A quantificação da expressão gênica no intestino não revelou diferenças estatisticamente significativas entre as linhagens avaliadas (Figura 34), sugerindo que *Dip1* não está diferencialmente regulado neste tecido durante a infecção por ZIKV, ao menos nas condições experimentais adotadas.

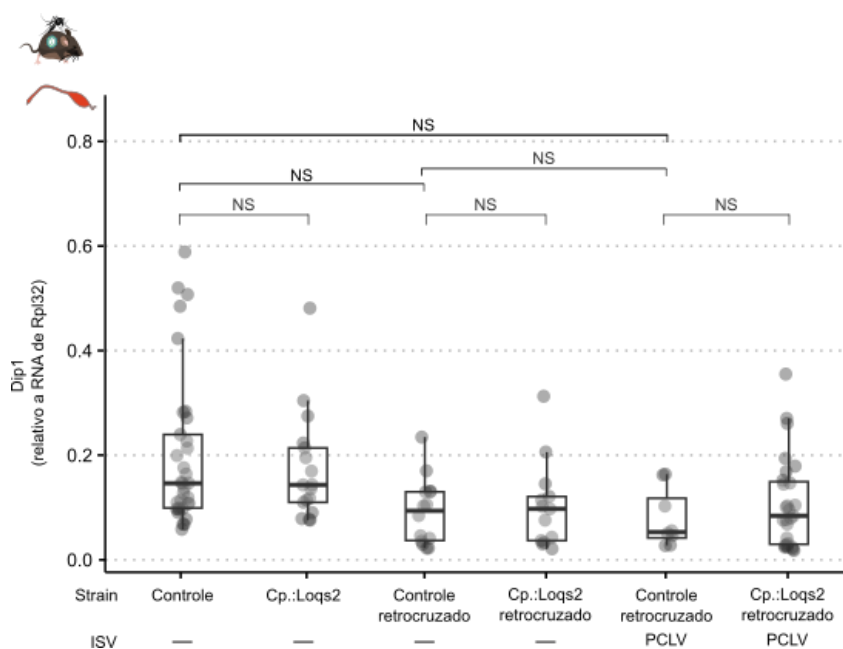


Figura 34. Expressão relativa de *Dip1* em linhagens de *Ae. aegypti* durante a infecção por ZIKV. Análise por RT-qPCR da expressão gênica de *Dip1* no intestino de mosquitos de diferentes perfis genéticos e virais: i) controle

negativo - mosquitos selvagens que não expressa Loqs2 no intestino com fundo genético de Bangkok; **ii)** CP.:Loqs2 (controle positivo) - linhagem com fundo genético de Bangkok e expressão de Loqs2 no intestino; **iii)** Controle retrocruzado - não expressa Loqs2 no intestino e não possui PCLV; **iv)** CP.:Loqs2 retrocruzado - expressa Loqs2 no intestino e não possui PCLV; **v)** Controle retrocruzado - não expressa Loqs2 no intestino e possui PCLV; **vi)** CP.:Loqs2 retrocruzado - expressa Loqs2 no intestino e possui PCLV. Para as análises estatísticas, foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis. Os valores de ΔCt foram submetidos à mediana para a construção dos gráficos. NS: não significativo (p -valor $> 0,05$).

A análise da expressão do gene *AAEL004859* não revelou diferenças estatisticamente significativas entre as linhagens, tanto no intestino quanto nas carcaças (Figura 35). No entanto, a ausência de detecção de expressão em determinadas amostras intestinais sugere possíveis limitações técnicas — como eficiência subótima dos primers ou degradação do RNA — ou, alternativamente, níveis de transcrição abaixo do limite de sensibilidade do ensaio de RT-qPCR. Esses fatores devem ser considerados na interpretação dos dados, especialmente ao se avaliar genes com expressão basal reduzida ou indução limitada sob as condições experimentais testadas.

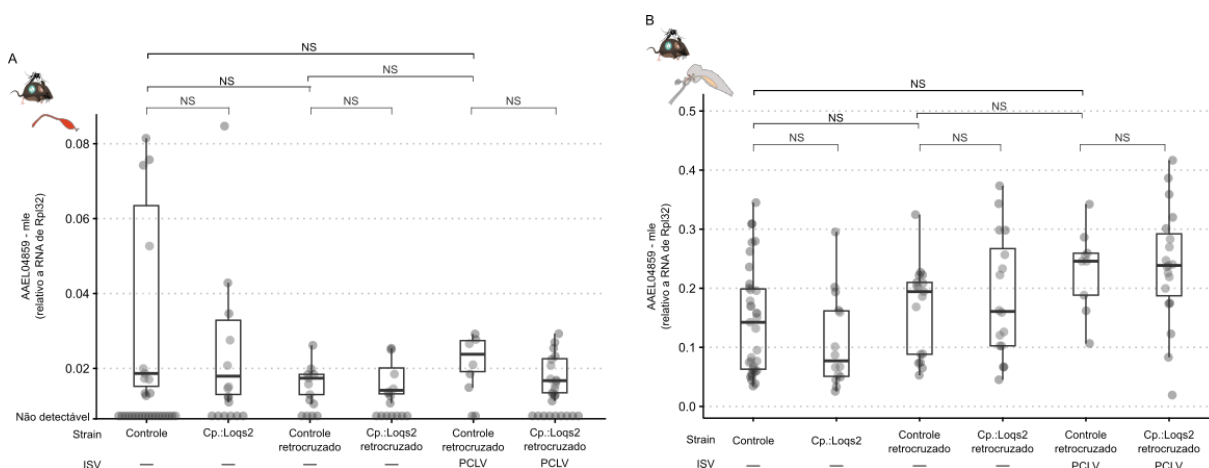


Figura 35. Expressão relativa de *AAEL004859* em linhagens de *Ae. aegypti* durante a infecção por ZIKV. Análise por RT-qPCR da expressão gênica de *AAEL004859* no intestino (A) e carcaça (B) de mosquitos de diferentes perfis genéticos e virais: **i)** controle negativo - mosquitos selvagens que não expressa Loqs2 no intestino com fundo genético de Bangkok; **ii)** CP.:Loqs2 (controle positivo) - linhagem com fundo genético de Bangkok e expressão de Loqs2 no intestino; **iii)** Controle retrocruzado - não expressa Loqs2 no intestino e não possui PCLV; **iv)** CP.:Loqs2 retrocruzado - expressa Loqs2 no intestino e não possui PCLV; **v)** Controle retrocruzado - não expressa Loqs2 no intestino e possui PCLV; **vi)** CP.:Loqs2 retrocruzado - expressa Loqs2 no intestino e possui PCLV. Para as análises estatísticas, foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis. Os valores de ΔCt foram submetidos à mediana para a construção dos gráficos. NS: não significativo (p -valor $> 0,05$).

O gene *AAEL004699* apresentou padrão de expressão uniforme no intestino entre as diferentes linhagens analisadas, sem variações estatisticamente significativas (Figura 36.A). Por outro lado, na carcaça, foi observado um aumento significativo na expressão desse gene na linhagem retrocruzada infectada com PCLV em comparação à linhagem Bangkok ($p = 0,04$; Figura 36.B). Esse resultado sugere que a presença de PCLV pode modular positivamente a

expressão de *AEEL004699* no compartimento corporal, potencialmente influenciando respostas antivirais sistêmicas.

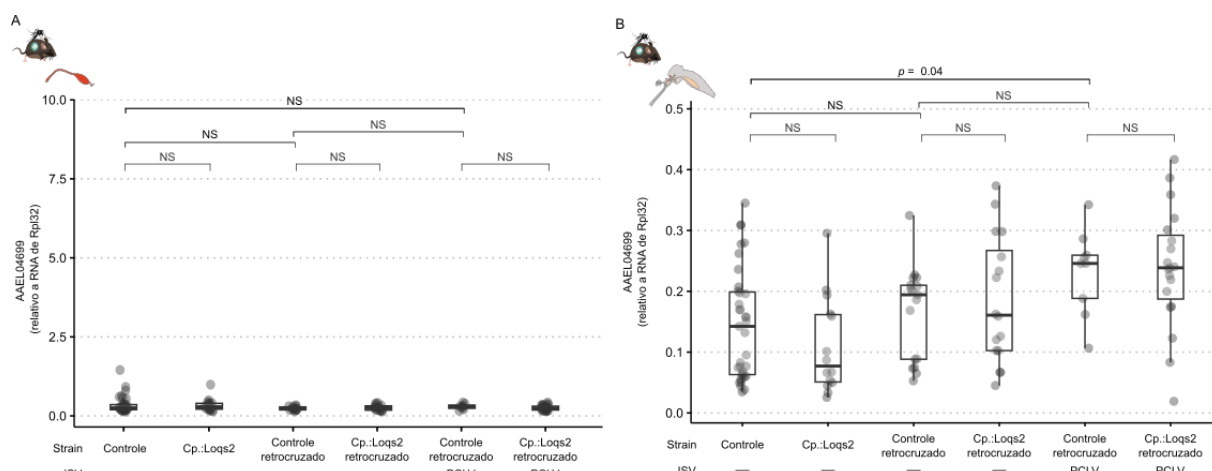


Figura 36. Expressão relativa de *AEEL004699* em linhagens de *Ae. aegypti* durante a infecção por ZIKV. Análise por RT-qPCR da expressão gênica de *AEEL004699* no intestino (A) e carcaça (B) de mosquitos de diferentes perfis genéticos e virais: i) controle negativo - mosquitos selvagens que não expressa Loqs2 no intestino com fundo genético de Bangkok; ii) CP::Loqs2 (controle positivo) - linhagem com fundo genético de Bangkok e expressão de Loqs2 no intestino; iii) Controle retrocruzado - não expressa Loqs2 no intestino e não possui PCLV; iv) CP::Loqs2 retrocruzado - expressa Loqs2 no intestino e não possui PCLV; v) Controle retrocruzado - não expressa Loqs2 no intestino e possui PCLV; vi) CP::Loqs2 retrocruzado - expressa Loqs2 no intestino e possui PCLV. Para as análises estatísticas, foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis. Os valores de ΔC_t foram submetidos à mediana para a construção dos gráficos. NS: não significativo (p -valor $> 0,05$).

O gene *Dicer-2* apresentou níveis de expressão comparáveis entre as linhagens no tecido intestinal, sem diferenças estatisticamente significativas (Figura 37.A). No entanto, na carcaça, observou-se um aumento significativo na expressão de *Dicer-2* na linhagem retrocruzada infectada com PCLV em relação à linhagem Bangkok ($p = 0,02$; Figura 37.B). Esse padrão sugere uma ativação sistêmica da via de RNAi associada à infecção persistente pelo vírus, indicando que infecções crônicas podem modular diferencialmente componentes centrais da resposta antiviral em tecidos periféricos.

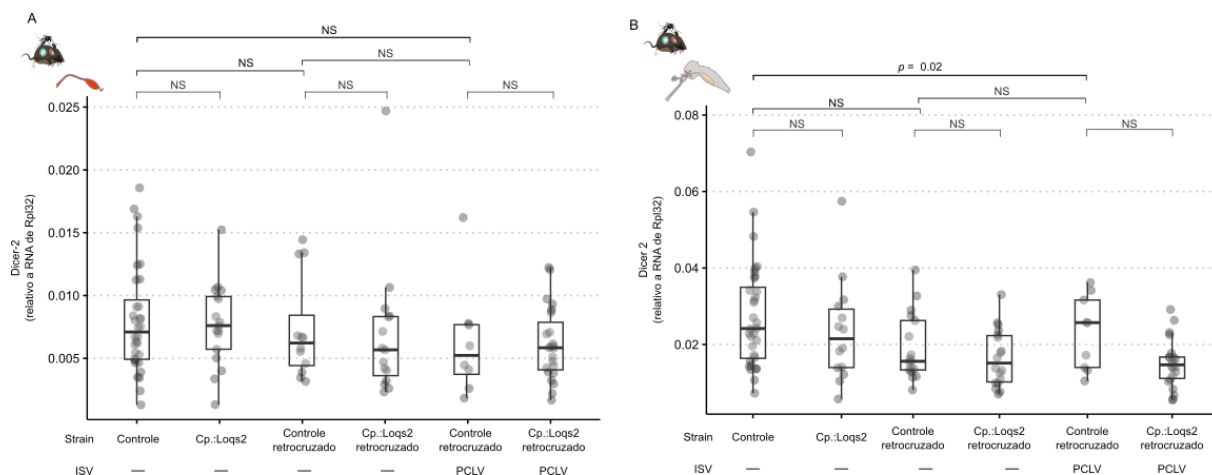


Figura 37. Expressão relativa de *Dicer-2* em linhagens de *Ae. aegypti* durante a infecção por ZIKV. Análise por RT-qPCR da expressão gênica de *Dicer-2* no intestino (A) e carcaça (B) de mosquitos de diferentes perfis genéticos e virais: i) controle negativo - mosquitos selvagens que não expressa Loqs2 no intestino com fundo

genético de Bangkok; **ii**) CP.:Loqs2 (controle positivo) - linhagem com fundo genético de Bangkok e expressão de Loqs2 no intestino; **iii**) Controle retrocruzado - não expressa Loqs2 no intestino e não possui PCLV; **iv**) CP.:Loqs2 retrocruzado - expressa Loqs2 no intestino e não possui PCLV; **v**) Controle retrocruzado - não expressa Loqs2 no intestino e possui PCLV; **vi**) CP.:Loqs2 retrocruzado - expressa Loqs2 no intestino e possui PCLV. Para as análises estatísticas, foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis. Os valores de ΔC_t foram submetidos à mediana para a construção dos gráficos. NS: não significativo (p -valor $> 0,05$).

6 DISCUSSÃO

6.1 ATIVIDADE ANTIVIRAL DE LOQS2 CONTRA ZIKV, CHIKV E MAYV EM *Ae. aegypti*

A via de RNA de interferência (RNAi) é um dos principais mecanismos antivirais em insetos. Essa via atua promovendo a clivagem do RNA viral de fita dupla (dsRNA) em pequenos RNAs interferentes (siRNAs), que direcionam o silenciamento específico do RNA viral durante a replicação, limitando assim sua propagação no hospedeiro. Dentre os modelos utilizados para o estudo dessa resposta, *Aedes aegypti* tem se mostrado fundamental para o avanço do conhecimento sobre a imunidade antiviral contra arbovírus (Barillas-Mury; Ribeiro; Valenzuela, 2022; Koo; Palli, 2024; Wang *et al.*, 2006).

Neste contexto, nós investigamos o papel de *Loqs2*, um componente-chave dessa via, cuja atividade antiviral foi inicialmente descrita contra DENV (Olmo *et al.*, 2018). Nossos resultados estendem esse papel ao ZIKV, demonstrando que *Loqs2* atua como fator restritivo contra vírus do gênero *Orthoflavivirus*. De forma notável, observamos que essa atividade antiviral é seletiva: *Loqs2* restringe a infecção por *Orthoflavivirus*, mas não exerce o mesmo efeito contra membros da família *Togaviridae*, como CHIKV e MAYV. Esses achados sugerem que a resposta antiviral mediada pela expressão ectópica de *Loqs2* no intestino de *Ae. aegypti* apresenta especificidade viral, refletindo a complexidade das interações entre arbovírus e seus vetores.

Estudos anteriores demonstraram que o silenciamento sistêmico de *Loqs2* em mosquitos selvagens reduz a carga viral de ZIKV nas carcaças (Olmo *et al.*, 2018), corroborando com os nossos resultados. No entanto, há uma aparente discrepância em relação aos estudos em cultura celular: por exemplo, em infecções por DENV-2 em células Aag2, *Loqs2* não apresentou efeito antiviral significativo (Besson *et al.*, 2022). Essa diferença pode estar relacionada às distintas abordagens experimentais, enquanto os estudos celulares avaliam respostas localizadas, nosso modelo *in vivo* abrange mecanismos sistêmicos e interações tecido-específicas, especialmente no intestino e na carcaça.

Acreditamos que a atividade antiviral de *Loqs2* no intestino esteja associada à sua função na via dos siRNAs. Por possuir domínios de ligação a dsRNA (Estevez-Castro *et al.*, 2024), *Loqs2* pode facilitar a clivagem do genoma viral por Dicer-2 e/ou o carregamento de siRNAs no complexo RISC mediado por AGO2, etapas cruciais para a resposta antiviral efetiva contra ZIKV e DENV. Essa função torna-se ainda mais relevante no intestino, onde a infecção

viral inicia-se e precisa superar mecanismos virais de supressão da RNAi, como o RNA subgenômico de flavivírus e a proteína NS2A (Chen, Xiang *et al.*, 2024; Moon *et al.*, 2015; Qiu *et al.*, 2020; Schnettler *et al.*, 2012).

Curiosamente, a atividade antiviral de *Loqs2* parece restrita ao intestino. Embora seja expressa em diversos tecidos, incluindo ovários e carcaças, sua ausência em mosquitos knockout não comprometeu significativamente a defesa antiviral nesses compartimentos (Babarit, 2023; Estevez-Castro *et al.*, 2024; Olmo *et al.*, 2018). Essa restrição funcional sugere que *Loqs2* atua de forma contexto-dependente, possivelmente modulada por cofatores específicos de cada tecido ou pelo estímulo infeccioso. Além disso, *Loqs2* exerce funções não imunes em tecidos reprodutivos, onde é amplamente expresso, regulando processos como o ritmo da oogênese no ovário e a sincronização da espermatogênese no testículo (Castro, 2024), indicando que sua atividade pode ser influenciada por múltiplas vias regulatórias.

Nossos resultados sugerem que a expressão de *Loqs2* no intestino, o primeiro local de contato com o vírus, potencializa a resposta antiviral contra *Orthoflavivirus* desde os estágios iniciais da infecção. Ao restringir a replicação viral logo após a ingestão do sangue infectado, *Loqs2* pode limitar a disseminação sistêmica do vírus antes que ele atinja tecidos secundários, como as glândulas salivares, impactando diretamente a competência vetorial do mosquito (Carpenter; Clem, 2023; Franz *et al.*, 2015). Essa ação precoce posiciona *Loqs2* como um elemento-chave na barreira imunológica intestinal contra *Orthoflavivirus*.

Por outro lado, a ausência de atividade antiviral de *Loqs2* contra MAYV e sua ação limitada e transitória contra CHIKV sugerem que esses vírus empregam mecanismos distintos de replicação e escape imune em *Ae. aegypti*. Esses achados são consistentes com relatos que demonstram falhas no controle da disseminação sistêmica de *Togaviridae* no mosquito. Por exemplo, Merklings *et al.* (2023) demonstraram que, embora a ausência de Dicer-2 em *Ae. aegypti* aumenta a carga viral de CHIKV no intestino em 2 dpi, essa diferença não é mantida em 5 dpi. No caso de MAYV, a inativação de Dicer-2 não influenciou significativamente a carga viral nos tecidos avaliados, o que está em consonância com nossos resultados.

Adicionalmente, nossos experimentos indicam que a atividade antiviral de *Loqs2* contra CHIKV é efêmera: observada aos 4 dpi, mas ausente aos 3, 6 e 8 dpi. Isso sugere uma perda progressiva da eficácia antiviral, possivelmente devido à capacidade do vírus de escapar da resposta imune. Além disso, nossos dados sugerem uma possível dependência da atividade de *Loqs2* à carga viral. Em infecções com baixas cargas de CHIKV (7×10^4 PFU/mL), observamos redução na infecção de intestinos e carcaças em 6 dpi. Contudo, esse efeito não se manteve sob

cargas virais mais elevadas ($3,5 \times 10^6$ e 7×10^5 PFU/mL), indicando que uma replicação viral robusta pode sobrepujar os mecanismos antivirais mediados por Loqs2.

Estudos indicam que CHIKV dispõe de estratégias virais para inibir a via de RNAi, incluindo a ação das proteínas nsP2 e nsP3, que bloqueiam o recrutamento do complexo RISC em células de *Ae. aegypti*. O domínio envolvido nessa supressão é altamente conservado entre os *Togaviridae*, sugerindo que esse mecanismo pode ser amplamente utilizado para escapar da degradação do RNA viral (Kumar *et al.*, 2021; Mathur *et al.*, 2016).

Além da via de RNAi, estudos demonstram que CHIKV pode suprimir outras vias de sinalização do sistema imune, como a via Toll. Mesmo quando outras vias imunológicas são ativadas, elas não conseguem controlar a replicação viral nas células de *Ae. aegypti* (McFarlane *et al.*, 2014). De maneira semelhante, foi observado que em mosquitos infectados com Sindbis vírus (SINV), outro membro da família *Togaviridae*, apresentaram inibição da transcrição da via Toll a partir de 4 dpi (Sanders *et al.*, 2005). Além de Toll, CHIKV também evade de outros mecanismos imunes, como a modulação a expressão de defensinas de modo dependente da linhagem de mosquitos (Zhao *et al.*, 2018) e resiste à ativação da via JAK/STAT (Jupatanakul *et al.*, 2017), sugerindo uma evasão imune ampla.

Esses achados podem explicar os nossos resultados, pois sugerem que a replicação de CHIKV é controlada nas fases iniciais da infecção, quando as vias imunológicas ainda estão ativas e a expressão de Loqs2 potencializa essa resposta. No entanto, em altas cargas virais, o CHIKV pode escapar do controle imunológico ao longo do tempo, possivelmente por meio da inibição das vias de RNAi, supressão transcricional da via Toll, e resistência à via JAK/STAT. Esse cenário pode favorecer uma replicação exacerbada na carcaça, possivelmente refletindo um mecanismo compensatório do vírus diante da pressão imune inicial.

Apesar desses mecanismos de escape, diversos estudos demonstram que a via RNAi continua sendo essencial para limitar a replicação de vírus da família *Togaviridae* (Dong *et al.*, 2022; Khoo *et al.*, 2010; Samuel *et al.*, 2023; Sucupira *et al.*, 2020). A ausência de efeito antiviral contra MAYV em nossos experimentos pode também estar associada ao tamanho amostral reduzido, o que limita a detecção de diferenças sutis entre os grupos experimentais.

Em conjunto, nossos dados reforçam a importância de estudos adicionais para esclarecer os mecanismos moleculares envolvidos na interação entre CHIKV/MAYV e *Ae. aegypti*, com especial atenção à expressão de componentes imunes em diferentes tecidos e momentos da infecção. Abordagens integradas, voltadas à modulação simultânea de múltiplas vias imunes, podem revelar novas estratégias de controle, considerando a variabilidade genética dos vetores

e das linhagens virais (Dabo *et al.*, 2023; de Freitas *et al.*, 2024; Novelo *et al.*, 2023; Vega-Rúa *et al.*, 2014).

Assim, nossos resultados indicam que *Loqs2* exerce um papel antiviral relevante e tecido-específico contra *Orthoflavivirus* em *Ae. aegypti*, com sua atividade restrita ao intestino. Em contraste, sua eficácia contra *Togaviridae* parece limitada por mecanismos virais de evasão e influenciada pela carga infecciosa. A especificidade dessa resposta reforça a importância de se explorar os mecanismos imunológicos de forma direcionada e adaptada ao perfil molecular de cada vírus.

6.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL DE LOQS2 EM POPULAÇÕES DE *Ae. aegypti* COM FUNDO GENÉTICO DE POPULAÇÕES DE CAMPO BRASILEIRAS

O mosquito *Ae. aegypti* é amplamente reconhecido por sua notável capacidade de resistência e adaptação ecológica, atribuída, em parte, à sua variabilidade genética (Hiragi *et al.*, 2009). Essa diversidade genômica pode influenciar diretamente a resposta imune, afetando a suscetibilidade à infecção por arbovírus, a competência vetorial e até mesmo a resistência a inseticidas (Ayres *et al.*, 2003). Estudos recentes demonstram que populações de *Ae. aegypti* oriundas de diferentes localidades, incluindo variações entre países, cidades e regiões intraurbanas, apresentam perfis distintos de suscetibilidade à infecção por arbovírus (Chaves *et al.*, 2021; de Freitas *et al.*, 2024; Godoy *et al.*, 2021; Gonçalves *et al.*, 2014). Tais evidências ressaltam a importância de considerar o contexto genético e geográfico nos estudos de interação vírus-vetor.

Nesse cenário, este estudo avaliou a atividade antiviral de *Loqs2* em uma população de *Ae. aegypti* oriunda de Belo Horizonte, cedida pelo Laboratório Mosquitos Vetores. Esses dados foram comparados com achados prévios de Olmo *et al.* (2018), que utilizaram linhagens transgênicas com fundo genético de Bangkok mantidas em condições laboratoriais. A escolha da população de Belo Horizonte foi motivada pelos elevados índices de arboviroses registrados na cidade (Prefeitura de Belo Horizonte, 2024; Secretária de Saúde de Minas Gerais, 2024), bem como pela presença documentada de resistência a inseticidas (Chediak *et al.*, 2016; Valle *et al.*, 2019), tornando-a altamente relevante para estudos voltados à imuno competência vetorial em contextos naturais.

Visando contextualizar o efeito de *Loqs2* em um genoma representativo da população natural, realizamos dez ciclos de retrocruzamentos entre a linhagem Bangkok (portadora do alelo de interesse) e a linhagem de Belo Horizonte (doadora recorrente). Essa abordagem

permitiu preservar aproximadamente 98% do genoma da população de campo (Vogel, 2009), reduzindo a influência genética da linhagem de Bangkok e preservando as características adaptativas da população de campo.

Nossos resultados revelaram uma divergência na atividade antiviral de *Loqs2* entre as linhagens: enquanto na linhagem Bangkok *Loqs2* demonstrou restringir a infecção por ZIKV, esse efeito foi ausente nos retrocruzados com fundo de campo. Essa diferença pode ser atribuída a dois fatores principais: (i) variabilidade genética entre as populações, que pode influenciar a regulação da via RNAi, e (ii) diferenças na composição da microbiota, em especial a presença de vírus específicos de insetos (ISVs). Estudos prévios de nosso grupo demonstraram que a coinfeção com PCLV e HTV pode aumentar a replicação e transmissão de DENV e ZIKV em *Ae. aegypti* (Olmo *et al.*, 2023), reforçando a hipótese de que fatores como a variabilidade genética e a composição da microbiota podem modular a eficácia de genes antivirais como *Loqs2*.

Diante disso, considerando a hipótese de que a microbiota viral pode ter papel modulador na resposta antiviral de *Loqs2*, realizamos o sequenciamento de pequenos RNAs, método padrão em nosso grupo para detecção de vírus em vetores (Abbo *et al.*, 2023; Aguiar *et al.*, 2015), em mosquitos selvagens de Belo Horizonte, a fim de verificar a presença de ISVs. Os resultados identificaram a presença de PCLV e HTV, com perfis característicos de siRNAs, evidenciando ativação da via antiviral de RNAi contra ambos. Contudo, apenas o PCLV apresentou perfil típico de piRNAs, corroborando estudos anteriores (Aguiar *et al.*, 2020; Almeida, 2023; Olmo *et al.*, 2023), os quais associam o tropismo do PCLV pela indução da via piRNA, principalmente nos órgãos reprodutivos. Por outro lado, embora o LTV tenha sido detectado no sequenciamento, o seu perfil de pequenos RNAs não foi claramente definido e, quando avaliado por RT-qPCR, não foi possível detectar a presença viral, sugerindo uma possível baixa carga viral ou contaminação residual.

Com base nesses resultados, aplicamos a metodologia de isofêmeas para separar linhagens expressando *Loqs2* de acordo com a presença ou ausência de ISVs. Curiosamente, conseguimos isolar apenas linhagens portadoras de PCLV. Quanto ao HTV, sua baixa frequência na população de Belo Horizonte (dados no anexo B) pode justificar sua ausência nas linhagens selecionadas. Essa seletividade natural dos ISVs pode ter impacto direto sobre a modulação da atividade antiviral de *Loqs2*.

Contrariamente à nossa hipótese inicial, a presença de PCLV não modulou a atividade antiviral de *Loqs2*, uma vez que não foram observadas diferenças significativas na carga viral de ZIKV entre os grupos. A confirmação da expressão proteica de *Loqs2* em todas as linhagens

sugere que sua inatividade antiviral nas populações de campo pode estar relacionada a fatores genéticos intrínsecos. Além disso, reforça-se que o efeito pró-viral de ISVs como PCLV e HTV sobre a replicação de flavivírus depende da coinfeção (Olmo *et al.*, 2023), indicando que interações sinérgicas entre ISVs são essenciais para esse fenômeno.

Um achado notável foi a resistência à infecção por ZIKV nas linhagens de campo, avaliada tanto no intestino (4 dpi) quanto na carcaça (8 dpi), independentemente da presença de PCLV ou da expressão de *Loqs2*. Considerando que a linhagem Bangkok é livre de ISVs, (Olmo *et al.*, 2023), esses resultados não apenas refutam nossa hipótese inicial, como também sugerem fortemente a participação de fatores genotípicos na modulação da infecção, levantando novas questões sobre os mecanismos regulatórios que governam a ação de *Loqs2*.

Diante disso, investigamos o perfil de expressão de genes que interagem com *Loqs2* e de componentes da via RNAi, comparando mosquitos retrocruzados e linhagem Bangkok. Essa análise enfrentou duas limitações: (i) o tamanho amostral reduzido, que pode ter limitado a detecção de diferenças sutis, especialmente no efeito antiviral de *Loqs2*; e (ii) a ausência de dados completos para 4 dpi, devido a restrições técnicas.

Apesar dessas limitações, identificamos padrões distintos de expressão gênica para componentes da via RNAi e genes interatores de *Loqs2*, como *AGO2*, *R2D2*, *Loqs*, *Dicer-2* e *AAEL022113*. No intestino, observou-se maior expressão de *AGO2* na linhagem Bangkok em comparação aos retrocruzados, levantando duas hipóteses: (i) a presença de polimorfismos constitutivos que influenciam a expressão basal, ou (ii) uma resposta tardia à infecção. Ambas são sustentadas por estudos anteriores que mostram variações na expressão de *AGO2* entre populações e sua associação com controle viral (Chen *et al.*, 2023; Terradas *et al.*, 2017).

Na carcaça, a expressão de *AGO2* foi modulada pela expressão intestinal de *Loqs2* e pela presença de PCLV. Em mosquitos de campo não infectados por PCLV, aqueles que expressavam *Loqs2* no intestino apresentaram uma supressão significativa de *AGO2* na carcaça, sugerindo um possível mecanismo de feedback negativo inter-tecidual, um fenômeno não observado na linhagem Bangkok.

Apesar dessa supressão, não houve impacto na carga viral de ZIKV, sugerindo a presença de mecanismos compensatórios. A ausência de variação na expressão de *R2D2* e *Dicer-2* nas mesmas carcaças reforça essa hipótese. Esses dados representam a primeira evidência de uma possível regulação negativa de *AGO2* sistêmica induzida por *Loqs2* intestinal em populações de campo.

Adicionalmente, mesmo com a elevação de *AGO2* no intestino da linhagem Bangkok, a carga viral de ZIKV não foi reduzida significativamente, reforçando a complexidade da

resposta antiviral e sugerindo que outras vias, como Toll ou JAK/STAT (Angleró-Rodríguez, Yesseinia I. *et al.*, 2017; Xi; Ramirez; Dimopoulos, 2008b), também estão envolvidas. A redução da infecção na carcaça observada nessa linhagem pode, portanto, refletir uma ação antiviral indireta de *Loqs2* mediada por mecanismos ainda não caracterizados.

Na presença de PCLV, foi observado aumento significativo de *AGO2* na carcaça, mas não no intestino, embora a carga viral de PCLV tenha sido semelhante em ambos os tecidos (Anexo C). Isso sugere que a carcaça pode abrigar mecanismos específicos para controlar infecções por ISVs e arbovírus, sustentados pelo aumento concomitante da expressão de *R2D2*, *Dicer-2*, *Loqs* e *AAEL004699*.

O gene *AAEL004699* codifica uma proteína com domínios de ligação a RNA (Sumitha *et al.*, 2023), foi identificado como interator de *AGO2*, *Dicer-2* e *Piwi4* em células de *Ae. aegypti*, com atividade antiviral contra SFV, CHIKV e ZIKV, mesmo de forma independente da via canônica de RNAi (Varjak *et al.*, 2020). Esse achado, aliado à detecção de piRNAs para PCLV (Aguiar *et al.*, 2015; Olmo *et al.*, 2023), sugere que *AAEL004699* pode atuar na interface entre as vias siRNA e piRNA na carcaça.

A expressão aumentada de *Loqs* na carcaça de mosquitos infectados com PCLV também foi observada. Estudos indicam que *Loqs* pode exercer tanto funções pró-virais (Besson *et al.*, 2022; Shivaprasad *et al.*, 2022), quanto antivirais (Shivaprasad *et al.*, 2022), e é essencial para a biogênese de pequenos RNAs (Haac *et al.*, 2015). A expressão elevada nesse contexto pode refletir uma resposta ao PCLV ou uma modulação da replicação viral.

Finalmente, os genes *R2D2* e *AAEL022113* apresentaram aumento de expressão na carcaça dos retrocruzados, independentemente da presença de PCLV. *R2D2* é um cofator clássico da via RNAi (Dong *et al.*, 2022; Liu *et al.*, 2003), enquanto *AAEL022113* possui domínios de ligação a RNA (Sumitha *et al.*, 2023). Segundo dados preliminares do nosso grupo, (Babart, 2023), *AAEL022113* apresenta atividade antiviral contra ZIKV. Sua expressão diferencial apenas na carcaça reforça a hipótese de uma resposta imune compartimentalizada entre os tecidos.

Em conjunto, esses achados indicam que a resposta antiviral em populações de campo de *Ae. aegypti* é multicomponente, modulada por interações entre fatores genéticos, composição do viroma e comunicação inter-tecidual. A aparente ausência de atividade antiviral de *Loqs2* nessas populações, apesar de sua eficácia em linhagens laboratoriais, evidencia a importância de considerar a variabilidade natural nos estudos de interação vírus-vetor.

A descoberta de um possível eixo regulador entre intestino e carcaça envolvendo *Loqs2* e *AGO2* levanta hipóteses sobre a existência de mecanismos sistêmicos de coordenação

imunológica. Embora a presença de PCLV não tenha impactado diretamente a eficácia de *Loqs2*, sua associação com o aumento da expressão de genes da via RNAi sugere que ISVs participam ativamente na modulação da imunidade do mosquito

Futuros estudos devem se concentrar na identificação dos determinantes genéticos que regulam a função de *Loqs2* em populações naturais, nos mecanismos de sinalização entre tecidos e na resposta imune frente à coinfeção por ZIKV e ISVs. Esses conhecimentos podem ser fundamentais para o desenvolvimento de estratégias inovadoras de controle vetorial baseadas na manipulação da imunidade de *Ae. aegypti*, levando em consideração sua diversidade genética e ecológica.

7. CONCLUSÃO

Nesta tese, investigamos o papel do gene *Loqs2* na resposta antiviral de *Ae. aegypti* frente à infecção por diferentes arbovírus, com foco em vírus do gênero *Orthoflavivirus* (ZIKV) e *Alphavirus* (CHIKV e MAYV). Demonstramos que *Loqs2* exerce uma atividade antiviral robusta e específica contra *Orthoflavivirus*, restringindo a infecção por ZIKV no intestino de mosquitos transgênicos com expressão direcionada, enquanto não apresentou efeito protetor contra os *Alphavirus* analisados. Esses achados indicam que *Loqs2* participa de uma resposta imune antiviral seletiva e tecido-específica, reforçando o papel do intestino como barreira primária à disseminação viral.

Observamos ainda que a eficácia antiviral de *Loqs2* pode ser modulada por fatores intrínsecos ao vetor. Em linhagens com fundo genético de campo, a atividade antiviral de *Loqs2* foi abolida, independentemente da presença do vírus específico de inseto PCLV. Essa ausência de efeito sugere que variantes genéticas naturais ou diferenças na regulação transcricional e pós-transcricional podem influenciar a eficácia da resposta antiviral mediada por *Loqs2*. Os dados também indicam que a coinfeção com múltiplos ISVs, e não a presença isolada de PCLV, pode ser necessária para modular a susceptibilidade do vetor a arbovírus.

Além disso, identificamos possíveis mecanismos de regulação inter-tecidual da resposta imune, como a supressão de *AGO2* na carcaça mediada por *Loqs2* intestinal, um fenômeno inédito que sugere a existência de circuitos de sinalização sistêmica no mosquito. A expressão diferencial de genes associados à via RNAi, como *AAEL004699*, *R2D2*, *Dicer-2* e *AAEL022113*, aponta para uma resposta imunológica compartimentalizada e potencialmente modulada pela presença de vírus persistentes.

Em conjunto, nossos resultados reforçam a importância de considerar o fundo genético e a composição do viroma nas investigações sobre a imuno competência vetorial. A atuação de *Loqs2* como fator antiviral contra *Orthoflavivirus* e sua limitação frente a *Togaviridae* destacam a complexidade das interações entre vírus e vetores, e sugerem que estratégias de controle baseadas na modulação da resposta imune devem ser específicas para cada vírus e adaptadas às características genéticas das populações locais de *Ae. aegypti*.

Esses achados contribuem para o entendimento dos determinantes moleculares da competência vetorial e abrem novas perspectivas para o desenvolvimento de abordagens inovadoras de controle de arbovirose, baseadas na manipulação genética ou imunológica de populações naturais de mosquitos.

PERSPECTIVAS

1. Consolidação dos dados sobre a atividade antiviral de Loqs2
 - Repetição dos ensaios de infecção por MAYV com o tamanho amostral ampliado, visando aumentar o poder estatístico e confirmar a consistência dos resultados observados.
 - Reavaliação do efeito de Loqs2 em infecções por ZIKV na linhagem de campo, garantindo que as conclusões sejam mais robustas;
2. Investigações de mecanismos da resposta antiviral
 - Análise das vias imunes Toll, IMD e JAK/STAT entre as linhagens de Bangkok e a de campo utilizada neste estudo, a fim de identificar possíveis diferenças de vias antivirais;
 - Perfis de expressão gênica em diferentes tempos pós-infecção, incluindo 4 dpi, para melhor compreensão da dinâmica da resposta imune.

REFERÊNCIAS

- ABAD-FRANCH, Fernando *et al.* Mayaro Virus Infection in Amazonia: A Multimodel Inference Approach to Risk Factor Assessment. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 6, n. 10, p. e1846, 2012.
- ABBO, Sandra R *et al.* The virome of the invasive Asian bush mosquito *Aedes japonicus* in Europe. **Virus Evolution**, [s. l.], v. 9, n. 2, p. vead041, 2023.
- ABDELNABI, Rana; NEYTS, Johan; DELANG, Leen. Towards antivirals against chikungunya virus. **Antiviral Research**, [s. l.], v. 121, p. 59–68, 2015.
- ACHESON, Nicholas H.; TAMM, Igor. Replication of semliki forest virus: An electron microscopic study. **Virology**, [s. l.], v. 32, n. 1, p. 128–143, 1967.
- ACOSTA, Eliana G.; CASTILLA, Viviana; DAMONTE, Elsa B. Functional entry of dengue virus into *Aedes albopictus* mosquito cells is dependent on clathrin-mediated endocytosis. **Journal of General Virology**, [s. l.], v. 89, n. 2, p. 474–484, 2008.
- AGARWAL, Ankita; PARIDA, Manmohan; DASH, Paban Kumar. Impact of transmission cycles and vector competence on global expansion and emergence of arboviruses. **Reviews in Medical Virology**, [s. l.], v. 27, n. 5, p. e1941, 2017.
- AGRAWAL, Neema *et al.* RNA Interference: Biology, Mechanism, and Applications. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, [s. l.], v. 67, n. 4, p. 657–685, 2003.
- AGUIAR, Eric Roberto Guimarães Rocha *et al.* A single unidirectional piRNA cluster similar to the flamenco locus is the major source of EVE-derived transcription and small RNAs in *Aedes aegypti* mosquitoes. **RNA**, [s. l.], v. 26, n. 5, p. 581–594, 2020.
- AGUIAR, Eric Roberto Guimarães Rocha *et al.* Sequence-independent characterization of viruses based on the pattern of viral small RNAs produced by the host. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 43, n. 13, p. 6191–6206, 2015.
- AGUIAR, Eric Roberto Guimarães Rocha; OLMO, Roenick Proveti; MARQUES, João Trindade. Virus-derived small RNAs: molecular footprints of host–pathogen interactions. **Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA**, [s. l.], v. 7, n. 6, p. 824–837, 2016.
- AKBARI, Omar S *et al.* The Developmental Transcriptome of the Mosquito *Aedes aegypti*, an Invasive Species and Major Arbovirus Vector. **G3 Genes|Genomes|Genetics**, [s. l.], v. 3, n. 9, p. 1493–1509, 2013.
- ALIOTA, Matthew T. *et al.* The wMel strain of *Wolbachia* Reduces Transmission of Zika virus by *Aedes aegypti*. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 28792, 2016.
- ALIROL, Emilie *et al.* Urbanisation and infectious diseases in a globalised world. **The Lancet Infectious Diseases**, [s. l.], v. 11, n. 2, p. 131–141, 2011.
- ALLISON, Steven L. *et al.* Mutational Evidence for an Internal Fusion Peptide in Flavivirus Envelope Protein E. **Journal of Virology**, [s. l.], v. 75, n. 9, p. 4268–4275, 2001.
- ALMEIDA, João Paulo Pereira de. **Explorando o viroma de mosquitos vetores: uma abordagem metagenômica utilizando pequenos RNAs da resposta imune do hospedeiro.**

2023. 184 f. Tese - Universidade de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2023. Disponível em: <https://repositorio.ufmg.br/handle/1843/80652>. Acesso em: 3 abr. 2025.

ALMEIDA, Iasmim Ferreira de *et al.* The expansion of chikungunya in Brazil. **The Lancet Regional Health – Americas**, [s. l.], v. 25, 2023. Disponível em: [https://www.thelancet.com/journals/lanam/article/PIIS2667-193X\(23\)00145-X/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lanam/article/PIIS2667-193X(23)00145-X/fulltext). Acesso em: 15 abr. 2025.

ALMEIDA-SOUZA, Pedro Augusto *et al.* High Frequencies of kdr Mutation and Chikungunya Infection in Aedes aegypti Population from Minas Gerais, Brazil. **Pathogens**, [s. l.], v. 13, n. 6, p. 457, 2024.

ALVES, Lise. Brazil hopes for new vaccine to combat dengue. **The Lancet**, [s. l.], v. 405, n. 10481, p. 770, 2025.

ANDERSON, Charles R. *et al.* Mayaro Virus: A New Human Disease Agent. [s. l.], 1957. Disponível em: <https://www.ajtmh.org/view/journals/tpmd/6/6/article-p1012.xml>. Acesso em: 16 abr. 2025.

ANDREWS, Simon. **Babraham Bioinformatics - FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data**. [S. l.], 2010. Disponível em: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>. Acesso em: 10 abr. 2025.

ANGELINI, R. *et al.* An outbreak of chikungunya fever in the province of Ravenna, Italy. **Weekly releases (1997–2007)**, [s. l.], v. 12, n. 36, p. 3260, 2007.

ANGLERÓ-RODRÍGUEZ, Yesseinia I. *et al.* Aedes aegypti Molecular Responses to Zika Virus: Modulation of Infection by the Toll and Jak/Stat Immune Pathways and Virus Host Factors. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 8, 2017. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2017.02050/full>. Acesso em: 7 abr. 2025.

ANGLERÓ-RODRÍGUEZ, Yesseinia I. *et al.* Aedes aegypti Toll pathway is induced through dsRNA sensing in endosomes. **Developmental & Comparative Immunology**, [s. l.], v. 122, p. 104138, 2021.

ANGLERÓ-RODRÍGUEZ, Yesseinia I. *et al.* An Aedes aegypti-associated fungus increases susceptibility to dengue virus by modulating gut trypsin activity. **eLife**, [s. l.], v. 6, p. e28844, 2017.

ARAÚJO, Thalia Velho Barreto de *et al.* Association between microcephaly, Zika virus infection, and other risk factors in Brazil: final report of a case-control study. **The Lancet Infectious Diseases**, [s. l.], v. 18, n. 3, p. 328–336, 2018.

ARAVIN, Alexei A.; HANNON, Gregory J.; BRENNECKE, Julius. The Piwi-piRNA Pathway Provides an Adaptive Defense in the Transposon Arms Race. **Science**, [s. l.], v. 318, n. 5851, p. 761–764, 2007.

ARBOUZOVA, Natalia I.; ZEIDLER, Martin P. JAK/STAT signalling in Drosophila: insights into conserved regulatory and cellular functions. **Development**, [s. l.], v. 133, n. 14, p. 2605–2616, 2006.

AUGUSTE, Albert J. *et al.* Evolutionary and Ecological Characterization of Mayaro Virus Strains Isolated during an Outbreak, Venezuela, 2010 - Volume 21, Number 10—October 2015 - Emerging Infectious Diseases journal - CDC. **Emerging Infectious Diseases**, [s. l.], v. 21, n. 10, p. 1742–1750, 2015.

AYERS, Jasmine B. *et al.* Clustered rapid induction of apoptosis limits ZIKV and DENV-2 proliferation in the midguts of *Aedes aegypti*. **Communications Biology**, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 1–9, 2021.

AYRES, C.F.J. *et al.* Genetic Differentiation of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), the Major Dengue Vector in Brazil. **Journal of Medical Entomology**, [s. l.], v. 40, n. 4, p. 430–435, 2003.

AZAR, Sasha R.; WEAVER, Scott C. Vector competence: What has Zika virus taught us?. **Viruses**, [s. l.], v. 11, n. 867, p. 1–24, 2019.

AZEVEDO, Raimunda S.S. *et al.* Mayaro Fever Virus, Brazilian Amazon. **Emerging Infectious Diseases**, [s. l.], v. 15, n. 11, p. 1830–1832, 2009.

BABARIT, Antinea. **ORIGIN AND FUNCTION OF LOQS2, A MOSQUITO-SPECIFIC DOUBLE-STRANDED RNA-BINDING PROTEIN**. 2023a. 135 f. Tese - UNIVERSITÉ DE STRASBOURG, STRASBOURG, 2023.

BABARIT, Antinea. **ORIGIN AND FUNCTION OF LOQS2, A MOSQUITO-SPECIFIC DOUBLE-STRANDED RNA-BINDING PROTEIN**. 2023b. 1–135 f. - Université de Strasbourg, [s. l.], 2023.

BAIDALIUK, Artem *et al.* Cell-Fusing Agent Virus Reduces Arbovirus Dissemination in *Aedes aegypti* Mosquitoes In Vivo. **Journal of Virology**, [s. l.], v. 93, n. 18, p. 10.1128/jvi.00705-19, 2019.

BALDON, Livia V. R. *et al.* AG129 Mice as a Comprehensive Model for the Experimental Assessment of Mosquito Vector Competence for Arboviruses. **Pathogens**, [s. l.], v. 11, n. 8, p. 879, 2022.

BAMFORD, Connor G G *et al.* Comparative analysis of genome-encoded viral sequences reveals the evolutionary history of flavivirids (family Flaviviridae). **Virus Evolution**, [s. l.], v. 8, n. 2, p. veac085, 2022.

BANG, In Seok. JAK/STAT signaling in insect innate immunity. **Entomological Research**, [s. l.], v. 49, n. 8, p. 339–353, 2019.

BANKEVICH, Anton *et al.* SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. **Journal of Computational Biology**, [s. l.], v. 19, n. 5, p. 455–477, 2012.

BARILLAS-MURY, Carolina *et al.* Anopheles gambiae Ag-STAT, a new insect member of the STAT family, is activated in response to bacterial infection. **The EMBO Journal**, [s. l.], v. 18, n. 4, p. 959–967, 1999.

BARILLAS-MURY, Carolina; RIBEIRO, José M. C.; VALENZUELA, Jesus G. Understanding pathogen survival and transmission by arthropod vectors to prevent human disease. **Science**, [s. l.], v. 377, n. 6614, p. eabc2757, 2022.

BARLETTA, Ana Beatriz Ferreira *et al.* Microbiota activates IMD pathway and limits Sindbis infection in *Aedes aegypti*. **Parasites & Vectors**, [s. l.], v. 10, p. 103, 2017.

BECK, Gregory; HABICHT, Gail S. Immunity and the Invertebrates. **Scientific American**, [s. l.], v. 275, n. 5, p. 60–66, 1996.

BEERNTSEN, B. T. *et al.* *Aedes aegypti*: A Quantitative Trait Locus (QTL) Influencing Filarial Worm Intensity Is Linked to QTL for Susceptibility to Other Mosquito-Borne Pathogens. **Experimental Parasitology**, [s. l.], v. 81, n. 3, p. 355–362, 1995.

BEERNTSEN, Brenda T.; JAMES, Anthony A.; CHRISTENSEN, Bruce M. Genetics of Mosquito Vector Competence. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, [s. l.], v. 64, n. 1, p. 115–137, 2000.

BEHURA, Susanta K.; SEVERSON, David W. Intrinsic features of *Aedes aegypti* genes affect transcriptional responsiveness of mosquito genes to dengue virus infection. **Infection, Genetics and Evolution**, [s. l.], v. 12, n. 7, p. 1413–1418, 2012.

BERNARD, Eric *et al.* Endocytosis of Chikungunya Virus into Mammalian Cells: Role of Clathrin and Early Endosomal Compartments. **PLOS ONE**, [s. l.], v. 5, n. 7, p. e11479, 2010.

BESSON, Benoit *et al.* Arbovirus-vector protein interactomics identifies Loquacious as a co-factor for dengue virus replication in *Aedes* mosquitoes. **PLoS Pathogens**, [s. l.], v. 18, n. 9, p. e1010329, 2022.

BESSON, Benoit *et al.* Pan-flavivirus analysis reveals sfRNA-independent, 3' UTR-biased siRNA production from an insect-specific flavivirus. **Journal of Virology**, [s. l.], v. 98, n. 11, p. e01215-24, 2024.

BEST, Sonja M. Flaviviruses. **Current Biology**, [s. l.], v. 26, n. 24, p. R1258–R1260, 2016.

BIAN, Guowu *et al.* The Endosymbiotic Bacterium *Wolbachia* Induces Resistance to Dengue Virus in *Aedes aegypti*. **PLoS Pathogens**, [s. l.], v. 6, n. 4, p. e1000833, 2010.

BIAN, Guowu *et al.* Transgenic alteration of Toll immune pathway in the female mosquito *Aedes aegypti*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 102, n. 38, p. 13568–13573, 2005.

BIRLEY, M. H.; CHARLWOOD, J. D. Vectorial capacity. **Parasitology Today**, [s. l.], v. 2, n. 9, p. 248, 1986.

BISCHOFF, Vincent *et al.* Function of the drosophila pattern-recognition receptor PGRP-SD in the detection of Gram-positive bacteria. **Nature Immunology**, [s. l.], v. 5, n. 11, p. 1175–1180, 2004.

BISWAL, Shibadas *et al.* Efficacy of a Tetravalent Dengue Vaccine in Healthy Children and Adolescents. **New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 381, n. 21, p. 2009–2019, 2019.

BLACK, William C. *et al.* Flavivirus Susceptibility in *Aedes aegypti*. **Archives of Medical Research**, [s. l.], v. 33, n. 4, p. 379–388, 2002.

BLITVICH, Bradley J.; FIRTH, Andrew E. Insect-Specific Flaviviruses: A Systematic Review of Their Discovery, Host Range, Mode of Transmission, Superinfection Exclusion Potential and Genomic Organization. **Viruses**, [s. l.], v. 7, n. 4, p. 1927–1959, 2015.

BOEHM, Emma C. *et al.* Wolbachia-mediated resistance to Zika virus infection in *Aedes aegypti* is dominated by diverse transcriptional regulation and weak evolutionary pressures. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 17, n. 10, p. e0011674, 2023.

BOLAND, Andreas *et al.* Crystal structure of the MID-PIWI lobe of a eukaryotic Argonaute protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 108, n. 26, p. 10466–10471, 2011.

BOLLING, Bethany G. *et al.* Insect-specific virus discovery: Significance for the arbovirus community. **Viruses**, [s. l.], v. 7, p. 4911–4928, 2015.

BOLLING, Bethany G. *et al.* Transmission dynamics of an insect-specific flavivirus in a naturally infected *Culex pipiens* laboratory colony and effects of co-infection on vector competence for West Nile virus. **Virology**, [s. l.], v. 427, n. 2, p. 90–97, 2012.

BOSIO, Christopher F *et al.* Quantitative Trait Loci That Control Vector Competence for Dengue-2 Virus in the Mosquito *Aedes aegypti*. **Genetics**, [s. l.], v. 156, n. 2, p. 687–698, 2000.

BOSIO, C. F.; BEATY, B. J.; BLACK, W. C. Quantitative genetics of vector competence for dengue-2 virus in *Aedes aegypti*. [s. l.], 1998. Disponível em: <https://www.ajtmh.org/view/journals/tpmd/59/6/article-p965.xml>. Acesso em: 26 abr. 2025.

BRACKNEY, Doug E. *et al.* C6/36 *Aedes albopictus* Cells Have a Dysfunctional Antiviral RNA Interference Response. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 4, n. 10, p. e856, 2010.

BRASIL. **Portaria de Consolidação nº 4, de 28 de setembro de 2017.pdf — Ministério da Saúde**. [S. l.], 2017. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/z/zika-virus/legislacao/portaria-de-consolidacao-no-4-de-28-de-setembro-de-2017.pdf/view>. Acesso em: 16 abr. 2025.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Boletim Epidemiológico - Volume 55 - nº 11 — Ministério da Saúde**. [S. l.], 2024a. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/edicoes/2024/boletim-epidemiologico-volume-55-no-11.pdf/view>. Acesso em: 15 abr. 2025.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Boletim Epidemiológico. Situação epidemiológica da síndrome congênita associada à infecção pelo vírus Zika: Brasil, 2015 a 2023. [s. l.], v. 55, 2024b. Disponível em: <http://plataforma.saude.gov.br/anomalias-congenitas/boletim-epidemiologico-SVSA-05-2024.pdf>. Acesso em: 23 fev. 2025.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Chikungunya**. [S. l.], [s. d.]. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/c/chikungunya/chikungunya>. Acesso em: 15 abr. 2025 a.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Febre do Mayaro**. [S. l.], [s. d.]. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/f/febre-do-mayaro/febre-do-mayaro>. Acesso em: 16 abr. 2025 b.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Painel de Monitoramento das Arboviroses**. [S. l.], 2025. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/a/aedes-aegypti/monitoramento-das-arboviroses/painel>. Acesso em: 22 fev. 2025.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Série histórica - Casos prováveis de Chikungunya (2014-2023) — Ministério da Saúde**. [S. l.], 2024c. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/c/chikungunya/situacao-epidemiologica/serie-historica-casos-provaveis-de-chikungunya-2014-2023/view>. Acesso em: 28 abr. 2025.

BRENNECKE, Julius *et al.* Discrete Small RNA-Generating Loci as Master Regulators of Transposon Activity in *Drosophila*. **Cell**, [s. l.], v. 128, n. 6, p. 1089–1103, 2007.

BRONKHORST, Alfred W.; VAN RIJ, Ronald P. The long and short of antiviral defense: Small RNA-based immunity in insects. **Current Opinion in Virology**, [s. l.], v. 7, p. 19–28, 2014.

BROWN, Rebecca S.; WAN, Judy J.; KIELIAN, Margaret. The Alphavirus Exit Pathway: What We Know and What We Wish We Knew. **Viruses**, [s. l.], v. 10, n. 2, p. 89, 2018.

BUCHFINK, Benjamin; REUTER, Klaus; DROST, Hajk-Georg. Sensitive protein alignments at tree-of-life scale using DIAMOND. **Nature Methods**, [s. l.], v. 18, n. 4, p. 366–368, 2021.

BUTTON, Julie M *et al.* Revisiting an old friend: new findings in alphavirus structure and assembly. **Current Opinion in Virology**, [s. l.], v. 45, 45. Virus structure & Expression (Dec 2020), p. 25–33, 2020.

CAI, Xuezhong; HAGEDORN, Curt H.; CULLEN, Bryan R. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. **Rna**, [s. l.], v. 10, n. 12, p. 1957–1966, 2004.

CAMACHO, Christiam *et al.* BLAST+: architecture and applications. **BMC Bioinformatics**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 421, 2009.

CAMPBELL, C. L. *et al.* MICRORNA levels are modulated in *Aedes aegypti* after exposure to Dengue-2. **Insect Molecular Biology**, [s. l.], v. 23, n. 1, p. 132–139, 2014.

CAMPOS, Gubio S.; BANDEIRA, Antonio C.; SARDI, Silvia I. Zika Virus Outbreak, Bahia, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, [s. l.], v. 21, n. 10, p. 1885–1886, 2015.

CANSADO-UTRILLA, Cintia *et al.* The microbiome and mosquito vectorial capacity: rich potential for discovery and translation. **Microbiome**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 111, 2021.

CAO, Sheng; ZHANG, Wei. Characterization of an early-stage fusion intermediate of Sindbis virus using cryoelectron microscopy. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 110, n. 33, p. 13362–13367, 2013.

CAO-LORMEAU, Van Mai *et al.* RE: Zika virus, French Polynesia, South Pacific, 2013. **Emerging Infectious Diseases**, [s. l.], v. 20, n. 6, p. 1085–1086, 2014.

CARAGATA, Eric P. *et al.* Competition for Amino Acids Between *Wolbachia* and the Mosquito Host, *Aedes aegypti*. **Microbial Ecology**, [s. l.], v. 67, n. 1, p. 205–218, 2014.

CARDOSO, Cristiane W. *et al.* Unrecognized Emergence of Chikungunya Virus during a Zika Virus Outbreak in Salvador, Brazil. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. e0005334, 2017.

CARPENTER, Alexis; CLEM, Rollie J. Factors Affecting Arbovirus Midgut Escape in Mosquitoes. **Pathogens**, [s. l.], v. 12, n. 2, p. 220, 2023.

CARRASCO, Luis; SANZ, Miguel Angel; GONZÁLEZ-ALMELA, Esther. The Regulation of Translation in Alphavirus-Infected Cells. **Viruses**, [s. l.], v. 10, n. 2, p. 70, 2018.

CARVALHO, F. D.; MOREIRA, L. A. Why is *Aedes aegypti* Linnaeus so Successful as a Species?. **Neotropical Entomology**, [s. l.], v. 46, n. 3, p. 243–255, 2017.

CASALS, JORDI; WHITMAN, LORING. Mayaro virus: a new human disease agent. I. Relationship to other arbor viruses. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, [s. l.], v. 6, n. 6, p. 1004–1111, 1957.

CASSADO, S *et al.* Emergence of chikungunya fever on the French side of Saint Martin island, October to December 2013. **Eurosurveillance**, [s. l.], v. 19, n. 13, 2014. Disponível em: <https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/1560-7917.ES2014.19.13.20752>. Acesso em: 15 abr. 2025.

CASTILLO-MÉNDEZ, Manuel; VALVERDE-GARDUÑO, Verónica. *Aedes aegypti* Immune Response and Its Potential Impact on Dengue Virus Transmission. **Viral Immunology**, [s. l.], v. 33, n. 1, p. 38–47, 2020.

CASTRO, Carlos Felipe Estevez. **ORIGIN, EVOLUTION AND FUNCTION OF loqs2, A GENE ENCODING AN Aedes SPECIFIC DOUBLE-STRANDED RNA BINDING PROTEIN**. 2024. 156 f. Tese - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2024.

CAUSEY, Ottis R.; MAROJA, Otavio M. Mayaro Virus: A New Human Disease Agent. [s. l.], 1957. Disponível em: <https://www.ajtmh.org/view/journals/tpmd/6/6/article-p1017.xml>. Acesso em: 16 abr. 2025.

CDC DIVISION OF VECTOR-BORNE DISEASES (DVBD). **Arbovirus Catalog**. [S. l.], [s. d.]. Disponível em: <https://wwwn.cdc.gov/arboicat/>. Acesso em: 5 mar. 2025.

CERUTTI, Heriberto; CASAS-MOLLANO, J. Armando. On the origin and functions of RNA-mediated silencing: from protists to man. **Current Genetics**, [s. l.], v. 50, n. 2, p. 81–99, 2006.

CERUTTI, Lorenzo; MIAN, Nina; BATEMAN, Alex. Domains in gene silencing and cell differentiation proteins: the novel PAZ domain and redefinition of the Piwi domain. **Trends in Biochemical Sciences**, [s. l.], v. 25, n. 10, p. 481–482, 2000.

CHAMBERS, Thomas J. *et al.* FLAVIVIRUS GENOME ORGANIZATION, EXPRESSION, AND REPLICATION. **Annual Review of Microbiology**, [s. l.], v. 44, n. 1, p. 649–688, 1990.

CHARLYS DA COSTA, Antonio *et al.* Spread of Chikungunya Virus East/Central/South African Genotype in Northeast Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, [s. l.], v. 23, n. 10, p. 1742–1744, 2017.

CHAVES, Bárbara Aparecida *et al.* Dengue Infection Susceptibility of Five *Aedes aegypti* Populations from Manaus (Brazil) after Challenge with Virus Serotypes 1–4. **Viruses**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 20, 2021.

CHEDIAK, Mateus *et al.* Spatial and temporal country-wide survey of temephos resistance in Brazilian populations of *Aedes aegypti*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s. l.], v. 111, n. 5, p. 311–321, 2016.

CHEN, Tse-Yu *et al.* *Aedes aegypti* adiponectin receptor-like protein signaling facilitates Zika virus infection. **mBio**, [s. l.], v. 15, n. 11, p. e02433-24, 2024.

CHEN, Rubing *et al.* ICTV Virus Taxonomy Profile: Togaviridae. **Journal of General Virology**, [s. l.], v. 99, n. 6, p. 761–762, 2018.

CHEN, Tse-Yu *et al.* Immune-related transcripts, microbiota and vector competence differ in dengue-2 virus-infected geographically distinct *Aedes aegypti* populations. **Parasites & Vectors**, [s. l.], v. 16, n. 1, p. 166, 2023.

CHEN, Xiang *et al.* The subgenomic flaviviral RNA suppresses RNA interference through competing with siRNAs for binding RISC components. **Journal of Virology**, [s. l.], v. 98, n. 2, p. e01954-23, 2024.

CHEN, Wei; WHITE, Michael A.; COBB, Melanie H. Stimulus-specific Requirements for MAP3 Kinases in Activating the JNK Pathway*. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 277, n. 51, p. 49105–49110, 2002.

CHOWDHURY, Avisha *et al.* JNK pathway restricts DENV2, ZIKV and CHIKV infection by activating complement and apoptosis in mosquito salivary glands. **PLoS Pathogens**, [s. l.], v. 16, n. 8, p. e1008754, 2020.

CHU, J. J. H.; NG, M. L. Infectious Entry of West Nile Virus Occurs through a Clathrin-Mediated Endocytic Pathway. **Journal of Virology**, [s. l.], v. 78, n. 19, p. 10543–10555, 2004.

CHUNG, Betty Y. -W.; FIRTH, Andrew E.; ATKINS, John F. Frameshifting in Alphaviruses: A Diversity of 3' Stimulatory Structures. **Journal of Molecular Biology**, [s. l.], v. 397, n. 2, p. 448–456, 2010.

CI, Yali; SHI, Lei. Compartmentalized replication organelle of flavivirus at the ER and the factors involved. **Cellular and Molecular Life Sciences**, [s. l.], v. 78, n. 11, p. 4939–4954, 2021.

CIOTA, Alexander T.; KRAMER, Laura D. Insights into Arbovirus Evolution and Adaptation from Experimental Studies. **Viruses**, [s. l.], v. 2, n. 12, p. 2594–2617, 2010.

CLYDE, Karen; BARRERA, Julio; HARRIS, Eva. The capsid-coding region hairpin element (cHP) is a critical determinant of dengue virus and West Nile virus RNA synthesis. **Virology**, [s. l.], v. 379, n. 2, p. 314–323, 2008.

CLYDE, Karen; HARRIS, Eva. RNA Secondary Structure in the Coding Region of Dengue Virus Type 2 Directs Translation Start Codon Selection and Is Required for Viral Replication. **Journal of Virology**, [s. l.], v. 80, n. 5, p. 2170–2182, 2006.

CONSOLI, Rotraut A. G. B.; OLIVEIRA, Ricardo Lourenço de. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. Rio de Janeiro: [s. n.], 1994.

CONWAY, Michael J.; COLPITTS, Tonya M.; FIKRIG, Erol. Role of the Vector in Arbovirus Transmission. **Annual review of virology**, [s. l.], v. 1, n. 1, p. 71–88, 2014.

COON, Kerri L. *et al.* Mosquitoes rely on their gut microbiota for development. **Molecular Ecology**, [s. l.], v. 23, n. 11, p. 2727–2739, 2014.

COOPER, Dawn M.; CHAMBERLAIN, Ciara M.; LOWENBERGER, Carl. Aedes FADD: A novel death domain-containing protein required for antibacterial immunity in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, [s. l.], v. 39, n. 1, p. 47–54, 2009.

COSTA-DA-SILVA, André Luis *et al.* First report of naturally infected *Aedes aegypti* with chikungunya virus genotype ECSA in the Americas. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 11, n. 6, p. e0005630, 2017.

CUI, Yingjun *et al.* Zika virus dissemination from the midgut of *aedes aegypti* is facilitated by bloodmeal-mediated structural modification of the midgut basal lamina. **Viruses**, [s. l.], v. 11, n. 11, 2019.

CULLEN, Bryan R. RNA interference: Antiviral defense and genetic tool. **Nature Immunology**, [s. l.], v. 3, n. 7, p. 597–599, 2002.

CUNHA, Marcela S. *et al.* Autochthonous Transmission of East/Central/South African Genotype Chikungunya Virus, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, [s. l.], v. 23, n. 10, p. 1737–1739, 2017.

DA ENCARNAÇÃO SÁ-GUIMARÃES, Thayane *et al.* Route of Zika virus infection in *Aedes aegypti* by transmission electron microscopy. **BMC Microbiology**, [s. l.], v. 21, n. 300, p. 1–9, 2021.

DABO, Stéphanie *et al.* **Extensive variation and strain-specificity in dengue virus susceptibility among African *Aedes aegypti* populations**. [S. l.]: bioRxiv, 2023. Disponível em: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2023.12.14.571617v1>. Acesso em: 4 abr. 2025.

DARNELL, James E.; KERR, Ian M.; STARK, George R. Jak-STAT Pathways and Transcriptional Activation in Response to IFNs and Other Extracellular Signaling Proteins. **Science**, [s. l.], v. 264, n. 5164, p. 1415–1421, 1994.

DAVIS, Larry E.; BECKHAM, J. David; TYLER, Kenneth L. North American Encephalitic Arboviruses. **Neurologic Clinics**, [s. l.], v. 26, n. 3, p. 727–757, 2008.

DE ALMEIDA, João PP *et al.* The virome of vector mosquitoes. **Current Opinion in Virology**, [s. l.], v. 49, p. 7–12, 2021.

DE CALUWÉ, Lien; ARIËN, Kevin K.; BARTHOLOMEËUSEN, Koen. Host Factors and Pathways Involved in the Entry of Mosquito-Borne Alphaviruses. **Trends in Microbiology**, [s. l.], v. 29, n. 7, p. 634–647, 2021.

DE CURTIS, I; SIMONS, K. Dissection of Semliki Forest virus glycoprotein delivery from the trans-Golgi network to the cell surface in permeabilized BHK cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 85, n. 21, p. 8052–8056, 1988.

DE FRANÇA CIRILO, Marcus Vinicius *et al.* Co-circulation of Chikungunya virus, Zika virus, and serotype 1 of Dengue virus in Western Bahia, Brazil. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 14, 2023. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2023.1240860/full>. Acesso em: 16 abr. 2025.

DE FREITAS, Amanda Cupertino *et al.* Infectivity and Dissemination of Dengue Virus-1 in Different *Aedes aegypti* Populations Throughout Brazil. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, [s. l.], v. 10, n. 4, p. 112, 2025.

DE FREITAS, Amanda *et al.* The High Capacity of Brazilian *Aedes aegypti* Populations to Transmit a Locally Circulating Lineage of Chikungunya Virus. **Viruses**, [s. l.], v. 16, n. 4, p. 575, 2024.

DE LIMA, Shirlene Telmos Silva *et al.* Fatal Outcome of Chikungunya Virus Infection in Brazil. **Clinical Infectious Diseases**, [s. l.], v. 73, n. 7, p. e2436–e2443, 2021.

DE MENDONÇA, Silvana F. *et al.* Oropouche orthobunyavirus in Urban Mosquitoes: Vector Competence, Coinfection, and Immune System Activation in *Aedes aegypti*. **Viruses**, [s. l.], v. 17, n. 4, p. 492, 2025.

DE PAULA SILVEIRA-LACERDA, Elisângela *et al.* Molecular epidemiological investigation of Mayaro virus in febrile patients from Goiania City, 2017–2018. **Infection, Genetics and Evolution**, [s. l.], v. 95, p. 104981, 2021.

DEDDOUCHE, Safia *et al.* The DExD/H-box helicase Dicer-2 mediates the induction of antiviral activity in drosophila. **Nature Immunology**, [s. l.], v. 9, n. 12, p. 1425–1432, 2008.

DELISLE, E. *et al.* Chikungunya outbreak in Montpellier, France, September to October 2014. **Eurosurveillance**, [s. l.], v. 20, n. 17, 2015. Disponível em: <https://hal.umontpellier.fr/hal-01990048>. Acesso em: 15 abr. 2025.

DENLI, Ahmet M. *et al.* Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. **Nature**, [s. l.], v. 432, p. 231–235, 2004.

DESOUSA, Dorothy *et al.* A Novel Double-stranded RNA-binding Protein, Disco Interacting Protein 1 (DIP1), Contributes to Cell Fate Decisions during *Drosophila* Development *. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 278, n. 39, p. 38040–38050, 2003.

DIALLO, M *et al.* Vectors of Chikungunya virus in Senegal: current data and transmission cycles. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, [s. l.], v. 60, n. 2, p. 281–286, 1999.

DICK, G.W.A; KITCHEN, S.F; HADDOW, A.J. Zika Virus (I). Isolations and serological specificity. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, [s. l.], v. 46, n. 5, p. 509–520, 1952.

DIDION, Elise M. *et al.* Microbiome reduction prevents lipid accumulation during early diapause in the northern house mosquito, *Culex pipiens pipiens*. **Journal of Insect Physiology**, [s. l.], v. 134, p. 104295, 2021.

DING, Shou-Wei. RNA-based antiviral immunity. **Nature Reviews Immunology**, [s. l.], v. 10, n. 9, p. 632–644, 2010.

DIOSA-TORO, Mayra *et al.* Role of RNA-binding proteins during the late stages of Flavivirus replication cycle. **Virology Journal**, [s. l.], v. 17, p. 60, 2020.

DONALD, Claire L. *et al.* Full Genome Sequence and sfRNA Interferon Antagonist Activity of Zika Virus from Recife, Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 10, n. 10, p. e0005048, 2016.

DONG, Shengzhang *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**, [s. l.], v. 11, n. 9, p. e0005976, 2017.

DONG, Shengzhang *et al.* Infection pattern and transmission potential of chikungunya virus in two New World laboratory-adapted *Aedes aegypti* strains. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 24729, 2016.

DONG, Yuemei *et al.* The *Aedes aegypti* siRNA pathway mediates broad-spectrum defense against human pathogenic viruses and modulates antibacterial and antifungal defenses. **PLoS Biology**, [s. l.], v. 20, n. 6, 2022.

DORIGATTI, Ilaria *et al.* Using Wolbachia for dengue control: insights from modelling. **Trends in parasitology**, [s. l.], v. 34, n. 2, p. 102–113, 2018.

DOSTERT, Catherine *et al.* The Jak-STAT signaling pathway is required but not sufficient for the antiviral response of drosophila. **Nature Immunology**, [s. l.], v. 6, n. 9, p. 946–953, 2005.

DUAN, YanPing *et al.* Flavivirus RNA-Dependent RNA Polymerase Interacts with Genome UTRs and Viral Proteins to Facilitate Flavivirus RNA Replication. **Viruses**, [s. l.], v. 11, n. 10, p. 929, 2019.

DUFFY, Mark R. *et al.* Zika Virus Outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. **New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 360, n. 24, p. 2536–2543, 2009.

DUPONT-ROUZEYROL, Myrielle *et al.* Co-infection with Zika and Dengue Viruses in 2 Patients, New Caledonia, 2014 - Volume 21, Number 2—February 2015 - Emerging Infectious Diseases journal - CDC. **Emerging Infectious Diseases**, [s. l.], v. 21, n. 2, 2015. Disponível em: https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/21/2/14-1553_article. Acesso em: 15 fev. 2025.

DUPUIS, Stéphanie *et al.* Impaired response to interferon- α/β and lethal viral disease in human STAT1 deficiency. **Nature Genetics**, [s. l.], v. 33, n. 3, p. 388–391, 2003.

DUTRA, Heverton Leandro Carneiro *et al.* Wolbachia Blocks Currently Circulating Zika Virus Isolates in Brazilian *Aedes aegypti* Mosquitoes. **Cell Host & Microbe**, [s. l.], v. 19, n. 6, p. 771–774, 2016.

EDER, Marcus *et al.* Scoping review on vector-borne diseases in urban areas: transmission dynamics, vectorial capacity and co-infection. **Infectious Diseases of Poverty**, [s. l.], v. 7, p. 90, 2018.

ELBASHIR, Sayda M. *et al.* Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. **EMBO Journal**, [s. l.], v. 20, n. 23, p. 6877–6888, 2001.

ELBASHIR, S. M.; LENDECKEL, W.; TUSCHL, T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. **Genes and Development**, [s. l.], v. 15, p. 188–200, 2001.

ELSHUBER, Sigrid *et al.* Cleavage of protein prM is necessary for infection of BHK-21 cells by tick-borne encephalitis virus FN1. **Journal of General Virology**, [s. l.], v. 84, n. 1, p. 183–191, 2003.

ERTÜRK-HASDEMİR, Deniz *et al.* Two roles for the *Drosophila* IKK complex in the activation of Relish and the induction of antimicrobial peptide genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 106, n. 24, p. 9779–9784, 2009.

ESTEVEZ-CASTRO, Carlos F. *et al.* Neofunctionalization driven by positive selection led to the retention of the *loqs2* gene encoding an *Aedes* specific dsRNA binding protein. **BMC Biology**, [s. l.], v. 22, n. 1, p. 14, 2024.

ETEBARI, Kayvan *et al.* Dengue virus infection alters post-transcriptional modification of microRNAs in the mosquito vector *Aedes aegypti*. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 15968, 2015.

FARIA, Nuno Rodrigues *et al.* Zika virus in the Americas: Early epidemiological and genetic findings. **Science**, [s. l.], v. 352, n. 6283, p. 345–349, 2016.

FAUCI, Anthony S.; MORENS, David M. Zika Virus in the Americas — Yet Another Arbovirus Threat. **New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 374, n. 7, p. 601–604, 2016.

FAY, R. W.; MORLAN, H.B. A mechanical device for separating the developmental stages, sexes and species of mosquitoes. **Mosquito News**, [s. l.], v. 19, p. 144–147, 1959.

FERREIRA, Qesya Rodrigues *et al.* Role of the Microbiome in *Aedes* spp. Vector Competence: What Do We Know?. **Viruses**, [s. l.], v. 15, n. 3, p. 779, 2023.

FILOMATO, Claudia V. *et al.* A 5' RNA element promotes dengue virus RNA synthesis on a circular genome. **Genes & Development**, [s. l.], v. 20, n. 16, p. 2238–2249, 2006.

FINN, Robert D. *et al.* InterPro in 2017—beyond protein family and domain annotations. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 45, n. D1, p. D190–D199, 2017.

FIRE, Andrew *et al.* Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, [s. l.], v. 391, n. 6669, p. 806–811, 1998.

FIRTH, Andrew E. *et al.* Discovery of frameshifting in Alphavirus 6K resolves a 20-year enigma. **Virology Journal**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 108, 2008.

FISHBURN, Adam T. *et al.* Let's Get Physical: Flavivirus-Host Protein-Protein Interactions in Replication and Pathogenesis. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 13, 2022. Disponível em:

<https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2022.847588/full>.

Acesso em: 26 jan. 2025.

FORATO, Julia *et al.* Molecular Epidemiology of Mayaro Virus among Febrile Patients, Roraima State, Brazil, 2018–2021 - Volume 30, Number 5—May 2024 - Emerging Infectious Diseases journal - CDC. [s. l.], v. 30, n. 1013–1016, 2024. Disponível em: https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/30/5/23-1406_article. Acesso em: 16 abr. 2025.

FORATTINI, Oswaldo Paulo; BRITO, Marylene de. Reservatórios domiciliares de água e controle do *Aedes aegypti*. **Revista de Saúde Pública**, [s. l.], v. 37, p. 676–677, 2003.

FÖRSTEMANN, Klaus *et al.* Normal microRNA maturation and germ-line stem cell maintenance requires loquacious, a double-stranded RNA-binding domain protein. **PLoS Biology**, [s. l.], v. 3, n. 7, p. e236, 2005.

FOSTER, Woodbridge A.; WALKER, Edward D. Mosquitoes (Culicidae). In: MEDICAL AND VETERINARY ENTOMOLOGY. [s. l.]: Elsevier, 2019. p. 261–325. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128140437000157>. Acesso em: 30 dez. 2024.

FRAGKLOUDIS, R. *et al.* Semliki Forest virus strongly reduces mosquito host defence signaling. **Insect Molecular Biology**, [s. l.], v. 17, n. 6, p. 647–656, 2008.

FRANZ, Alexander W.E. *et al.* Tissue Barriers to Arbovirus Infection in Mosquitoes. **Viruses**, [s. l.], v. 7, n. 7, p. 3741–3767, 2015.

FRITSCH, Hegger *et al.* Retrospective Genomic Surveillance of Chikungunya Transmission in Minas Gerais State, Southeast Brazil. **Microbiology Spectrum**, [s. l.], v. 10, n. 5, p. e01285-22, 2022.

FROLOVA, E; FROLOV, I; SCHLESINGER, S. Packaging signals in alphaviruses. **Journal of Virology**, [s. l.], v. 71, n. 1, p. 248–258, 1997.

FROS, Jelke J. *et al.* Comparative Usutu and West Nile virus transmission potential by local *Culex pipiens* mosquitoes in north-western Europe. **One Health**, [s. l.], v. 1, p. 31–36, 2015.

FU, X Y *et al.* The proteins of ISGF-3, the interferon alpha-induced transcriptional activator, define a gene family involved in signal transduction. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 89, n. 16, p. 7840–7843, 1992.

GAEDIGK-NITSCHKO, Kerstin; SCHLESINGER, Milton J. The sindbis virus 6K protein can be detected in virions and is acylated with fatty acids. **Virology**, [s. l.], v. 175, n. 1, p. 274–281, 1990.

GANJIAN, Niloofar; RIVIERE-CINNAMOND, Ana. Mayaro virus in Latin America and the Caribbean. **Revista Panamericana de Salud Pública**, [s. l.], v. 44, p. e14, 2020.

GARCIA-BLANCO, Mariano A. *et al.* Flavivirus RNA transactions from viral entry to genome replication. **Antiviral Research**, [s. l.], v. 134, p. 244–249, 2016.

GARVER, Lindsey S.; DONG, Yuemei; DIMOPOULOS, George. Caspar Controls Resistance to *Plasmodium falciparum* in Diverse Anopheline Species. **PLOS Pathogens**, [s. l.], v. 5, n. 3, p. e1000335, 2009.

GEIGENMÜLLER-GNIRKE, U; NITSCHKO, H; SCHLESINGER, S. Deletion analysis of the capsid protein of Sindbis virus: identification of the RNA binding region. **Journal of Virology**, [s. l.], v. 67, n. 3, p. 1620–1626, 1993.

GENDRIN, Mathilde *et al.* The Peptidoglycan Recognition Proteins PGRPLA and PGRPLB Regulate Anopheles Immunity to Bacteria and Affect Infection by *Plasmodium*. **Journal of Innate Immunity**, [s. l.], v. 9, n. 4, p. 333–342, 2017.

GEOGHEGAN, Vincent *et al.* Perturbed cholesterol and vesicular trafficking associated with dengue blocking in Wolbachia-infected *Aedes aegypti* cells. **Nature Communications**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 526, 2017.

GHOSH, Julie *et al.* Invertebrate immune diversity. **Developmental & Comparative Immunology**, [s. l.], v. 35, n. 9, Special issue: In Honour of Gregory Warr, p. 959–974, 2011.

GIBBONS, Don L. *et al.* Multistep Regulation of Membrane Insertion of the Fusion Peptide of Semliki Forest Virus. **Journal of Virology**, [s. l.], v. 78, n. 7, p. 3312–3318, 2004.

GOBERT, Vanessa *et al.* Dual Activation of the *Drosophila* Toll Pathway by Two Pattern Recognition Receptors. **Science**, [s. l.], v. 302, n. 5653, p. 2126–2130, 2003.

GODOY, Raquel Soares Maia *et al.* Dengue and Zika virus infection patterns vary among *Aedes aegypti* field populations from Belo Horizonte, a Brazilian endemic city. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 15, n. 11, p. e0009839, 2021.

GOMES DA SILVA, Priscilla *et al.* Serological Cross-Reactivity in Zoonotic Flaviviral Infections of Medical Importance. **Antibodies**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 18, 2023.

GOMES, Helierson; DE JESUS, Andrielly Gomes; QUARESMA, Juarez Antônio Simões. Identification of risk areas for arboviruses transmitted by *Aedes aegypti* in northern Brazil: A One Health analysis. **One Health**, [s. l.], v. 16, p. 100499, 2023.

GONÇALVES, Caroline M. *et al.* Distinct variation in vector competence among nine field populations of *Aedes aegypti* from a Brazilian dengue-endemic risk city. **Parasites & Vectors**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 320, 2014.

GORCHAKOV, Rodion *et al.* A New Role for ns Polyprotein Cleavage in Sindbis Virus Replication. **Journal of Virology**, [s. l.], v. 82, n. 13, p. 6218–6231, 2008.

GRANDADAM, Marc *et al.* Chikungunya Virus, Southeastern France. **Emerging Infectious Diseases**, [s. l.], v. 17, n. 5, p. 910–913, 2011.

GREEN, Jon *et al.* Passage of viral membrane proteins through the Golgi complex. **Journal of Molecular Biology**, [s. l.], v. 152, n. 4, p. 663–698, 1981.

GREGORY, Richard I. *et al.* The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. **Nature**, [s. l.], v. 432, p. 235–240, 2004.

GRIEF, C. *et al.* Intracellular localisation of dengue-2 RNA in mosquito cell culture using electron microscopic in situ hybridisation. **Archives of Virology**, [s. l.], v. 142, n. 12, p. 2347–2357, 1997.

GUBLER, Duane J. Human arbovirus infections worldwide. **Annals of the New York Academy of Sciences**, [s. l.], v. 951, n. 1, p. 13–24, 2006.

GUÉGAN, Morgane *et al.* The mosquito holobiont: fresh insight into mosquito-microbiota interactions. **Microbiome**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 49, 2018.

GUNAWARDANE, Lalith S. *et al.* A slicer-mediated mechanism for repeat-associated siRNA 5' end formation in *Drosophila*. **Science**, [s. l.], v. 315, n. 5818, p. 1587–1590, 2007.

HAAC, Mary Etna *et al.* The hub protein loquacious connects the microRNA and short interfering RNA pathways in mosquitoes. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 43, n. 7, p. 3688–3700, 2015.

HAMMON, W. McD.; RUNDNICK, A.; SATHER, G. E. Viruses Associated with Epidemic Hemorrhagic Fevers of the Philippines and Thailand. **Science**, [s. l.], v. 131, n. 3407, p. 1102–1103, 1960.

HAMMOND, Scott M. *et al.* An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. **Nature**, [s. l.], v. 404, p. 293–296, 2000.

HANLEY, Kathryn A.; WEAVER, Scott C. Arbovirus Evolution. *In*: ORIGIN AND EVOLUTION OF VIRUSES. [S. l.]: Elsevier, 2008. p. 351–391. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123741530000163>. Acesso em: 15 out. 2024.

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

HASAN, S. Saif *et al.* Cryo-EM Structures of Eastern Equine Encephalitis Virus Reveal Mechanisms of Virus Disassembly and Antibody Neutralization. **Cell Reports**, [s. l.], v. 25, n. 11, p. 3136–3147.e5, 2018.

HASHIMOTO, Carl; HUDSON, Kathy L.; ANDERSON, Kathryn V. The *Toll* gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. **Cell**, [s. l.], v. 52, n. 2, p. 269–279, 1988.

HAYD, Ramão Luciano Nogueira *et al.* Persistent chikungunya arthritis in Roraima, Brazil. **Clinical Rheumatology**, [s. l.], v. 39, n. 9, p. 2781–2787, 2020.

HEANG, Vireak *et al.* Zika Virus Infection, Cambodia, 2010. **Emerging Infectious Diseases**, [s. l.], v. 18, n. 2, p. 349–351, 2012.

HERNANDEZ, Raquel; BROWN, Dennis T.; PAREDES, Angel. Structural Differences Observed in Arboviruses of the Alphavirus and Flavivirus Genera. **Advances in Virology**, [s. l.], v. 2014, n. 1, p. 259382, 2014.

HIGUERA, Adriana; RAMÍREZ, Juan David. Molecular epidemiology of dengue, yellow fever, Zika and Chikungunya arboviruses: An update. **Acta Tropica**, [s. l.], v. 190, p. 99–111, 2019.

HILLYER, Julián F. Insect immunology and hematopoiesis. **Developmental and comparative immunology**, [s. l.], v. 58, p. 102–118, 2016.

HIRAGI, Cassia *et al.* Variabilidade Genética em Populações de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) Utilizando Marcadores de RAPD. **Neotropical Entomology**, [s. l.], v. 38, p. 542–547, 2009.

HIRAKATA, Shigeki; SIOMI, Mikiko C. piRNA biogenesis in the germline: From transcription of piRNA genomic sources to piRNA maturation. **Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms**, [s. l.], v. 1859, n. 1, p. 82–92, 2016.

HOBSON-PETERS, Jody *et al.* A New Insect-Specific Flavivirus from Northern Australia Suppresses Replication of West Nile Virus and Murray Valley Encephalitis Virus in Co-infected Mosquito Cells. **PLOS ONE**, [s. l.], v. 8, n. 2, p. e56534, 2013.

HOCH, Alfred L. *et al.* An Outbreak of Mayaro Virus Disease in Belterra, Brazil. [s. l.], 1981. Disponível em: <https://www.ajtmh.org/view/journals/tpmd/30/3/article-p689.xml>. Acesso em: 16 abr. 2025.

HOFFMANN, Jules A. The immune response of *Drosophila*. **Nature**, [s. l.], v. 426, n. 6962, p. 33–38, 2003.

HOLBROOK, Michael R. Historical Perspectives on Flavivirus Research. **Viruses**, [s. l.], v. 9, n. 5, p. 97, 2017.

HOLMES, Edward C. The Evolution of Endogenous Viral Elements. **Cell Host & Microbe**, [s. l.], v. 10, n. 4, p. 368–377, 2011.

HOLMES, Quynh. Vectorial Capacity: Its Components, Limitations and Challenges. **Vector Biology Journal**, [s. l.], v. 2023, 2023. Disponível em: https://www.scitechnol.com/peer-review/vectorial-capacity-its-components-limitations-and-challenges-oLV4.php?article_id=22976. Acesso em: 1 maio 2025.

HORNG, Tiffany; MEDZHITOV, Ruslan. *Drosophila* MyD88 is an adapter in the Toll signaling pathway. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 98, n. 22, p. 12654–12658, 2001.

HUANG, Xiaoqiu; MADAN, Anup. CAP3: A DNA Sequence Assembly Program. **Genome Research**, [s. l.], v. 9, n. 9, p. 868–877, 1999.

HUSSAIN, M.; ETEBARI, K.; ASGARI, S. Functions of Small RNAs in Mosquitoes. In: **ADVANCES IN INSECT PHYSIOLOGY**. [S. l.]: Elsevier, 2016. v. 51, p. 189–222. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065280616300042>. Acesso em: 19 abr. 2025.

IWASAKI, Yuka W.; SIOMI, Mikiko C.; SIOMI, Haruhiko. PIWI-interacting RNA: Its biogenesis and functions. **Annual Review of Biochemistry**, [s. l.], v. 84, p. 405–433, 2015.

JONES, Christopher Iain; ZABOLOTSKAYA, Maria Vasilyevna; NEWBURY, Sarah Faith. The 5' → 3' exoribonuclease XRN1/Pacman and its functions in cellular processes and development. **WIREs RNA**, [s. l.], v. 3, n. 4, p. 455–468, 2012.

JOOSTEN, Joep *et al.* Endogenous piRNA-guided slicing triggers responder and trailer piRNA production from viral RNA in *Aedes aegypti* mosquitoes. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 49, n. 15, p. 8886–8899, 2021a.

JOOSTEN, Joep *et al.* PIWI proteomics identifies Atari and Pasilla as piRNA biogenesis factors in *Aedes* mosquitoes. **Cell Reports**, [s. l.], v. 35, n. 5, 2021b. Disponível em: [https://www.cell.com/cell-reports/abstract/S2211-1247\(21\)00404-6](https://www.cell.com/cell-reports/abstract/S2211-1247(21)00404-6). Acesso em: 20 abr. 2025.

JOSE, Joyce; SNYDER, Jonathan E; KUHN, Richard J. A structural and functional perspective of alphavirus replication and assembly. **Future Microbiology**, [s. l.], v. 4, n. 7, p. 837–856, 2009.

JOSHUA-TOR, L. The Argonautes. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, [s. l.], v. 71, p. 67–72, 2006.

JUNJHON, Jiraphan *et al.* Ultrastructural Characterization and Three-Dimensional Architecture of Replication Sites in Dengue Virus-Infected Mosquito Cells. **Journal of Virology**, [s. l.], v. 88, n. 9, p. 4687–4697, 2014.

JUPATANAKUL, Natapong *et al.* Engineered *Aedes aegypti* JAK/STAT Pathway-Mediated Immunity to Dengue Virus. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. e0005187, 2017.

JUSTMAN, J; KLIMJACK, M R; KIELIAN, M. Role of spike protein conformational changes in fusion of Semliki Forest virus. **Journal of Virology**, [s. l.], v. 67, n. 12, p. 7597–7607, 1993.

KÄÄRIÄINEN, Leevi; AHOLA, Tero. Functions of alphavirus nonstructural proteins in RNA replication. **Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology**, [s. l.], v. 71, p. 187–222, 2002.

KANTOR, Asher M. *et al.* Identification of a dengue 2 virus envelope protein receptor in *Aedes aegypti* critical for viral midgut infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 121, n. 48, p. e2417750121, 2024.

KEAN, Joy *et al.* Fighting Arbovirus Transmission: Natural and Engineered Control of Vector Competence in *Aedes* Mosquitoes. **Insects**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 236–278, 2015.

KENNERDELL, Jason R.; CARTHEW, Richard W. Use of dsRNA-Mediated Genetic Interference to Demonstrate that frizzled and frizzled 2 Act in the Wingless Pathway. **Cell**, [s. l.], v. 95, n. 7, p. 1017–1026, 1998.

KHOO, Cynthia CH *et al.* The RNA interference pathway affects midgut infection- and escape barriers for Sindbis virus in *Aedes aegypti*. **BMC Microbiology**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 130, 2010.

KIELIAN, Margaret. Class II virus membrane fusion proteins. **Virology**, [s. l.], v. 344, n. 1, Virology 50th Anniversary Issue, p. 38–47, 2006.

KIM, Myungjin *et al.* Caspar, a suppressor of antibacterial immunity in *Drosophila*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 103, n. 44, p. 16358–16363, 2006.

KIM, Arthur S.; DIAMOND, Michael S. A molecular understanding of alphavirus entry and antibody protection. **Nature Reviews Microbiology**, [s. l.], v. 21, n. 6, p. 396–407, 2023.

KIM, V. Narry; HAN, Jinju; SIOMI, Mikiko C. Biogenesis of small RNAs in animals. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [s. l.], v. 10, n. 2, p. 126–139, 2009.

KISSELEVA, T *et al.* Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. **Gene**, [s. l.], v. 285, n. 1, p. 1–24, 2002.

KLEMA, Valerie J.; PADMANABHAN, Radhakrishnan; CHOI, Kyung H. Flaviviral Replication Complex: Coordination between RNA Synthesis and 5'-RNA Capping. **Viruses**, [s. l.], v. 7, n. 8, p. 4640–4656, 2015.

KOH, Cassandra *et al.* Dengue virus dominates lipid metabolism modulations in Wolbachia-coinfected *Aedes aegypti*. **Communications Biology**, [s. l.], v. 3, n. 1, p. 1–14, 2020.

KOH, Cassandra *et al.* Interactions of the Insect-Specific Palm Creek Virus with Zika and Chikungunya Viruses in *Aedes* Mosquitoes. **Microorganisms**, [s. l.], v. 9, n. 8, p. 1652, 2021.

KOO, Jinmo; PALLI, Subba Reddy. Recent advances in understanding of the mechanisms of RNA interference in insects. **Insect Molecular Biology**, [s. l.], p. 1–4, 2024.

KRAMER, Laura D.; CIOTA, Alexander T. Dissecting vectorial capacity for mosquito-borne viruses. **Current Opinion in Virology**, [s. l.], v. 15, p. 112–118, 2015.

KROL, Jacek; LOEDIGE, Inga; FILIPOWICZ, Witold. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. **Nature Reviews Genetics**, [s. l.], v. 11, p. 597–610, 2010.

KRUEGER, Felix. **Babraham Bioinformatics - Trim Galore!**. [S. l.], 2012. Disponível em: https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore/. Acesso em: 10 abr. 2025.

KUADKITKAN, Atichat *et al.* Identification and characterization of prohibitin as a receptor protein mediating DENV-2 entry into insect cells. **Virology**, [s. l.], v. 406, n. 1, p. 149–161, 2010.

KUHN, Richard J. *et al.* Structure of Dengue Virus: Implications for Flavivirus Organization, Maturation, and Fusion. **Cell**, [s. l.], v. 108, n. 5, p. 717–725, 2002.

KUMAR, Ramesh *et al.* Chikungunya virus non-structural protein nsP3 interacts with *Aedes aegypti* DEAD-box helicase RM62F. **VirusDisease**, [s. l.], v. 32, n. 4, p. 657–665, 2021.

KWAK, Pieter Bas; TOMARI, Yukihide. The N domain of Argonaute drives duplex unwinding during RISC assembly. **Nature Structural & Molecular Biology**, [s. l.], v. 19, n. 2, p. 145–151, 2012.

LANGMEAD, Ben *et al.* Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. **Genome Biology**, [s. l.], v. 10, n. 3, p. R25, 2009.

LANZREIN, M.; WEINGART, R.; KEMPF, C. PH-Dependent Pore Formation in Semliki Forest Virus-Infected *Aedes albopictus* Cells. **Virology**, [s. l.], v. 193, n. 1, p. 296–302, 1993.

LÁZARI, Carolina dos Santos *et al.* Clinical markers of post-Chikungunya chronic inflammatory joint disease: A Brazilian cohort. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. e0011037, 2023.

LEDNICKY, John *et al.* Mayaro Virus in Child with Acute Febrile Illness, Haiti, 2015. **Emerging Infectious Diseases**, [s. l.], v. 22, n. 11, p. 2000–2002, 2016.

LEE, Young-Min *et al.* Dual Mechanisms of Pestiviral Superinfection Exclusion at Entry and RNA Replication. **Journal of Virology**, [s. l.], v. 79, n. 6, p. 3231–3242, 2005.

LEE, Yoontae *et al.* MicroRNA maturation: Stepwise processing and subcellular localization. **EMBO Journal**, [s. l.], v. 21, n. 17, p. 4663–4670, 2002.

LEE, Regina Ching Hua *et al.* Mosquito Cellular Factors and Functions in Mediating the Infectious entry of Chikungunya Virus. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 7, n. 2, p. e2050, 2013.

LEE, Yoontae *et al.* The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. **Nature**, [s. l.], v. 425, p. 415–419, 2003.

LEITE, Thiago H. J. F. *et al.* Distinct Roles of Hemocytes at Different Stages of Infection by Dengue and Zika Viruses in *Aedes aegypti* Mosquitoes. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 12, 2021. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2021.660873/full>. Acesso em: 2 maio 2025.

LEMAITRE, B *et al.* A recessive mutation, immune deficiency (*imd*), defines two distinct control pathways in the *Drosophila* host defense. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 92, n. 21, p. 9465–9469, 1995.

LEMAITRE, Bruno *et al.* The Dorsoventral Regulatory Gene Cassette *spätzle/Toll/cactus* Controls the Potent Antifungal Response in *Drosophila* Adults. **Cell**, [s. l.], v. 86, n. 6, p. 973–983, 1996.

LEMM, J.A. *et al.* Polypeptide requirements for assembly of functional Sindbis virus replication complexes: a model for the temporal regulation of minus- and plus-strand RNA synthesis. **The EMBO Journal**, [s. l.], v. 13, n. 12, p. 2925–2934, 1994.

LEPARC-GOFFART, Isabelle *et al.* Chikungunya in the Americas. **The Lancet**, [s. l.], v. 383, n. 9916, p. 514, 2014.

LETSOU, A *et al.* Genetic and molecular characterization of *tube*, a *Drosophila* gene maternally required for embryonic dorsoventral polarity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 88, n. 3, p. 810–814, 1991.

LEUNG, Jason Yat-Sing; NG, Mary Mah-Lee; CHU, Justin Jang Hann. Replication of Alphaviruses: A Review on the Entry Process of Alphaviruses into Cells. **Advances in Virology**, [s. l.], v. 2011, n. 1, p. 249640, 2011.

LEWIS, Samuel H. *et al.* Pan-arthropod analysis reveals somatic piRNAs as an ancestral defence against transposable elements. **Nature ecology & evolution**, [s. l.], v. 2, n. 1, p. 174–181, 2018.

LEWIS, Zenobia; LIZÉ, Anne. Insect behaviour and the microbiome. **Current Opinion in Insect Science**, [s. l.], v. 9, Pests and resistance * Behavioural ecology, p. 86–90, 2015.

LEWIS, Samuel H.; SALMELA, Heli; OBBARD, Darren J. Duplication and Diversification of Dipteran Argonaute Genes, and the Evolutionary Divergence of Piwi and Aubergine. **Genome Biology and Evolution**, [s. l.], v. 8, n. 3, p. 507–518, 2016.

LI, Yan *et al.* Membrane topology of NS2B of dengue virus revealed by NMR spectroscopy. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, [s. l.], v. 1848, n. 10, Part A, p. 2244–2252, 2015.

LI, Yan *et al.* Secondary Structure and Membrane Topology of the Full-Length Dengue Virus NS4B in Micelles. **Angewandte Chemie International Edition**, [s. l.], v. 55, n. 39, p. 12068–12072, 2016.

LI, Long *et al.* Structural changes of envelope proteins during alphavirus fusion. **Nature**, [s. l.], v. 468, n. 7324, p. 705–708, 2010.

LI, Long *et al.* The Flavivirus Precursor Membrane-Envelope Protein Complex: Structure and Maturation. **Science**, [s. l.], v. 319, n. 5871, p. 1830–1834, 2008.

LI, Cui *et al.* Zika Virus Disrupts Neural Progenitor Development and Leads to Microcephaly in Mice. **Cell Stem Cell**, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 120–126, 2016.

LI, G; RICE, C M. The signal for translational readthrough of a UGA codon in Sindbis virus RNA involves a single cytidine residue immediately downstream of the termination codon. **Journal of Virology**, [s. l.], v. 67, n. 8, p. 5062–5067, 1993.

LIM, Ahyoung *et al.* The overlapping global distribution of dengue, chikungunya, Zika and yellow fever. **Nature Communications**, [s. l.], v. 16, n. 1, p. 3418, 2025.

LIMA, William Gustavo *et al.* Rate of exposure to Mayaro virus (MAYV) in Brazil between 1955 and 2018: a systematic review and meta-analysis. **Archives of Virology**, [s. l.], v. 166, n. 2, p. 347–361, 2021.

LINGEL, Andreas *et al.* Nucleic acid 3'-end recognition by the Argonaute2 PAZ domain. **Nature Structural & Molecular Biology**, [s. l.], v. 11, n. 6, p. 576–577, 2004.

LINGEL, Andreas *et al.* Structure and nucleic-acid binding of the Drosophila Argonaute 2 PAZ domain. **Nature**, [s. l.], v. 426, n. 6965, p. 465–469, 2003.

LIU, Qinghua *et al.* R2D2, a bridge between the initiation and effector steps of the Drosophila RNAi pathway. **Science**, [s. l.], v. 301, n. 5641, p. 1921–1925, 2003.

LIUMBRUNO, Giancarlo Maria *et al.* The Chikungunya epidemic in Italy and its repercussion on the blood system. **Blood Transfusion**, [s. l.], v. 6, n. 4, p. 199–210, 2008.

LOBIGS, M; ZHAO, H X; GAROFF, H. Function of Semliki Forest virus E3 peptide in virus assembly: replacement of E3 with an artificial signal peptide abolishes spike heterodimerization and surface expression of E1. **Journal of Virology**, [s. l.], v. 64, n. 9, p. 4346–4355, 1990.

LOKER, Eric S *et al.* Invertebrate immune systems – not homogeneous, not simple, not well understood. **Immunological Reviews**, [s. l.], v. 198, n. 1, p. 10–24, 2004.

LONG, Kanya C. *et al.* Experimental Transmission of Mayaro Virus by *Aedes aegypti*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, [s. l.], v. 85, n. 4, p. 750–757, 2011a.

LONG, Kanya C. *et al.* Experimental Transmission of Mayaro Virus by *Aedes aegypti*. [s. l.], 2011b. Disponível em: <https://www.ajtmh.org/view/journals/tpmd/85/4/article-p750.xml>. Acesso em: 9 abr. 2025.

LORENZ, Camila; CHIARAVALLOTI-NETO, Francisco. Brazil reports an increased incidence of oropouche and mayaro fever in the amazon region. **Travel Medicine and Infectious Disease**, [s. l.], v. 58, p. 102692, 2024.

LOUNIBOS, Leon Philip; KRAMER, Laura D. Invasiveness of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* and Vectorial Capacity for Chikungunya Virus. **The Journal of Infectious Diseases**, [s. l.], v. 214, n. suppl_5, p. S453–S458, 2016.

LOURDES MUÑOZ, Maria *et al.* Putative dengue virus receptors from mosquito cells. **FEMS Microbiology Letters**, [s. l.], v. 168, n. 2, p. 251–258, 1998.

LU, Thomas X.; ROTHENBERG, Marc E. MicroRNA. **The Journal of allergy and clinical immunology**, [s. l.], v. 141, n. 4, p. 1202–1207, 2018.

LUNA, C. *et al.* Characterization of three Toll-like genes from mosquito *Aedes aegypti*. **Insect Molecular Biology**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 67–74, 2003.

LUPLERTLOP, Natthanej *et al.* Induction of a Peptide with Activity against a Broad Spectrum of Pathogens in the *Aedes aegypti* Salivary Gland, following Infection with Dengue Virus. **PLOS Pathogens**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. e1001252, 2011.

LUSA, Sari; GAROFF, Henrik; LIUESTRÖM, Peter. Fate of the 6K membrane protein of semliki forest virus during virus assembly. **Virology**, [s. l.], v. 185, n. 2, p. 843–846, 1991.

MA, Jin-Biao *et al.* Structural basis for 5'-end-specific recognition of guide RNA by the *A. fulgidus* Piwi protein. **Nature**, [s. l.], v. 434, n. 7033, p. 666–670, 2005.

MACHADO, Samara Rosendo *et al.* The DEAD-box RNA helicase Dhx15 controls glycolysis and arbovirus replication in *Aedes aegypti* mosquito cells. **PLoS Pathogens**, [s. l.], v. 18, n. 11, 2022.

MACKAY, Ian M.; ARDEN, Katherine E. Mayaro virus: a forest virus primed for a trip to the city?. **Microbes and Infection**, [s. l.], v. 18, n. 12, p. 724–734, 2016.

MACKENZIE, Jason M.; JONES, Malcolm K.; YOUNG, Paul R. Immunolocalization of the Dengue Virus Nonstructural Glycoprotein NS1 Suggests a Role in Viral RNA Replication. **Virology**, [s. l.], v. 220, n. 1, p. 232–240, 1996.

MACNAMARA, F.N. Zika virus : A report on three cases of human infection during an epidemic of jaundice in Nigeria. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, [s. l.], v. 48, n. 2, p. 139–145, 1954.

MANCINI, M. V. *et al.* Estimating bacteria diversity in different organs of nine species of mosquito by next generation sequencing. **BMC Microbiology**, [s. l.], v. 18, n. 1, p. 126, 2018.

MARGARET KIELIAN; ARI HELENIUS. pH-induced alterations in the fusogenic spike protein of Semliki Forest virus. **The Journal of Cell Biology**, [s. l.], v. 101, n. 6, p. 2284–2291, 1985.

MARQUES, João Trindade *et al.* Loqs and R2D2 act sequentially in the siRNA pathway in *Drosophila*. **Nature Structural and Molecular Biology**, [s. l.], v. 17, p. 24–31, 2010.

MARTÍN, Claudia Sánchez-San; LIU, Catherine Y.; KIELIAN, Margaret. Dealing with low pH: entry and exit of alphaviruses and flaviviruses. **Trends in Microbiology**, [s. l.], v. 17, n. 11, p. 514–521, 2009.

MARTÍN, Claudia Sánchez-San; SOSA, Hernando; KIELIAN, Margaret. A Stable Prefusion Intermediate of the Alphavirus Fusion Protein Reveals Critical Features of Class II Membrane Fusion. **Cell Host & Microbe**, [s. l.], v. 4, n. 6, p. 600–608, 2008.

MARTINES, Roosecelis Brasil. Notes from the Field: Evidence of Zika Virus Infection in Brain and Placental Tissues from Two Congenitally Infected Newborns and Two Fetal Losses — Brazil, 2015. **MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report**, [s. l.], v. 65, 2016. Disponível em: <https://www.cdc.gov/mmwr/volumes/65/wr/mm6506e1.htm>. Acesso em: 22 fev. 2025.

MATHUR, Kalika *et al.* Analysis of chikungunya virus proteins reveals that non-structural proteins nsP2 and nsP3 exhibit RNA interference (RNAi) suppressor activity. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 38065, 2016.

MATTHEWS, Benjamin J. *Aedes aegypti*. **Trends in Genetics**, [s. l.], v. 35, n. 6, p. 470–471, 2019.

MATTHEWS, Benjamin J. *et al.* Improved reference genome of *Aedes aegypti* informs arbovirus vector control. **Nature**, [s. l.], v. 563, n. 7732, p. 501–507, 2018.

MCFARLANE, Melanie *et al.* Characterization of *Aedes aegypti* Innate-Immune Pathways that Limit Chikungunya Virus Replication. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 8, n. 7, p. e2994, 2014.

MEISTER, Gunter. Argonaute proteins: functional insights and emerging roles. **Nature Reviews Genetics**, [s. l.], v. 14, n. 7, p. 447–459, 2013.

MEISTER, Stephan *et al.* Immune signaling pathways regulating bacterial and malaria parasite infection of the mosquito *Anopheles gambiae*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 102, n. 32, p. 11420–11425, 2005.

MELANCON, P; GAROFF, H. Processing of the Semliki Forest virus structural polyprotein: role of the capsid protease. **Journal of Virology**, [s. l.], v. 61, n. 5, p. 1301–1309, 1987.

MERCADO-CURIEL, Ricardo F. *et al.* The four serotypes of dengue recognize the same putative receptors in *Aedes aegypti* midgut and *Ae. albopictus* cells. **BMC Microbiology**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 85, 2006.

MERKLING, Sarah Hélène *et al.* Multifaceted contributions of Dicer2 to arbovirus transmission by *Aedes aegypti*. **Cell Reports**, [s. l.], v. 42, n. 8, 2023. Disponível em: [https://www.cell.com/cell-reports/abstract/S2211-1247\(23\)00988-9](https://www.cell.com/cell-reports/abstract/S2211-1247(23)00988-9). Acesso em: 2 abr. 2025.

MICHEL, Tatiana *et al.* *Drosophila* Toll is activated by Gram-positive bacteria through a circulating peptidoglycan recognition protein. **Nature**, [s. l.], v. 414, n. 6865, p. 756–759, 2001.

MIESEN, Pascal; GIRARDI, Erika; VAN RIJ, Ronald P. Distinct sets of PIWI proteins produce arbovirus and transposon-derived piRNAs in *Aedes aegypti* mosquito cells. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 43, n. 13, p. 6545–6556, 2015.

MILLER, B. R. *et al.* Epidemic yellow fever caused by an incompetent mosquito vector. **Tropical medicine and parasitology: official organ of Deutsche Tropenmedizinische Gesellschaft and of Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit (GTZ)**, [s. l.], v. 40, n. 4, p. 396–399, 1989.

MILLER, Sven *et al.* The Non-structural Protein 4A of Dengue Virus Is an Integral Membrane Protein Inducing Membrane Alterations in a 2K-regulated Manner *. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 282, n. 12, p. 8873–8882, 2007.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Painel de Monitoramento das Arboviroses**. [S. l.], [s. d.]. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/a/aedes-aegypti/monitoramento-das-arboviroses/painel>. Acesso em: 1 abr. 2025.

MIYOSHI, Keita *et al.* Molecular mechanisms that funnel RNA precursors into endogenous small-interfering RNA and microRNA biogenesis pathways in *Drosophila*. **Rna**, [s. l.], v. 16, p. 506–515, 2010.

MLAKAR, Jernej *et al.* Zika Virus Associated with Microcephaly. **New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 374, n. 10, p. 951–958, 2016.

MODIS, Yorgo *et al.* A ligand-binding pocket in the dengue virus envelope glycoprotein. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 100, n. 12, p. 6986–6991, 2003.

MOLINA-CRUZ, Alvaro *et al.* Effect of mosquito midgut trypsin activity on dengue-2 virus infection and dissemination in *Aedes aegypti*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, [s. l.], v. 72, n. 5, p. 631–637, 2005.

MOON, Stephanie L. *et al.* Flavivirus sfRNA suppresses antiviral RNA interference in cultured cells and mosquitoes and directly interacts with the RNAi machinery. **Virology**, [s. l.], v. 485, p. 322–329, 2015.

MOONEN, Jurgen P. *et al.* Composition and global distribution of the mosquito virome - A comprehensive database of insect-specific viruses. **One Health**, [s. l.], v. 16, p. 100490, 2023.

MORAZZANI, Elaine M. *et al.* Production of Virus-Derived Ping-Pong-Dependent piRNA-like Small RNAs in the Mosquito Soma. **PLOS Pathogens**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. e1002470, 2012.

MOREIRA, Luciano A. *et al.* A Wolbachia Symbiont in *Aedes aegypti* Limits Infection with Dengue, Chikungunya, and Plasmodium. **Cell**, [s. l.], v. 139, n. 7, p. 1268–1278, 2009.

MORITA, Eiji; SUZUKI, Youichi. Membrane-Associated Flavivirus Replication Complex—Its Organization and Regulation. **Viruses**, [s. l.], v. 13, n. 6, p. 1060, 2021.

MORRISON, Thomas E. Reemergence of Chikungunya Virus. **Journal of Virology**, [s. l.], v. 88, n. 20, p. 11644–11647, 2014.

MOTA, Mânlio Tasso De Oliveira *et al.* Mayaro Virus: a Neglected Arbovirus of the Americas. **Future Virology**, [s. l.], v. 10, n. 9, p. 1109–1122, 2015.

MUKHOPADHYAY, Suchetana; KUHN, Richard J.; ROSSMANN, Michael G. A structural perspective of the flavivirus life cycle. **Nature Reviews Microbiology**, [s. l.], v. 3, n. 1, p. 13–22, 2005.

NEUFELDT, Christopher J. *et al.* Rewiring cellular networks by members of the Flaviviridae family. **Nature Reviews. Microbiology**, [s. l.], v. 16, n. 3, p. 125–142, 2018.

NICOLA, Anthony V.; CHEN, Wei; HELENIUS, Ari. Co-translational folding of an alphavirus capsid protein in the cytosol of living cells. **Nature Cell Biology**, [s. l.], v. 1, n. 6, p. 341–345, 1999.

NISHIMASU, Hiroshi *et al.* Structure and function of Zucchini endoribonuclease in piRNA biogenesis. **Nature**, [s. l.], v. 491, n. 7423, p. 284–287, 2012.

NOVELO, Mario *et al.* Dengue and chikungunya virus loads in the mosquito *Aedes aegypti* are determined by distinct genetic architectures. **PLOS Pathogens**, [s. l.], v. 19, n. 4, p. e1011307, 2023.

NUNES, Marcio Roberto Teixeira *et al.* Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil. **BMC Medicine**, [s. l.], v. 13, p. 102, 2015.

OEHLER, E. *et al.* Zika virus infection complicated by Guillain-Barré syndrome – case report, French Polynesia, December 2013. **Eurosurveillance**, [s. l.], v. 19, n. 9, p. 20720, 2014.

OKUDA, K. *et al.* Functional morphology of adult female *Culex quinquefasciatus* midgut during blood digestion. **Tissue and Cell**, [s. l.], v. 34, n. 3, p. 210–219, 2002.

OLIVIERI, Daniel *et al.* An in vivo RNAi assay identifies major genetic and cellular requirements for primary piRNA biogenesis in *Drosophila*. **EMBO Journal**, [s. l.], v. 29, n. 19, p. 3301–3317, 2010.

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

OLMO, Roenick P. *et al.* Mosquito vector competence for dengue is modulated by insect-specific viruses. **Nature Microbiology**, [s. l.], v. 8, p. 135–149, 2023.

OU, J H *et al.* Sequence studies of several alphavirus genomic RNAs in the region containing the start of the subgenomic RNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 79, n. 17, p. 5235–5239, 1982.

PAN, Xiaoling *et al.* Wolbachia induces reactive oxygen species (ROS)-dependent activation of the Toll pathway to control dengue virus in the mosquito *Aedes aegypti*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 109, n. 1, p. E23–E31, 2012.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. **Epidemic Diseases - Chikungunya in the Americas**. [S. l.], [s. d.]. Disponível em: https://ais.paho.org/phis/viz/ed_chikungunya_amro.asp. Acesso em: 15 abr. 2025.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. **Epidemiological Alert: Chikungunya increase in the Region of the Americas - PAHO/WHO | Pan American Health Organization**. [S. l.], 2023. Disponível em: <https://www.paho.org/en/documents/epidemiological-alert-chikungunya-increase-region-americas>. Acesso em: 15 abr. 2025.

PARADKAR, Prasad N. *et al.* Dicer-2-Dependent Activation of *Culex Vago* Occurs via the TRAF-Rel2 Signaling Pathway. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 8, n. 4, p. e2823, 2014.

PARADKAR, Prasad N. *et al.* Secreted Vago restricts West Nile virus infection in *Culex* mosquito cells by activating the Jak-STAT pathway. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 109, n. 46, p. 18915–18920, 2012.

PAREDES, A M *et al.* Three-dimensional structure of a membrane-containing virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 90, n. 19, p. 9095–9099, 1993.

PARK, Joseph K. *et al.* The miRNA Pathway Intrinsically Controls Self-Renewal of *Drosophila* Germline Stem Cells. **Current Biology**, [s. l.], v. 17, p. 533–538, 2007.

PEREIRA, Thiago Nunes *et al.* Vector competence of *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, and *Culex quinquefasciatus* mosquitoes for Mayaro virus. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 14, n. 4, p. e0007518, 2020.

PEREIRA, Thiago Nunes *et al.* Wolbachia significantly impacts the vector competence of *Aedes aegypti* for Mayaro virus. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 6889, 2018.

PEREZ-RESTREPO, Laura S. *et al.* Mayaro Virus as the cause of Acute Febrile Illness in the Colombian Amazon Basin. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 15, p. 1419637, 2024.

PETIT, Marine *et al.* piRNA pathway is not required for antiviral defense in *Drosophila melanogaster*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 113, n. 29, p. E4218–E4227, 2016.

PIERSON, Theodore C; KIELIAN, Margaret. Flaviviruses: braking the entering. **Current Opinion in Virology**, [s. l.], v. 3, n. 1, Virus entry / Environmental virology, p. 3–12, 2013.

PIJLMAN, Gorben P. *et al.* A Highly Structured, Nuclease-Resistant, Noncoding RNA Produced by Flaviviruses Is Required for Pathogenicity. **Cell Host & Microbe**, [s. l.], v. 4, n. 6, p. 579–591, 2008.

PIKE, Andrew *et al.* Changes in the microbiota cause genetically modified *Anopheles* to spread in a population. **Science**, [s. l.], v. 357, n. 6358, p. 1396–1399, 2017.

PILI-FLOURY, Sebastien *et al.* In Vivo RNA Interference Analysis Reveals an Unexpected Role for GGBP1 in the Defense against Gram-positive Bacterial Infection in *Drosophila* Adults *. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 279, n. 13, p. 12848–12853, 2004.

PIMENTEL, Edilene Pereira *et al.* Identification of Mayaro Virus Genotype D in Rondônia, Brazil. [s. l.], 2024. Disponível em: <https://www.ajtmh.org/view/journals/tpmd/110/3/article-p557.xml>. Acesso em: 16 abr. 2025.

PLOURDE, Anna R.; BLOCH, Evan M. A Literature Review of Zika Virus. **Emerging Infectious Diseases**, [s. l.], v. 22, n. 7, p. 1185–1192, 2016.

POWERS, Ann M. *et al.* GENETIC RELATIONSHIPS AMONG MAYARO AND UNA VIRUSES SUGGEST DISTINCT PATTERNS OF TRANSMISSION. [s. l.], 2006. Disponível em: <https://www.ajtmh.org/view/journals/tpmd/75/3/article-p461.xml>. Acesso em: 16 abr. 2025.

PREFEITURA DE BELO HORIZONTE. **Incidência de casos de dengue aumenta e BH entra em situação de epidemia**. [S. l.], 2024. Disponível em: <https://prefeitura.pbh.gov.br/noticias/incidencia-de-casos-de-dengue-aumenta-e-bh-entra-em-situacao-de-epidemia>. Acesso em: 3 abr. 2025.

PRETO, Clara *et al.* Vaccination coverage and adherence to a dengue vaccination program in the state of Paraná, Brazil. **Vaccine**, [s. l.], v. 39, n. 4, p. 711–719, 2021.

QIU, Yang *et al.* Flavivirus induces and antagonizes antiviral RNA interference in both mammals and mosquitoes. **Science Advances**, [s. l.], v. 6, n. 6, p. eaax7989, 2020.

RAMIREZ, José L. *et al.* The *Aedes aegypti* IMD pathway is a critical component of the mosquito antifungal immune response. **Developmental & Comparative Immunology**, [s. l.], v. 95, p. 1–9, 2019.

RAMIREZ, Jose L.; DIMOPOULOS, George. The Toll immune signaling pathway control conserved anti-dengue defenses across diverse *Ae. aegypti* strains and against multiple dengue virus serotypes. **Developmental & Comparative Immunology**, [s. l.], v. 34, n. 6, p. 625–629, 2010.

RAYNER, Jonathan O.; DRYGA, Sergey A.; KAMRUD, Kurt I. Alphavirus vectors and vaccination. **Reviews in Medical Virology**, [s. l.], v. 12, n. 5, p. 279–296, 2002.

REID, David W. *et al.* Dengue Virus Selectively Annexes Endoplasmic Reticulum-Associated Translation Machinery as a Strategy for Co-opting Host Cell Protein Synthesis. **Journal of Virology**, [s. l.], v. 92, n. 7, p. 10.1128/jvi.01766-17, 2018.

RENNER, Max *et al.* Flavivirus maturation leads to the formation of an occupied lipid pocket in the surface glycoproteins. **Nature Communications**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 1238, 2021.

REY, Félix A. *et al.* The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution. **Nature**, [s. l.], v. 375, n. 6529, p. 291–298, 1995.

REY, Félix A; STIASNY, Karin; HEINZ, Franz X. Flavivirus structural heterogeneity: implications for cell entry. **Current Opinion in Virology**, [s. l.], v. 24, Antiviral strategies • Virus Structure and Expression, p. 132–139, 2017.

ROCHA, Ricardo da Costa *et al.* First official record of *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* (Diptera: Culicidae) in the Acre State, Northern Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, [s. l.], v. 65, p. e20, 2023.

RODRIGUES, Manuela Viana Rennó. **Caracterização da infecção de vírus específicos de inseto em linhagem de mosquitos *Aedes aegypti* e suas aplicações biotecnológicas**. 2024. 70 f. Dissertação - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2024.

RODRIGUES FARIA, Nuno *et al.* Epidemiology of Chikungunya Virus in Bahia, Brazil, 2014–2015. **PLoS Currents**, [s. l.], v. 8, p. ecurrents.outbreaks.c97507e3e48efb946401755d468c28b2, 2016.

ROMO, Hannah *et al.* Restriction of Zika virus infection and transmission in *Aedes aegypti* mediated by an insect-specific flavivirus. **Emerging Microbes & Infections**, [s. l.], v. 7, p. 181, 2018.

ROMOLI, Ottavia; GENDRIN, Mathilde. The tripartite interactions between the mosquito, its microbiota and Plasmodium. **Parasites & Vectors**, [s. l.], v. 11, p. 200, 2018.

ROSS, R. W. The Newala epidemic: III. The virus: isolation, pathogenic properties and relationship to the epidemic. **Journal of Hygiene**, [s. l.], v. 54, n. 2, p. 177–191, 1956.

ROTH, A. *et al.* Concurrent outbreaks of dengue, chikungunya and Zika virus infections – an unprecedented epidemic wave of mosquito-borne viruses in the Pacific 2012–2014. **Eurosurveillance**, [s. l.], v. 19, n. 41, p. 20929, 2014.

ROWLEY, Andrew F.; POWELL, Adam. Invertebrate Immune Systems—Specific, Quasi-Specific, or Nonspecific?. **The Journal of Immunology**, [s. l.], v. 179, n. 11, p. 7209–7214, 2007.

RUFINO, Polinar Bandeira *et al.* MAYARO VIRUS: AN EMERGING ARBOVIROSIS IN BRAZIL?. **Multidisciplinary Sciences Reports**, [s. l.], v. 2, n. 2, p. 1–24, 2022.

RUTSCHMANN, Sophie; KILINC, Ahmet; FERRANDON, Dominique. Cutting Edge: The Toll Pathway Is Required for Resistance to Gram-Positive Bacterial Infections in *Drosophila*1. **The Journal of Immunology**, [s. l.], v. 168, n. 4, p. 1542–1546, 2002.

SAITO, Kuniaki *et al.* Roles for the Yb body components Armitage and Yb in primary piRNA biogenesis in *Drosophila*. **Genes and Development**, [s. l.], v. 24, p. 2493–2498, 2010.

SALAS-BENITO, J S; DEL ANGEL, R M. Identification of two surface proteins from C6/36 cells that bind dengue type 4 virus. **Journal of Virology**, [s. l.], v. 71, n. 10, p. 7246–7252, 1997.

SALDAÑA, Miguel A. *et al.* Zika virus alters the microRNA expression profile and elicits an RNAi response in *Aedes aegypti* mosquitoes. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 11, n. 7, p. e0005760, 2017.

SAMUEL, Gladys Hazitha *et al.* RNA interference is essential to modulating the pathogenesis of mosquito-borne viruses in the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 120, n. 11, p. e2213701120, 2023.

SANDERS, Heather R. *et al.* Sindbis virus induces transport processes and alters expression of innate immunity pathway genes in the midgut of the disease vector, *Aedes aegypti*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, [s. l.], v. 35, n. 11, p. 1293–1307, 2005.

SANTOS, Ellen Caroline Nobre *et al.* *Aedes Aegypti* (DIPTERA: CULICIDAE) INFESTATION RATES IN A WESTERN AMAZONIAN CITY: AEDES AEGYPTI (DIPTERA: CULICIDAE) TAXAS DE INFECÇÃO EM UMA CIDADE AMAZONIANA OCIDENTAL. **Revista Gestão e Conhecimento**, [s. l.], v. 16, n. 3, p. 1056–1067, 2022.

SANTOS, Ellen Caroline Nobre *et al.* Zika Vírus: Dos Aspectos Epidemiológicos Ao Tratamento. In: SAÚDE DA CRIANÇA E ADOLESCENTE: EPIDEMIOLOGIA, DOENÇAS INFECCIOSAS E PARASITÁRIAS. [S. l.: s. n.], 2019. p. 88–106.

SANZ, Miguel Angel *et al.* Interfacial Domains in Sindbis Virus 6K Protein: DETECTION AND FUNCTIONAL CHARACTERIZATION *. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 278, n. 3, p. 2051–2057, 2003.

SARIOLA, Merja; SARASTE, Jaakko; KUISMANEN, Esa. Communication of post-golgi elements with early endocytic pathway: Regulation of endoproteolytic cleavage of semliki forest virus p62 precursor. **Journal of Cell Science**, [s. l.], v. 108, n. 6, p. 2465–2475, 1995.

SASAYA, Takahide *et al.* ICTV Virus Taxonomy Profile: Phenuiviridae 2023. **Journal of General Virology**, [s. l.], v. 104, n. 9, p. 001893, 2023.

SAUCEREAU, Yoann *et al.* Structure and dynamics of Toll immunoreceptor activation in the mosquito *Aedes aegypti*. **Nature Communications**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 5110, 2022.

SCHAAR, Hilde M. van der *et al.* Dissecting the Cell Entry Pathway of Dengue Virus by Single-Particle Tracking in Living Cells. **PLOS Pathogens**, [s. l.], v. 4, n. 12, p. e1000244, 2008.

SCHINDLER, C *et al.* Proteins of transcription factor ISGF-3: one gene encodes the 91- and 84-kDa ISGF-3 proteins that are activated by interferon alpha. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 89, n. 16, p. 7836–7839, 1992.

SCHNETTLER, Esther *et al.* Noncoding Flavivirus RNA Displays RNA Interference Suppressor Activity in Insect and Mammalian Cells. **Journal of Virology**, [s. l.], v. 86, n. 24, p. 13486–13500, 2012.

SCHUFFENECKER, Isabelle *et al.* Genome Microevolution of Chikungunya Viruses Causing the Indian Ocean Outbreak. **PLOS Medicine**, [s. l.], v. 3, n. 7, p. e263, 2006.

SCHULER-FACCINI, Lavinia. Possible Association Between Zika Virus Infection and Microcephaly — Brazil, 2015. **MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report**, [s. l.], v. 65, 2016. Disponível em: <https://www.cdc.gov/mmwr/volumes/65/wr/mm6503e2.htm>. Acesso em: 22 fev. 2025.

SECRETARIA DE SAÚDE DE MINAS GERAIS. Boletim Epidemiológico de Monitoramento dos casos de Dengue, Chikungunya e Zika (20/5). - Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais. In: 20 maio 2024. Disponível em: <https://www.saude.mg.gov.br/documentos/boletim-epidemiologico-dengue-chikungunya-e-zika/boletim-epidemiologico-de-monitoramento-dos-casos-de-dengue-chikungunya-e-zika-20-5/>. Acesso em: 3 abr. 2025.

SERRA, Otacília Pereira *et al.* Mayaro virus and dengue virus 1 and 4 natural infection in culicids from Cuiabá, state of Mato Grosso, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s. l.], v. 111, p. 20–29, 2016.

SHARP, Phillip A. RNAi and double-strand RNA. **GENES & DEVELOPMENT**, [s. l.], v. 13, p. 139–141, 1999.

SHIN, Sang Woon *et al.* Characterization of three alternatively spliced isoforms of the Rel/NF- κ B transcription factor Relish from the mosquito *Aedes aegypti*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 99, n. 15, p. 9978–9983, 2002.

SHIN, Sang Woon *et al.* REL1, a Homologue of *Drosophila* Dorsal, Regulates Toll Antifungal Immune Pathway in the Female Mosquito *Aedes aegypti**. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 280, n. 16, p. 16499–16507, 2005.

SHIN, Sang Woon *et al.* Relish-mediated immune deficiency in the transgenic mosquito *Aedes aegypti*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 100, n. 5, p. 2616–2621, 2003.

SHIN, Gyehwa *et al.* Structural and functional insights into alphavirus polyprotein processing and pathogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 109, n. 41, p. 16534–16539, 2012.

SHIN, Sang Woon; BIAN, Guowu; RAIKHEL, Alexander S. A Toll Receptor and a Cytokine, Toll5A and Spz1C, Are Involved in Toll Antifungal Immune Signaling in the Mosquito *Aedes aegypti**. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 281, n. 51, p. 39388–39395, 2006.

SHIRAKO, Yukio; STRAUSS, James H. Cleavage between nsP1 and nsP2 initiates the processing pathway of Sindbis virus nonstructural polyprotein P123. **Virology**, [s. l.], v. 177, n. 1, p. 54–64, 1990.

SHIRAKO, Y; STRAUSS, J H. Regulation of Sindbis virus RNA replication: uncleaved P123 and nsP4 function in minus-strand RNA synthesis, whereas cleaved products from P123 are required for efficient plus-strand RNA synthesis. **Journal of Virology**, [s. l.], v. 68, n. 3, p. 1874–1885, 1994.

SHIVAPRASAD, Shwetha *et al.* Loquacious modulates flaviviral RNA replication in mosquito cells. **PLOS Pathogens**, [s. l.], v. 18, n. 4, p. e1010163, 2022.

SHUAI, Ke; LIU, Bin. Regulation of JAK–STAT signalling in the immune system. **Nature Reviews Immunology**, [s. l.], v. 3, n. 11, p. 900–911, 2003.

SILVA, Laurie A.; DERMODY, Terence S. Chikungunya virus: epidemiology, replication, disease mechanisms, and prospective intervention strategies. **The Journal of Clinical Investigation**, [s. l.], v. 127, n. 3, p. 737–749, 2017.

SILVERMAN, Neal *et al.* A *Drosophila* I κ B kinase complex required for Relish cleavage and antibacterial immunity. **Genes & Development**, [s. l.], v. 14, n. 19, p. 2461–2471, 2000.

SIM, Shuzhen *et al.* Transcriptomic Profiling of Diverse *Aedes aegypti* Strains Reveals Increased Basal-level Immune Activation in Dengue Virus-refractory Populations and Identifies Novel Virus-vector Molecular Interactions. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 7, n. 7, p. e2295, 2013.

SIM, Shuzhen; DIMOPOULOS, George. Dengue virus inhibits immune responses in *Aedes aegypti* cells. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 5, n. 5, p. e10678, 2010.

SIM, Shuzhen; JUPATANAKUL, Natapong; DIMOPOULOS, George. Mosquito Immunity against Arboviruses. **Viruses**, [s. l.], v. 6, n. 11, p. 4479–4504, 2014.

SIMMONDS, Peter *et al.* ICTV Virus Taxonomy Profile: Flaviviridae. **Journal of General Virology**, [s. l.], v. 98, n. 1, p. 2–3, 2017.

SIROHI, Devika; KUHN, Richard J. Zika Virus Structure, Maturation, and Receptors. **The Journal of Infectious Diseases**, [s. l.], v. 216, n. Suppl 10, p. S935–S944, 2017.

SLUSS, H. K. *et al.* A JNK signal transduction pathway that mediates morphogenesis and an immune response in *Drosophila*. **Genes & Development**, [s. l.], v. 10, n. 21, p. 2745–2758, 1996.

SMIT, Jolanda M. *et al.* Flavivirus Cell Entry and Membrane Fusion. **Viruses**, [s. l.], v. 3, n. 2, p. 160–171, 2011.

SÖDERLUND, Hans. Kinetics of Formation of the Semliki Forest Virus Nucleocapsid. **Intervirology**, [s. l.], v. 1, n. 5–6, p. 354–361, 1973.

SOLIGNAT, Maxime *et al.* Replication cycle of chikungunya: A re-emerging arbovirus. **Virology**, [s. l.], v. 393, n. 2, p. 183–197, 2009.

SONG, Ji-Joon *et al.* Crystal Structure of Argonaute and Its Implications for RISC Slicer Activity. **Science**, [s. l.], v. 305, n. 5689, p. 1434–1437, 2004.

SOUZA, Wayner Vieira de *et al.* Microcephaly epidemic related to the Zika virus and living conditions in Recife, Northeast Brazil. **BMC Public Health**, [s. l.], v. 18, n. 1, p. 130, 2018.

SOUZA, William M. de *et al.* Pathophysiology of chikungunya virus infection associated with fatal outcomes. **Cell Host & Microbe**, [s. l.], v. 32, n. 4, p. 606–622.e8, 2024.

SOUZA-NETO, Jayme A.; POWELL, Jeffrey R.; BONIZZONI, Mariangela. *Aedes aegypti* vector competence studies: A review. **Infection, Genetics and Evolution**, [s. l.], v. 67, p. 191–209, 2019.

SOUZA-NETO, Jayme A.; SIM, Shuzhen; DIMOPOULOS, George. An evolutionary conserved function of the JAK-STAT pathway in anti-dengue defense. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 106, n. 42, p. 17841–17846, 2009.

SPYR, Christian A.; KÄSERMANN, Fabian; KEMPF, Christoph. Identification of the pore forming element of Semliki Forest virus spikes. **FEBS Letters**, [s. l.], v. 375, n. 1, p. 134–136, 1995.

STARR, Robyn *et al.* A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. **Nature**, [s. l.], v. 387, n. 6636, p. 917–921, 1997.

STILLING, R. M.; DINAN, T. G.; CRYAN, J. F. Microbial genes, brain & behaviour – epigenetic regulation of the gut–brain axis. **Genes, Brain and Behavior**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 69–86, 2014.

STÖVEN, Svenja *et al.* Caspase-mediated processing of the Drosophila NF-κB factor Relish. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 100, n. 10, p. 5991–5996, 2003.

STRAND, Michael R. Composition and functional roles of the gut microbiota in mosquitoes. **Current Opinion in Insect Science**, [s. l.], v. 28, Vectors and medical and veterinary entomology * Social insects, p. 59–65, 2018.

STRAUSS, J H; STRAUSS, E G. The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution. **Microbiological Reviews**, [s. l.], v. 58, n. 3, p. 491–562, 1994.

SUCUPIRA, Pedro H. F. *et al.* The RNAi Pathway Is Important to Control Mayaro Virus Infection in *Aedes aegypti* but not for Wolbachia-Mediated Protection. **Viruses**, [s. l.], v. 12, n. 8, p. 871, 2020.

SUMITHA, Melveetil Kishor *et al.* In silico identification, characterization, and expression analysis of RNA recognition motif (RRM) containing RNA-binding proteins in *Aedes aegypti*. **Parasitology Research**, [s. l.], v. 122, n. 12, p. 2847–2857, 2023.

SUN, Siyang *et al.* Structural analyses at pseudo atomic resolution of Chikungunya virus and antibodies show mechanisms of neutralization. **eLife**, [s. l.], v. 2, p. e00435, 2013.

SUOMALAINEN, M; LILJESTRÖM, P; GAROFF, H. Spike protein-nucleocapsid interactions drive the budding of alphaviruses. **Journal of Virology**, [s. l.], v. 66, n. 8, p. 4737–4747, 1992.

SUZUKI, Yasutsugu *et al.* Non-retroviral Endogenous Viral Element Limits Cognate Virus Replication in *Aedes aegypti* Ovaries. **Current Biology**, [s. l.], v. 30, n. 18, p. 3495–3506.e6, 2020.

SWARTS, Daan C. *et al.* The evolutionary journey of Argonaute proteins. **Nature Structural & Molecular Biology**, [s. l.], v. 21, n. 9, p. 743–753, 2014.

TABACHNICK, W. J. *et al.* Oral Infection of *Aedes Aegypti* with Yellow Fever Virus: Geographic Variation and Genetic Considerations. [s. l.], 1985. Disponível em: <https://www.ajtmh.org/view/journals/tpmd/34/6/article-p1219.xml>. Acesso em: 26 abr. 2025.

TABARA, Hiroaki *et al.* The rde-1 gene, RNA interference, and transposon silencing in *C. elegans*. **Cell**, [s. l.], v. 99, n. 2, p. 123–132, 1999.

TAKATSU, Yoshihiro *et al.* TAK1 Participates in c-Jun N-Terminal Kinase Signaling during *Drosophila* Development. **Molecular and Cellular Biology**, [s. l.], v. 20, n. 9, p. 3015–3026, 2000.

TALYULI, Octavio A. C. *et al.* The *Aedes aegypti* peritrophic matrix controls arbovirus vector competence through HPx1, a heme-induced peroxidase. **PLOS Pathogens**, [s. l.], v. 19, n. 2, p. e1011149, 2023.

TAN, Ter Yong *et al.* Capsid protein structure in Zika virus reveals the flavivirus assembly process. **Nature Communications**, [s. l.], v. 11, p. 895, 2020.

TAN, Bocejar Bia *et al.* Molecular architecture of the Chikungunya virus replication complex. **Science Advances**, [s. l.], v. 8, n. 48, p. eadd2536, 2022.

TANG, Hengli *et al.* Zika Virus Infects Human Cortical Neural Progenitors and Attenuates Their Growth. **Cell Stem Cell**, [s. l.], v. 18, n. 5, p. 587–590, 2016.

TANTS, Jan Niklas *et al.* Molecular basis for asymmetry sensing of siRNAs by the *Drosophila* Loqs-PD/Dcr-2 complex in RNA interference. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 45, n. 21, p. 12536–12550, 2017.

TERRADAS, Gerard *et al.* Family level variation in Wolbachia-mediated dengue virus blocking in *Aedes aegypti*. **Parasites & Vectors**, [s. l.], v. 10, p. 622, 2017.

TERZIAN, Ana Carolina B. *et al.* Isolation and Characterization of Mayaro Virus from a Human in Acre, Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, [s. l.], v. 92, n. 2, p. 401–404, 2015.

THE NOBEL PRIZE. **The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2006**. [S. l.], 2006. Disponível em: <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2006/summary/>. Acesso em: 19 abr. 2025.

THOMPSON, Ryan; Martin Del Campo ,Jorge; AND CONSTENLA, Dagna. A review of the economic evidence of Aedes-borne arboviruses and Aedes-borne arboviral disease prevention and control strategies. **Expert Review of Vaccines**, [s. l.], v. 19, n. 2, p. 143–162, 2020.

TOGNARELLI, J. *et al.* A report on the outbreak of Zika virus on Easter Island, South Pacific, 2014. **Archives of Virology**, [s. l.], v. 161, n. 3, p. 665–668, 2016.

TOMARI, Yukihide; DU, Tingting; ZAMORE, Phillip D. Sorting of *Drosophila* Small Silencing RNAs. **Cell**, [s. l.], v. 130, n. 2, p. 299–308, 2007.

TORIBIO, René *et al.* Translation initiation of alphavirus mRNA reveals new insights into the topology of the 48S initiation complex. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 46, n. 8, p. 4176–4187, 2018.

TRICOU, Vianney *et al.* Long-term efficacy and safety of a tetravalent dengue vaccine (TAK-003): 4·5-year results from a phase 3, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. **The Lancet Global Health**, [s. l.], v. 12, n. 2, p. e257–e270, 2024.

TSETSARKIN, Konstantin A; CHEN, Rubing; WEAVER, Scott C. Interspecies transmission and chikungunya virus emergence. **Current Opinion in Virology**, [s. l.], v. 16, Emerging viruses• Viral immunology, p. 143–150, 2016.

ULMANEN, I; SÖDERLUND, H; KÄÄRIÄINEN, L. Semliki Forest virus capsid protein associates with the 60S ribosomal subunit in infected cells. **Journal of Virology**, [s. l.], v. 20, n. 1, p. 203–210, 1976.

UMAREDDY, Indira *et al.* Dengue virus NS4B interacts with NS3 and dissociates it from single-stranded RNA. **Journal of General Virology**, [s. l.], v. 87, n. 9, p. 2605–2614, 2006.

UNTERGASSER, Andreas *et al.* Primer3-new capabilities and interfaces. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 40, n. 15, p. 1–12, 2012.

VALERO-MORA, Pedro M. ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. **Journal of Statistical Software**, [s. l.], v. 35, p. 1–3, 2010.

VALLE, Denise *et al.* Resistance to temephos and deltamethrin in *Aedes aegypti* from Brazil between 1985 and 2017. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s. l.], v. 114, p. e180544, 2019.

VAN DEN ELSEN, Kaïn; QUEK, Jun Ping; LUO, Dahai. Molecular Insights into the Flavivirus Replication Complex. **Viruses**, [s. l.], v. 13, n. 6, p. 956, 2021.

VAN DUIJL-RICHTER, Mareike K. S. *et al.* Early Events in Chikungunya Virus Infection—From Virus CellBinding to Membrane Fusion. **Viruses**, [s. l.], v. 7, n. 7, p. 3647–3674, 2015.

VAN LEUR, Sophie Wilhelmina *et al.* Pathogenesis and virulence of flavivirus infections. **Virulence**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 2814–2838, 2021.

VARIZA, Paula Fassicolo *et al.* Updated spatio-temporal distribution of *Aedes (Stegomyia) albopictus* in Brazil. **Acta Tropica**, [s. l.], v. 232, p. 106511, 2022.

VARJAK, Margus *et al.* aBravo is a novel aedes aegypti antiviral protein that interacts with, but acts independently of, the exogenous siRNA pathway effector dicer 2. **Viruses**, [s. l.], v. 12, n. 7, 2020.

VARJAK, Margus *et al.* Aedes aegypti Piwi4 Is a Noncanonical PIWI Protein Involved in Antiviral Responses. **mSphere**, [s. l.], v. 2, n. 3, p. 10.1128/msphere.00144-17, 2017.

VARJAK, Margus; LEGGEWIE, Mayke; SCHNETTLER, Esther. The antiviral piRNA response in mosquitoes?. **Journal of General Virology**, [s. l.], v. 99, n. 12, p. 1551–1562, 2018.

VEGA-ALMEIDA, Tania Olivia *et al.* Surface proteins of C6/36 cells involved in dengue virus 4 binding and entry. **Archives of Virology**, [s. l.], v. 158, n. 6, p. 1189–1207, 2013.

VEGA-RÚA, Anubis *et al.* High Level of Vector Competence of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from Ten American Countries as a Crucial Factor in the Spread of Chikungunya Virus. **Journal of Virology**, [s. l.], v. 88, n. 11, p. 6294–6306, 2014.

VIEIRA, Carla Julia da Silva Pessoa *et al.* Detection of Mayaro virus infections during a dengue outbreak in Mato Grosso, Brazil. **Acta Tropica**, [s. l.], v. 147, p. 12–16, 2015.

VIRALZONE. Alphavirus. *In*: [s. d.]. Disponível em: <https://viralzone.expasy.org/625>. Acesso em: 16 mar. 2025 a.

VIRALZONE. Flaviviridae. *In*: [s. d.]. Disponível em: <https://viralzone.expasy.org/43>. Acesso em: 23 fev. 2025 b.

VODOVAR, Nicolas *et al.* Arbovirus-Derived piRNAs Exhibit a Ping-Pong Signature in Mosquito Cells. **PLOS ONE**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. e30861, 2012.

VOGEL, Karla E. Backcross Breeding. *In*: SCOTT, M. Paul (org.). **Transgenic Maize**. Totowa, NJ: Humana Press, 2009. (Methods in Molecular Biology). v. 526, p. 161–169. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/978-1-59745-494-0_14. Acesso em: 3 abr. 2025.

VOSS, James E. *et al.* Glycoprotein organization of Chikungunya virus particles revealed by X-ray crystallography. **Nature**, [s. l.], v. 468, n. 7324, p. 709–712, 2010.

WAHID, Braira *et al.* Global expansion of chikungunya virus: mapping the 64-year history. **International Journal of Infectious Diseases**, [s. l.], v. 58, p. 69–76, 2017a.

WAHID, Braira *et al.* Global expansion of chikungunya virus: mapping the 64-year history. **International Journal of Infectious Diseases**, [s. l.], v. 58, p. 69–76, 2017b.

WAHLBERG, J M *et al.* Membrane fusion of Semliki Forest virus involves homotrimers of the fusion protein. **Journal of Virology**, [s. l.], v. 66, n. 12, p. 7309–7318, 1992.

WAHLBERG, J M; BOERE, W A; GAROFF, H. The heterodimeric association between the membrane proteins of Semliki Forest virus changes its sensitivity to low pH during virus maturation. **Journal of Virology**, [s. l.], v. 63, n. 12, p. 4991–4997, 1989.

WAHLBERG, J M; GAROFF, H. Membrane fusion process of Semliki Forest virus. I: Low pH-induced rearrangement in spike protein quaternary structure precedes virus penetration into cells. **Journal of Cell Biology**, [s. l.], v. 116, n. 2, p. 339–348, 1992.

WANG, Xiao-Hong *et al.* RNA Interference Directs Innate Immunity Against Viruses in Adult *Drosophila*. **Science**, [s. l.], v. 312, n. 5772, p. 452–454, 2006.

WANG, Yan-Hong *et al.* The immune strategies of mosquito *Aedes aegypti* against microbial infection. **Developmental & Comparative Immunology**, [s. l.], v. 83, Insect innate immunity in China, p. 12–21, 2018a.

WANG, Yan-Hong *et al.* The immune strategies of mosquito *Aedes aegypti* against microbial infection. **Developmental & Comparative Immunology**, [s. l.], v. 83, Insect innate immunity in China, p. 12–21, 2018b.

WEBER, Alexander N. R. *et al.* Binding of the *Drosophila* cytokine Spätzle to Toll is direct and establishes signaling. **Nature Immunology**, [s. l.], v. 4, n. 8, p. 794–800, 2003.

WEISS, B *et al.* Evidence for specificity in the encapsidation of Sindbis virus RNAs. **Journal of Virology**, [s. l.], v. 63, n. 12, p. 5310–5318, 1989.

WEISS, Barbara; GEIGENMÜLLER-GNIRKE, Ute; SCHLESINGER, Sondra. Interactions between Sindbis virus RNAs and a 68 amino acid derivative of the viral capsid protein further defines the capsid binding site. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 22, n. 5, p. 780–786, 1994.

WELCH, W J; SEFTON, B M. Characterization of a small, nonstructural viral polypeptide present late during infection of BHK cells by Semliki Forest virus. **Journal of Virology**, [s. l.], v. 33, n. 1, p. 230–237, 1980.

WELCH, W J; SEFTON, B M. Two small virus-specific polypeptides are produced during infection with Sindbis virus. **Journal of Virology**, [s. l.], v. 29, n. 3, p. 1186–1195, 1979.

WELSCH, Sonja *et al.* Composition and Three-Dimensional Architecture of the Dengue Virus Replication and Assembly Sites. **Cell Host & Microbe**, [s. l.], v. 5, n. 4, p. 365–375, 2009.

WHITE, Christine L.; THOMSON, Michael; DIMMOCK, Nigel J. Deletion Analysis of a Defective Interfering Semliki Forest Virus RNA Genome Defines a Region in the nsP2 Sequence That Is Required for Efficient Packaging of the Genome into Virus Particles. **Journal of Virology**, [s. l.], v. 72, n. 5, p. 4320–4326, 1998.

WHITFIELD, Zachary J. *et al.* The Diversity, Structure, and Function of Heritable Adaptive Immunity Sequences in the Aedes aegypti Genome. **Current Biology**, [s. l.], v. 27, n. 22, p. 3511-3519.e7, 2017.

WILKINSON, Leland. **The Grammar of Graphics**. New York: Springer-Verlag, 2005. (Statistics and Computing). Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/0-387-28695-0>. Acesso em: 10 abr. 2025.

WILLIAMS, David T.; MACKENZIE, John S.; BINGHAM, John. Flaviviruses. In: ZIMMERMAN, Jeffrey J. *et al.* (org.). **Diseases of Swine**. 1. ed. [S. l.]: Wiley, 2019. p. 530–543. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9781119350927.ch33>. Acesso em: 6 jan. 2025.

WILSON, Ross C.; DOUDNA, Jennifer A. Molecular mechanisms of RNA interference. **Annual Review of Biophysics**, [s. l.], v. 42, n. 1, p. 217–239, 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Vector-borne diseases**. [S. l.], 2024. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/vector-borne-diseases>. Acesso em: 30 abr. 2025.

WU, Pa *et al.* A Gut Commensal Bacterium Promotes Mosquito Permissiveness to Arboviruses. **Cell Host & Microbe**, [s. l.], v. 25, n. 1, p. 101-112.e5, 2019.

WU, Jin'en *et al.* Argonaute proteins: Structural features, functions and emerging roles. **Journal of Advanced Research**, [s. l.], v. 24, p. 317–324, 2020.

WU, Qingfa *et al.* Virus discovery by deep sequencing and assembly of virus-derived small silencing RNAs. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 107, n. 4, p. 1606–1611, 2010.

XAVIER, Joilson *et al.* Chikungunya virus ECSA lineage reintroduction in the northeasternmost region of Brazil. **International Journal of Infectious Diseases**, [s. l.], v. 105, p. 120–123, 2021.

XAVIER, Joilson *et al.* Increased interregional virus exchange and nucleotide diversity outline the expansion of chikungunya virus in Brazil. **Nature Communications**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 4413, 2023.

XI, Zhiyong; RAMIREZ, Jose L.; DIMOPOULOS, George. The Aedes aegypti Toll Pathway Controls Dengue Virus Infection. **PLOS Pathogens**, [s. l.], v. 4, n. 7, p. e1000098, 2008a.

XI, Zhiyong; RAMIREZ, Jose L.; DIMOPOULOS, George. The Aedes aegypti Toll Pathway Controls Dengue Virus Infection. **PLOS Pathogens**, [s. l.], v. 4, n. 7, p. e1000098, 2008b.

XIE, Xuping *et al.* Membrane Topology and Function of Dengue Virus NS2A Protein. **Journal of Virology**, [s. l.], v. 87, n. 8, p. 4609–4622, 2013.

YAO, J S; STRAUSS, E G; STRAUSS, J H. Interactions between PE2, E1, and 6K required for assembly of alphaviruses studied with chimeric viruses. **Journal of Virology**, [s. l.], v. 70, n. 11, p. 7910–7920, 1996.

YATES, Luke A.; NORBURY, Chris J.; GILBERT, Robert J.C. The long and short of microRNA. **Cell**, [s. l.], v. 153, n. 3, p. 516–519, 2013.

YEN, Pei-Shi *et al.* Assessing the Potential Interactions between Cellular miRNA and Arboviral Genomic RNA in the Yellow Fever Mosquito, Aedes aegypti. **Viruses**, [s. l.], v. 11, n. 6, p. 540, 2019.

YU, I.-M. *et al.* Association of the pr Peptides with Dengue Virus at Acidic pH Blocks Membrane Fusion. **Journal of Virology**, [s. l.], v. 83, n. 23, p. 12101–12107, 2009.

YU, I-Mei *et al.* Structure of the Immature Dengue Virus at Low pH Primes Proteolytic Maturation. **Science**, [s. l.], v. 319, n. 5871, p. 1834–1837, 2008.

YUAN, Ling *et al.* A single mutation in the prM protein of Zika virus contributes to fetal microcephaly. **Science**, [s. l.], v. 358, n. 6365, p. 933–936, 2017.

ZAIDMAN-RÉMY, Anna *et al.* The Drosophila Amidase PGRP-LB Modulates the Immune Response to Bacterial Infection. **Immunity**, [s. l.], v. 24, n. 4, p. 463–473, 2006.

ZANLUCA, Camila *et al.* First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s. l.], v. 110, n. 4, p. 569–572, 2015.

ZERBINO, Daniel R. Using the Velvet de novo assembler for short-read sequencing technologies. **Current protocols in bioinformatics / editorial board, Andreas D. Baxevanis ... [et al.]**, [s. l.], v. CHAPTER, p. Unit-11.5, 2010.

ZERBINO, Daniel R.; BIRNEY, Ewan. Velvet: Algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. **Genome Research**, [s. l.], v. 18, n. 5, p. 821–829, 2008.

ZHANG, Liming *et al.* A naturally isolated symbiotic bacterium suppresses flavivirus transmission by Aedes mosquitoes. **Science**, [s. l.], v. 384, n. 6693, p. eadn9524, 2024.

ZHANG, Ying *et al.* Conformational Changes of the Flavivirus E Glycoprotein. **Structure**, [s. l.], v. 12, n. 9, p. 1607–1618, 2004.

ZHANG, Qi *et al.* DIP1 plays an antiviral role against DCV infection in *Drosophila melanogaster*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [s. l.], v. 460, n. 2, p. 222–226, 2015.

ZHANG, Xinyong *et al.* Furin Processing and Proteolytic Activation of Semliki Forest Virus. **Journal of Virology**, [s. l.], v. 77, n. 5, p. 2981–2989, 2003.

ZHANG, Wei *et al.* Placement of the Structural Proteins in Sindbis Virus. **Journal of Virology**, [s. l.], v. 76, n. 22, p. 11645–11658, 2002.

ZHAO, Yongqian *et al.* Molecular basis for specific viral RNA recognition and 2'-O-ribose methylation by the dengue virus nonstructural protein 5 (NS5). **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 112, n. 48, p. 14834–14839, 2015.

ZHAO, Liming *et al.* Transcription Profiling for Defensins of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) During Development and in Response to Infection With Chikungunya and Zika Viruses. **Journal of Medical Entomology**, [s. l.], v. 55, n. 1, p. 78–89, 2018.

ZHOU, Rui *et al.* Processing of *Drosophila* endo-siRNAs depends on a specific Loquacious isoform. **Rna**, [s. l.], v. 15, p. 1886–1895, 2009.

ZHU, Kun Yan; PALLI, Subba Reddy. Mechanisms, Applications, and Challenges of Insect RNA Interference. **Annual Review of Entomology**, [s. l.], v. 65, n. Volume 65, 2020, p. 293–311, 2020.

ZOU, Jing *et al.* Mapping the Interactions between the NS4B and NS3 Proteins of Dengue Virus. **Journal of Virology**, [s. l.], v. 89, n. 7, p. 3471–3483, 2015.

ZUCHI, Nayara *et al.* Molecular detection of Mayaro virus during a dengue outbreak in the state of Mato Grosso, Central-West Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s. l.], v. 109, p. 820–823, 2014.

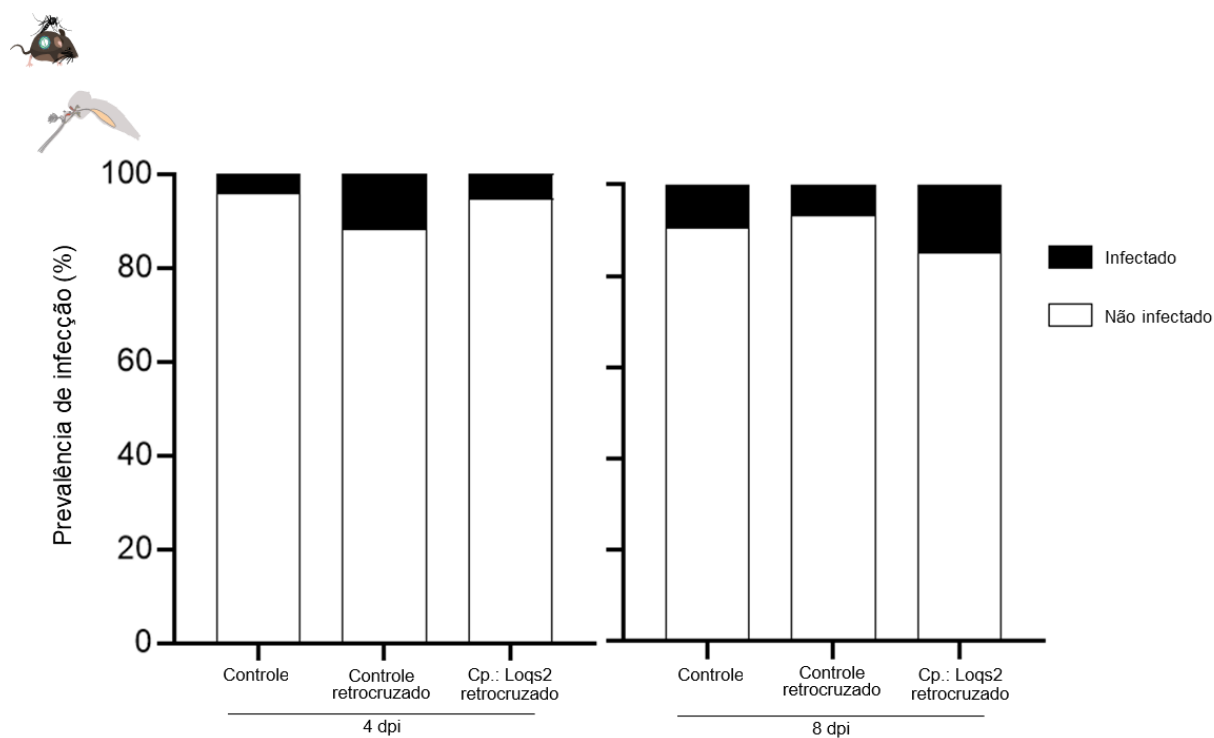
ANEXO A

Tabela S1. Melhores correspondências (hits) obtidas para cada contig com base na comparação das sequências de nucleotídeos contra bancos de dados genômicos, utilizando o algoritmo BLASTn+.

Tabela S2. Melhores correspondências (hits) obtidas para cada contig com base na comparação das sequências traduzidas (a nível de aminoácidos) contra bancos de dados de proteínas, utilizando o algoritmo DIAMOND.

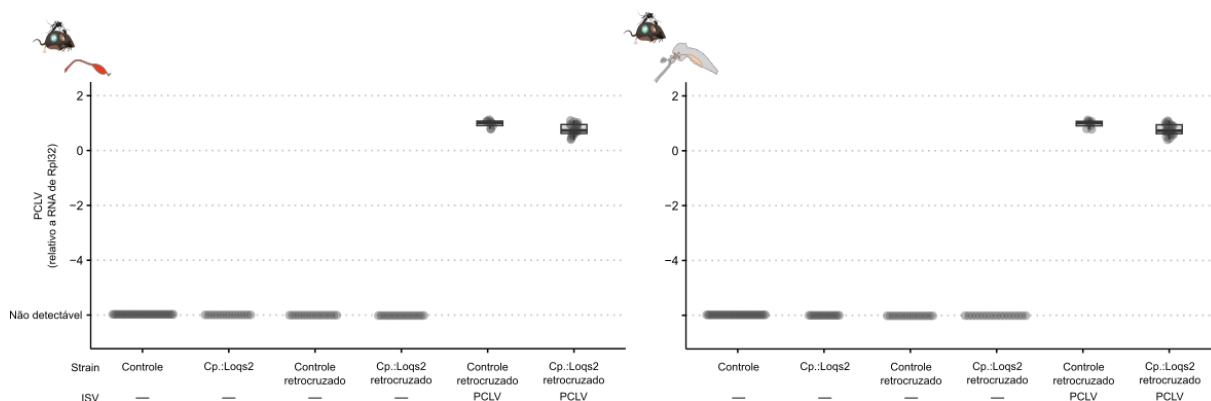
As tabelas completas estão disponíveis online e podem ser acessadas por meio do seguinte link: <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.c.7800341.v1>

ANEXO B



Anexo B. Prevalência de infecção por HTV na carcaça dos grupos experimentais aos 4 e 8 dpi. Os dados apresentados neste anexo foram obtidos antes da separação dos grupos com base no perfil de ISVs, no contexto da investigação da atividade antiviral de Loqs2 em populações de campo.

ANEXO C



Anexo C. Carga viral de PCLV em linhagens de *Ae. aegypti* durante a infecção por ZIKV. Análise por RT-qPCR da carga de PCLV no intestino (A) e carcaça (B) de mosquitos de diferentes perfis genéticos e virais: (i) controle negativo - mosquitos selvagens que não expressa Loqs2 no intestino com fundo genético de Bangkok; (ii) CP.:Loqs2 (controle positivo) - linhagem com fundo genético de Bangkok e expressão de Loqs2 no intestino; (iii) controle retrocruzado - não expressa Loqs2 no intestino e não possui PCLV; (iv) CP.:Loqs2 retrocruzado - expressa Loqs2 no intestino e não possui PCLV; (v) controle retrocruzado - não expressa Loqs2 no intestino e possui PCLV; (vi) CP.:Loqs2 retrocruzado - expressa Loqs2 no intestino e possui PCLV. Para as análises estatísticas, foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis. Os valores de ΔC_t foram submetidos à mediana para a construção dos gráficos. NS: não significativo (p -valor > 0,05).